

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

ANGELISA TOSCAN

**ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODO
QUIMIOMÉTRICO PARA A PESQUISA DE ANTIMICROBIANOS EM
LEITE DA MICRORREGIÃO DE PATO BRANCO – PR**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2016

ANGELISA TOSCAN

**ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODO
QUIMIOMÉTRICO PARA A PESQUISA DE ANTIMICROBIANOS EM
LEITE DA MICRORREGIÃO DE PATO BRANCO – PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Área do conhecimento: Química de Alimentos.

Orientador: Professor Dr. Márcio Barreto Rodrigues

PATO BRANCO

2016



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 37

Título da Dissertação

**"ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODO QUIMIOMÉTRICO PARA A
PESQUISA DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE DA MICRORREGIÃO DE PATO
BRANCO - PR"**

Autora

ANGELISA TOSCAN

Esta dissertação foi apresentada às 13 horas e 30 minutos do dia 29 de fevereiro de 2016, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Alimentos – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Márcio Barreto Rodrigues
UTFPR/PB
Presidente

Profa. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto
UTFPR/FB
Examinadora

Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima
UTFPR/PB
Examinador

Visto da Coordenação

Prof. Dra. Raquel Dalla Costa da Rocha
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde e pela força mental, física e psicológica concedida para realização deste trabalho.

Aos meus familiares, meu pai Gelavir e minha mãe Salete Toscan, pelo amor e confiança, pela dedicação e carinho incondicionais e, sobretudo, o apoio em todas as escolhas da minha vida.

Aos meus irmãos Gustavo e Ângelo, pela vivacidade, energia positiva e o incentivo, sempre presentes. Um agradecimento especial ao Doutor Gustavo Toscan pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, servindo de inspiração em momentos de dificuldade, além do apoio como pseudo orientador.

Ao orientador Dr Márcio Barreto Rodrigues, pelos ensinamentos compartilhados, pelas cobranças sinceras, pelo exemplo de profissionalismo e serenidade na condução dos trabalhos.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela convivência e ensinamentos compartilhados durante esta jornada.

A toda equipe do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pelos momentos que compartilhamos, pelos erros e acertos no decorrer da caminhada, pelo apoio e dedicação no período de trabalho em todas as etapas deste estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

Ao apoio e solicitude de todos os profissionais da Central de Análises, do LAQUA e dos laboratórios de Química da UTFPR/Pato Branco, que compartilharam tempo, paciência e dificuldades durante os ensaios experimentais.

Às agências financiadoras CAPES e CNPq, pelo apoio.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

***“Comece por fazer o que é necessário,
depois faça o que é possível e
em breve estará fazendo o que é impossível.”
(São Francisco de Assis)***

RESUMO

TOSCAN, Angelisa. **Espectroscopia no Infravermelho e Método Quimiométrico para a pesquisa de antimicrobianos em leite da microrregião de Pato Branco – PR.** 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

Tendo em vista a importância social e econômica que o leite possui, o objetivo do trabalho foi avaliar a incidência e quantificar resíduos de antimicrobianos neste alimento. As amostras foram coletadas em laticínios do sudoeste do estado do Paraná e desta maneira puderam-se abranger todos os dez municípios pertencentes à microrregião de Pato Branco. Os trabalhos se concentraram no desenvolvimento de modelos apropriados para a identificação e quantificação dos analitos: tetraciclina, sulfametazina, sulfadimetoxina, cloranfenicol e ampicilina, todos antimicrobianos com interesse sanitário. Para a fase de calibração e validação dos modelos foi utilizada a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de *Fourier* associada a método quimiométrico fundamentado em regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS - *Partial Least Squares*). Para o preparo de uma solução estoque de trabalho, foram utilizados os cinco analitos de interesse em doses crescentes, a saber, tetraciclina 0 a 0,60 ppm, sulfametazina 0 a 0,12 ppm, sulfadimetoxina 0 a 2,40 ppm, cloranfenicol 0 a 1,20 ppm e ampicilina 0 a 1,80 ppm, para a realização das análises de multirresíduos. O desempenho dos modelos construídos foi avaliado através das figuras de mérito: erros quadráticos médios de calibração e de validação cruzada, coeficientes de determinação e relação de desempenho de desvio. Para efeitos de aplicabilidade no âmbito deste trabalho, considerou-se que os modelos gerados para Tetraciclina, Sulfadimetoxina e Cloranfenicol foram considerados viáveis, com maior poder de predição e eficiência, logo foram empregados para a avaliação da qualidade do leite cru da microrregião de Pato Branco. Dentre as amostras analisadas por NIR, 70 % estavam em conformidade com a legislação sanitária, sendo que 5 % destas amostras apresentaram concentrações abaixo do Limite Máximo de Resíduos permitido, sendo igualmente satisfatória. No entanto 30 % do conjunto amostral apresentou resultado insatisfatório quando avaliada a contaminação com resíduos de antimicrobianos, sendo esta não conformidade relacionada à presença de antimicrobiano de uso proibido ou com concentrações acima dos limites permitidos. Com o desenvolvimento deste trabalho pode-se dizer que a análises laboratoriais na área de alimentos, utilizando a espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada apresenta bons resultados, com rapidez nas análises, custos reduzidos e com mínima geração de resíduos laboratoriais. Sendo assim, o método alternativo proposto vai ao encontro dos anseios de qualidade e eficiência almejados pelos setores industriais e pela sociedade de um modo geral.

Palavras-chave: leite; antimicrobianos; espectroscopia no infravermelho; calibração multivariada; Mínimos Quadrados Parciais PLS; quimiometria.

ABSTRACT

TOSCAN, Angelisa. **Spectroscopy Infrared and chemometric method for antimicrobial research on milk of the region of Pato Branco – PR.** 2016. 106f. Dissertation (Masters in Technology Chemical and Biochemical Process) - Federal Technological University of Parana, Pato Branco, 2016.

Considering the social and economic importance that the milk has, the objective of this study was to evaluate the incidence and quantifying antimicrobial residues in the food. The samples were collected in dairy industry of southwestern Paraná state and thus they were able to cover all ten municipalities in the region of Pato Branco. The work focused on the development of appropriate models for the identification and quantification of analytes: tetracycline, sulfamethazine, sulfadimethoxine, chloramphenicol and ampicillin, all antimicrobials with health interest. For the calibration procedure and validation of the models was used the Infrared Spectroscopy Fourier Transform associated with chemometric method based on Partial Least Squares regression (PLS - Partial Least Squares). To prepare a work solution antimicrobials, the five analytes of interest were used in increasing doses, namely tetracycline from 0 to 0.60 ppm, sulfamethazine 0 to 0.12 ppm, sulfadimethoxine 0 to 2.40 ppm chloramphenicol 0 1.20 ppm and ampicillin 0 to 1.80 ppm to perform the work with the interest in multiresidues analysis. The performance of the models constructed was evaluated through the figures of merit: mean square error of calibration and cross-validation, correlation coefficients and offset performance ratio. For the purposes of applicability in this work, it is considered that the models generated for Tetracycline, Sulfadimethoxine and Chloramphenicol were considered viable, with the greatest predictive power and efficiency, then were employed to evaluate the quality of raw milk from the region of Pato Branco . Among the analyzed samples by NIR, 70% were in conformity with sanitary legislation, and 5% of these samples had concentrations below the Maximum Residue permitted, and is also satisfactory. However 30% of the sample set showed unsatisfactory results when evaluating the contamination with antimicrobials residues, which is non conformity related to the presence of antimicrobial unauthorized use or concentrations above the permitted limits. With the development of this work can be said that laboratory tests in the food area, using infrared spectroscopy with multivariate calibration was also good, fast in analysis, reduced costs and with minimum generation of laboratory waste. Thus, the alternative method proposed meets the quality concerns and desired efficiency by industrial sectors and society in general.

Keywords: milk; antimicrobials; infrared spectroscopy; multivariate calibration; Partial Least Squares PLS; chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Tetraciclina.....	26
Figura 2 – Estrutura química das Sulfonamidas.....	27
Figura 3 – Estrutura química do Cloranfenicol	28
Figura 4 – Estrutura química da Ampicilina.....	30
Figura 5 – Diagrama das etapas da Calibração Multivariada	50
Figura 6 – Seleção do número adequado de VL para a construção de modelos	56
Figura 7 – Fluxograma de elaboração e aplicação dos modelos construídos	62
Figura 8 – Composição da solução estoque de trabalho	64
Figura 9 – Preparo das amostras de leite dopadas com a solução estoque de trabalho	65
Figura 10 – Espectros no infravermelho médio para caracterização da amostra de leite cru.....	72
Figura 11 – Determinação do número de VL para Tetraciclina	74
Figura 12 – Valor experimental X Valor previsto para TTC-TS e TTC-CV	76
Figura 13 – Histograma de resíduos para os modelos TTC-TS e TTC-CV	76
Figura 14 - Determinação do número de VL para Sulfametazina.....	77
Figura 15 – Valor experimental X Valor previsto para SFM-TS e SFM-CV	78
Figura 16 – Histograma de resíduos para os modelos SFM-TS e SFM-CV	79
Figura 17 - Determinação do número de VL para Sulfadimetoxina.....	80
Figura 18 – Valor experimental X Valor previsto para SFD-TS e SFD-CV	82
Figura 19 - Histograma de resíduos para os modelos SFD-TS e SFD-CV	82
Figura 20 – Determinação do número de VL para Cloranfenicol.....	83
Figura 21 – Valor experimental X Valor previsto para CRF-TS e CRF-CV	85
Figura 22 – Histograma de resíduos para os modelos CRF-TS e CRF-CV	85
Figura 23 – Determinação do número de VL para Ampicilina	86
Figura 24 – Valor experimental X Valor previsto para AMP-TS e AMP-CV.....	88
Figura 25 - Histograma de resíduos para os modelos AMP-TS e AMP-CV	88
Figura 26 – Perfil das amostras regionais de leite cru após aplicação dos modelos construídos.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do leite em diferentes raças bovinas.....	18
Tabela 2 – Produção leiteira dos municípios da microrregião de Pato Branco	20
Tabela 3 – Produção leiteira dos municípios com maior produção do estado do Paraná.....	20
Tabela 4 – Limite Máximo de Resíduo permitido para antimicrobianos, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de acordo com as referências internacionais	34
Tabela 5 – Principais kits de identificação de antimicrobianos no leite	36
Tabela 6 – Regiões espectrais no infravermelho e amostras utilizadas.....	45
Tabela 7 – Grupos funcionais e suas regiões no espectro eletromagnético de maior absorção.....	47
Tabela 8 – Concentrações crescentes de solução estoque de trabalho, acrescentadas a 25 mL de leite cru, proporcionando contaminações gradativas dos antimicrobianos SFD, AMP, CRF, TTC, SFM em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de leite	65
Tabela 9 – Resultados laboratoriais das amostras compostas de leite cru fornecidos pelos laboratórios de controle de qualidade dos laticínios	70
Tabela 10 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para TTC.....	75
Tabela 11 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para SFM.....	78
Tabela 12 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para SFD	81
Tabela 13 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para CRF	84
Tabela 14 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para AMP.....	87
Tabela 15 – Resultados das análises das amostras regionais, empregando os modelos de calibração multivariada TTC-CV, SFD-CV e CRF-CV	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Reagentes e equipamentos utilizados nos trabalhos experimentais, em suas respectivas etapas.....	61
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRF	Cloranfenicol
CV	Cross Validation
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FIR	Espectroscopia no Infravermelho Distante
FT-NIR	Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
IPARDES	Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social
LANAGRO	Laboratórios Nacionais Agropecuários
LAQUA	Laboratório de Qualidade Agroindustrial
LDM	Limite de Detecção do Método
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIR	Espectroscopia no Infravermelho Médio
MSE	Média dos Erros de Predição
NIR	Espectroscopia no Infravermelho Próximo
PA	Para Análise
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários
PCA	Análise por Componentes Principais
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
Ppb	parte por bilhão
Ppm	parte por milhão
Qsp	quantidade suficiente para
PRESS	Soma dos Quadrados dos Resíduos dos Erros de Predição
R	Coeficiente de Correlação
R ²	Coeficiente de Determinação
RMSEC	Erros Quadráticos Médios de Calibração
RMSECV	Erros Quadráticos Médios de Validação Cruzada
RMSEE	Erros Quadráticos Médios
RMSEP	Erros Quadráticos Médios de Predição
RNA	Ácido Ribonucléico
RPD	Relação de Desempenho de Desvio
SFD	Sulfadimetoxina
SFM	Sulfametazina
TECPAR	Instituto de Tecnologia do Paraná
TS	Test Set
TTC	Tetraciclina
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 LEITE	17
3.2 PRODUÇÃO DE LEITE	18
3.3 QUALIDADE DA PRODUÇÃO LEITEIRA	21
3.4 LEGISLAÇÃO	22
3.5 MEDICAMENTOS DE USO EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO DE ALIMENTOS ..	24
3.5.1 Classes de Antimicrobianos	25
3.5.1.1 Tetraciclinas	25
3.5.1.2 Sulfonamidas	26
3.5.1.3 Anfenicóis	28
3.5.1.4 Beta-lactâmicos	29
3.6 RESÍDUOS DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS	30
3.7 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR)	33
3.8 DETECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE	35
3.8.1 Métodos de Triagem	35
3.8.2 Métodos Confirmatórios	37
3.8.3 Análises Oficiais	38
3.8.4 Métodos Alternativos de Análises em Alimentos	39
3.9 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	44
3.10 MÉTODOS DE ANÁLISE MULTIVARIADA	49
3.10.1 Quimiometria e Calibração Multivariada	49
3.10.2 Métodos de Calibração Multivariada	54
3.10.2.1 Regressão de mínimos quadrados parciais	54
3.10.2.2 Escolha do número de variáveis latentes	55
3.10.2.3 Detecção de amostras anômalas	57
4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	59
4.1 MATERIAIS E MÉTODO	59

4.1.1 Amostras	59
4.1.2 Aparatos	60
4.1.3 Reagentes e Equipamentos	61
4.2 PROCEDIMENTO	62
4.3 SOLUÇÃO ESTOQUE DE TRABALHO	63
4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO.....	64
4.5 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA...	67
4.6 APLICAÇÃO DOS MODELOS CONSTRUÍDOS.....	68
4.7 GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 AMOSTRAGEM	70
5.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO APLICADA À ANÁLISE DE LEITE	72
5.3 MODELOS CONSTRUÍDOS PARA OS ANTIMICROBIANOS DE INTERESSE	74
5.3.1 Tetraciclina	74
5.3.2 Sulfametazina.....	77
5.3.3 Sulfadimetoxina	79
5.3.4 Cloranfenicol	83
5.3.5 Ampicilina	86
5.4 ANÁLISE DO LEITE CRU DA MICRORREGIÃO DE PATO BRANCO.....	89
5.4.1 Aplicação dos Modelos de Calibração	89
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
REFERÊNCIAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de leite no Brasil e no mundo vem sendo alvo de constantes debates, isso porque esta atividade é vista com grandes perspectivas de crescimento econômico. Mesmo com os avanços nos últimos anos, o Brasil ainda necessita transpor barreiras para elevar a produção e tornar-se um grande exportador de leite. Nos anos 70, o país detinha uma produção de 7,3 bilhões de litros de leite e em 2014, apresentou produção de 35 bilhões de litros. Com este desempenho, a expectativa é de que o país assuma, em breve, a terceira posição em produção mundial de leite (MEGALEITE, 2014).

A pecuária leiteira no Brasil é uma das atividades mais tradicionais no meio rural, onde uma em cada quatro propriedades rurais estão voltadas à produção de leite, empregando aproximadamente cinco milhões de pessoas. O valor bruto desta produção, em 2013, foi de R\$ 22,9 bilhões, o que movimenta principalmente a economia das pequenas e médias cidades (IPARDES, 2013).

No Paraná, a produção leiteira vem ganhando adensamento e representatividade no âmbito nacional nos últimos anos, tanto na aquisição (produção) quanto no processamento industrial do leite (IPARDES, 2011). O estado produz 11,7 % do total nacional, firmando-se como a terceira unidade da federação em produção leiteira, atrás apenas de Minas Gerais, responsável por 27,6 %, e Rio Grande do Sul, por 13,7 % (IBGE, 2012). O bom desempenho apresentado pela produção paranaense está relacionado com o crescimento do rebanho e os elevados níveis de produtividade (IPARDES, 2009).

Com aproximadamente 30 mil unidades produtoras e um rebanho estimado de 322 mil vacas lactantes, o sudoeste do Paraná assumiu a posição de região com maior bacia leiteira do estado, responsável por 25,2 % da produção estadual (TROMBETTA, 2015).

Da mesma forma, vem crescendo significativamente o consumo de leite e derivados lácteos entre os brasileiros. No entanto este consumo ainda é considerado baixo, quando comparado ao consumo recomendando pelo Ministério da Saúde e pela Organização Mundial da Saúde que preconizam 210 litros de leite por indivíduo por ano. No Brasil, o consumo atual é de, aproximadamente, 170 litros/habitante/ano (IPARDES, 2009).

As exigências deste mercado consumidor têm levado a cadeia de produção leiteira a priorizar pelo aperfeiçoamento industrial para aumentar a produtividade, levando em consideração a redução de custos de produção e primando por qualidade (ARAÚJO, 2010). Esta condição se faz necessária, pois o consumidor tem buscado adquirir alimentos isentos de perigos, especialmente em relação aos contaminantes químicos e microbiológicos. Em ação conjunta, os produtores, os profissionais de assistência técnica e as indústrias lácteas buscam soluções para minimizar estes riscos, uma vez que a qualidade do alimento só é garantida quando preservada em toda sua cadeia produtiva.

Em situações específicas, como tratamentos farmacológicos de animais produtores de alimento, este pode veicular resíduos de medicamentos. Esta contaminação do leite por resíduos químicos tem ocorrência mundial e os resíduos de antimicrobianos são detectados constantemente (NERO et al., 2007). A presença destes contaminantes é resultado da utilização indiscriminada de medicamentos na prática veterinária com descumprimento de seus períodos de carência (NETTO et al., 2005), da precária higienização de equipamentos e utensílios nos postos de processamento ou da adição intencional de agentes antimicrobianos para mascarar a má qualidade higiênica do produto (BORGES et al., 2000). O leite contendo resíduos químicos é considerado adulterado e impróprio para o consumo, pois representa potencial nocivo ao consumidor (MENDES et al., 2008), além de agravos tecnológicos para a indústria de derivados lácteos e riscos comerciais (ARAÚJO, 2010).

A avaliação da contaminação química em alimentos, neste caso o leite, é realizada através de métodos para rápida detecção de resíduos de antimicrobianos nos laboratórios de controle de qualidade dos laticínios. Os resultados rápidos e seguros garantem a qualidade da matéria-prima na rotina da indústria. (IDEXX, 2014). Esta avaliação é qualitativa, ou seja, sem a quantificação do analito avaliado, sendo considerada uma análise de triagem.

Quando se objetiva uma análise quantitativa devem ser empregados métodos que tenham uma boa seletividade e sensibilidade para a identificação dos compostos a serem mensurados. Para esta análise confirmatória, vêm sendo utilizadas as análises cromatográficas: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para compostos com polaridade elevada e baixa volatilidade e Cromatografia Gasosa para compostos voláteis/semivoláteis, não polares e/ou

lipofílicos. O conhecimento das propriedades físico-químicas do analito de interesse torna-se fundamental para escolher a técnica a ser utilizada e evitar problemas na quantificação. Para a pesquisa de antimicrobianos em leite, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a massas é a técnica de referência empregada, pois alia a vantagem de análise de traços de contaminantes, com grande reprodutibilidade e sensibilidade, e, ainda, a possibilidade de análise multirresíduos (DA SILVA, COLLINS, 2011). No entanto, o elevado custo desta análise impede que esta seja aplicada em atividades de rotina nos laboratórios de controle de qualidade das indústrias de alimentos.

Para diminuir esta interface entre as vantagens e desvantagens das análises quantitativas para resíduos de antimicrobianos em leite será apresentado neste trabalho Espectroscopia no Infravermelho associada à Quimiometria como alternativa a esta problemática. Esta análise química associada aos métodos quimiométricos apresenta custos reduzidos quando comparados aos da cromatografia. Por se tratar de uma técnica rápida e não destrutiva, tem-se ainda a vantagem sobre o preparo das amostras que é simples ou em muitos casos desnecessário. A utilização de pequena quantidade de material nas análises também é uma das vantagens (ALMEIDA, 2012). O uso da Espectroscopia no Infravermelho vai ao encontro dos princípios da química verde, onde a tendência é a redução do tempo e dos custos das análises, eficiência para obtenção dos resultados e baixo consumo de reagentes, conseqüentemente, baixa geração de resíduos laboratoriais (FERREIRA, 2013).

Desta forma o emprego da técnica alternativa e inovadora, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de *Fourier* e os métodos quimiométricos (PLS), em amostras de leite produzido microrregião de Pato Branco proporcionou um perfil de qualidade do leite avaliado quando pesquisados os resíduos químicos de interesse: tetraciclina, sulfametazina, sulfadimetoxina, cloranfenicol e ampicilina, tendo em vista a problemática em saúde pública e em processos tecnológicos no processamento do leite.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta pesquisa é a proposição de modelos quimiométricos fundamentados em espectroscopia no infravermelho para determinação dos resíduos dos antimicrobianos cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina, sulfadimetoxina e sulfametazina em amostras de leite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Preparar padrões analíticos compostos pelos antimicrobianos tetraciclina, sulfametazina, sulfadimetoxina, cloranfenicol e ampicilina em leite cru isento de resíduos de antimicrobianos;

Analisar e obter dados espectrométricos via espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de *Fourier* para construção e validação de modelos quimiométricos fundamentados em regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*);

Aplicar os modelos obtidos a fim de averiguar a incidência de resíduos de compostos antimicrobianos em amostras regionais de leite cru.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LEITE

No aspecto fisiológico, o leite é o produto de glândulas mamárias de fêmeas mamíferas cujo objetivo é a alimentação e a proteção imunológica de seu recém-nascido. Já do ponto de vista físico-químico ele é uma mistura homogênea de uma variedade de substâncias: lipídeos, proteínas, carboidratos, sais minerais e vitaminas (ORDÓÑEZ, 2006).

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda. (BRASIL, 2011).

Com teores próximos a 87% de água, componente quantitativamente mais importante, o leite possui em média 3,9 % de lipídeos, 3,2 % de proteínas, 4,6 % de carboidratos e 0,9 % de vitaminas e minerais, os quais estão dissolvidos, dispersos ou emulsionados formando uma matriz complexa. Com esta riqueza de nutrientes, temperatura elevada (37 °C no momento da ordenha) e com pH em torno de 6,8 o leite é um alimento perecível e com favoráveis condições para o desenvolvimento de micro-organismos (OHI, 2010).

O lipídeo, componente com maior variação entre as raças, é inversamente proporcional ao volume de leite produzido (ORDÓÑEZ, 2006). Outros fatores que influenciam a composição do leite entre os animais, além da raça da espécie mamífera, são o estágio da lactação e o momento durante a ordenha (início e fim da ordenha) (GONZÁLEZ, DÜRR, FONTANELI, 2001). A Tabela 1 ilustra a variação dos componentes do leite entre algumas espécies bovinas, onde podem ser observadas as diferenças na composição do leite em relação à espécie/raça leiteira.

Tabela 1 – Composição química do leite em diferentes raças bovinas

Espécie/Raça	Lipídeo(%)	Proteína (%)	Carboidrato (%)	Cinza (%)
Vaca Jersey	5,5	3,9	4,9	0,7
Vaca Guernsey	5,0	3,8	4,9	0,7
Vaca Zebu	4,9	3,9	5,1	0,8
Vaca Ayrshire	4,1	3,6	4,7	0,7
Vaca Pardo Suíço	4,0	3,6	5,0	0,7
Vaca Holstein	3,5	3,1	4,9	0,7

Fonte: Adaptado de GONZÁLEZ, DÜRR, FONTANELI 2001.

3.2 PRODUÇÃO DE LEITE

O crescimento do mercado interno e a possibilidade de consolidação no mercado exportador de produtos lácteos representaram um acréscimo na produção nacional de leite de 4,3 % ao ano, entre 1999 e 2009. Com este incremento, o país passou de 19.070 para 29.105 bilhões de litros de leite ao ano (IPARDES, 2011). Com a boa qualidade apresentada pela produção nacional, em 2014 o país atingiu um volume de produção de leite de 35 bilhões de litros com este desempenho estima-se que o Brasil torne-se o terceiro maior produtor de leite do mundo (MEGALEITE, 2014).

No contexto nacional, o estado do Paraná tem apresentado significativo crescimento na produção de leite e entre os anos de 1997 e 2006 observou-se aumento de 71 % (IPARDES, 2009). Dados referentes ao primeiro trimestre de 2014, referentes à produção leiteira nacional, apontam o estado do Paraná como terceiro maior produtor de leite com 11,7 % do total nacional, atrás apenas de Minas Gerais (27,6 %) e do Rio Grande do Sul (13,7 %) que ocupam a primeira e segunda posição, respectivamente (IBGE, 2012).

Segundo o Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES), no estado do Paraná as regiões que têm destaque na produção de leite são: Sudoeste, Oeste e Centro-Oriental, abrangendo 95 municípios que contemplam 48,5 % dos produtores e sendo responsáveis por 53% da produção de leite do estado (IPARDES, 2009).

No Paraná, a regularidade na produção é um fator bastante importante, pois não ocorrem oscilações mesmo em períodos de inverno e verão. Isto é possível em virtude do desempenho dos grandes produtores, os quais minimizam as variações sazonais com auxílio de investimentos tecnológicos, o mesmo não é evidenciando nas pequenas propriedades, onde a produtividade sofre interferência dos fatores climáticos no decorrer o ano (IPARDES, 2009). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010), a produtividade nacional é de 1.340 litros/vaca/ano enquanto o Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais apresentam, respectivamente, rendimentos de 2.319, 2.430 e 1.540 litros/vaca/ano, consideravelmente acima da média nacional.

De acordo com o Perfil Pecuário Municipal, a região sudoeste do Paraná é responsável por 24 % da produção total de leite do estado (IBGE, 2010), e dados mais recentes do IBGE e do Departamento de Economia Rural já apontam a região sudoeste como a maior bacia leiteira do estado, com a representatividade estadual de 25,2 %, contabilizando 1,095 bilhão de litros de leite produzidos no ano de 2013 (TROMBETTA, 2015). O desempenho positivo é resultado da modernização da atividade leiteira na região através da implantação de tecnologias, do melhoramento de pastagens e do uso de inseminações artificiais, adequações estas exigidas pelo mercado, pelas indústrias e pelas cooperativas para uma maior produtividade e qualidade na produção (SCHMITZ, SANTOS, 2013; TOSCAN, RODRIGUES, 2015).

O estado do Paraná é composto por 39 microrregiões, dentre elas está a microrregião de Pato Branco que é composta por: Bom Sucesso do Sul, Chopinzinho, Coronel Vivida, Itapejara d'Oeste, Mariópolis, Pato Branco, São João, Saudade do Iguaçu, Sulina e Vitorino. Segundo o Anuário Estatístico do Estado do Paraná 2013, estes dez municípios contribuíram com 8,52 % da produção total de leite do estado em 2012 (IPARDES, 2013).

Para uma melhor visualização do desempenho de produção leiteira da microrregião de Pato Branco, a Tabela 2, apresenta a produção leiteira (em mil litros de leite) por município, evidenciando apenas àqueles pertencentes à microrregião de Pato Branco, com os dados referentes à produção de 2012. O município de Chopinzinho apresentou a maior produtividade da microrregião com 78.880 mil litros, representando 23,3 % do total produzido. Enquanto o município de Bom Sucesso do Sul contribuiu com 2,7 % do total produzido no período (IPARDES, 2013).

Tabela 2 – Produção leiteira dos municípios da microrregião de Pato Branco

Município	Leite (mil litros)
Chopinzinho	78.880
Coronel Vivida	51.698
Pato Branco	44.413
São João	36.847
Sulina	27.838
Vitorino	24.823
Itapejara d'Oeste	23.588
Mariópolis	21.845
Saudade do Iguaçu	19.238
Bom Sucesso do Sul	9.138

Fonte: IPARDES 2013.

A Tabela 3 traz os municípios com maior produção no estado do Paraná e seus respectivos volumes de produção, dispostos em ordem decrescente de volume de leite produzido no ano de 2012 (IPARDES, 2013).

Tabela 3 – Produção leiteira dos municípios com maior produção do estado do Paraná

Classificação	Município	Produção (mil litros)
1	Castro	226.800
2	Carambeí	129.600
3	Marechal Cândido Rondon	93.398
4	Toledo	83.295
5	Cascavel	80.779
6	Chopinzinho	78.880
7	Palmeira	65.000
8	Pitanga	58.747
9	Arapoti	57.005
10	Coronel Vivida	51.698
11	Francisco Beltrão	46.000
12	Pato Branco	44.413
13	Matelândia	41.720
14	Catanduvas	41.610
15	São João	36.847

Fonte: IPARDES 2013.

No cenário estadual, apresentado pela Tabela 3, quatro municípios da microrregião de Pato Branco apresentaram destaque com relação à produtividade de leite no ano de 2012, são eles Chopinzinho, Coronel Vivida, Pato Branco e São João por apresentarem, respectivamente, produtividade de 78.800, 51.698, 44.413 e 36.847 mil litros de leite em 2012, estando entre os 15 maiores produtores do estado, em volume de leite produzido (IPARDES, 2013).

3.3 QUALIDADE DA PRODUÇÃO LEITEIRA

Juntamente com o considerável crescimento produtivo, eleva-se também o consumo de medicamentos veterinários para a criação intensiva de animais produtores de alimentos, neste caso especial o leite. Quer com ação terapêutica ou profilática, ou ainda como promotores de crescimento, os medicamentos veterinários estão cada vez mais presentes nesta rotina. Medicamentos veterinários podem ser definidos, no âmbito deste trabalho, como substâncias, ou associação de substâncias, utilizadas para prevenir ou tratar doenças em animais. Estas substâncias podem ainda ser usadas para diagnóstico ou para corrigir ou modificar funções fisiológicas (OHI, 2010).

Quando se abordam medicamentos veterinários e suas patologias, remete-se à mastite como o agravo fisiológico que mais afeta os animais produtores de leite e gera os maiores prejuízos à pecuária leiteira. No quesito sanitário, a mastite é responsável por 38% da morbidade e no âmbito econômico ela está relacionada a perdas de 25%. Atualmente, três de cada dez vacas leiteiras desenvolvem mastite clínica, inflamação clinicamente aparente, nas glândulas mamárias no decorrer de um ano. O desenvolvimento da doença nos animais acometidos pode variar de acordo com as condições nutricionais, higiênicas, genéticas e ambientais da vaca (hospedeiro) para combater a invasão agressiva do micro-organismo e as características do agente infeccioso, ou seja, sua virulência intrínseca (SMITH, 2006).

A terapia medicamentosa é coadjuvante nas defesas do animal no combate ao patógeno invasor. O tratamento farmacológico ideal para a mastite é aquele que controla o processo infeccioso nas glândulas mamárias e não deixa

resíduos no leite produzido. Em se tratando de custo/benefício o tempo de tratamento da mastite clínica com antimicrobianos intramamários e/ou sistêmicos não deveria ser superior a cinco dias, isso porque no intervalo de três a cinco dias ocorrem os maiores índices de cura desta patologia. A isto se deve acrescentar o benefício de um menor período de descarte de leite (SPINOSA, GÓRNIK, BERNARDI, 2006).

Os animais de produção que recebem tratamento medicamentoso (antimicrobiano) devem receber cuidados especiais, com o objetivo de impedir a presença de resíduos químicos no alimento. Por isso deve-se respeitar o período de carência o qual representa o tempo necessário para que o contaminante de preocupação toxicológica atinja concentrações seguras no organismo em tratamento. Este intervalo é o tempo entre a última administração da dose medicamentosa até o momento permitido para o uso do leite em animais que foram submetidos a tratamentos farmacológicos (SPINOSA, GÓRNIK, BERNARDI, 2006; BRASIL, 1952).

3.4 LEGISLAÇÃO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é o órgão responsável pelas normas legais no âmbito agropecuário no Brasil. Aprovada desde 2011, a Instrução Normativa (IN) nº 62, exclusiva para o leite de vaca comercializado em território nacional, estabelece o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Nesta normativa são estabelecidos os parâmetros para o controle de qualidade do leite, como matéria-prima, na etapa inicial de beneficiamento do leite, ao ser recebido nos laticínios. Nesta mesma legislação faz-se menção aos métodos empregados na pesquisa de antibióticos no leite, onde estes devem apresentar sensibilidade para os Limites Máximos de Resíduos e serem aprovados pelo MAPA.

A IN n ° 26, de 09 de julho de 2009, do MAPA, aprova o Regulamento Técnico para Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário.

Art. 1º Este Regulamento Técnico visa estabelecer as normas complementares para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego dos produtos antimicrobianos de uso veterinário, produzidos no país ou importados, utilizados em espécies animais terrestres e aquáticas, incluindo os antissépticos, a fim de garantir um nível adequado de proteção aos animais, à saúde humana e ao meio ambiente. (BRASIL, 2009).

A IN 26 exige relatórios técnicos dos laboratórios fabricantes de medicamentos de uso veterinário com estudos de eficácia, segurança e determinação de período de carência quando licenciada ou renovada a licença dos produtos antimicrobianos. Estes laboratórios devem seguir ainda o Decreto n ° 5053, do MAPA, vigente desde 22 de abril de 2004, que aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comercializem, entre outras providências (BRASIL, 2009).

Quanto ao programa de controle de resíduos e contaminantes do governo federal, o mesmo é regido pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) o qual foi instituído pela Portaria Ministerial n ° 51, de 06 de maio de 1986 e atualizado pela Portaria Ministerial n ° 527, de 15 de agosto de 1995. A execução de suas atividades é responsabilidade do Secretário de Defesa Agropecuária, cabendo o gerenciamento do cumprimento das metas estabelecidas na operacionalização do Plano pelo seu Coordenador Geral (BRASIL, 1999).

O PNCRC desenvolve suas atividades visando, especificamente, conhecer o potencial de exposição da população aos resíduos nocivos à saúde do consumidor, parâmetro orientador para a adoção de políticas nacionais de saúde animal e fiscalização sanitária e impedir o abate para consumo de animais oriundos de criatórios onde se tenha constatado a violação dos limites máximos de resíduos e, sobretudo, o uso de drogas veterinárias proibidas no território nacional (MAPA, 2015).

Ressalta-se a importância do PNCRC para o país, haja vista que o descumprimento das metas anuais previstas para o controle de resíduos acarreta sérios problemas de qualidade da produção, dificultando muitas vezes o comércio

internacional dos produtos brasileiros, além é claro das maiores dificuldades no processamento industrial de matérias-primas com baixa qualidade, culminando em prejuízos econômicos.

Entre as inúmeras legislações que regulamentam a produção de alimentos de origem animal, cabe mencionar a IN n^o 09, de 27 de junho de 2003, do MAPA,

Art. 1^o Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. (BRASIL, 2003).

Apesar de o antimicrobiano cloranfenicol ser altamente eficaz para uma vasta quantidade de patógenos, ele é extremamente tóxico, fato este que tem sido relacionado com o surgimento de anemia aplástica em indivíduos sensíveis. Por isso a determinação de proibição de uso deste antimicrobiano na exploração pecuária para animais produtores de alimentos (BRASIL, 2003).

Devido à importância que estes contaminantes possuem no cenário nacional, Spisso, Nóbrega e Marques (2009), publicaram um estudo retratando o histórico, a legislação e a atuação da vigilância sanitária e outros órgãos regulatórios sobre contaminantes e resíduos químicos em alimentos de origem animal no Brasil. Os pesquisadores apontaram como o entrosamento entre os órgãos regulatórios e os segmentos envolvidos na cadeia produtiva de leite é importante para se garantir a segurança alimentar ao consumidor e, com o comprometimento de todo o ciclo produtivo do leite é possível criar uma estrutura adequada prevenir e minimizar os riscos à saúde pública provenientes do uso de medicamentos veterinários em animais de produção.

3.5 MEDICAMENTOS DE USO EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO DE ALIMENTOS

A indústria farmacêutica ao solicitar o registro de um novo produto, fornece aos órgãos competentes os relatórios de estudos sobre resíduos teciduais, inclusive metabólitos, e os métodos analíticos de detecção para que o período de

carência possa ser definido. Este período, também chamado de período de retirada, de depleção ou de depuração, é determinado levando-se em consideração vários fatores como: os componentes da fórmula farmacêutica, a via de administração, a dose administrada e a espécie animal. Além dos antimicrobianos, outros medicamentos usados em animais de produção também possuem este intervalo de respaldo, como os antiparasitários e os hormônios (SPINOSA, GÓRNIAK, BERNARDI, 2006).

Os antimicrobianos são medicamentos de ampla utilização em medicina veterinária, no entanto os mesmos devem ser utilizados com orientação técnica profissional a fim de evitar a resistência do agente infeccioso, seus efeitos carcinogênicos ou tóxicos, as disfunções orgânicas, as reações alérgicas e os resíduos, quando utilizados em animais de produção de alimentos (OHI, 2010).

Devido às tecnologias desenvolvidas para a síntese dos medicamentos houve a necessidade de atualizar o termo antibiótico para antimicrobiano, pois se tornou possível adquiri-los através de produção laboratorial parcial ou total e não apenas pela produção dos micro-organismos (SPINOSA, GÓRNIAK, BERNARDI, 2006).

3.5.1 Classes de Antimicrobianos

3.5.1.1 Tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro que podem ser produzidas por diferentes espécies de *Streptomyces*, ou ainda obtidas semissinteticamente. Entre as tetraciclinas naturais estão a oxitetraciclina, a clortetraciclina e a demeclociclina, enquanto que a tetraciclina, a doxiciclina, a minociclina e a metaciclina são consideradas semissintéticas de acordo com a origem da síntese de cada composto. Todas as tetraciclinas são compostos policíclicos anfotéricos que fluorescem ao serem expostas à luz ultravioleta. Apresentam ainda a característica de formação de quelatos insolúveis com alguns

cátions, como o alumínio, cálcio, ferro e magnésio (ANDRADE, 2008). A Figura 1 ilustra a fórmula estrutural da tetraciclina.

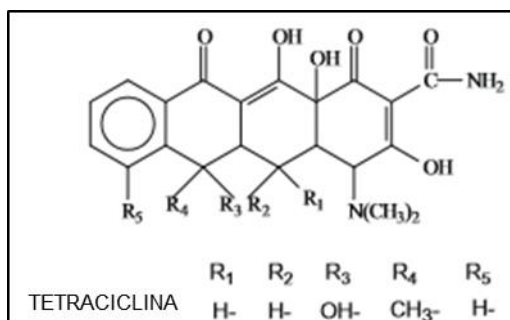


Figura 1 - Estrutura química da Tetraciclina
Fonte: Adaptado de Mamani, Reyes, Rath (2009).

A ação bacteriostática das tetraciclina ocorre através da inibição da síntese proteica do micro-organismo. Em um processo dependente de gasto de energia, as tetraciclina entram na célula por difusão, se ligam de maneira reversível à porção 30 S do ribossoma, bloqueiam a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese proteica (ANVISA, 2014). Esta classe de antimicrobianos é eficaz contra bactérias: Gram-positivas, Gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas, clamídias, riquetsias, espiroquetas, micoplasmas e alguns protozoários (ANDRADE, 2008).

Todas as tetraciclina, exceto a doxiciclina e a minociclina, são excretadas na sua forma ativa pela urina ou, em menor proporção, pela bile. Quando administradas por via parenteral as tetraciclina atingem boa concentração nas glândulas mamárias, por isso têm sido empregadas no tratamento de mastites, entretanto já se observa elevado nível de resistência a algumas tetraciclina (SPINOSA, GÓRNIK, BERNARDI, 2006).

3.5.1.2 Sulfonamidas

As sulfonamidas são antimicrobianos que possuem em sua estrutura química grupamentos amina e enxofre (Figura 2). De acordo com a farmacocinética,

as sulfas podem ser classificadas em: rápida absorção e excreção, sulfatiazol e sulfadiazina; rápida absorção e lenta excreção, sulfametoxazol e sulfametazina; rápida absorção, lenta excreção e efeito prolongado, sulfadimetoxina; rápida absorção, excreção muito lenta e efeito muito prolongado, sulfadoxina; não absorvíveis pelo trato gastro-intestinal, sulfaguanidina ou sulfas de uso tópico (ANDRADE, 2008).

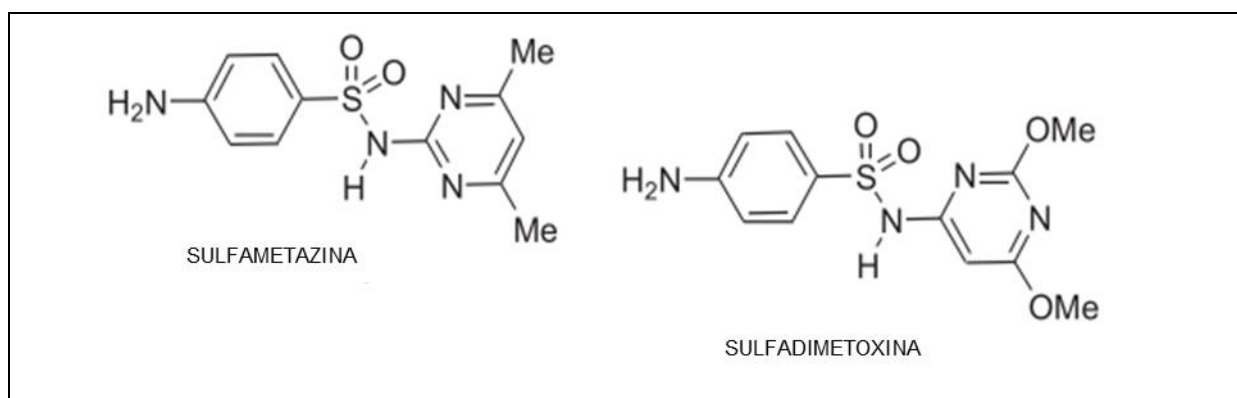


Figura 2 – Estrutura química das Sulfonamidas

Fonte: Feltrin et al. (2007).

O mecanismo de ação desta classe de medicamentos está relacionado com a produção de DNA, pois as sulfas competem com o ácido para-aminobenzóico, o qual é precursor do ácido fólico, substância necessária para a síntese do DNA bacteriano. A ação antimicrobiana das sulfas ocorre diante de bacilos Gram-negativos entéricos, cocos Gram-positivos aeróbicos, clamídias, toxoplasmas e outros coccídeos (ANDRADE, 2008).

As sulfonamidas, quando utilizadas em concentrações terapêuticas, são bacteriostáticas e, em concentrações elevadas, são bactericidas, porém neste caso podem ocorrer graves reações adversas ao hospedeiro (SPINOSA, GÓRNIK, BERNARDI, 2006).

Através de acetilações, conjugações ou hidroxilações aromáticas as sulfas são metabolizadas pelo fígado e, a maior parte, excretadas pelos rins, tanto a forma ativa quanto o metabólito. Uma pequena porção pode ser eliminada através do leite, fezes ou saliva (ANDRADE, 2008).

3.5.1.3 Anfenicóis

O cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol são antimicrobianos bacteriostáticos classificados como anfenicóis. Eles são obtidos por síntese laboratorial e possuem estrutura química (Figura 3) e espectros de ação muito semelhantes entre si (ANDRADE, 2008). Todos têm atividade antimicrobiana idêntica, porém apenas o cloranfenicol é capaz de desenvolver anemia aplástica, efeito tóxico grave o qual se acredita estar relacionado com sua estrutura química (SPINOSA, GÓRNIK, BERNARDI, 2006).

O espectro de ação destas drogas é amplo, atuando sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, requétsias, espiroquetas e micoplasmas. O mecanismo de ação se dá através da inibição da síntese proteica ligando-se às subunidades 50 S e, desta maneira, interferem na formação do peptídeo pelo bloqueio da enzima peptidiltransferase, impedindo assim o alongamento da cadeia polipeptídica. Estes medicamentos também inibem a síntese proteica mitocondrial das células da medula óssea dos mamíferos, provocando anemia hipoplástica, e a redução na produção de anticorpos. Porém estes efeitos adversos estão atrelados à dose e à duração do tratamento; a suspensão do uso leva ao desaparecimento dos sintomas (SPINOSA, GÓRNIK, BERNARDI, 2006).

O cloranfenicol e o florfenicol são moléculas pequenas e lipossolúveis, alcançando elevadas concentrações em praticamente todos os tecidos corporais. A eliminação destes compostos do organismo pode ser através do leite (ANDRADE, 2008).

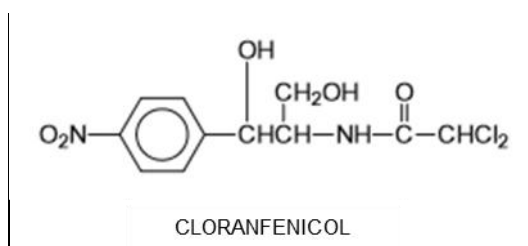


Figura 3 – Estrutura química do Cloranfenicol
Fonte: Adaptado de Mamani, Reyes, Rath (2009).

3.5.1.4 Beta-lactâmicos

São antibióticos que estruturalmente possuem em comum um anel de nitrogênio contendo o β -Lactam. Em razão da semelhança química desses antibióticos com o grupamento terminal D-alanil-D-alanina dos peptidoglicanos da parede celular bacteriana, os antibióticos Beta-lactâmicos inibem a transpeptidase mediante ligação covalente. Por conseguinte, o polímero linear não é transformado em polímero cruzado e não há a formação da parede celular bacteriana (ANVISA, 2009).

Os antibióticos Beta-lactâmicos podem ser divididos em quatro subclasses: as penicilinas (oxacilina, ampicilina, amoxicilina, benzilpenicilinas), as cefalosporinas (cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefadroxila, cefoxitina, cefuroxima, cefaclor, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona), os monobactams, os carbapenems (ertapenen, imipenen, meropenen), que apresentam variações químicas entre si, mas mantêm o núcleo estrutural (o anel Beta-lactâmico) o qual confere a atividade bactericida (ANVISA, 2010; SILVA et al., 2013; ANVISA, 2014).

Dentre os beta-lactâmicos, as penicilinas apresentam um papel importante na descoberta dos antibióticos. Alexander Fleming, oficial médico inglês, em 1928, descobriu, quase que acidentalmente, a presença da penicilina em uma cultura celular de estafilococos como coproduto do fungo *Penicillium notatum*. Fleming isolou o fungo em cultura pura e demonstrou a produção de uma substância antibacteriana, que nomeou penicilina (SILVA et al., 2013). As penicilinas possuem o anel Beta-lactâmico fundido a um anel com cinco membros contendo tiazolidina. Modificações na cadeia lateral do anel Beta-lactâmico resultam em drogas com diferentes propriedades farmacológicas (ANVISA, 2009; CAPA, 2009).

A ampicilina (Figura 4), disponível para o uso desde os anos 60, foi desenvolvida semissinteticamente e pertence à subclasse das penicilinas. Após a adição de um grupamento amino na cadeia lateral, a ampicilina passou a apresentar um espectro de ação mais amplo, quando comparada às benzilpenicilinas. A ampicilina apresenta boa absorção, tanto oral quanto parenteral, sendo bem distribuída em todos os compartimentos orgânicos, atingindo concentrações terapêuticas em líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, articulações e fluidos peritoneais na presença de inflamação (ANVISA, 2014).

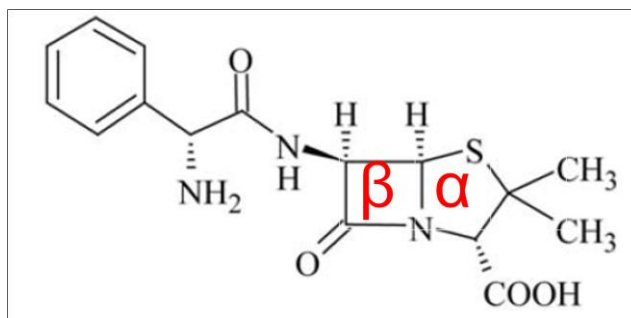


Figura 4 – Estrutura química da Ampicilina
Fonte: ANVISA (2010).

Notas:

β : anel Beta-lactâmico.

A: anel tiazolidínico.

A presença de resíduos de Beta-lactâmicos no leite resulta de seu uso no gado leiteiro para prevenção ou tratamento de doenças, principalmente infecções de glândulas mamárias e doenças do trato reprodutivo. Os riscos à saúde do consumidor são reações alérgicas que podem desencadear choque anafilático em indivíduos sensíveis (ANVISA, 2009).

3.6 RESÍDUOS DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS

A presença de resíduos químicos no alimento (leite) requer atenção especial, pois estes contaminantes representam potencial risco à saúde do consumidor e podem influenciar na produção de derivados lácteos. Os perigos à saúde humana devido ao uso de medicamentos veterinários em animais de produção estão vinculados ao fato da possibilidade destes alimentos apresentarem resíduos químicos acima dos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos (OHI, 2010).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode levar a problemas como a seleção de micro-organismos mais resistentes principalmente pelo uso indiscriminado ou doses incorretas em tratamentos infecciosos. Outro agravamento importante à saúde pública é decorrente da presença deste resíduo ser

potencialmente alergênico para alguns indivíduos sensíveis (OHI, 2010; PRADO, 2012),

No setor industrial o problema está relacionado às alterações nos processos de fabricação de derivados lácteos, tais como: coagulação inadequada do leite e maturação imprópria de queijos, diminuição da acidez e produção de *flavour* durante a manufatura de manteiga e produtos similares, alteração ou mascaramento de resultados de análises de controle de qualidade e, ainda, diminuição do crescimento do fermento lácteo, com a possibilidade de inativação de culturas lácteas usadas na produção de derivados como iogurtes, leites fermentados, queijos e manteiga (OHI, 2010).

O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) é uma ferramenta da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e trabalha, progressivamente, para avaliar resíduos de medicamentos em todos os alimentos de origem animal. No entanto, para iniciar os trabalhos de avaliação, foi selecionada a matriz leite por apresentar um importante papel na alimentação de grupos populacionais mais susceptíveis (crianças e idosos) e, principalmente, por ser um alimento de notável consumo entre os brasileiros (ANVISA, 2009). Em paralelo à ANVISA, o MAPA contribui com o controle na qualidade dos alimentos de origem animal através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) (MAPA, 2015).

Os antimicrobianos, juntamente com os hormônios, são os contaminantes emergentes de maior preocupação atualmente, pois representam grandes riscos à saúde pública quer seja no âmbito de seleção genética de bactérias resistentes, no caso dos antimicrobianos, quer seja no caráter de indução de efeitos estrogênicos (hormônios). Para estes resíduos químicos, tem-se utilizado o termo contaminantes emergentes, os quais têm como característica não necessitar persistir no ambiente para causar efeito nocivo, visto que suas altas taxas de transformação e remoção são compensadas por introduções contínuas no ambiente, podendo levar a altas concentrações em longo prazo (DA SILVA, COLLINS, 2011).

Com o objetivo de avaliar a qualidade do leite produzido em propriedades de sistemas orgânicos, nos quesitos de identificação de microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino, Ribeiro et al. (2009) investigaram a qualidade do leite proveniente de propriedades, certificadas como orgânicas, do interior do estado de São Paulo. Os resultados, obtidos através

de análises com *kits* comerciais de triagem, revelaram a presença de resíduos de antimicrobianos em 2,7 % das amostras analisadas, evidenciando a necessidade de maior rigor na fiscalização do uso de antimicrobianos em propriedades de sistema orgânico.

Já o estudo de Nero et al. (2007) objetivou avaliar a qualidade do leite produzido, em propriedades convencionais, de Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, devido à expressiva produção destes estados em relação à produção nacional. Através de ensaios de inibição microbiana, os pesquisadores detectaram presença de resíduos de antimicrobianos em 8,5 %, 11,4 %, 8,0 % e 6,0 % das amostras avaliadas para Viçosa (MG), Londrina (PR), Pelotas (RS) e Botucatu (SP), respectivamente. Em posse destes resultados, os pesquisadores acreditam ocorrer falhas em relação à utilização de medicamentos veterinários em animais de lactação e sinalizam que testes confirmatórios devem ser realizados nas amostras positivas para presença de resíduos de antimicrobianos, uma vez que o estudo realizado foi em caráter qualitativo.

Em levantamento realizado em 2005, sobre os medicamentos veterinários mais utilizados no rebanho leiteiro no estado do Paraná foi constatado o amplo emprego de antimicrobianos e antiparasitários nas populações avaliadas. Os pesquisadores, já naquela época, relataram preocupação e necessidade de implementações de programas de monitoramento, tendo em vista que havia o uso intensivo destes medicamentos pelos produtores e responsáveis técnicos na cadeia produtiva do leite (NETTO et al., 2005).

Em estudo publicado em 2012, referente ao panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil, Ferreira et al. (2012) compilaram registros de avaliações de autoridades governamentais e de instituições acadêmicas entre 2000 e 2012. Dentre os documentos avaliados, 20 % e 50 % das referências apresentaram resultados insatisfatórios para antimicrobianos e antiparasitários, respectivamente. A pesquisa ainda evidenciou que 25,7 % dos trabalhos avaliados apresentavam resultados de não conformidade com a legislação vigente para antimicrobianos e antiparasitários simultaneamente. O panorama exposto pelo estudo de Ferreira et al. (2012) evidencia o uso de substâncias indevidas ou de forma incorreta na produção de alimentos, o que propicia a geração de resíduos de medicamentos no leite.

3.7 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR)

O *Codex Alimentarius*, fórum internacional de normalização de alimentos, estabelecido pela Organização das Nações Unidas, por meio da *Food and Agricultural Administration*, da *Food and Drug Administration* e da Organização Mundial da Saúde estabelece as diretrizes para o Limite Máximo de Resíduo definido como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de medicamento veterinário, expresso em mg/kg, mg/L, µg/kg, µg/L, µg/mL, parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é legalmente reconhecido como tolerável no alimento determinado para cada antimicrobiano aprovado para uso em animal (ANVISA, 2009; SANTOS, DUARTE, POZZI, 2011).

Este limite baseia-se no tipo e quantidade de resíduos que não oferecem risco de toxicidade para a saúde humana, levando-se em consideração a Ingestão Diária Aceitável (ANVISA, 2009). O uso de substâncias químicas em animais produtores de alimentos para consumo humano requer estudos farmacocinéticos de depleção de resíduos, para a determinação de valores limitativos, de forma a não oferecer risco à saúde do consumidor (SPISSO, NÓBREGA, MARQUES, 2009).

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como o *Joint Expert Committee on Food Additives*, o *Food and Drug Administration* e a Agência Europeia de Medicamentos, estabelecem os valores para LMR no âmbito mundial. No Brasil, a competência para estabelecer o LMR de resíduos e contaminantes em alimentos é do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (PRESTES et al., 2013). Na Tabela 4 estão compilados os antimicrobianos de interesse na cadeia leiteira, assim como seus referenciais para LMR e os órgãos responsáveis pela sua determinação.

Tabela 4 – Limite Máximo de Resíduo permitido para antimicrobianos, em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de acordo com as referências internacionais

Classe de Antimicrobianos	Substância Ativa	LMR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referência
B-LACTÂMICOS (PENICILINAS)	Benzilpenicilina	0,004	MERCOSUL
	Ampicilina	0,004	MERCOSUL
	Amoxicilina	0,004	MERCOSUL
	Cloxacilina	0,030	União Europeia
	Oxacilina	0,030	União Europeia
TETRACICLINAS	Oxitetraciclina ^(a)		
	Tetraciclina ^(a)	0,100	MERCOSUL
	Clortetraciclina ^(a)		
ANFENICÓIS	Cloranfenicol	Zero	MERCOSUL
	Florfenicol	nd ^(c)	-
	Tianfenicol	0,050	União Europeia
SULFONAMIDAS	Sulfametazina ^(b)		
	Sulfadimetoxina ^(b)	0,100	MERCOSUL
	Sulfatiazol ^(b)		

Fonte: Adaptado de ANVISA 2009.

Notas:

(a) somatório das tetraciclinas.

(b) somatório das sulfonamidas.

(c) não definido.

Segundo o PAMVet, para efeito de entendimento dos valores expostos na Tabela 4, os níveis de resíduos no leite são considerados satisfatórios e/ou insatisfatórios quando obedecem as seguintes definições:

Para LMR definido:

Valor encontrado \leq LMR = SATISFATÓRIO

Valor encontrado $>$ LMR = INSATISFATÓRIO

Para LMR não definido:

Valor encontrado $<$ LDM* = SATISFATÓRIO

Valor encontrado \geq LDM* = INSATISFATÓRIO

Para LMR = zero:

Valor encontrado $<$ LDM* = SATISFATÓRIO

Valor encontrado \geq LDM* = INSATISFATÓRIO

* O LDM é o Limite de Detecção do Método e representa a menor concentração que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada.

3.8 DETECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE

3.8.1 Métodos de Triagem

Atualmente a maioria dos testes para pesquisa de antimicrobianos em leite disponível comercialmente tem como finalidade apenas a detecção da presença do contaminante no alimento. Neste caso, pode-se conceituar como teste de triagem o método de detecção que permite, com boa precisão, identificar se determinada droga encontra-se (resultado positivo) ou não (resultado negativo) presente, porém não é possível com estes testes determinar a quantidade exata de resíduo de antimicrobiano presente na amostra analisada. Essa quantificação somente é realizada através de testes quantitativos (ARAÚJO, 2010).

A legislação brasileira não permite o beneficiamento do leite pelas indústrias de laticínios sem que análises de pesquisa de antimicrobianos sejam realizadas previamente (BRASIL, 2011). Por isso o controle de resíduos de antimicrobianos nas indústrias brasileiras de derivados lácteos é feito com o auxílio dos conjuntos comerciais de análise (*kits*). Esta ferramenta que auxilia o setor agroindustrial é aceita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, desde que aprovadas para tal finalidade. Na Tabela 5 estão expostos os principais *kits* disponíveis para a triagem de antimicrobianos em leite (DIETRICH, 2008).

Tabela 5 – Principais kits de identificação de antimicrobianos no leite

Nome comercial	Método	Tempo	Fabricante	Classe de antimicrobianos
Copam®	Biológico	2,75 h	Copan / Itália (a)	Beta-lactâmicos, Tetraciclina, Sulfonamida, Aminoglicosídeo, Macrolídeo, Anfenicol e outros.
Eclipse 100®	Biológico	2,5 h	Inmunotec / Espanha (b)	Beta-lactâmicos, Tetraciclina, Sulfonamida, Aminoglicosídeo, Macrolídeo e outros.
Beta Star®	Enzimático	5 min	CHR Hansen / Dinamarca (c)	Beta-lactâmicos.
Charm Rosa Lactam®	Enzimático	8 min	Charm Sciences / EUA (d)	Beta-lactâmico.
Charm Rosa Tetra®	Enzimático	8 min	Charm Sciences / EUA (d)	Tetraciclina.
Charm Rosa Sulfa®	Enzimático	8 min	Charm Sciences / EUA (d)	Sulfonamida.
TwinSensor®	Enzimático	6 min	Unisensor / Bélgica (e)	Beta-lactâmicos e Tetraciclina.
Snap Beta®	Enzimático	5 min	Idexx / EUA (f)	Beta-lactâmicos.
Snap Tetra®	Enzimático	5 min	Idexx / EUA (f)	Tetraciclina.

Fonte: Adaptado de DIETRICH 2008.

Notas:

(a) www.copaninnovation.com

(b) www.zeu-inmunotec.com

(c) www.chr-hansen.com

(d) www.charm.com

(e) www.unisensor.be

(f) www.idexx.com

Os *kits* analíticos de triagem autorizados para avaliação de presença de resíduos de antimicrobianos em leite possuem limites de detecção específicos para cada analito. Desta forma estes testes de triagem apresentam a sensibilidade compatível com os limites máximos de resíduos autorizados pela legislação vigente (NERO et al., 2007). Porém quando se trabalha com uma gama de analitos há um comprometimento desta sensibilidade, pois o teste utilizado pode apresentar resultado falso-negativo para determinado analito, no conjunto de analitos avaliados.

Resultados falso-negativos foram evidenciados por Tenório et al. (2009), quando foi avaliada a eficiência de um *kit* comercial para a detecção de antimicrobianos em leite contaminando intencionalmente com 13 analitos distintos. A eficiência da análise não foi a mesma para todos os analitos, pois o limite de detecção declarado pelo fabricante, para eritromicina, oxitetraciclina, tetraciclina, trimetropim e gentamicina, era superior ao LMR permitido e o resultado apresentado foi de conformidade, em amostras conhecidamente não conformes.

Outra situação de igual relevância é a presença de resultados falso-positivos que podem estar vinculados ao limite de detecção do método ser inferior ao limite de contaminante permitido por legislação. Moraes et al. (2009), avaliaram a presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado através do uso de alguns *kits* de triagem. A elevada incidência de tetraciclina encontrada pelos pesquisadores nas amostras avaliadas estava relacionada à sensibilidade do teste empregado, o qual possuía limite de detecção cinco vezes menor do que o LMR permitido.

O PAMVet adota como estratégia a realização de testes de triagem àqueles cujo método é enzimático. A utilização de testes de triagem, embora exija confirmação por outros métodos em caso de resultado positivo, é uma alternativa eficiente, pois reduz significativamente o custo e agiliza a análise (ANVISA, 2009), no entanto deve-se considerar a especificidade do *kit* empregado e a sensibilidade declarada pelo fabricante para que se possam obter resultados seguros.

3.8.2 Métodos Confirmatórios

Os métodos confirmatórios, também chamados de métodos quantitativos, envolvem análises cromatográficas e frequentemente se baseiam na combinação de um procedimento cromatográfico com outra técnica instrumental de análise, como, por exemplo, espectrometria de massa e espectrofotometria (MOATS, 1997).

Devido à facilidade da cromatografia efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas ela vem tomando lugar de destaque entre os métodos modernos de análise por ser um método físico-químico de segregação de

compostos de uma mistura, realizada através distribuição destes compostos entre duas fases que estão em contato íntimo (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006). Fazem parte do procedimento analítico de cromatografia na determinação de antimicrobianos em leite algumas etapas prévias como: extração, limpeza, identificação/quantificação e confirmação para dar prosseguimento às análises cromatográficas (PRADO, 2012), e como vantagem das técnicas cromatográficas para análises de resíduos pode-se citar a capacidade de detecção de quantidades muito pequenas de contaminantes, inclusive traços de resíduos (ARAUJO, 2007).

Por este e outros fatores a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) tem sido amplamente empregada no controle de qualidade de produtos, tanto em indústrias de alimentos quanto nas demais áreas como farmacêutica, ambiental e química (RIBEIRO et al., 2007).

3.8.3 Análises Oficiais

Como rotina em análises oficiais, a técnica oficial utilizada para avaliação de antimicrobianos em leite é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Massas (HPLC MS/MS), para isto os órgãos governamentais contam com a rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGRO) para a execução das análises oficiais e o cumprimento do cronograma do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). Localizados em seis estado brasileiros, os LANAGROS estão estrategicamente distribuídos para melhor atender a demanda das atividades oficiais, porém apenas os LANAGROS/GO E LANAGRO/RS executam análises de pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite (MAPA, 2015).

Os demais laboratórios, credenciados ou não no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que realizam análises de presença de antimicrobiano em leite as fazem através de métodos qualitativos (*kits* comerciais), na sua grande maioria, ou quantitativos (cromatografia). Esta preferência pelo método qualitativo tem sua justificativa pelo elevado custo das análises cromatográficas. Para a

realização de uma análise em leite, através da cromatografia líquida / espectrometria de massa, com diferentes analitos a serem avaliados, os custos podem variar entre R\$ 500,00 (US\$ 125,00) e R\$ 650,00 (US\$ 162,50) por substância quantificada, inviabilizando a prática destas análises na rotina de laboratórios de controle de qualidade em uma indústria de alimentos (orçamento nº 2540 ALAC[®]/Eurofins 2015; orçamento nº 003419 TECPAR/Instituto de Tecnologia do Paraná 2015).

3.8.4 Métodos Alternativos de Análises em Alimentos

As análises químicas convencionais (métodos de referência) na área de alimentos estão sendo desafiadas pelas técnicas alternativas, com o intuito de conciliar as vantagens que as técnicas inovadoras oferecem conservando a efetividade e a segurança das análises de referência. Isto já vem sendo observado em diferentes ramos industriais, principalmente, no de alimentos. Pesquisas empregando espectroscopia no infravermelho para avaliação da qualidade de alimentos vêm sendo bastante procuradas pelas áreas de Controle de Qualidade das indústrias alimentícias. Visando atender esta necessidade, muitos trabalhos científicos estão sendo desenvolvidos e os resultados têm se apresentado satisfatórios.

Como forma de minimizar esta distância entre o emprego de métodos qualitativos e quantitativos vem sendo apresentadas alternativas para que os resultados das análises sejam simples, rápidos, objetivos e de custo reduzido, atributos dos métodos de triagem, associados às respostas específicas e precisas dos métodos confirmatórios. Assim as técnicas espectroscópicas, em especial a espectroscopia no infravermelho, associada a métodos quimiométricos, vem sendo apresentada como uma opção para métodos confiáveis de identificação e quantificação de compostos em matrizes complexas (GONDIM, JUNQUEIRA, SOUZA, 2011).

Interessados pelo aumento dos estudos das técnicas Espectroscópicas no Infravermelho Médio e a contínua expansão de métodos no Infravermelho Próximo, Helfer et al. (2006) estudaram a aplicação de métodos de análise

multivariada empregando espectroscopia no controle qualitativo de essências alimentícias. O crescente interesse no uso desta metodologia de análise é justificado por ser um método analítico rápido e limpo, minimizando o uso de reagentes poluentes e conseqüentemente, reduzindo geração de resíduos agressivos ao ambiente.

Para desenvolver seu estudo, Helfer et al. (2006) contaram com a gentileza da empresa Filler S.A., indústria alimentícia, a qual forneceu amostras das essências: baunilha 01, baunilha 02, baunilha 03, leite, caramelo, cereja e morango. Os resultados foram satisfatórios e evidenciaram discriminação entre as classes avaliadas. A metodologia proposta confirmou a importância do seu uso em controle da produção de essências, bem como o controle de lotes recebidos pelas indústrias que as utilizam em suas linhas de produção.

Outro estudo de boa relevância com espectroscopia associada a método quimiométrico foi realizado por Morgano et al. (2005) utilizou a combinação da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) e calibração multivariada (PLS - método dos mínimos quadrados parciais) para a quantificação do teor de proteína total em amostras de café cru. As análises foram realizadas primeiramente utilizando-se o método de referência, de Kjeldhal, e posteriormente foram construídos modelos de regressão a partir dos dados espectrais na região do infravermelho das amostras avaliadas. Os erros relativos médios entre o método proposto e o de referência foram inferiores a 6,7 %, sinalizando uma boa capacidade de previsão pelo método proposto para as amostras de café cru. A associação do método analítico com a quimiometria mostrou-se interessante, possibilitando a determinação direta das amostras, sem a destruição das mesmas e com resultados rápidos e sem o consumo de reagentes químicos.

Já a aplicação da espectroscopia no infravermelho associada à quimiometria para prever parâmetros de qualidade da soja e da quinoa foi objeto de estudo de Ferreira (2013). Este estudo procurou avaliar a aplicação da espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) e na do médio (MIR), para determinação do conteúdo de umidade, proteína, lipídios e cinzas para amostras de grãos funcionais (soja) gerando modelos PLS compatíveis e com capacidade preditiva. Os erros relativos (E%) entre os valores de referência e os valores previstos pelos modelos de calibração PLS foram pequenos, tanto para o NIR como para o MIR. No entanto a grande vantagem sobre o método de referência está no

tempo dispensado na execução das análises. Enquanto os métodos de referência exigiram de 10 a 16 horas para apresentarem os resultados, a espectroscopia no infravermelho necessitou de alguns minutos entre a preparação e a análise das amostras.

Outro aspecto importante mencionado por Ferreira (2013) foi a construção de modelos de calibração PLS com NIR para parâmetros de qualidade para a soja moída e para a quinoa, grão inteiro e moído. A técnica mostrou capacidade de predição adequada para todos os parâmetros. Portanto, a técnica é potencialmente útil como método analítico não destrutivo para determinações simples e rápidas de constituintes alimentares, visto que mesmo grãos inteiros, quando utilizados, forneceram bons resultados para a previsão dos parâmetros de interesse.

Ainda na linha de alimentos, porém no segmento de bebidas, Rech (2014) propôs o uso da análise espectroscópica na região do infravermelho combinada com a análise multivariada para a caracterização e controle de qualidade de bebidas saborizadas a base de soja. Em seu estudo, foram utilizadas amostras comerciais de extrato de soja e proteína isolada de soja com sabores variados.

Objetivou-se avaliar a potencialidade da espectroscopia em revelar adulterações por adição de água, o que foi satisfatoriamente detectada pelo método combinado com as ferramentas quimiométricas de análise multivariada propostas. As demais vantagens do método proposto por Rech (2014) envolvem os custos reduzidos e a rapidez das análises, além da mínima geração de resíduos químicos durante a execução dos trabalhos.

Com o leite, bebida com elevada aceitação pelo mercado consumidor, também vem sendo realizados estudos direcionados às novas tecnologias de análise. Jawaid et al. (2013) apresentaram em seu trabalho um método rápido para quantificar melanina em leite de vaca, visto que este analito é um componente adulterante na matriz leite. Existem vários métodos para análise de compostos de melanina e produtos relacionados em alimentos, no entanto a preparação das amostras, os procedimentos de limpeza e o elevado volume de solventes orgânicos empregados nos métodos de referência instigaram os pesquisadores a desenvolverem um método sensível, preciso e reprodutivo aliado às facilidades no preparo das amostras e ao baixo consumo de reagentes orgânicos. Assim, utilizando a Espectroscopia Vibracional associada à Refletância Total Atenuada (SB-ATR-FTIR) e Mínimos Quadrados Parciais (PLS), pode-se estabelecer um modelo de

correlação entre os dados espectrais e as concentrações de melanina no leite, satisfazendo a necessidade inicial, quantificação do analito de interesse.

Outro estudo de investigação de compostos adulterantes em leite foi proposto por Santos, Pereira-Filho, Rodriguez-Saona (2013), quando utilizaram a Microespectroscopia no Infravermelho Médio com Refletância Total Atenuada e ferramentas quimiométricas como um método rápido para a detecção e quantificação de adulterantes no leite. Foram utilizadas amostras comercializadas na cidade de Columbus, em Ohio, nos Estados Unidos, as quais foram acrescidas dos adulterantes de interesse: soro de leite, peróxido de hidrogênio, urina sintética, ureia e leite sintético, utilizando diferentes concentrações de cada adulterante. Os resultados obtidos no estudo confirmaram a viabilidade do método por apresentar desempenho analítico preciso e confiável, evidenciando que a metodologia estudada pode ser uma alternativa para indústrias de laticínios no rastreamento de potenciais práticas fraudulentas na cadeia de produção de leite.

Na mesma linha de interesse, Botelho et al. (2015) propõem um método de triagem simples para investigação simultânea de cinco adulterantes comuns em leite de vaca cru, utilizando Espectroscopia no Infravermelho Médio acoplado à Refletância Total Atenuada e Análise Discriminante com Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). O método foi capaz de quantificar de um a cinco dos adulterantes pesquisados (água, amido, citrato de sódio, formaldeído e sacarose) em um pequeno volume de amostra (30 mL). Por se tratar de um método rápido e simples, os pesquisadores concluíram que o mesmo seria apropriado para o controle de qualidade do leite cru em indústrias de laticínios.

Luiz et al. (2014) objetivaram avaliar a qualidade do leite comercializado no Brasil, utilizaram a Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Transformada de *Fourier* (FT-NIR) associada à Análise de Componentes Principais (PCA) em amostras de leite pasteurizado tipo "A" integral homogeneizado comercializado na região de Juiz de Fora, Minas Gerais. A técnica escolhida combinada com a quimiometria permitiu realizar as análises com rapidez, o que se torna interessante na rotina laboratorial nas indústrias de laticínios. Os pesquisadores tiveram bom resultado ao objetivo proposto, pois o método detectou facilmente as amostras pré-contaminadas com diclofenaco sódico (anti-inflamatório) nas diferentes concentrações de estudo (0,1 %, 0,5 % e 10,0 %). No entanto, evidenciou-se que a

ferramenta estatística (PCA) empregada teve fundamental importância para a obtenção dos resultados para as concentrações mais baixas (0,1 % e 0,5 %).

Com o mesmo interesse, porém com diferentes analitos, foram avaliadas amostras de leite provenientes de fabricantes distintos no estudo realizado por Luiz et al. (2015). Foram avaliadas diferentes concentrações de antimicrobianos (penicilina G, terramicina e enrofloxacino), com percentuais abaixo de 1 %, através de método Espectroscópico no Infravermelho Próximo e Análise de Componentes Principais. A partir dos resultados, os pesquisadores apontaram como vantagens da análise FT-NIR, associada à quimiometria, a rápida obtenção dos resultados, a necessidade de uma quantidade mínima de amostra na execução das análises, além do fato de que a amostra não precisa ser descartada, pois a análise é não destrutiva e com mínima geração de resíduos.

Quando comparado o método de referência univariado (HPLC) com método alternativo multivariado (Espectroscopia) com amostras dos medicamentos amoxicilina suspensão oral, cefaclor cápsulas e cloridrato de fluoxetina comprimidos pode-se observar que o tempo despendido para a execução das análises foi de 210, 269 e 210 minutos, respectivamente, quando utilizado o HPLC e 70, 50 e 20 minutos, respectivamente, quando as análises foram executadas pelas técnicas alternativas. Com este estudo, Ribeiro et al. (2007) também apontaram para uma redução significativa entre os custos das análises, pois houve um investimento de R\$ 64,12 para uma amostra de cloridrato de fluoxetina em HPLC, enquanto para a análise por espectroscopia NIR, para o mesmo analito, o custo foi R\$ 2,06, sendo a análise realizada no comprimido intacto sem a necessidade de preparo de amostra. A geração de resíduos também foi consideravelmente menor nas análises alternativas multivariadas quando comparadas ao método de referência univariado.

Para contextualizar esta diferença de custos entre as análises de HPLC e espectroscopia podemos citar os valores aplicados pelo Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, atualizada em 2015 para análises físico-químicas de medicamentos: a identificação de fármaco por HPLC tem custo de R\$ 150,00 (US\$ 37,50), enquanto por espectrofotometria na região do UV R\$ 100,00 (US\$ 25,00) por amostra. O teor de fármaco por HPLC está orçado em R\$ 250,00 (US\$ 62,50) e por espectrofotometria na região do UV ou VIS R\$ 150,00 (US\$ 37,50). O ensaio para dissolução com quantificação por HPLC custa R\$ 600,00 (US\$ 150,00), enquanto por espectrofotometria na região do UV está em R\$ 400,00 (US\$ 100,00), pode-se

observar que a cromatografia líquida de alta eficiência tem apresentado custos mais elevados, para todos os quesitos, quando comparados à espectrofotometria neste conjunto de análises (IAL, 2015).

3.9 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A descoberta da região infravermelha do espectro eletromagnético deve-se ao astrônomo William Herschel, em 1800, por acaso e sem interesse específico. Em seus estudos, confeccionou um prisma de vidro equipado com termômetros com bulbos pretos onde mediu as temperaturas de diferentes cores. Ele observou a presença de radiação térmica na faixa de energia imediatamente abaixo da região do visível, do espectro solar, pois observou um aumento de temperatura à medida que movimentava o termômetro da cor violeta para a cor vermelha no espectro criado pela luz do sol, denominando esta radiação como invisível de infravermelho (ILHARCO, 1998; OLIVEIRA, 2011).

Somente em meados de 1880, Abney e Festing, utilizando placas fotográficas, obtiveram os primeiros espectros de absorção do infravermelho ao irradiar moléculas orgânicas. No entanto, mesmo com os avanços da publicação de espectros de infravermelho para centenas de compostos orgânicos e inorgânicos, ainda existia muita limitação nos estudos devido às dificuldades experimentais. O ponto crucial e decisivo nesta evolução foi marcado pelo interesse em astronomia de Richard Perkin e Charles Elmer, norte-americanos, que fundaram uma pequena empresa para estudo e desenvolvimento de componentes ópticos de precisão em 1937 (ILHARCO, 1998).

Nos anos 80, com o desenvolvimento da microeletrônica e a popularização dos microcomputadores, houve um significativo avanço nas análises instrumentais favorecendo a aquisição de um grande número de dados relacionados a uma mesma amostra. Entretanto, a modelagem desses dados tornou-se mais complexa e só pode ser solucionada com a aplicação de técnicas quimiométricas, as quais foram fundamentais para a utilização da espectroscopia como ferramenta de análise em aplicações qualitativas e quantitativas na química analítica contemporânea (OLIVEIRA, 2011).

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

A região do infravermelho do espectro eletromagnético pode ser dividida em três partes principais: infravermelho próximo (NIR – *Near Infrared* - região das harmônicas) 0,8 – 2,5 μm ($12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$); infravermelho médio (MIR – *Middle Infrared* - região de vibração-rotação) 2,5 – 50 μm ($4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$) e infravermelho distante (FIR – *Far Infrared* - região de rotação) 50 – 1000 μm ($200 - 10 \text{ cm}^{-1}$) (MENDHAM et al., 2002).

A região de maior interesse para fins analíticos está entre os comprimentos de onda de 2,5 e 25 μm (micrômetros), isto é, cujos números de onda estão entre 4000 e 400 cm^{-1} . No infravermelho, os espectros têm origem nos diferentes modos de vibração e rotação das moléculas. Em comprimentos de onda inferiores a 25 μm , a radiação tem energia suficiente para alterar os níveis de energia vibracional das moléculas e o processo é acompanhado por mudanças nos níveis de energia rotacional (MENDHAM et al., 2002). A Tabela 6 relaciona as regiões espectrais de interesse analítico com os materiais utilizados, de acordo com as características intrínsecas dos compostos a serem analisados.

Tabela 6 – Regiões espectrais no infravermelho e amostras utilizadas

Região	Número de onda cm^{-1}	Amostra a que se aplica
Próximo	12500 a 4000	Materiais comerciais sólidos ou líquidos e misturas gasosas
Médio	4000 a 200	Sólidos, líquidos ou gases puros, misturas complexas de líquidos, sólidos ou gases
Distante	200 a 10	Amostras sólidas, líquidas e gasosas

Fonte: HOLLER, SKOOG, CROUCH (2009).

Assim como acontece em outros tipos de absorção de energia, as moléculas, quando absorvem radiação no infravermelho, são excitadas para atingir um estado de maior energia. A absorção de radiação no infravermelho corresponde a alterações de energia da ordem de 8 a 40 kJ/mol. A radiação nessa faixa de energia corresponde à faixa que envolve frequências vibracionais de estiramento e dobramento as ligações na maioria das moléculas covalentes. Ligações simétricas não absorvem radiação no infravermelho, por exemplo, H₂ ou Cl₂, isto não ocorre porque para transferir energia uma ligação deve apresentar um dipolo elétrico que mude na mesma frequência da radiação que está sendo introduzida. O dipolo elétrico oscilante da ligação pode, então, acoplar-se com o campo eletromagnético da radiação incidente, que varia de forma senoidal. Desta forma, uma ligação simétrica que tenha grupos idênticos ou praticamente idênticos em cada extremidade não absorverá no infravermelho. Por isso as ligações mais propensas a ser afetadas por essa restrição são aquelas de alcenos e alcinos (PAVIA et al., 2010).

Cada tipo de ligação possui sua própria frequência natural de vibração, e como dois tipos idênticos de ligações em dois diferentes compostos estão em dois ambientes levemente diferentes, os padrões de absorção no infravermelho em duas moléculas de estruturas diferentes nunca serão exatamente idênticos. Apesar das frequências absorvidas nos dois casos poderem ser iguais, jamais os espectros infravermelhos de duas moléculas diferentes serão idênticos. Outro uso, tão importante quanto, do espectro infravermelho é o fornecimento de informações estruturais de uma molécula. As absorções de cada tipo de ligação são, em geral, encontradas apenas em determinadas regiões do infravermelho vibracional, como se pode observar na Tabela 7 (PAVIA et al., 2010).

Tabela 7 – Grupos funcionais e suas regiões no espectro eletromagnético de maior absorção

Grupo funcional	Frequência (cm⁻¹)
Alcoóis, Fenóis, Ácidos Carboxílicos (O / H)	3400
Aminas e Amidas primárias e secundárias (N / H)	3400
Alcanos, Alcenos, Aromáticos, Alcinos, Aldeídos (C / H)	3000
Nitrilas (C /// N)	2250
Alcinos (C /// C)	2150
Aldeídos, Cetonas, Ácidos Carboxílicos, Ésteres, Amidas, Anidridos, Cloreto Ácido (C // O)	1715
Alcenos, Aromáticos (C // C)	1650
Alcoóis, Éteres, Ésteres, Ácidos Carboxílicos, Anidridos (C / O)	1100

Fonte: PAVIA et al. 2010.

Como técnica de análise quantitativa para produtos industrializados e controle de alimentos e medicamentos, a espectroscopia no infravermelho apresentou grande avanço após o advento da Transformada de *Fourier*, o que deixou o método mais rápido e robusto. Há, portanto, um vasto campo de aplicações utilizando as técnicas de espectroscopia no infravermelho em conjunto com métodos de calibração multivariada, com diversos propósitos. O crescente aperfeiçoamento nos últimos anos revela o contínuo interesse por métodos analíticos rápidos, não invasivos e não destrutivos e que não gerem subprodutos tóxicos ou deletérios (OLIVEIRA, 2011).

O instrumento que obtém o espectro de absorção no infravermelho é chamado de espectrômetro de infravermelho ou, simplesmente, espectrofotômetro. Nos laboratórios químicos há dois tipos de espectrômetros de infravermelho que são mais utilizados: instrumentos dispersivos e de Transformada de *Fourier*. Apesar de ambos produzirem espectros praticamente idênticos para qualquer composto e oferecerem espectros em uma faixa comum de 4000 a 400 cm⁻¹, os espectrômetros de infravermelho de transformada de *Fourier* oferece uma melhor relação sinal/ruído para uma dada resolução, uma exatidão de valores de frequência muito melhor, rapidez e melhores condições para a manipulação de dados (PAVIA et al., 2010; HARRIS, 2012).

A essência de um espectrômetro de infravermelho com Transformada de *Fourier* é o interferômetro (IV-TF), pois este espectrômetro utiliza o interferômetro

para manipular a energia enviada à amostra que será analisada. A radiação proveniente da fonte chega ao divisor de feixe, o qual transmite uma parte da radiação para o espelho fixo e reflete a outra para o espelho móvel. Os raios refletidos pelos espelhos retornam ao divisor de feixe, onde metade de cada raio é transmitida e metade é refletida. Um raio recombinado se desloca em direção a amostra e outro retorna para a fonte. Quando os dois feixes se encontram no divisor de feixe, eles se recombinaem, mas as diferenças de caminhos dos dois feixes causam interferências destrutivas e construtivas. O feixe combinado contendo esses padrões de interferências dá origem ao interferograma, o qual contém toda a energia radiativa proveniente da fonte, além de uma grande faixa de comprimentos de onda (PAVIA et al., 2010; HARRIS, 2012).

Quando ocorre isto, a amostra absorve de forma simultânea todos os comprimentos de onda (frequências) normalmente encontrados em seu espectro infravermelho. O sinal do interferograma modificado que chega ao detector contém informações sobre a quantidade de energia absorvida em cada comprimento de onda. O computador compara os interferogramas, o modificado e o produzido por um feixe de *laser* de referência, para obter um padrão de comparação. O processo matemático chamado transformada de *Fourier* é executado pelo computador para extrair as frequências individuais que foram absorvidas e então reconstruir e plotar o gráfico típico do espectro de infravermelho (PAVIA et al., 2010).

Quando comparados com os instrumentos que trabalham com dispersão, o IV-TF apresenta inúmeras vantagens. A melhora na relação sinal/ruído se deve ao fato de um espectrômetro com Transformada de *Fourier* utilizar a energia do espectro inteiro, ao invés de analisar apenas uma sequência de pequenas faixas de comprimento de onda disponibilizadas por um monocromador. A precisão na reprodução de valores de número de onda entre os espectros obtidos permite que os instrumentos com Transformada de *Fourier* estabeleçam uma média entre sinais a partir de múltiplas aquisições de dados, resultando em uma melhor razão sinal/ruído. A precisão em determinar valores de número de onda e os baixos níveis de ruído permite que espectros com poucas diferenças estruturais possam ser subtraídos um do outro de modo a expor essas diferenças (HARRIS, 2012).

A partir dos anos 50 o uso da espectroscopia no infravermelho médio começou a ser utilizada de maneira mais intensiva para análise qualitativa de compostos orgânicos, desde então, sua aplicação estava vinculada principalmente à

identificação de ligações moleculares. Com o surgimento dos espectrômetros com Transformada de *Fourier*, relativamente baratos, aumentou consideravelmente as aplicações da espectroscopia no infravermelho. Dentre as vantagens das análises por espectroscopia no infravermelho podem-se citar: (a) simplicidade da operação, pois após a calibração do equipamento, a análise torna-se rotineira; (b) rapidez do método, pois com o instrumento devidamente calibrado é possível obter resultados de análises em minutos, utilizando o detector adequado; (c) redução significativa no uso de reagentes químicos; (d) análise simultânea de multicomponentes (amostras complexas), (e) além da possibilidade de realização de mais de uma calibração para o instrumento (FERREIRA, 2013).

3.10 MÉTODOS DE ANÁLISE MULTIVARIADA

3.10.1 Quimiometria e Calibração Multivariada

A quimiometria pertence a uma área multidisciplinar do conhecimento que trata de aplicação de métodos estatísticos e matemáticos em problemas de ordem química. É considerada como uma poderosa ferramenta para processar a vasta quantidade de informações geradas pelas modernas técnicas instrumentais. Com a ascensão destas técnicas, aliadas a expansão dos microprocessadores e microcomputadores nos laboratórios químicos, tornaram-se necessários os tratamentos dos dados mais complexos do ponto de vista estatístico e matemático, com o intuito de relacionar os sinais obtidos com os resultados desejados (MENDHAM et al., 2002; MORGANO et al., 2005).

Cada vez mais difundida, a quimiometria não pode ser considerada como uma simples ferramenta, pois envolve planejamento e otimização de experimentos; reconhecimento de padrões e classificação de dados, otimização e validação de metodologias analíticas; planejamento de experiências; ajuste de curva; processamento de sinais analíticos; análise de fatores, calibração multivariada,

monitoramento e modelagem de processos multivariados e métodos de inteligência artificial (MENDHAM et al., 2002; ARAUJO, 2007).

As técnicas quimiométricas têm como objetivo utilizar de forma correta, eficiente e econômica os recursos disponíveis através do delineamento e da análise dos experimentos (FERRÃO et al., 2004), além disto, as indústrias precisam de respostas rápidas e análises não destrutivas, combinando as técnicas espectroscópicas com as ferramentas quimiométricas, em especial processos quimiométricos envolvendo calibração multivariada, sendo o ideal para o monitoramento e o controle de qualidade de seus produtos (OLIVEIRA, 2006).

A principal linha de trabalho da quimiometria aplicada à química analítica tem sido a construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem, ou seja, aqueles dados que podem ser representados através de vetores. A construção desses modelos é denominada calibração multivariada (ARAUJO, 2007).

Dentre as diversas áreas de atuação, a calibração multivariada é aquela que permite definir um elemento de interesse em matrizes complexas e analisar vários componentes em sistema mais simples simultaneamente, independente de interferência espectral. A essência da calibração multivariada é, portanto, estabelecer uma relação entre duas matrizes de informações químicas, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas (QUEJI, 2008).

A calibração multivariada segue, de maneira geral, as etapas representadas no diagrama abaixo (Figura 5), que consiste, basicamente, em duas fases: a calibração e a validação:

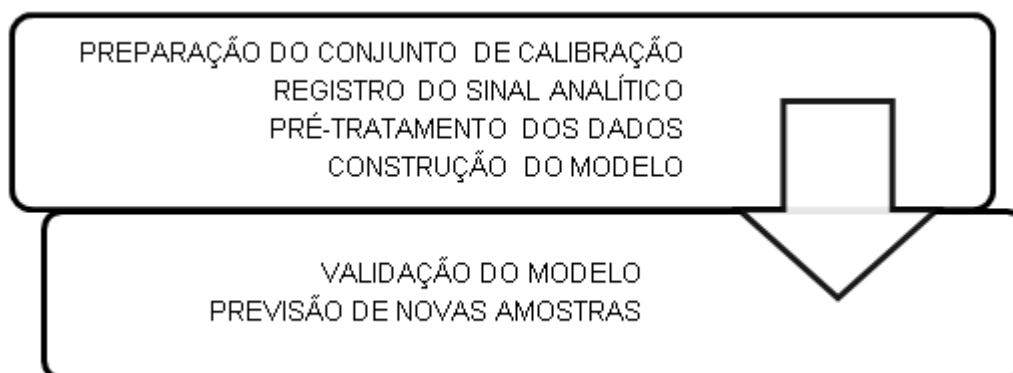


Figura 5 – Diagrama das etapas da Calibração Multivariada
Fonte: Próprio autor (2015).

A preparação do conjunto de calibração consiste na obtenção de um conjunto de amostras das quais se conheça a propriedade de interesse e que seja representativo para executar futuras previsões. Este conjunto deve ser representativo tanto nas variações químicas quanto físicas. A partir disto, pode-se registrar o sinal analítico que se tem interesse. A informação analítica pode ser obtida de diversas maneiras, porém nos casos dos métodos espectrométricos este registro é obtido através de espectros (NUNES, 2008).

Os dados para a calibração multivariada são organizados através dos valores espectrais, cada comprimento de onda, corresponde as variáveis independentes, e as concentrações das amostras indicam as variáveis dependentes (QUEJI, 2008). Inicialmente os dados obtidos devem ser organizados e submetidos a uma avaliação (pré-tratamento), para a escolha adequada do melhor método de análise multivariada (ARAUJO, 2007).

Em muitos casos os dados obtidos são expressos em grandezas diferentes, ou apresentam muitos ruídos, e dependendo do tipo de informações que se deseja extrair, isto poderá comprometer a análise. O pré-tratamento minimiza este tipo de problema na maioria dos casos. Como formas de pré-processamento tem sido utilizadas a normalização, a correção da linha base, a correção multiplicativa de sinal, o escalonamento e filtragem digital para remoção de ruído ou o cálculo da derivada (ARAUJO, 2007).

Outro procedimento bastante utilizado é a seleção de variáveis, o qual permite excluir termos que não são relevantes na modelagem. A seleção de variáveis envolve a escolha de uma determinada região do espectro, que pode ser comprimentos de ondas discretos ou faixas. Várias razões práticas corroboram para a seleção de variáveis, como, por exemplo, a seleção de um subconjunto com um menor número de variáveis, e que apresenta maior sensibilidade e linearidade para os analitos (NUNES, 2008; ARAUJO, 2007).

Os métodos de seleção de variáveis procuram encontrar as variáveis minimamente colineares e correlacionadas que possuam informações do parâmetro de interesse. Desta forma, a modelagem pode ser realizada com base nessas variáveis selecionadas a fim de construir modelos mais simples, eficientes, robustos e de fácil interpretação (ARAUJO, 2007).

O passo seguinte consiste em definir o modelo matemático que melhor estabelece a relação entre o sinal analítico instrumental e a propriedade desejada, determinando o vetor dos coeficientes de regressão (**b**) que melhor reproduz **Ycal** a partir dos dados da matriz **Xcal** (equação A) (1). Esse modelo é usado na fase de validação para estimar as concentrações de novas amostras, a partir de seus espectros (**Xteste**) (equação B) (2). Como estas metodologias utilizam matrizes de dados, a maneira de isolar o fator Y da Equação A para obtenção da Equação B, requer a utilização da matriz transposta de **X**, ou seja, (**Xteste**)^t (QUEJI, 2008).

$$X_{cal} = b \cdot Y_{cal} \quad \text{(Equação A) (1)}$$

$$Y_{teste} = (X_{teste})^t \cdot b \quad \text{(Equação B) (2)}$$

Dentre as metodologias para a determinação do vetor do coeficiente de regressão (**b**), pode-se citar a Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais, baseada na Análise de Componentes Principais, que decompõe a matriz das variáveis independentes **Xcal** (Equação C) (3) e a matriz das variáveis dependentes **Ycal** (Equação D) (4) em outro sistema de eixos (denominados componentes principais, fatores ou variáveis latentes), representando as amostras em um menor número de dimensões, sem que haja perda de informações analíticas (QUEJI, 2008).

As novas coordenadas da amostra são chamadas de *scores* (**T** ou **U**) e o peso que cada variável anterior são chamados de *loadings* (**P** ou **Q**). Posteriormente, realiza-se uma relação entre as duas matrizes de *scores*, das variáveis dependente e independente, através de um modelo linear (Equação E) (5) (QUEJI, 2008).

$$X_{cal} = TP' + E \quad \text{(Equação C) (3)}$$

$$Y_{cal} = UQ' + E \quad \text{(Equação D) (4)}$$

$$U = b \cdot T \quad \text{(Equação E) (5)}$$

A organização dos dados é fundamental para que se possa executar a análise multivariada de maneira correta. Para tanto, alguns fatores precisam ser levados em consideração. Deve-se investigar a forma como os dados foram gerados, os métodos utilizados e a confiabilidade destes dados além da representatividade do grupo de amostras disponíveis. Torna-se desprezível um

conjunto extenso de dados se o grupo de amostras não é representativo o suficiente para fornecer as informações adequadas ao tratamento que se propõe a fazer (ARAUJO, 2007).

O processo de validação tem como finalidade assegurar a capacidade preditiva de um modelo e envolve o estudo quantitativo dos resultados da aplicação do modelo em amostras que não fizeram parte da etapa de calibração. Esta validação pode ser um processo externo, fazendo o uso de um grupo de amostras independentes daquelas usadas na calibração, mas que sejam representativas daquelas e de futuras amostras a analisar, denominado conjunto de validação (NUNES, 2008).

No entanto, pode-se realizar a validação através de processo interno ou validação cruzada. Por este método, divide-se o conjunto de calibração em diversos segmentos. Um dos segmentos é usado para a validação e os outros para a confecção do modelo de calibração. São construídos modelos de acordo com a quantidade de segmentos utilizados, de forma que cada segmento seja excluído do modelo de calibração e utilizado na validação. O modelo final será aquele que apresentar o menor resíduo de concentração (NUNES, 2008).

Sendo a validação cruzada uma metodologia auxiliar na escolha do número de variáveis latentes, a seleção do melhor modelo de calibração ocorre através da avaliação dos menores erros de previsão (Erro Padrão Relativo, % Er), obtido através da Equação F (6):

$$\% Er = ((y \cdot 100) / y') - 100 \quad (\text{Equação F (6)})$$

Onde y é o valor previsto e y' é o valor experimental

Já a Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Calibração (RMSEC, do inglês *Root Mean Square Error of Calibration*) e a Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Validação (RMSECV, do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation*) são importantes medidas obtidas na validação cruzada (QUEJI, 2008).

Além dos parâmetros de erros, que auxiliam na seleção dos modelos de calibração, a análise dos valores dos coeficientes de correlação (R), entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais, permite avaliar a capacidade de previsão dos modelos multivariados (QUEJI, 2008).

A previsão das novas amostras é a etapa do uso do modelo construído e validado para prever as propriedades de interesse nas amostras reais. Para avaliar a capacidade de previsão utiliza-se o PRESS (do inglês *Prediction Residual Error Sum of Squares* – soma dos quadrados dos resíduos dos erros de predição) ou seu valor médio, MSE (do inglês *Mean Squared Error*), obtido dividindo-se o PRESS pelo número de amostras (NUNES, 2008). O PRESS é a soma dos desvios quadrados para os valores conhecidos, o qual pode ser usado para determinar o número ideal de variáveis latentes a serem incluídas no modelo (FERRARINI, 2004).

3.10.2 Métodos de Calibração Multivariada

3.10.2.1 Regressão de mínimos quadrados parciais

A regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês *Partial Least Squares Regression* – PLS) utiliza técnicas de decomposição espectral, onde são consideradas as concentrações das amostras de calibração na decomposição, o que resulta em pesos maiores para espectros com concentrações do analito mais altas e dois conjuntos de vetores e escores, um para os dados espectrais e outro para as concentrações (OLIVEIRA, 2006; NUNES, 2008). Desenvolvida em meados dos anos 60 por Herman O. A. Wold, a regressão por mínimos quadrados parciais foi originalmente voltada para o uso no campo da econometria, sendo então adotada pelo campo da quimiometria. Atualmente a PLS tornou-se uma ferramenta padrão para modelagem de relações lineares entre medições multivariadas (MORELATTO, 2010).

Este método não requer necessariamente o conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras, podendo executar a previsão de amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes na ocasião da confecção do modelo (ARAUJO, 2007).

Durante a etapa de calibração, a modelagem PLS utiliza tanto a informação da matriz de dados (\mathbf{X} - variáveis independentes) quanto da matriz de

concentração (Y - variáveis dependentes), obtendo-se novas variáveis denominadas variáveis latentes, componentes ou fatores (NUNES, 2008; ARAUJO, 2007).

A decomposição de ambas as matrizes não é independente, ocorre simultaneamente, estabelecendo-se uma relação interna entre os *scores* dos blocos X e Y (NUNES, 2008) e como resultado as equações do modelo PLS são complexas (OLIVEIRA, 2006).

As vantagens do PLS são que ele associa a cobertura espectral completa com predição, as calibrações são geralmente mais robustas, podendo ser aplicado em misturas complexas. Porém como desvantagem cabe citar a necessidade de uma adequada seleção das amostras de calibração, pois as mesmas não devem apresentar colinearidade em suas propriedades (OLIVEIRA, 2006).

3.10.2.2 Escolha do número de variáveis latentes

Nas construções dos modelos PLS a escolha do número de variáveis latentes, aquelas geradas a partir das variáveis originais da matriz X , é de suma importância, sendo ideais aquelas que permitem a obtenção de um modelo com boa capacidade de previsão para amostras (MORGANO et al., 2005; TERRA et al., 2014). A seleção do número ótimo de variáveis latentes é primordial na qualidade de um modelo, pois a utilização de um número menor de variáveis latentes poderá fornecer resultados insatisfatórios, uma vez que toda a informação disponível dos dados não estará sendo utilizada (*underfitting*). Por outro lado, ser for utilizada grande quantidade de variáveis latentes, pode evidenciar uma deterioração das análises, pela incorporação de ruídos (*overfitting*) (CONZEN, 2006; ARAUJO, 2007).

O número adequado de variáveis latentes a ser utilizado é aquele que corresponde ao equilíbrio entre o menor erro de previsão sem grande aumento da complexidade do modelo, reduzindo assim a supervalorização como está esquematizado na figura a seguir (Figura 6) (FERRARINI, 2004).

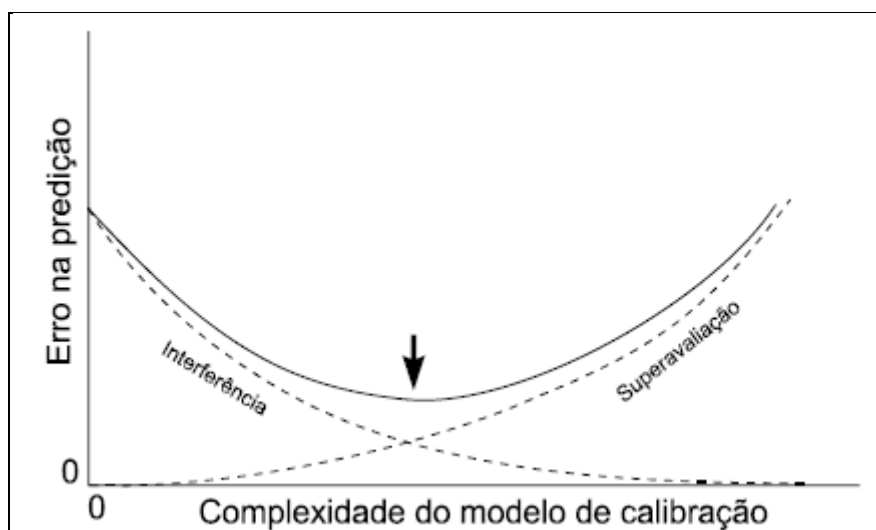


Figura 6 – Seleção do número adequado de VL para a construção de modelos
Fonte: Ferrarini (2004).

Para a determinação do número ideal de variáveis latentes, o método mais utilizado é a validação cruzada. Tal método é baseado na habilidade de previsão de um modelo construído por parte de um conjunto de dados, seguido pela previsão do restante do conjunto de dados, que é realizada pelo modelo construído (ARAUJO, 2007).

A validação cruzada pode ser realizada em blocos, onde um número definido de amostras é deixado de fora no processo de confecção do modelo e a seguir essas amostras são previstas pelo modelo construído, ou ainda por um caso chamado de “leave-one-out” (deixe uma fora por vez), em que apenas uma amostra é retirada do processo de confecção do modelo e em seguida essa amostra é prevista pelo modelo construído. Em ambas as situações, o processo é repetido até que todas as amostras tenham sido previstas e a raiz quadrada do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV) é calculada (CONZEN, 2006; ARAUJO, 2007).

O cálculo é realizado para o número de componentes de 1 a A, e os valores encontrados de RMSECV são representados em gráficos em função do número de variáveis latentes. O perfil para esses gráficos é a observação de um mínimo, que indica o melhor número de variáveis latentes que produziu o menor erro de previsão sem perda significativa da variância dos dados, ou seja, a melhor dimensionalidade do modelo de regressão (ARAUJO, 2007).

3.10.2.3 Detecção de amostras anômalas

A etapa de detecção de amostras anômalas ou *outliers* é tão importante quanto à escolha do número de variáveis latentes (QUEJI, 2008). Consideram-se anomalias os elementos muito diferentes ou que apresentam erros grosseiros quando comparados ao conjunto de dados, por isso torna-se necessária a identificação e a eliminação destes elementos desde o processo de calibração, caso contrário pode-se obter um modelo não representativo (ARAUJO, 2007).

A presença de amostras anômalas no conjunto de calibração pode conduzir a modelos com baixa capacidade de previsão, ou seja, que produzem elevados valores de erro (VALDERRAMA, 2005). Quando presentes no conjunto de validação, os “*outliers*” podem influenciar os resultados, geralmente, levando a resultados que indicam que o modelo é inadequado ou que a sua capacidade é inferior à que poderia ser apresentada na ausência destas amostras anômalas (CONZEN, 2006). Desta forma, a identificação de anomalias é fundamental para a otimização dos conjuntos de calibração e validação, pois a exclusão destes dados permite a construção de modelos mais precisos e eficientes e com melhor capacidade de previsão (VALDERRAMA, 2005).

Várias razões podem explicar a ocorrência das anomalias desde erros instrumentais ou experimentais, como por exemplo, a presença de compostos químicos não pertencentes ao grupo que está em análise ou de diferentes composições químicas, além de outras fontes. Desta maneira, tem-se que as anomalias podem ser provenientes das amostras, das variáveis e da relação entre amostras e variáveis (ARAUJO, 2007).

A forma mais importante de anomalia está relacionada àquela proveniente das amostras. Uma amostra difere da outra por ter uma composição diferente ou por alguma falha instrumental, experimental, etc. Uma variável anômala é proveniente de dados de alguma amostra que difere do conjunto total de calibração por causa de ruídos, erros na medição e/ou métodos inadequados para análise de determinada amostra ou porque ela apresenta alguma propriedade exclusiva (ARAUJO, 2007).

Atualmente tem-se desenvolvido métodos estatísticos robustos que executam a identificação e remoção automática das anomalias. No entanto, este tipo de procedimento requer uma atenção especial, pois em alguns casos a presença de

uma amostra diferente das demais pode trazer, ao invés de erros, informações que não estavam contidas em outros dados (ARAUJO, 2007).

Os métodos utilizados para a análise e determinação de anomalias são baseados nos estudos de “*leverages*” e análise residual, que são medidas quantitativas para avaliar a qualidade de uma análise. A *leverage* é uma medida de influência de uma amostra no modelo de regressão e pode ser interpretada como a distância de uma amostra ao centroide do conjunto de dados (CONZEN, 2006; QUEJI, 2008). Quanto à análise residual, esta corresponde aos desvios entre os dados de referência e os estimados pelo modelo, pois se trata matematicamente da diferença entre os dados experimentais e os dados previstos pelo modelo construído (CONZEN, 2006; ARAUJO, 2007).

4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E MÉTODO

4.1.1 Amostras

Foram coletadas 20 amostras de leite cru na microrregião de Pato Branco no mês de setembro de 2015. Contou-se com o apoio dos laticínios nesta fase do trabalho, pois os próprios estabelecimentos forneceram as amostras solicitadas.

As amostras foram coletadas de acordo com o Manual de Coleta de Amostras do PNCRC/MAPA seguindo as Boas Práticas de Laboratório (MAPA, 2015), onde 500 mL de leite cru refrigerado foram depositados em frasco limpo e seco, após prévia homogeneização do volume de acondicionamento (em torno de 3000 litros de leite), após a identificação de acordo com a procedência do material coletado, foram encaminhados ao laboratório com temperatura inferior a 10 °C.

Dentre as 20 amostras selecionou-se uma, escolha aleatória, para ser utilizada como amostra de referência e empregada na etapa de calibração e validação do modelo construído. A amostra de referência foi avaliada através de uma associação de *kits* de triagem e apresentou-se isenta de antimicrobianos.

Todas as 20 amostras fizeram parte da etapa seguinte, de aplicação do modelo, tendo como intuito o emprego do modelo construído.

Para abranger um maior número de produtores rurais optou-se pelo uso de amostras compostas, ou seja, o leite cru foi coletado dos caminhões transportadores (caminhões tanque isotérmicos), os quais transportam simultaneamente a produção leiteira de vários produtores rurais. Desta forma, o laticínio A forneceu três amostras compostas de produtores rurais do município de Sulina. O mesmo procedimento foi adotado para os demais laticínios, sendo que o laticínio B forneceu amostras de produtores de Pato Branco, Itapejara d'Oeste e Bom Sucesso do Sul, o laticínio C colaborou com amostras de leite de propriedades dos municípios de Saudade do Iguçu, Chopinzinho e Coronel Vivida. Amostras de

leite de São João foram fornecidas pelo laticínio D. E, por fim, o laticínio E contribuiu com amostras de leite de produtores rurais de Mariópolis e Vitorino. Desta forma podem-se abranger todos os dez municípios da microrregião de Pato Branco para que os resultados obtidos pudessem ser representativos e fidedignos à realidade regional.

Todas as 20 amostras de leite cru foram apresentadas com seus laudos de análises laboratoriais realizadas pelos laboratórios de controle de qualidade das indústrias beneficiadoras de leite. A partir da avaliação dos laudos fornecidos observou-se que todas as amostras estavam em conformidade com a legislação vigente (IN 62, de 29 de dezembro de 2011) quanto aos parâmetros de identidade e qualidade do leite cru. Então, foram organizadas de maneira aleatória, ou seja, de uma forma que não fosse possível fazer a correlação entre amostra X estabelecimento fornecedor para que se pudesse preservar a origem das mesmas, uma vez que o intuito do presente trabalho é a avaliação regional, sem especificação pontual do município produtor.

As amostras foram preservadas em temperatura inferior a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ e foram descongeladas, em temperatura ambiente, 24 horas antes do início dos trabalhos laboratoriais. Com o descongelamento lento e gradual houve a necessidade de homogeneização manual, de maneira vigorosa. Na fase seguinte, o leite (amostra de referência) foi manipulado e as análises foram realizadas. Enquanto as amostras regionais empregadas apenas na fase de aplicação dos modelos construídos permaneceram congeladas até o momento da execução as análises.

4.1.2 Aparatos

Os espectros no Infravermelho Próximo com Transformada de *Fourier* foram obtidos através do Analisador FIT-NIR Multipropósito MPA Bruker empregando o *software* Opus/Lab Bruker. Utilizou-se uma resolução espectral de 32 cm^{-1} com acumulação de 64 varreduras, em número de onda no intervalo de 12.500 a 4.000 cm^{-1} e os espectros registrados em triplicata em modo absorbância.

As amostras foram acondicionadas em *vial* de vidro e inseridas no equipamento para leitura espectral conforme instrução do fabricante.

Para os espectros no Infravermelho Médio com Transformada de *Fourier* utilizou-se o equipamento PerkinElmer FT-IR Spectrometer Frontier™ com resolução espectral de 4 cm^{-1} , em número de onda no intervalo de $400 - 4000\text{cm}^{-1}$, sendo o registro realizado em duplicata.

4.1.3 Reagentes e Equipamentos

Os reagentes e equipamentos utilizados estão apresentados no Quadro 1. Vale salientar que todos os reagentes empregados para o preparo das soluções ou para o uso direto nas análises químicas são de grau analítico P.A. As soluções foram preparadas com água ultrapurificada, obtida através do sistema Milli-Q (Milli-Q® Direct 8/16 filtro Millipak® Millipore $0,22\mu\text{m}$), padronizadas conforme a necessidade, e utilizando-se de material volumétrico.

Etapa	Reagentes	Equipamentos
Preparo da solução estoque de antibióticos	Padrões de antibióticos: Cloranfenicol Palm (CRF) lote: SZBC107XV; Sulfadimetoxina (SFD) lote: SZBB028XV; Sulfametazina (SFM) lote: SZBB193XV; Tetraciclina Clor (TTC) lote: SZBA140XV; Ampicilina (AMP) lote: SZBA083XV. Fabricante: Sigma Aldrich Brasil Ltda (SP) Álcool Metílico lote: DCBB 1226; Fabricante: Vetec Química Fina Ltda (RJ)	Balanças analíticas: Sartorius AG CPA2P; Shimadzu AX200; Ultrassom: Ultrasonic Cleaner USC 2800; Agitador de soluções: Phoenix Luferco AP56; Micropipetas: Peguepet micropipetas de alta performance
Espectroscopia no infravermelho		FIT-NIR Multipropósito MPA Bruker; PerkinElmer FT-IR Spectrometer Frontier™
Análise multivariada		Opus/Lab Bruker
Processamento dos dados		Programa OriginPro 6.0

Quadro 1 – Reagentes e equipamentos utilizados nos trabalhos experimentais, em suas respectivas etapas

Fonte: Próprio autor (2015).

4.2 PROCEDIMENTO

No fluxograma a seguir (Figura 7), estão retratadas as etapas referentes ao procedimento executado.

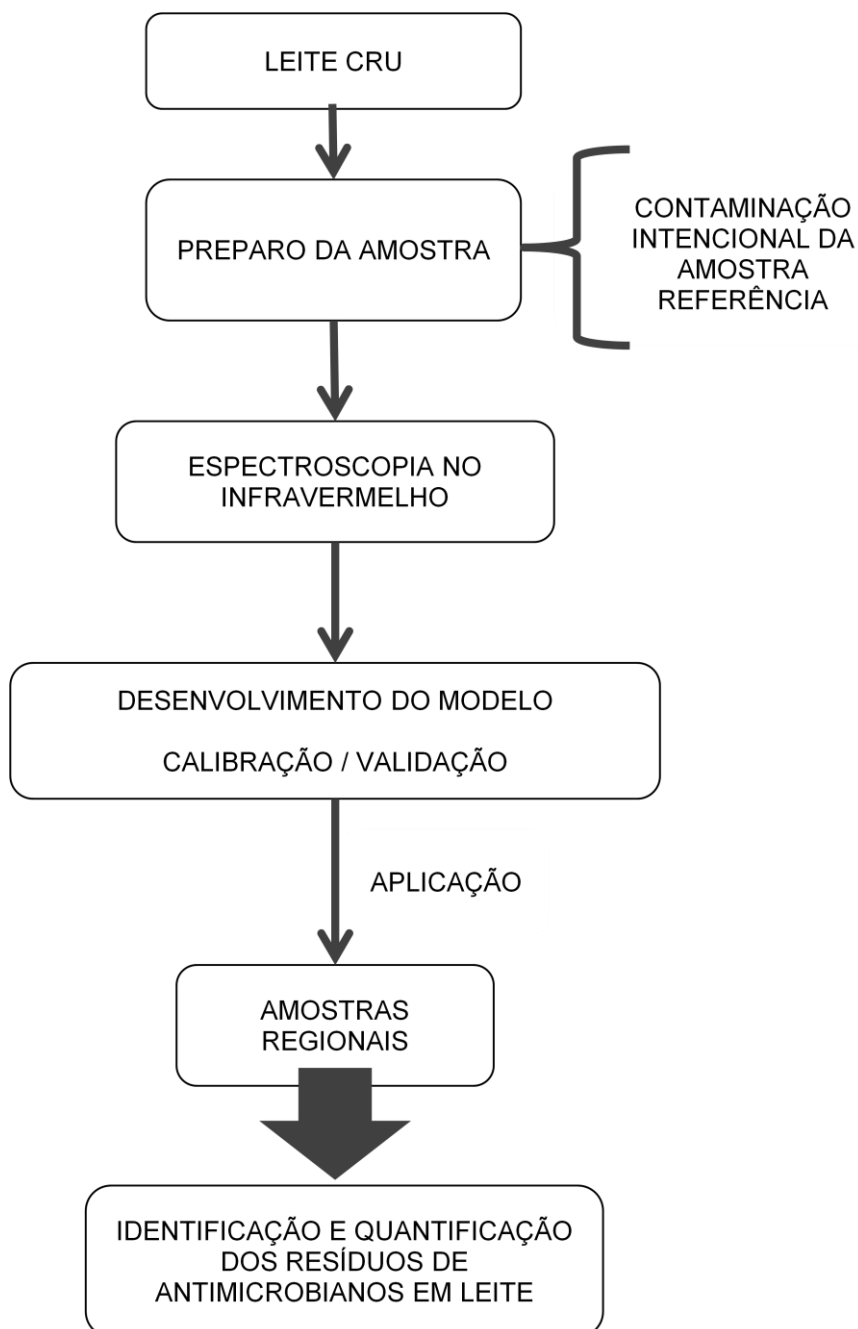


Figura 7 – Fluxograma de elaboração e aplicação dos modelos construídos
Fonte: Próprio autor (2015).

O leite cru adquirido foi submetido a um preparo inicial, onde foram acrescentados os analitos de interesse (antimicrobianos). A esta etapa chamamos de preparo de solução estoque de trabalho, a qual será detalhadamente descrita na sequência.

Em um segundo momento, as amostras de leite cru dopadas intencionalmente com contaminantes foram submetidas às análises por espectroscopia no infravermelho acondicionadas em recipientes próprios e compatíveis com o equipamento. O registro das concentrações das amostras e seus espectros gerados foram armazenados no equipamento, sendo posteriormente resgatados e utilizados para a elaboração do modelo, na etapa de calibração e validação.

Antes mesmo da construção do modelo foram necessários executar alguns passos, como: o pré-processamento dos dados e definição da faixa de melhor frequência. Nesta etapa, importantes parâmetros, como coeficiente de determinação (R^2) e RMSECV e RMSEP são calculados, além da identificação e exclusão das amostras anômalas.

Durante a fase de calibração são calculados os *scores* e os *loadings*, assim o coeficiente de calibração (**b**) é definido. Estes valores ficam armazenados internamente no equipamento e a partir disto o modelo construído pode ser utilizado para avaliar novas amostras, as análises das amostras regionais de leite cru para a identificação e quantificação dos analitos de interesse.

4.3 SOLUÇÃO ESTOQUE DE TRABALHO

A solução estoque de trabalho, composta por cinco diferentes antimicrobianos (TTC, SFM, SFD, CRF e AMP), foi preparada dissolvendo-se os padrões em solvente metanol : água (70 : 30). Fez-se o uso de quantidade suficiente de solvente para solubilizar o soluto. Devido à diferença de solubilidade dos antimicrobianos que variam entre solúvel em água (TTC e SFM), pouco solúvel em água (SFD e AMP), mas solúvel em alcoóis (SFD e CRF), foi necessário o uso de vigorosa agitação com auxílio do agitador de soluções (LIDE, 1964; ANVISA, 2010; EUROPEAN UNION, 2014). Em seguida, esta solução foi vertida e solubilizada em

qsp 100 mL de leite cru, momento onde se utilizou a amostra de referência. Assim obteve-se o leite dopado com os antimicrobianos de interesse, nas concentrações conhecidas.

A solução estoque de trabalho, utilizada para o preparo das amostras para a calibração e validação na construção do modelo, ficou assim composta: Sulfadimetoxina (SFD) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, Ampicilina (AMP) $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, Cloranfenicol (CRF) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, Tetraciclina (TTC) $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Sulfametazina (SFM) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 8).

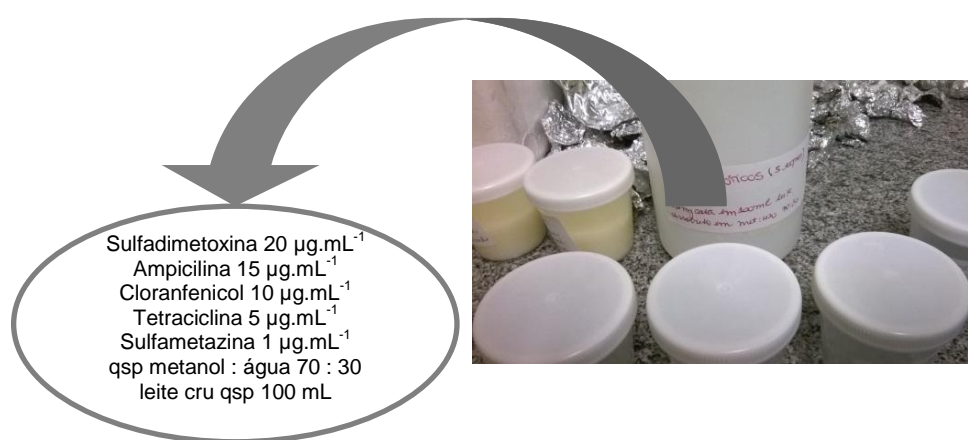


Figura 8 – Composição da solução estoque de trabalho
Fonte: Próprio autor (2015).

4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO

A solução estoque de trabalho foi utilizada para o preparo de 62 amostras de leite dopadas com antimicrobianos, em concentrações crescentes e conhecidas. A seguir está exposto como foram organizadas e manipuladas as amostras para o conjunto de calibração e validação (Figura 9).

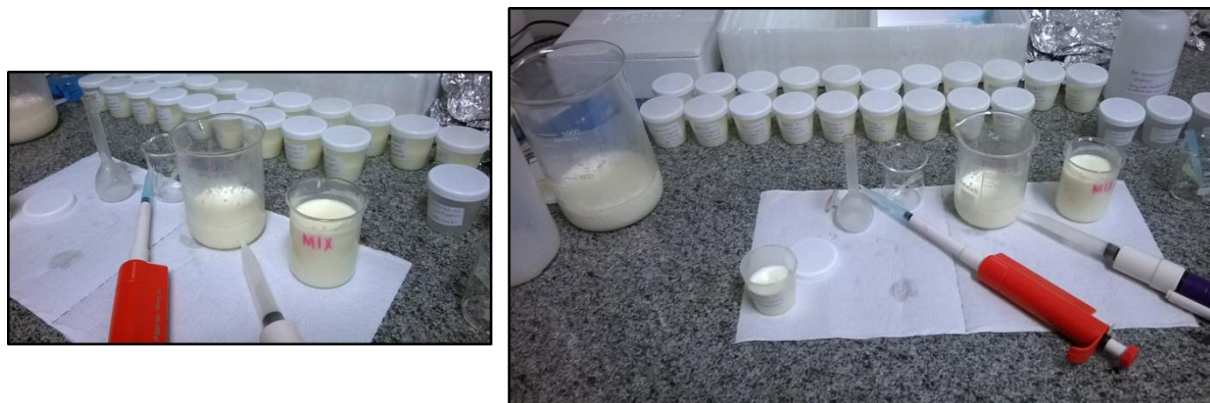


Figura 9 – Preparo das amostras de leite dopadas com a solução estoque de trabalho
 Fonte: Próprio autor (2015).

Foram realizadas sucessivas preparações adicionando a solução estoque de trabalho à qsp 25 mL de leite, obtendo-se 62 amostras de leite cru dopado com antimicrobianos. Na tabela a seguir (Tabela 8) estão as informações referentes a esta etapa do preparo das amostras para o conjunto de calibração e validação.

Tabela 8 – Concentrações crescentes de solução estoque de trabalho, acrescentadas a 25 mL de leite cru, proporcionando contaminações gradativas dos antimicrobianos SFD, AMP, CRF, TTC, SFM em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de leite

(continua)

	Solução Estoque de Trabalho (mL)	SFD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AMP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CRF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TTC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SFM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,025	0,020	0,015	0,010	0,005	0,001
3	0,050	0,040	0,030	0,020	0,010	0,002
4	0,100	0,080	0,060	0,040	0,020	0,004
5	0,150	0,120	0,090	0,060	0,030	0,006
6	0,200	0,160	0,120	0,080	0,040	0,008
7	0,250	0,200	0,150	0,100	0,050	0,010
8	0,300	0,240	0,180	0,120	0,060	0,012
9	0,350	0,280	0,210	0,140	0,070	0,014
10	0,400	0,320	0,240	0,160	0,080	0,016
11	0,450	0,360	0,270	0,180	0,090	0,018
12	0,500	0,400	0,300	0,200	0,100	0,020
13	0,550	0,440	0,330	0,220	0,110	0,022
14	0,600	0,480	0,360	0,240	0,120	0,024

Tabela 8 – Concentrações crescentes de solução estoque de trabalho, acrescentadas a 25 mL de leite cru, proporcionando contaminações gradativas dos antimicrobianos SFD, AMP, CRF, TTC, SFM em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de leite

(continua)

	Solução Estoque de Trabalho (mL)	SFD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AMP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CRF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TTC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SFM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
15	0,650	0,520	0,390	0,260	0,130	0,026
16	0,700	0,560	0,420	0,280	0,140	0,028
17	0,750	0,600	0,450	0,300	0,150	0,030
18	0,800	0,640	0,480	0,320	0,160	0,032
19	0,850	0,680	0,510	0,340	0,170	0,034
20	0,900	0,720	0,540	0,360	0,180	0,036
21	0,950	0,760	0,570	0,380	0,190	0,038
22	1,000	0,800	0,600	0,400	0,200	0,040
23	1,050	0,840	0,630	0,420	0,210	0,042
24	1,100	0,880	0,660	0,440	0,220	0,044
25	1,150	0,920	0,690	0,460	0,230	0,046
26	1,200	0,960	0,720	0,480	0,240	0,048
27	1,250	1,000	0,750	0,500	0,250	0,050
28	1,300	1,040	0,780	0,520	0,260	0,052
29	1,350	1,080	0,810	0,540	0,270	0,054
30	1,400	1,120	0,840	0,560	0,280	0,056
31	1,450	1,160	0,870	0,580	0,290	0,058
32	1,500	1,200	0,900	0,600	0,300	0,060
33	1,550	1,240	0,930	0,620	0,310	0,062
34	1,600	1,280	0,960	0,640	0,320	0,064
35	1,650	1,320	0,990	0,660	0,330	0,066
36	1,700	1,360	1,020	0,680	0,340	0,068
37	1,750	1,400	1,050	0,700	0,350	0,070
38	1,800	1,440	1,080	0,720	0,360	0,072
39	1,850	1,480	1,110	0,740	0,370	0,074
40	1,900	1,520	1,140	0,760	0,380	0,076
41	1,950	1,560	1,170	0,780	0,390	0,078
42	2,000	1,600	1,200	0,800	0,400	0,080
43	2,050	1,640	1,230	0,820	0,410	0,082
44	2,100	1,680	1,260	0,840	0,420	0,084
45	2,150	1,720	1,290	0,860	0,430	0,086
46	2,200	1,760	1,320	0,880	0,440	0,088
47	2,250	1,800	1,350	0,900	0,450	0,090
48	2,300	1,840	1,380	0,920	0,460	0,092

Tabela 8 – Concentrações crescentes de solução estoque de trabalho, acrescentadas a 25 mL de leite cru, proporcionando contaminações gradativas dos antimicrobianos SFD, AMP, CRF, TTC, SFM em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de leite

(conclusão)

	Solução Estoque de Trabalho (mL)	SFD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AMP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CRF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TTC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SFM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
49	2,350	1,880	1,410	0,940	0,470	0,094
50	2,400	1,920	1,440	0,960	0,480	0,096
51	2,450	1,960	1,470	0,980	0,490	0,098
52	2,500	2,000	1,500	1,000	0,500	0,100
53	2,550	2,040	1,530	1,020	0,510	0,102
54	2,600	2,080	1,560	1,040	0,520	0,104
55	2,650	2,120	1,590	1,060	0,530	0,106
56	2,700	2,160	1,620	1,080	0,540	0,108
57	2,750	2,200	1,650	1,100	0,550	0,110
58	2,800	2,240	1,680	1,120	0,560	0,112
59	2,850	2,280	1,710	1,140	0,570	0,114
60	2,900	2,320	1,740	1,160	0,580	0,116
61	2,950	2,360	1,770	1,180	0,590	0,118
62	3,000	2,400	1,800	1,200	0,600	0,120

Fonte: PRÓPRIO AUTOR 2015.

De forma sequencial e de acordo com técnicas analíticas adequadas, regidas pelas Boas Práticas de Laboratório, as preparações foram executadas a partir da menor concentração até atingir a concentração máxima prevista para o estudo, de $2,400 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1,800 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1,200 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,600 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,120 \mu\text{g mL}^{-1}$, para os contaminantes de interesse SFD, AMP, CRF, TTC e SFM, respectivamente. A faixa de concentração utilizada foi definida de acordo com os Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos em legislação para alimentos, já mencionados no item 3.7 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR) (ANVISA, 2009).

4.5 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A metodologia estatística empregada para o desenvolvimento dos modelos de calibração dos dados do presente estudo é a por Regressão por

Mínimos Quadrados Parciais (PLS) que foi responsável por relacionar concentração e espectros das amostras. Para a construção dos modelos de calibração multivariada foi empregado o *software* Opus/Lab Bruker e no desenvolvimento de gráficos e figuras ilustrativas o Origin Pro 6.0.

Na construção dos modelos foram utilizados espectros oriundos das replicatas, organizados em uma matriz de dados, que foram correlacionadas a um vetor que armazena as concentrações médias dos antimicrobianos em estudo. Dentre o número total de espectros lidos, aproximadamente dois terços (2/3) foram empregados na fase de calibração do modelo e um terço (1/3) para a fase de validação externa.

Os espectros foram inicialmente centrados na média e posteriormente foram utilizados pré-processamentos, em alguns casos. Para determinar o número ideal de variáveis latentes dos modelos foi aplicado o método de validação cruzada, sendo escolhido o número de variáveis latentes que apresentou o menor erro sem perda da dimensionalidade do modelo de regressão.

Para avaliar o desempenho dos modelos desenvolvidos, as seguintes figuras de mérito foram observadas: erros quadráticos médios (RMSEE - *Root Mean Square Error*), de calibração (RMSEC), de validação cruzada (RMSECV), assim como o R^2 e RPD. A presença ou ausência de “*outliers*” foi verificada visualmente por meio da utilização dos gráficos de normalidade de resíduos.

Os modelos foram executados no *software* do próprio equipamento e as amostras utilizadas na calibração e validação foram escolhidas pelo programa, assim foram selecionadas as regiões e pré-processamentos que forneceram os valores mais indicados para a geração das figuras de mérito.

4.6 APLICAÇÃO DOS MODELOS CONSTRUÍDOS

Para avaliação da capacidade dos modelos em realizar a quantificação dos analitos de interesse, os mesmos foram aplicados em amostras de leite cru coletadas na microrregião de Pato Branco. De maneira simples e rápida as amostras foram analisadas individualmente, em triplicata, e os dados foram armazenados no equipamento para posterior avaliação.

4.7 GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS

A gestão dos resíduos gerados durante todas as fases do trabalho foi realizada de acordo com o Regulamento de Gestão de Resíduos Institucionais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, o qual é competência do Departamento de Administração da Sede e de corresponsabilidade de toda comunidade universitária (UTFPR Pato Branco, 2011).

Com o propósito de reduzir o impacto negativo sobre o ambiente e minimizar volumes de resíduos, o Regulamento de Gestão de Resíduos Institucionais preconiza que a recolha, o transporte, o armazenamento, a eliminação ou a contratação de empresas para gestão dos resíduos especiais, dentre eles resíduos líquidos, sólidos ou gasosos perigosos gerados em laboratório, é responsabilidade de seus geradores (UTFPR Pato Branco, 2014).

Desta forma utilizou-se das diretrizes do Plano de Gestão e Resíduos de Laboratórios de Química, da UTFPR, Campus Pato Branco, para dar o destino correto ao material residual do presente estudo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AMOSTRAGEM

Abaixo estão relacionadas as amostras de leite cru com os resultados das análises laboratoriais realizadas pelos laticínios em seus laboratórios de controle de qualidade (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados laboratoriais das amostras compostas de leite cru fornecidos pelos laboratórios de controle de qualidade dos laticínios

Amostra	Organolépticas	G	A T	D Rel	I C	EST	T	Antibiótico
1	C	C	C	C	C	C	C	ND
2	C	C	C	C	C	C	C	ND
3	C	C	C	C	C	C	C	ND
4	C	C	C	C	C	C	C	ND
5	C	C	C	C	C	C	C	ND
6	C	C	C	C	C	C	C	ND
7	C	C	C	C	C	C	C	ND
8	C	C	C	C	C	C	C	ND
9	C	C	C	C	C	C	C	ND
10	C	C	C	C	C	C	C	ND
11	C	C	C	C	C	C	C	ND
12	C	C	C	C	C	C	C	ND
13	C	C	C	C	C	C	C	ND
14	C	C	C	C	C	C	C	ND
15	C	C	C	C	C	C	C	ND
16	C	C	C	C	C	C	C	ND
17	C	C	C	C	C	C	C	ND
18	C	C	C	C	C	C	C	ND
19	C	C	C	C	C	C	C	ND
20	C	C	C	C	C	C	C	ND

Fonte: PRÓPRIO AUTOR 2015.

Notas:

Organolépticas = características do leite como cor, odor e aspecto.

G = gordura total (> 3,0 g/100g)

A T = acidez titulável (0,14 a 0,18 g/100mL)

D Rel = densidade relativa (1,028 a 1,034 g/mL)

IC = índice crioscópico (- 0,512 a - 0,531 °C)

EST = extrato seco total (> 11,4 g/100g)

Antibiótico = teste de triagem (*kit* comercial)

T = temperatura em °C, no momento da coleta (< 10,0 °C)

C = conforme

NC = não conforme

ND = não detectado

Os resultados expressos na Tabela 9 foram fornecidos com as amostras e sinalizam que todas as 20 amostras estão em condições de consumo e/ou processamento industrial, pois respeitam os parâmetros de qualidade exigidos pela IN n ° 62/2011.

Para a avaliação de aspecto organoléptico, o analista avalia cor, odor e aspecto e atribui a condição de conformidade se todos os três quesitos estão em condições normais e característicos de leite. Para os atributos: gordura total, acidez titulável, densidade relativa, índice crioscópico e extrato seco total as análises realizadas determinam o teor de cada um destes itens presente no leite e o leite analisado deve respeitar faixas de concentrações, definidos por legislação, para ser considerado conforme/aprovado. Os limites exigidos são: gordura total superior a 3,0 g/100g; acidez titulável entre 0,14 a 0,18 g/100mL; densidade relativa na faixa de 1,028 a 1,034 g/mL; índice crioscópico entre - 0,512 e - 0,531 °C e extrato seco total superior a 11,4 g/100g (BRASIL, 2011).

Para mensurar a temperatura, utilizam-se termômetros aferidos e calibrados de acordo com cronogramas do próprio laboratório de controle de qualidade e o resultado esperado é a temperatura estar abaixo de 10,0 °C na chegada do leite à plataforma de recebimento do laticínio (BRASIL, 2011).

A avaliação de presença de antibiótico na amostra é feita pelo método de triagem, utilizando *kits* comerciais aprovados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A análise é qualitativa e o resultado apresentado deve ser conforme, ou seja, não haver a detecção do analito pesquisado (BRASIL, 2011).

5.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO APLICADA À ANÁLISE DE LEITE

Na realização do estudo espectroscópico, foram analisadas diversas amostras preparadas com distintas concentrações de antimicrobianos através da espectroscopia no infravermelho próximo em regiões de maior sensibilidade para estes contaminantes ($4000 - 9000 \text{ cm}^{-1}$). Porém, para caracterização do perfil espectroscópico estão apresentados na Figura 10, os espectros de infravermelho médio do leite cru puro e do leite cru com antibióticos (SFD, AMP, CRF, TTC e SFM todos em concentrações de $1,60 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente.

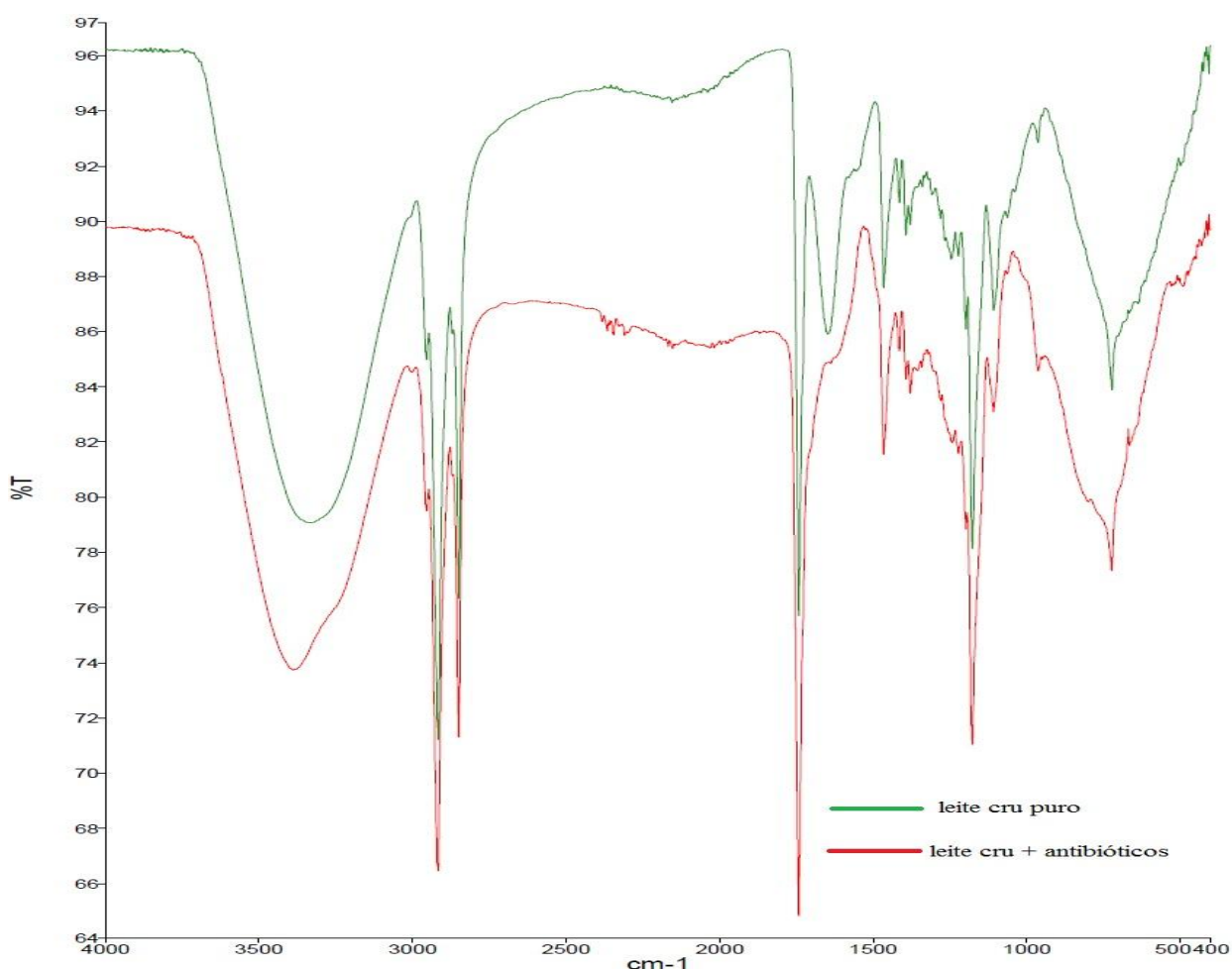


Figura 10 – Espectros no infravermelho médio para caracterização da amostra de leite cru
Fonte: Próprio autor (2016).

Em ambos os espectros é possível identificar a presença de frequências típicas referentes a características estruturais das moléculas orgânicas do leite, como por exemplo, os estiramentos simétricos em 3438 cm^{-1} atribuído ao grupamento --OH , em 1747 cm^{-1} atribuído ao grupamento C=O , grupamento que proporciona uma forte absorção na região de $1820\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$, com pico forte e de largura média, e assimétrico em $2927\text{--}2925\text{ cm}^{-1}$ atribuído ao grupamento CH_2 , todos presentes em moléculas de gordura constituinte da amostra de leite. As bandas de forte intensidade próximas a $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ remetem ao grupamento éster, igualmente perceptível no espectro de caracterização da amostra (leite) (PAVIA et al., 2010; LEI et al., 2010).

Outras frequências menores na região de $800\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$ e na região de 700 cm^{-1} também presentes nos espectros podem ser atribuídas a grupamentos pertencentes a moléculas de carboidratos e proteínas, respectivamente (LEI et al., 2010).

5.3 MODELOS CONSTRUÍDOS PARA OS ANTIMICROBIANOS DE INTERESSE

5.3.1 Tetraciclina

Foi possível calcular o número de variáveis latentes a serem utilizadas nos modelos de calibração para a tetraciclina (TTC) através da validação cruzada. O número ideal de variáveis latentes foi 5, ou seja, aquele que proporcionou a melhor dimensionalidade do modelo de regressão (Figura 11) (ARAUJO, 2007).

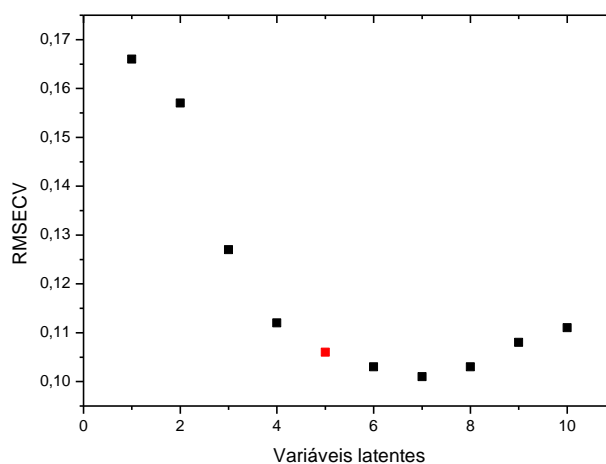


Figura 11 – Determinação do número de VL para Tetraciclina
Fonte: Próprio autor (2016).

Quanto às amostras anômalas, elementos muito diferentes ou que apresentam erros grosseiros quando comparados ao conjunto de dados (ARAUJO, 2007), foram identificadas e excluídas 9 para o modelo TS e 19 para o CV. A eliminação destes *outliers* faz-se necessária para que se obtenham modelos com maior eficiência e precisão.

Os resultados das figuras de mérito dos modelos de calibração multivariada para a Tetraciclina (TS e CV) encontram-se descritos na Tabela 10.

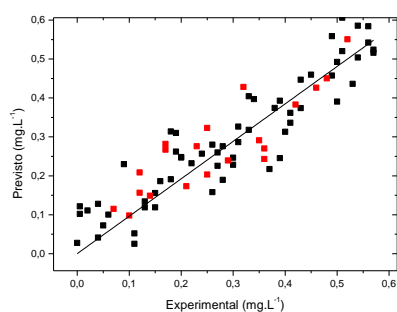
Tabela 10 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para TTC

Modelo	Pré- Processamento	Conjunto de Calibração			Conjunto de Validação			Região
		R ²	RMSEE	RPD	R ²	RMSEP /CV	RPD	
CONJUNTO DE TESTE								
TTC- TS	<i>Multiplicative scattering correction</i>	92,24	0,0499	3,59	67,24	0,0754	1,75	6102.1- 4597.8
VALIDAÇÃO CRUZADA								
TTC- CV	Nenhum	95,62	0,0386	4,78	62,56	0,1060	1,64	6102.1- 5446.4

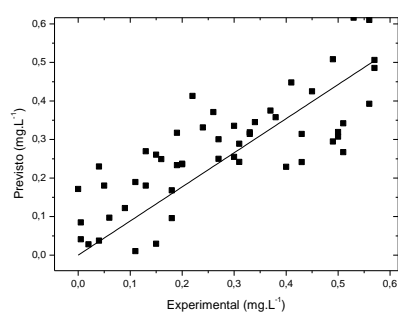
Fonte: PRÓPRIO AUTOR 2016.

O modelo TTC-CV para Tetraciclina apresentou melhores valores de figuras de mérito em comparação com o TTC-TS para o conjunto de calibração. O baixo valor do erro quadrático (RMSEE) e elevados valores para R² e RPD (> 2,0) conferem maior eficiência para aplicação com poder de predição (NICOLAI et al., 2007). Para o conjunto de validação o perfil inverte-se, há melhores resultados provenientes do modelo TTC-TS.

Por meio das Figuras 12 e 13 podem ser visualizados os gráficos de correlação entre o valor experimental e o valor previsto, bem como a relação entre os resíduos e as frequências absolutas para os modelos desenvolvidos pelos métodos TS e CV para a Tetraciclina. Os modelos foram construídos a partir de 53 espectros para a calibração e 34 para a validação.

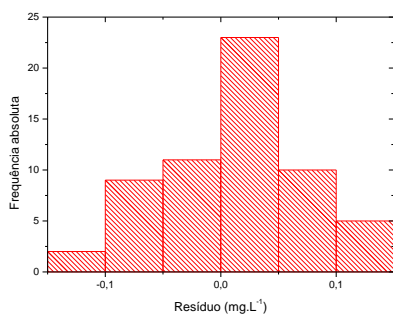


TTC-TS

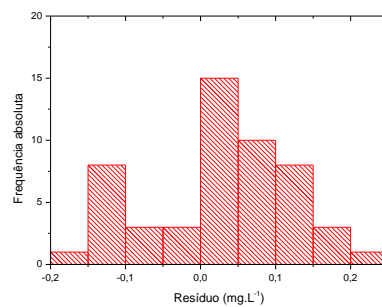


TTC-CV

Figura 12 – Valor experimental X Valor previsto para TTC-TS e TTC-CV
 Fonte: Próprio autor (2016).



TTC-TS



TTC-CV

Figura 13 – Histograma de resíduos para os modelos TTC-TS e TTC-CV
 Fonte: Próprio autor (2016).

Ambos os modelos apresentaram boa dispersão dos pontos ao longo da curva linear (Figura 12). Esta maior proximidade dos valores com a curva linear evidencia a boa correlação entre os valores experimentais e os valores previstos. Conforme pode ser observado na Figura 13, a distribuição de resíduos representada pelo histograma TTC-TS e TTC-CV, o modelo TTC-TS apresentou um aspecto harmonioso superior ao modelo TTC-CV, tendendo a normalidade.

5.3.2 Sulfametazina

O número de variáveis latentes para os modelos de calibração para Sulfametazina (SFM) é 1 (Figura 14). A determinação deste valor se deu através da validação cruzada. A determinação do número de variáveis latentes está relacionada ao melhor número de fatores que produz o menor erro de previsão sem perda significativa da variância dos dados (ARAUJO, 2007).

Após esta definição, do número de fatores, faz-se necessário a identificação e segregação das amostras anômalas. Foram excluídos 28 e 29 *outliers* para os métodos TS e CV, respectivamente.

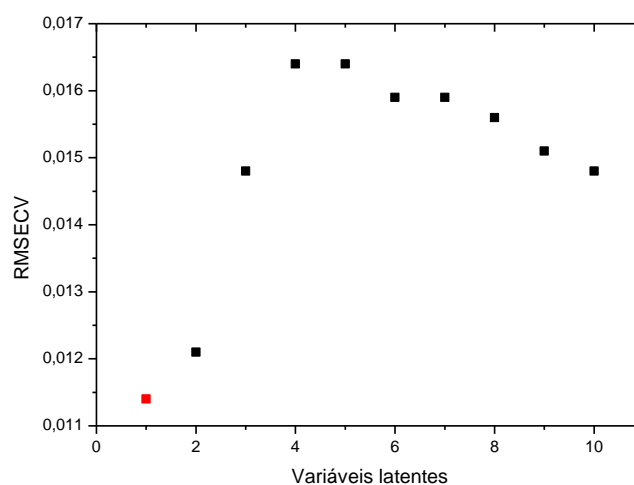


Figura 14 - Determinação do número de VL para Sulfametazina
Fonte: Próprio autor (2016).

A Tabela 11 expõe os dados comparativos para os modelos SFM-TS e SFM-CV, para o conjunto de calibração e validação. Ambos os modelos foram pré-processados por *Min-max normalization* e apresentaram valores muito próximos entre si para todas as figuras de mérito. Os valores de RPD do conjunto de calibração para ambos os modelos foi inferior a 2,0, resultado este considerado ruim, pois não garante a boa eficiência e um poder de predição confiável.

Tabela 11 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para SFM

Modelo	Pré- Processamento	Conjunto de Calibração			Conjunto de Validação			Região
		R ²	RMSEE	RPD	R ²	RMSEP /CV	RPD	
CONJUNTO DE TESTE								
SFM- TS	<i>Min-max normalization</i>	71,98	0,0108	1,89	65,62	0,0120	1,97	9403.9- 7498.4 e 6102.1- 5446.4
VALIDAÇÃO CRUZADA								
SFM- CV	<i>Min-max normalization</i>	73,73	0,0106	1,95	67,74	0,0114	1,76	9403.9- 7498.4 e 6102.1- 5446.4

Fonte: PRÓPRIO AUTOR 2016.

Nas Figuras 15 e 16 estão expressos os gráficos que relacionam o valor experimental em função do valor previsto e os resíduos *versus* a frequência absoluta para os modelos SFM-TS e SFM-CV, respectivamente. A confecção dos modelos foi feita a partir de 53 espectros para calibração e 24 para validação.

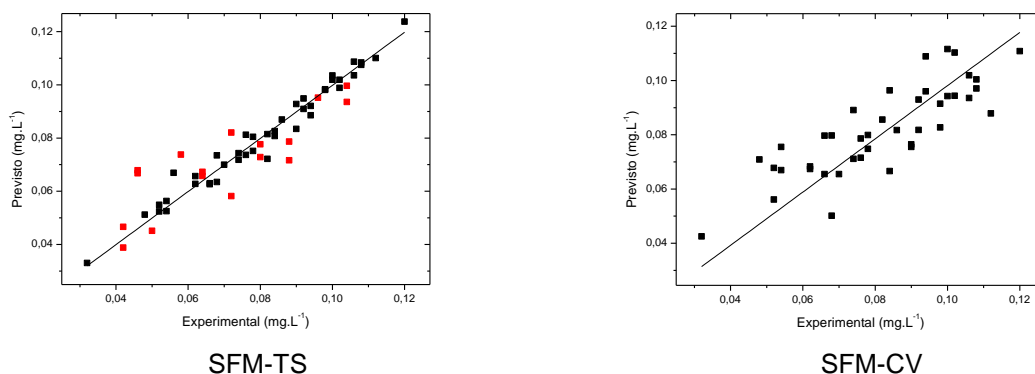


Figura 15 – Valor experimental X Valor previsto para SFM-TS e SFM-CV
Fonte: Próprio autor (2016).

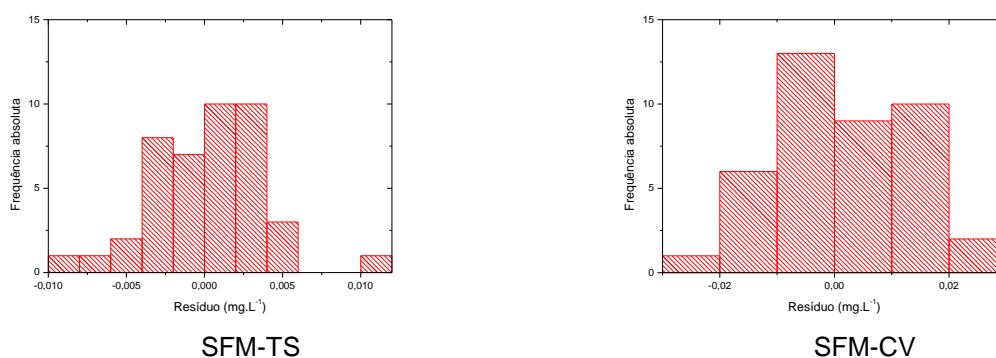


Figura 16 – Histograma de resíduos para os modelos SFM-TS e SFM-CV
Fonte: Próprio autor (2016).

Ambos os modelos apresentaram boa distribuição dos pontos no gráfico que correlaciona valores experimentais e valores previstos (Figura 15).

Através da Figura 16 podem-se observar os histogramas de resíduos dos modelos propostos para Sulfametazina. O perfil apresentado pelos modelos SFM-TS e SFM-CV não conferem uma boa distribuição.

5.3.3 Sulfadimetoxina

Por meio da validação cruzada foi calculado o número de variáveis latentes a serem incluídas nos modelos de calibração para a Sulfadimetoxina (SFD), sendo 4 o número em que houve o menor valor de RMSECV, sem perdas significativas na variância dos dados (Figura 17).

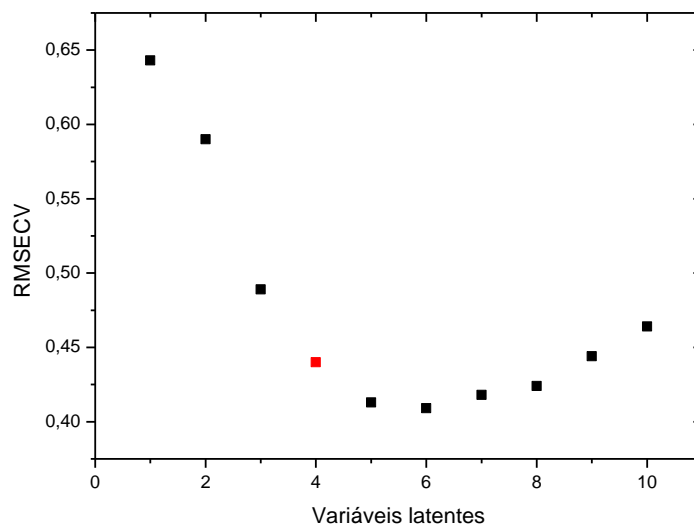


Figura 17 - Determinação do número de VL para Sulfadimetoxina
Fonte: Próprio autor (2016).

Determinado o número de variáveis latentes, foi analisada a presença de amostras com comportamento *outliers* e excluídas da construção dos modelos. Para o método TS, 9 *outliers* foram detectados e retirados do conjunto de dados, por outro lado, para o método CV foram excluídos 15 espectros com comportamento diferenciado.

Os resultados para a comparação da utilização de diferentes métodos de validação no desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada para Sulfadimetoxina com 4 variáveis latentes são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para SFD

Modelo	Pré- Processamento	Conjunto de Calibração			Conjunto de Validação			Região
		R ²	RMSEE	RPD	R ²	RMSEP /CV	RPD	
CONJUNTO DE TESTE								
SFD- TS	<i>Multiplicative scattering correction</i>	88,20	0,24	2,91	78,71	0,25	2,26	6102.1- 4597.8
VALIDAÇÃO CRUZADA								
SFD- CV	Nenhum	92,52	0,19	3,66	57,83	0,44	1,54	6102.1- 5446.4

Fonte: PRÓPRIO AUTOR 2016.

O modelo SFD-CV para Sulfadimetoxina apresentou, para o conjunto de calibração, todos os valores de figuras de mérito melhores do que o SFD-TS, sendo o R², significativamente, superior e RPD superior a 2,0, o que lhe confere maior eficiência para aplicação com excelente poder de predição (NICOLAI et al., 2007). Para o conjunto de validação não se observa o mesmo perfil de desempenho.

Nas Figuras 18 e 19 são apresentados os gráficos da relação entre os valores experimentais e os valores previstos pelos modelos para conjunto de dados e dos resíduos *versus* a frequência absoluta para os modelos SFD-TS e SFD-CV, respectivamente. O modelo foi construído utilizando 53 espectros para a calibração e 38 para validação.

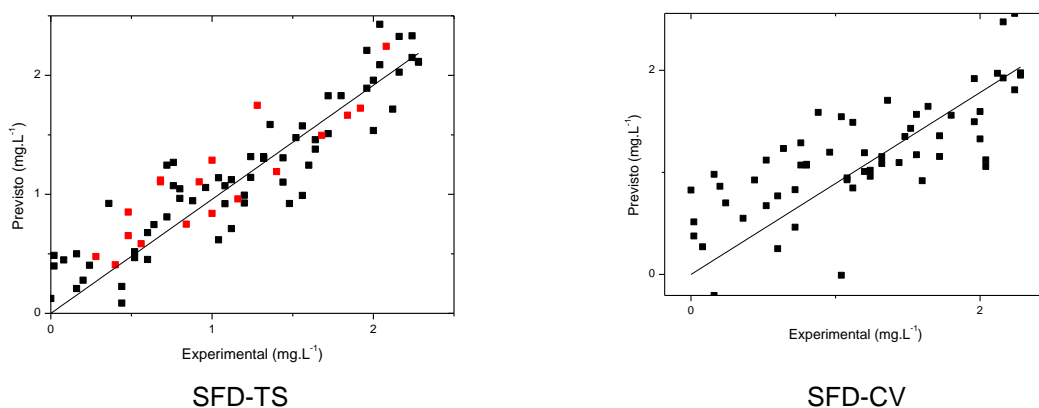


Figura 18 – Valor experimental X Valor previsto para SFD-TS e SFD-CV
Fonte: Próprio autor (2016).

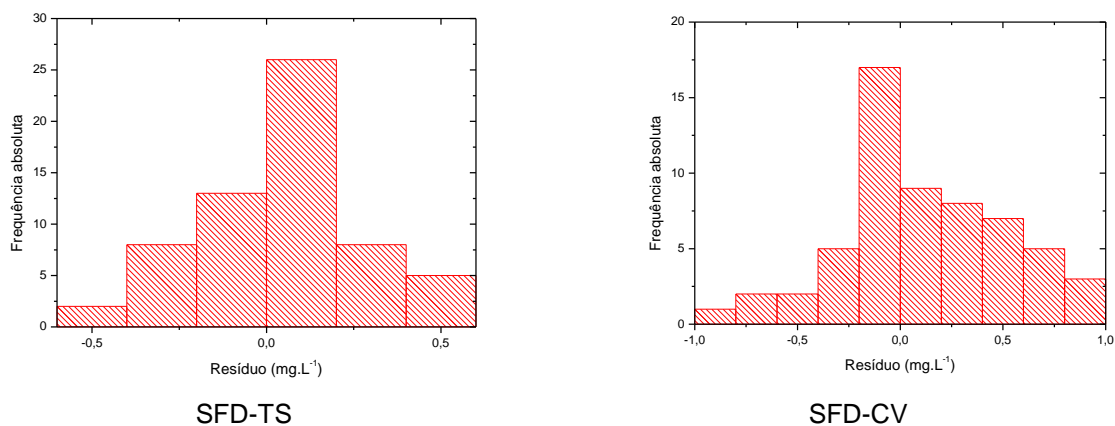


Figura 19 - Histograma de resíduos para os modelos SFD-TS e SFD-CV
Fonte: Próprio autor (2016).

Para o modelo SFD-TS, nota-se uma relativa distribuição uniforme de pontos entre as concentrações de 0,0 e 2,4 mg.L⁻¹, similar à distribuição do modelo SFD-CV, com boa correlação entre os valores experimentais e previstos, os quais se aproximam curva linear (Figura 18). Conforme pode ser observado na Figura 19, a distribuição de resíduos ilustrada pelo histograma para o modelo SFD-CV apresentou um perfil de normalidade relativamente superior.

5.3.4 Cloranfenicol

Através da validação cruzada foi estimado o número de variáveis latentes para construção do modelo de calibração para o Cloranfenicol (CRF). Obteve-se o número de 4 variáveis latentes como está representado graficamente na Figura 20, por apresentar o menor valor de RMSECV sem grande aumento da complexidade do modelo.

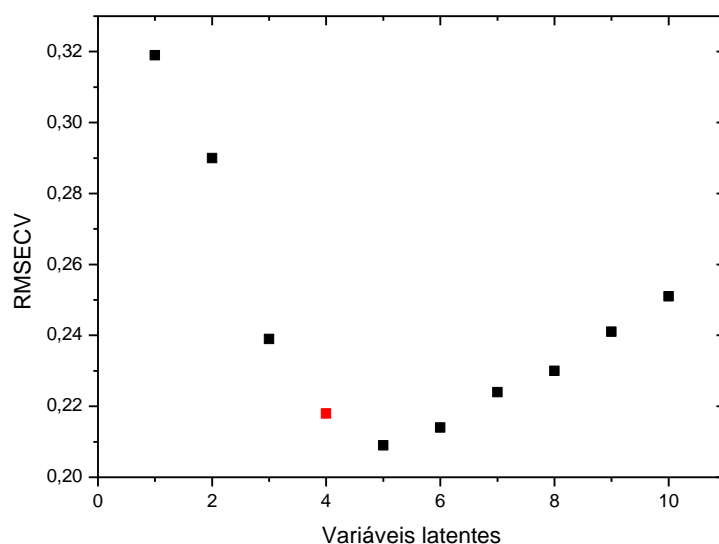


Figura 20 – Determinação do número de VL para Cloranfenicol
Fonte: Próprio autor (2016).

Após a determinação do número de variáveis latentes, foi considerada a presença de amostras com comportamentos anômalos (*outliers*) e identificadas para a exclusão do conjunto de dados. Esta avaliação das amostras anômalas é de fundamental importância para a construção de modelos precisos e eficientes, do contrário podem-se obter modelos não representativos (ARAUJO, 2007). Para o método TS, foram detectadas 9 amostras com comportamento diferenciado e, então, foram excluídas do conjunto amostral, enquanto para o método CV foram excluídos 14 *outliers*. Os modelos foram confeccionados a partir de 53 espectros para calibração e 39 para validação.

A tabela a seguir (Tabela 13) expressa os resultados obtidos a partir dos diferentes métodos de calibração (TS e CV) no desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada para Cloranfenicol.

Tabela 13 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para CRF

Modelo	Pré- Processamento	Conjunto de Calibração			Conjunto de Validação			Região
		R ²	RMSEE	RPD	R ²	RMSEP /CV	RPD	
CONJUNTO DE TESTE								
CRF- TS	<i>Multiplicative scattering correction</i>	87,93	0,1210	2,88	79,39	0,126	2,34	6102.1- 4597.8
VALIDAÇÃO CRUZADA								
CRF- CV	Nenhum	91,97	0,0995	3,53	57,87	0,218	1,54	6102.1- 5446.4

Fonte: PRÓPRIO AUTOR 2016.

O modelo CRF-CV para Cloranfenicol ofereceu os melhores valores, quando comparado ao CRF-TS, para o conjunto de calibração, com excelente desempenho do modelo CRF-CV, observados pelos valores das figuras de mérito obtidos. Conforme observado para outros antimicrobianos avaliados no presente trabalho, o uso do pré-processamento *Multiplicative scattering correction*, embora melhore as figuras de mérito do conjunto de validação, afeta negativamente àquelas pertencentes ao conjunto de calibração. Considerando que estas últimas estão diretamente relacionadas a qualidade de predição analítica, os modelos com melhor *performance* neste conjunto foram priorizados.

A Figura 21 apresenta os gráficos que relacionam os valores experimentais *versus* os valores previstos pelos modelos TS e CV para o conjunto de dados.

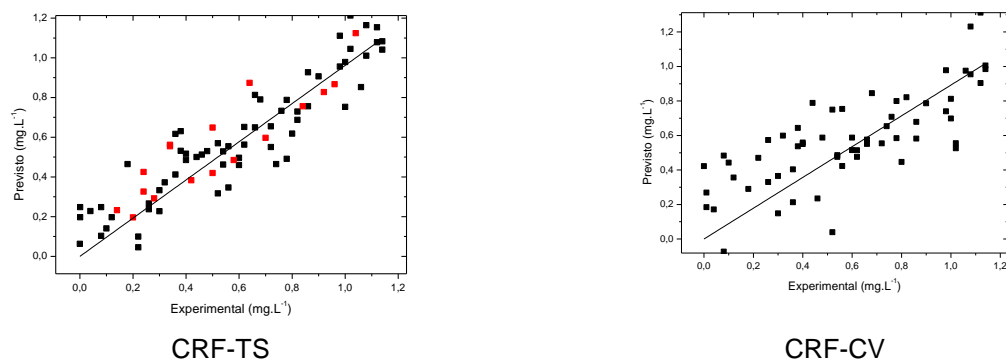


Figura 21 – Valor experimental X Valor previsto para CRF-TS e CRF-CV
Fonte: Próprio autor (2016).

A representação gráfica dos resíduos *versus* frequência absoluta está na Figura 22, através de histogramas, para TS e CV, respectivamente.

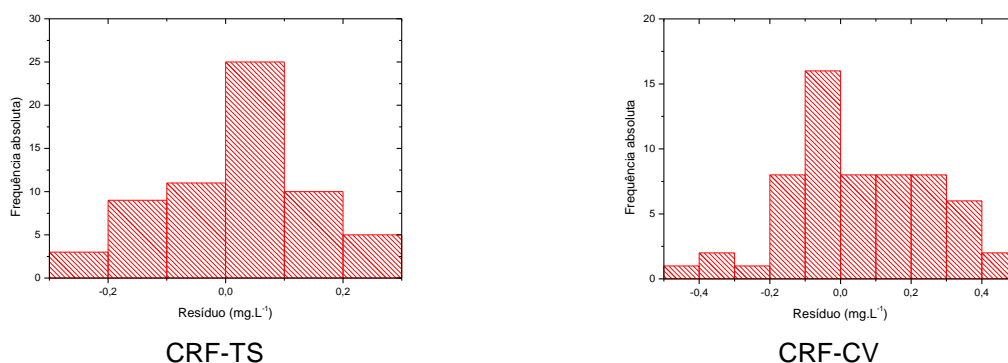


Figura 22 – Histograma de resíduos para os modelos CRF-TS e CRF-CV
Fonte: Próprio autor (2016).

Há uma boa distribuição com relativa linearização dos pontos nos modelos CRF-TS e CRF-CV, sendo um indicativo de modelos com capacidade preditiva regular (Figura 21). Com relação aos histogramas observados na Figura 22, evidencia-se um contorno mais próximo da normalidade no CRF-TS, quando comparado CRF-CV.

5.3.5 Ampicilina

A validação cruzada fornece subsídios para a determinação do número de variáveis latentes ou fatores. Para os modelos de calibração para Ampicilina (AMP) o número de variáveis latentes é 1 (Figura 23). Por ser um número de variáveis latentes muito baixo, podem-se obter modelos inadequados, uma vez que toda a informação disponível não está sendo aproveitada (*underfitting*) (CONZEN, 2006; ARAUJO, 2007).

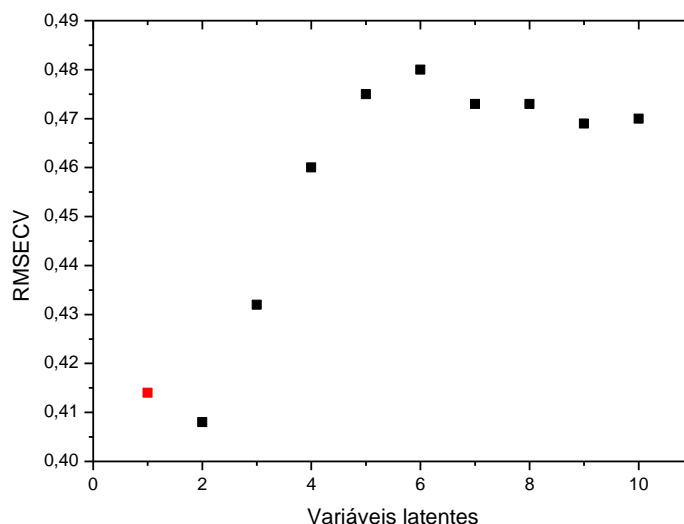


Figura 23 – Determinação do número de VL para Ampicilina
Fonte: Próprio autor (2016).

Na etapa de detecção de amostras anômalas, muito importante para a construção dos modelos, foram identificadas e excluídas 6 *outliers* para o método TS e 14 *outliers* para o método CV. A presença destas amostras com comportamento diferenciado no conjunto de calibração pode induzir a modelos com baixa capacidade de previsão, por isso a exclusão das mesmas (VALDERRAMA, 2005).

Dados comparativos entre o modelo TS e CV para Ampicilina são expostos na Tabela 14. Mesmo com a utilização de diferentes tipos de pré-processamento, *Min-Max Normalization* para TS e *Straight Line Subctration* para CV, os resultados não foram bons, pois apresentaram baixos valores de R^2 e RPD e

elevados valores de RMSEE, tanto para o conjunto de calibração quanto para o de validação.

Tabela 14 – Resultados para os modelos de calibração multivariada para AMP

Modelo	Pré- Processamento	Conjunto de Calibração			Conjunto de Validação			Região
		R ²	RMSEE	RPD	R ²	RMSEP /CV	RPD	
CONJUNTO DE TESTE								
AMP- TS	<i>Min-max normalization</i>	41,44	0,416	1,31	30,26	0,341	1,20	9403.9- 7498.4 e 5454.1- 4597.8
VALIDAÇÃO CRUZADA								
AMP- CV	<i>Straight line subtraction</i>	67,37	0,302	1,75	36,94	0,414	1,26	9403.9- 7498.4 e 5454.1- 4597.8

Fonte: PRÓPRIO AUTOR 2016.

Nas Figuras 24 e 25 estão expostos os gráficos que relacionam o valor experimental com o valor previsto e os histogramas dos resíduos *versus* a frequência absoluta para os modelos AMP-TS e AMP-CV, respectivamente. Na construção dos modelos foram utilizados 53 espectros para a calibração e 39 para validação.

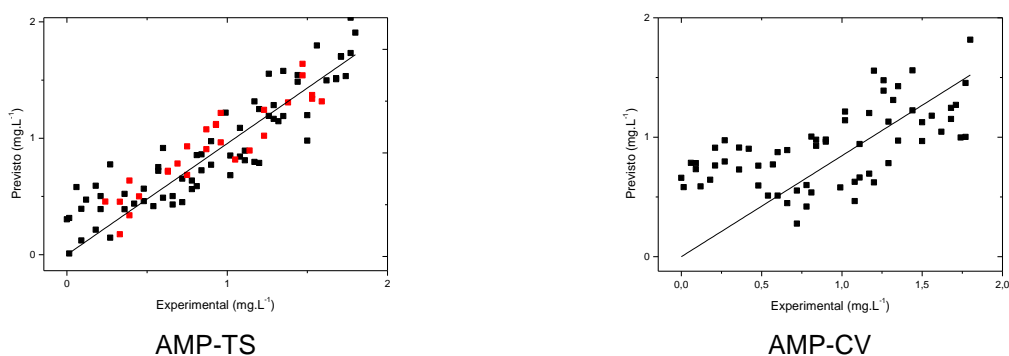


Figura 24 – Valor experimental X Valor previsto para AMP-TS e AMP-CV
Fonte: Próprio autor (2016).

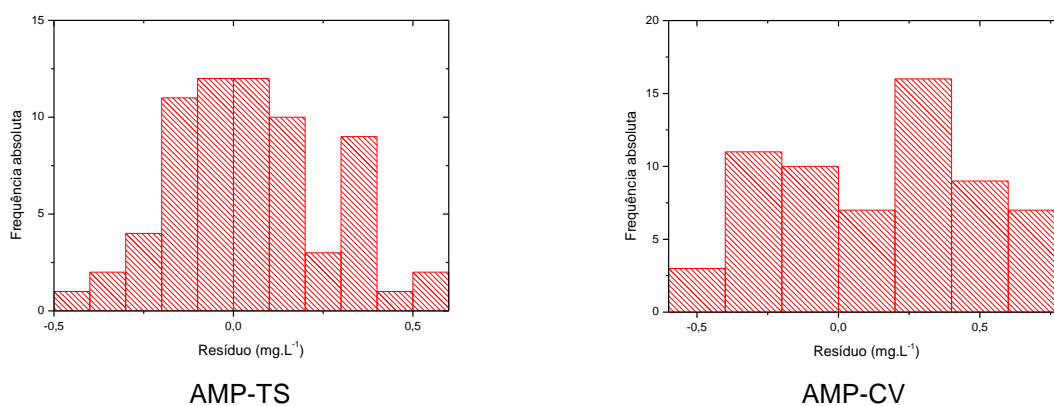


Figura 25 - Histograma de resíduos para os modelos AMP-TS e AMP-CV
Fonte: Próprio autor (2016).

Para o modelo AMP-TS percebe-se uma distribuição uniforme dos pontos dos valores experimentais e dos valores previstos, quando comparada ao modelo AMP-CV. Graficamente nota-se que os pontos tendem a se aproximar da curva linear, enquanto no modelo AMP-CV há uma maior dispersão gráfica (Figura 24).

Na Figura 25 estão expostos os histogramas de AMP-TS e AMP-CV, respectivamente. Observa-se que, entre eles, o histograma da esquerda (AMP-TS) possui um aspecto mais próximo da normalidade, porém não ideal, representando melhor a distribuição dos resíduos em função da frequência absoluta, quando comparado ao histograma do modelo AMP-CV.

5.4 ANÁLISE DO LEITE CRU DA MICRORREGIÃO DE PATO BRANCO

5.4.1 Aplicação dos Modelos de Calibração

O modelo de regressão, para ser ideal, deve obedecer alguns critérios, quanto ao erro gerado na fase de calibração: R^2 deve ser o mais próximo possível de 1 (100) e RMSEC e RMSECV devem ser menores que 10 %. No entanto, para uma fase de previsão esses erros tendem a aumentar (CABRAL, 2011). Por isso um valor de R^2 próximo de 1 não é considerado suficiente para assegurar a linearidade do método, é fundamental avaliar as demais figuras de mérito coletivamente e verificar se os resíduos do ajuste apresentam comportamento aleatório (BOTELHO, 2014).

Para efeitos de aplicabilidade no âmbito deste estudo, considerou-se que, com exceção dos modelos gerados para Sulfametazina e Ampicilina, todos os outros cumpriram a maioria dos requisitos necessários, como, número de variáveis latentes, RMSECV, R^2 , RMSEE, RMSEP, RPD, correlação entre valores de referência/experimentais e preditos e normalidade de resíduos.

Neste contexto, após comparação relativa das figuras de mérito, os seguintes modelos foram considerados viáveis e foram empregados na análise de amostras regionais de leite cru: TTC-CV, SFD-CV e CRF-CV.

A escolha destes modelos para a aplicação em amostras regionais está relacionada aos melhores valores das figuras de mérito encontrados para o conjunto de calibração, pois este influencia incisivamente na qualidade de predição analítica, seguidas da criteriosa análise dos dados gráficos dos valores experimentais *versus* valores previstos e dos histogramas de resíduos.

O uso de pré-processamentos também foi considerado na escolha dos modelos viáveis a serem aplicados. No entanto o pré-processamento utilizado foi *Multiplicative scattering correction*, o qual influenciou positivamente sobre as figuras de mérito dos conjunto de validação, porém não o fez para o conjunto de calibração. Logo, primando pela capacidade preditiva, diretamente relacionada com o conjunto de calibração, optou-se por modelos com melhores valores para este conjunto.

A Tabela 15, a seguir, apresenta os resultados das amostras de leite cru quando avaliadas através da espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada a fim de quantificar tetraciclina, sulfadimetoxina e cloranfenicol simultaneamente.

Tabela 15 – Resultados das análises das amostras regionais, empregando os modelos de calibração multivariada TTC-CV, SFD-CV e CRF-CV

	TTC-CV* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	SFD-CV* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CRF-CV* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	0,4046 \pm 0,0323	0,9060 \pm 0,0028	0,3131 \pm 0,0096
2	0,2693 \pm 0,0134	0,4685 \pm 0,0169	0,1120 \pm 0,0176
3	0,3090 \pm 0,1051	0,6613 \pm 0,3016	0,3305 \pm 0,1347
4	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND
8	0,2004 \pm 0,0845	0,4367 \pm 0,0904	0,2244 \pm 0,0414
9	ND	ND	ND
10	0,0704 \pm 0,0002	0,3703 \pm 0,0349	0,1124 \pm 0,0165
11	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
13	0,0244 \pm 0,0112	ND	ND
14	ND	ND	ND
15	0,3952 \pm 0,1311	1,7344 \pm 0,4238	0,8645 \pm 0,2049
16	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND

Fonte: PRÓPRIO AUTOR 2016.

*Valor Médio \pm Desvio Padrão

Notas:

ND: Não detectável

LMR: Tetraciclina (TTC) = 100 $\mu\text{g/L}$ (0,1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

LMR: Sulfadimetoxina (SFD) = 100 $\mu\text{g/L}$ (0,1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

LMR: Cloranfenicol (CRF) = zero $\mu\text{g/L}$ (ausência)

Os resultados apresentados na Tabela 15 ilustram a aplicação dos modelos TTC-CV, SFD-CV e CRF-CV nas amostras de leite cru coletadas na

microrregião de Pato Branco, no estado do Paraná. Para cada conjunto amostral foi aplicado o teste de rejeição para dados anômalos (teste Q), com 95% de confiança. Neste contexto, dentre o conjunto de 20 amostras analisadas, 65 % estavam isentas de quaisquer resíduos de antimicrobianos (Tetraciclina, Sulfadimetoxina e Cloranfenicol).

A Figura 26 apresenta graficamente o perfil de cada amostra regional frente à aplicação dos modelos construídos para a quantificação dos analitos de interesse e faz menção ao LMR permitido para tetraciclina e sulfadimetoxina. Os coeficientes de variação foram expressos em 18, 19 e 21% para TTC, SFD e CRF, respectivamente, indicando relativa homogeneidade dos dados.

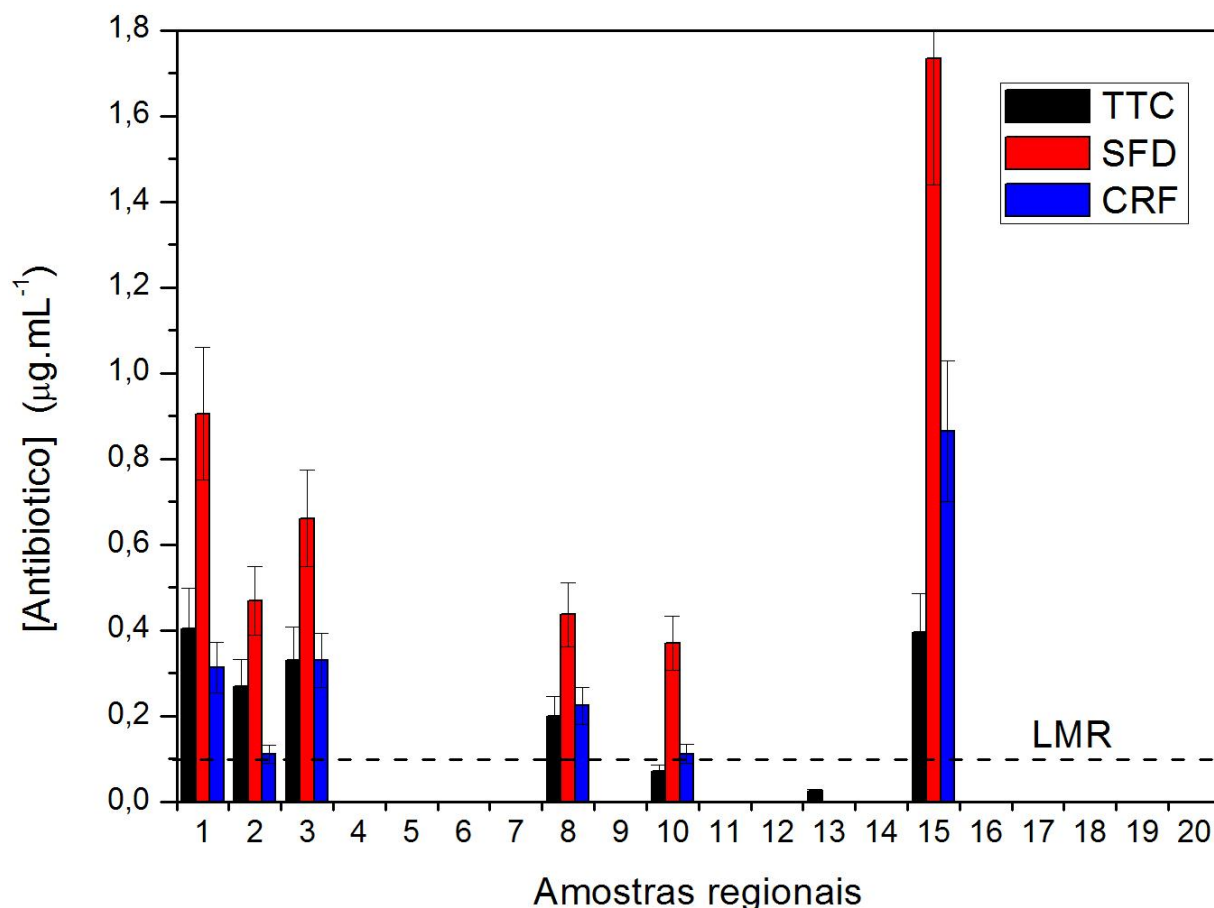


Figura 26 – Perfil das amostras regionais de leite cru após aplicação dos modelos construídos
Fonte: Próprio autor (2016).

De acordo com a Figura 26, pode se observar que as amostras de número 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19 e 20 não apresentam resíduos dos

antimicrobianos investigados, sinalizando que este conjunto amostral, 65 % do total, encontra-se em condições adequadas de consumo, neste quesito.

Considerando os Limites Máximos de Resíduos de antimicrobianos aceitáveis pelos órgãos competentes e ilustrado na Figura 26 pela linha tracejada horizontalmente, identificando a concentração permitida de $0,1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para tetraciclinas e sulfas, pode-se observar que 5 % das amostras avaliadas apresentam resíduos abaixo do LMR permitido (amostra de número 13), sendo consideradas adequadas para o consumo humano, seja *in natura*, seja após processamento industrial.

Cabe ainda ressaltar que, levando em consideração o LMR para a tetraciclina ($0,1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), as amostras de números 10 e 13 apresentaram concentrações inferiores ao LMR aceito ($0,0704 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,0244 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), estando satisfatórias para o consumo vistas por este aspecto. Ocorre que a amostra de número 10 apresentou resultado insatisfatório para outros analitos avaliados, a sulfadimetoxina, com valor de $0,3703 \mu\text{g.mL}^{-1}$, concentração acima do LMR de $0,1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e cloranfenicol $0,1124 \mu\text{g.mL}^{-1}$ tornando, assim, a amostra imprópria para o consumo e/ou processamento industrial.

Por se tratar de uma análise de multirresíduos, ou seja, quantificação de vários analitos simultaneamente, é possível fazer esta correlação e excluir a amostra insatisfatória (de número 10) dentro do conjunto global. Desta forma evidencia-se a importância de análises para multirresíduos, onde é possível mensurar componentes químicos distintos em uma mesma amostra, em uma mesma análise, otimizando tempo e recursos financeiros.

Para os antimicrobianos avaliados, considera-se que concentrações menores ou iguais a $100 \mu\text{g/L}$ ($0,1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em leite, para tetraciclina e sulfadimetoxina, são teores toleráveis de contaminantes químicos e esta contaminação não oferece risco de toxicidade para o consumo humano, tendo em vista a Ingestão Diária Aceitável (ANVISA, 2009). No entanto, valores acima de $100 \mu\text{g/L}$ são prejudiciais à saúde humana e oferecem perigo quando consumidos (BRASIL, 2011).

A quantificação do antimicrobiano cloranfenicol neste estudo tem uma importância ímpar. Dentre as amostras avaliadas, 30 % apresentaram resíduos de cloranfenicol em concentrações entre $0,1120$ e $0,8645 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de leite (amostras de número 1, 2, 3, 8, 10 e 15) (Figura 26). Este resultado tem uma repercussão

sanitária expressiva, pois pode estar vinculado ao emprego de drogas veterinárias de uso proibido no Brasil.

O monitoramento de resíduos de cloranfenicol em alimentos vem sendo realizado em estudos de abrangência estadual e nacional. Por exemplo, Oliveira, Bando, Junior (2007), em estudo realizado entre 2005 e 2006 constataram, através de ensaios imunoenzimáticos, a presença de cloranfenicol em 2,6 % das amostras de leite pasteurizado oriundas de 35 municípios paranaenses. Esta preocupação com a segurança alimentar é abordada também por Júnior et al. (2006), onde utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas em “tandem” com ionização por “eletrospray” (CLAE-ESI/EM/EM) como uma alternativa na detecção de resíduos de cloranfenicol em matrizes de alimentos, avaliaram amostras de leite e mel com expressiva participação no mercado nacional. Foram quantificados resíduos de cloranfenicol em 25 % das amostras de leite integral e 66 % das amostras de leite em pó, enquanto as amostras de mel se apresentaram isentas deste contaminante.

De uma maneira geral, os contaminantes químicos em leite vêm sendo pesquisados e relatados em literatura, como se observa no estudo de Pacheco-Silva, Souza, Caldas (2014), o qual expõe uma revisão sobre resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos, através da compilação de dados das análises oficiais realizadas pelos órgãos reguladores federais, MAPA e ANVISA.

No período de 2006 a 2012 o PNCRC, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, avaliou 2398 amostras sendo que 25 apresentaram-se não conformes. A não conformidade estava relacionada à presença de resíduos de antimicrobianos acima do LMR permitido ou de resíduos de substâncias de uso proscrito no país.

Com o intuito de complementar as ações do MAPA, o programa PAMVet, vinculado à ANVISA, analisa o insumo alimentício final, aquele que já está disponível ao consumidor em estabelecimentos comerciais. Na compilação dos resultados oficiais realizados pelo PAMVet, houve resultados não conformes para uma ampla variedade de resíduos de medicamentos veterinários. De maneira geral, o percentual de amostras contaminadas foi maior entre os leites em pó, resultado esperado uma vez que os resíduos se encontram concentrados neste produto.

Os resultados de ambos os programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários, PNCRC e PAMVet, mostraram que os antiparasitários,

seguido dos antimicrobianos, foram os principais compostos encontrados nas amostras oficiais de leite no período de 2006 a 2012. Assim Pacheco-Silva, Souza, Caldas (2014) concordam e confirmam a necessidade de manutenção e ampliação dos programas governamentais para o controle da qualidade dos alimentos de origem animal, tornando-os seguros para o consumo humano.

Em uma avaliação comparativa entre as tabelas de resultados (Tabelas 9 e 15) apresentadas para as amostras de leite cru utilizadas no presente estudo, há considerações importantes a serem discutidas. Na Tabela 9, todas as 20 amostras foram analisadas e liberadas para o processo fabril nas indústrias de laticínios, no entanto na Tabela 15 as mesmas 20 amostras, quando avaliadas quantitativamente, não apresentaram os mesmos resultados satisfatórios.

Esta dissonância fica parcialmente explicada pelo fato de que os *kits* comerciais utilizados em rotina de laboratórios de controle de qualidade dos laticínios não são sensíveis para cloranfenicol, assim este antimicrobiano não é pesquisado, nem mesmo qualitativamente, no leite produzido e comercializado do Brasil.

Como o método alternativo multirresíduos pesquisa uma maior variedade de analitos, fica evidente a vantagem oferecida pelo método proposto, pois proporciona melhores resultados do ponto de vista de qualidade do leite. Tendo em vista que todas as análises, as de triagem, as confirmatórias e até mesmo as práticas alternativas, exigem o manuseio e o emprego correto das técnicas analíticas, os diferentes resultados apresentados nas Tabelas 9 e 15 podem estar vinculados a uma propagação de erros. O resultado analítico é gerado a partir do conjunto de elementos: material, método, instrumento, analista, ambiente e equipamento. Qualquer um destes, quando executados de maneira incorreta ou imprecisa, pode produzir resultados igualmente incorretos ou imprecisos.

Ainda sobre a diferença ilustrada entre as tabelas de resultados, via *kit* comercial (Tabela 9) e via método multirresíduos (Tabela 15), este apresenta seus resultados quantificados, podendo assim, serem identificadas aquelas amostras que apresentam concentrações de resíduos de antibióticos abaixo dos parâmetros permitidos. Isto é de fato muito importante no trabalho de assistência técnica junto ao produtor rural, pois em algum momento na cadeia produtiva de leite estão ocorrendo falhas, proporcionando a contaminação do produto final. Mesmo que em quantidades relativamente baixas, esta contaminação química pode ser controlada e

reduzida quando se alia responsabilidade técnica no campo com qualidade do produto final e isto só é possível quando se utilizam técnicas analíticas quantitativas, como é o caso do método proposto.

Como agravo de ordem econômica, a presença de antimicrobiano no leite pode causar a inibição de culturas lácteas sensíveis utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos fermentados, alterando a sua qualidade ou dificultando a obtenção dos mesmos. Em produtos como manteiga e creme, a presença destes resíduos químicos pode desenvolver a formação de odores desagradáveis. A pasteurização, processo físico ao qual o leite é submetido para o preparo de inúmeros derivados lácteos, tem pouco ou nenhum efeito sobre o conteúdo de resíduos de antibióticos no leite, sendo impossível inativar ou extrair este contaminante da matriz leite (JÚNIOR, BELOTI, 2012).

Já os problemas relacionados à saúde pública se devem à possibilidade de desenvolvimento de reações alérgicas ou tóxicas ao indivíduo sensível que ingere o produto lácteo contaminado com resíduos de antibióticos. Dentre as reações mais comuns se destacam as urticárias, as dermatites ou rinites e a asma brônquica. Geralmente estão vinculadas às penicilinas, porém tetraciclina e sulfonamidas também podem causar este tipo de reação (BRITO, LANGE, 2005).

Algumas reações tóxicas estão relacionadas ao potencial carcinogênico e /ou poder de desenvolvimento de alterações hematológicas de alguns antimicrobianos em indivíduos susceptíveis, como é o caso dos nitrofuranos e do cloranfenicol. Por isso, não se admite resíduos dessas substâncias no leite, sendo proibido o emprego destes em terapias farmacológicas para animais destinados à produção de alimentos (BRITO, LANGE, 2005).

Tendo em vista estes fatores, a análise laboratorial realizada a partir da espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada mostra-se uma boa opção, visto que oferece a praticidade e rapidez de uma avaliação de triagem combinada com a precisão e robustez de uma análise confirmatória. Por isso a proposta para o uso deste método alternativo proporcionando agilidade e eficiência às rotinas de controle de qualidade das fábricas de laticínios agrega vantagens econômicas ao setor lácteo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muito embora não tenha sido possível avaliar a presença de todos os antimicrobianos previstos nos objetivos deste trabalho, pode-se concluir que a análise quantitativa de contaminantes químicos em alimentos realizada a partir da espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada representa uma boa opção para a avaliação de antimicrobianos em leite cru. Apesar de o presente estudo ter gerado figuras de mérito para o conjunto de calibração com perfil considerado satisfatório, aquelas para o conjunto de validação não apresentaram o mesmo desempenho. Como se trata de um método alternativo pioneiro para pesquisa de multirresíduos químicos em leite há a necessidade de aperfeiçoamento para obtenção de modelos ainda mais robustos, eficientes e com maior capacidade preditiva e, para que, desta forma, tenham aplicabilidade em análises de rotina em fábricas de laticínios. Um exemplo disto seria o retrabalho sobre os modelos que não apresentaram bom desempenho no presente estudo, como os modelos para sulfametazina e ampicilina. Alguns ajustes e alinhamentos precisam ser feitos nestes modelos para que os mesmos possam ser utilizados. Sabe-se que o aperfeiçoamento das figuras de mérito proporcionariam modelos com melhor desempenho analítico, desta forma o uso de um maior número de amostras para o conjunto de calibração e validação, poderia influenciar incisivamente sobre as figuras de mérito. Outro ponto importante a ser retrabalhado seria o emprego de diferentes tipos de pré-processamento e/ou faixas espectrais objetivando um melhor desempenho para as figuras de mérito.

O aperfeiçoamento deste método, sendo uma alternativa para métodos confirmatórios de pesquisa de antimicrobianos em leite, poderia proporcionar ao setor lácteo, tão expressivo na economia nacional, maior agilidade nas análises de leite e fornecer ao consumidor um produto mais seguro e confiável. Esta preocupação com a qualidade do leite fica evidente tanto no aspecto econômico como no sanitário e social.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm>. Acesso em 08/2014.

ALMEIDA, Francylaine Silva de. **Aplicação das técnicas de espectroscopia óptica vibracional em compostos químicos e biológicos**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2012.

ANDRADE, Silvia F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2008.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira – Volume 2 – Monografias**. 5. ed. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal PAMVET. Relatório 2006 – 2007**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009.

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

ARAÚJO, Tiago Pucca. **Emprego de espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos para a análise direta de tetraciclinas em leite bovino**. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

Associação Brasileira dos Criadores de Girolando - MEGALEITE. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br/megaleite/?noticia>>. Acesso em 08/2014.

BORGES, Gabriela T.; SANTANA, Ângela P.; MESQUITA, Albenones J.; MESQUITA, Sandra Q. P.; SILVA, Luiz A. F.; NUNES, Vanessa Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 1, n. 1, p. 59 - 63, 2000.

BOTELHO, Bruno G.; REIS, Nádia; OLIVEIRA, Leandro S.; SENA, Marcelo M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of Five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**. Belo Horizonte, n. 181, p. 31 – 37, 2015.

BOTELHO, Bruno Gonçalves. **Desenvolvimento e validação de métodos para análise direta de alimentos usando ferramentas quimiométricas, espectroscopia no infravermelho e imagens digitais**. 2014. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n^o 30691, de 29 de março de 1952. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, DF, 1952.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n^o 62, de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2011.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n^o 26, de 09 de julho de 2009. **Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário**. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2009.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n^o 42, de 20 de dezembro de 1999. **Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado – PCRP**. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1999.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n^o 09, de 27 de junho de 2003. **Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos**. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.

BRITO, Maria A. V. P.; LANGE, Carla C. Resíduos de antibióticos no leite. **Comunicado Técnico 44**. Juiz de Fora, p. 1 – 4, 2005.

CABRAL, Alessandra Miranda. **Construção de modelos multivariados para determinação de lipídios totais e umidade em leite em pó comercial utilizando espectroscopia no infravermelho próximo**. 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

CAPA, Nossa. Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 45, n. 5, 2009.

Charm Sciences INC. Disponível em: <www.charm.com>. Acesso em: 01/2016.

CHR Hansen. Disponível em: <www.chr-hansen.com>. Acesso em: 01/2016.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006.

CONZEN, Jörg-Peter. **Multivariate Calibration. A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry**. Bruker, 2006.

Copan Innovating Together. Disponível em: <www.copaninnovation.com>. Acesso em: 01/2016.

DA SILVA, Carla G. A.; COLLINS, Carol H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**. Campinas, v. 34, n. 4, p. 665 – 676, 2011.

DIETRICH, Jaime M. Controle do resíduo de antibióticos no leite. **Leite & Derivados**. p. 156 - 162, 2008.

EUROPEAN UNION. **European Pharmacopoeia**. 8. ed. EDQM, 2014.

FELTRIN, Carlos W.; MELLO, Ana M. S.; SANTOS, João G. R.; MARQUES, Marcelo V.; SEIBEL, Nair M.; FONTOURA, Luiz A. M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. Cachoeirinha, v. 30, n. 1, p. 80 - 82, 2007.

FERRÃO, Marco F.; CARVALHO, Claudia W.; MÜLLER, Edson I.; DAVANZO, Celso U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência Tecnologia Alimentos**. Campinas, v. 24, n. 3, p. 333 - 340, 2004.

FERRARINI, Hair. **Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada**. 2004. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FERREIRA, Daniela Souza. **Aplicação de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada para previsão de parâmetros de qualidade em soja e quinoa**. 2013. 119 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

FERREIRA, Rosana G.; SPISSO, Bernadete F.; HORA, Iracema M. C.; MONTEIRO, Mychelle A.; PEREIRA, Mararlene U.; COSTA, Rafaela P.; CARLOS, Betânia S. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**. Campinas, v. 2, n. 19, p. 40 – 49, 2012.

GONDIM, Carina S.; JUNQUEIRA, Roberto G.; SOUZA, Scheilla V. C. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 70, n. 4, p. 433 - 447, 2011.

GONZÁLEZ, Félix H. D.; DÜRR, João W.; FONTANELI, Roberto S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

HELFER, Gilson A.; FERRÃO, Marco F.; FERREIRA, Cristiano V.; HERMES, Nadir. Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 4, n. 26, p. 779 – 786, 2006.

HOLLER, James F.; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária**, Brasília, jun. 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, 2010.

IDEXX Laboratories – IDEXX. Disponível em: <https://www.idexx.com/corporate/products-and-services/products-and-services.html>. Acesso em 08/2014.

Idexx laboratories. Disponível em: <www.idexx.com>. Acesso em: 01/2016.

ILHARCO, Laura M. Espectroscopia de infravermelho uma técnica antiga, sempre atual. **Química: Técnicas Experimentais**. n. 69, p. 34 -45, 1998.

Instituto Adolfo Lutz – IAL. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/material_estatico/tbl_preco/tabelaok.html>. Acesso em: 11/2015.

Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social – IPARDES. Disponível em: <http://www.ipardes.pr.gov.br/anuario_2013/index.html>. Acesso em 06/2015.

IPARDES. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Caracterização Socioeconômica da Atividade Leiteira do Paraná**, Curitiba, 2009.

IPARDES. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Cad. IPARDES**. Curitiba, v. 1, n. 1, p. 32-46, 2011.

JAWAID, Sana; TALPUR, Farah N.; SHERAZI, S. T. H.; NIZAMANI, Shafi M. KHASKELI, Abid A. Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR-Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. Jamshoro, n. 141, p. 3066 – 3071, 2013.

JÚNIOR, Hélio A. M.; BUSTILHOS, Oscar V.; PIRES, Maria A. F.; LEBRE, Daniel T.; WANG, Alexandre Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massa em "tandem" (CLAE-EM/EM). **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 3, p. 586 - 592, 2006.

JÚNIOR, José C. R.; BELOTI, Vanerli. Mastite bovina e seu reflexo na qualidade do leite – Revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)**. v. 2, n. 2, p. 1 -12, 2012.

LEI, Yu et al. Analysis of crystallized lactose in milk powder by Fourier-transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**. n. 974, p. 88 – 93, 2010.

LIDE, David R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. Editora: Robert C. Weast, 1964.

^aLUIZ, Leandro C.; BELL, Maria J. V.; ROCHA, Roney A.; MENDES, Thiago O.; ANJOS, Virgílio C. Método espectroscópico no infravermelho próximo e análise de componentes principais na detecção de antibióticos no leite. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 36, n. 1, 2015.

^bLUIZ, Leandro C.; BELL, Maria J. V.; ROCHA, Roney A.; MENDES, Thiago O.; ANJOS, Virgílio C. Análise de resíduos de diclofenaco sódico veterinário em leite por espectroscopia no infravermelho próximo. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 18, n. 3, p. 219 – 224, 2014.

MAMANI, Mônica C. V.; REYES, Felix G. R.; RATH, Susanne. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. **Food Chemistry**. v. 117, n. 3, p. 545 - 552, 2009.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LEITE, A.Í. Pesquisa de resíduos de beta-lactâmicos no leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o delvotest sp. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 75, n. 1, p. 95 - 98, 2008.

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

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Manual_COLETA_01_12%20>. Acesso em: 08/2015.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/pncrc>> Acesso em: 06/2015.

MOATS, William A. Advances in determination of antibiotic residues. **Journal AOAC Int**. v. 1, n. 80, p. 1 – 4, 1997.

MORAIS, Christina Maria Queiroz de Jesus; DURÃES, Thiago dos Santos; NÓBREGA, Armi Wanderley da; JACOB, Silvana do Couto. Presença de resíduos de antimicrobianos em leite bovino pasteurizado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 2009.

MORELATTO, Saulo Almeida. **Modelos de regressão PLS com erros heteroscedásticos**. 2010. 49 f. Dissertação (Mestrado em Estatística) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

MORGANO, Marcelo A.; FARIA, Cristiano G.; FERRÃO, Marco F.; BRAGAGNOLO, Neura; FERREIRA, Márcia M. C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 1, n. 25, p. 25 – 31, 2005.

NERO, Luís A.; MATTOS, Marcos R.; BELOTI, Vanerli; BARROS, Márcia A. F.; FRANCO, Bernadette D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

NETTO, Daisy P.; LOPES, Marcia O.; OLIVEIRA, Mayra C. S.; NUNES, Mauricio P.; MACHINSKI, Miguel; BOSQUIROLI, Silvana L.; BENATTO, Alfredo; BENINI, Ailton; BOMBARDELLI, Aniela L. C.; FILHO, Dirceu V.; MACHADO, Eraldo; BELMONTE, Ivana L.; ALBERTON, Marcelo; PEDROSO, Pedro P.; SCUCATO, Eliana da S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do estado do Paraná. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

NICOLAI, Bart M.; BEULLENS, Katrien; BOBELYN, Els; PEIRS, Ann; SAEYS, Wouter; THERON, Karen I. **Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review**. *Postharvest Biology and Technology*. v. 46, n. 2, p. 99 – 118, 2007.

NUNES, Pedro Germano Antônio. **Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias UV-VIS e NIR**. 2008. 106 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

OHI, Masahiko e colaboradores. **Princípios Básicos para Produção de Leite Bovino**. Curitiba: UFPR, 2010.

OLIVEIRA, Flávia Carneiro da Cunha. **Modelos de calibração multivariada associados à espectroscopia vibracional para análises de misturas diesel - óleos vegetais**. 2006. 108 f. Dissertação - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

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

OLIVEIRA, Renata C.; BANDO, Érika; JUNIOR, Miguel M. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Sci Health Sci.** Maringá, v. 29, n. 1, p. 59 - 62, 2007.

ORDÓÑEZ, Juan A. e Colaboradores. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal.** Porto Alegre: Artmed, 2006.

PACHECO-SILVA, Érica; SOUZA, Jurandir R.; CALDAS, Eloisa D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova.** v. 37, n. 1, p. 111 – 122, 2014.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. **Introdução à espectroscopia.** 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PRADO, Carolina Kato. **Determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência.** 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

PRESTES, Osmar D.; MARTINS, Manoel L.; FRIGGI, Caroline A.; MUNARETTO, Juliana S.; ADAIME, Martha B.; ZANELLA, Renato. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova.** v. 36, n. 5, p. 697 - 710, 2013.

QUEJI, Mary Dias. **Determinação de açúcares simples, ácido málico e compostos fenólicos totais em bagaço de maçã por espectroscopia no infravermelho e método de calibração multivariada.** 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

RECH, André Machado. **Avaliação da espectroscopia no infravermelho combinada a análise multivariada para caracterização e controle de qualidade de bebidas saborizadas a base de soja.** 2014. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Química Industrial. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

RIBEIRO, Fabiana A. L.; BARBOZA, Fernando D.; BREITKREITZ, Márcia C.; MARTINS, José A. Quimiometria: inovação no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade na indústria química. **Jornal do Conselho Regional de Química IV Região (SP e MS)**. p. 14 -15, 2007.

RIBEIRO, Márcio G.; GERALDO, Juliana S.; LANGONI, Hélio; LARA, Gustavo H. B.; SIQUEIRA, Amanda K.; SALERNO, Tatiana; FERNANDES, Marta C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 1, n. 29, p. 52 – 58, 2009.

SANTOS, Aline F. S.; DUARTE, Keila M. R.; POZZI, Cláudia R. Detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. **Cient Ciênc Biol Saúde**. v. 3, n. 13, p. 205 - 212, 2011.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. **Food Chemistry**. Londres, v. 138, n. 1, p. 19-24, 2013.

SCHMITZ, Aline M.; SANTOS, Roselí A. A produção de leite na agricultura familiar do Sudoeste do Paraná e a participação das mulheres no processo produtivo. **Terra Plural**. Ponta Grossa, v. 7, n. 2, p. 339 - 355, 2013.

SILVA, Joel R.; VARGEM, Daiana S.; SANTOS, Willians; FRUTUOSO, Graziela F.; VIEIRA, Eliane F.; MENEZES, Eliana D. Inativação por hidrólise alcalina de antibióticos B-lactâmicos, cefalosporínicos e penicilâmicos. **Ensaio e Ciências Biológicas, Agrárias e Saúde**. v. 17, n. 1, p. 19 – 31, 2013.

SMITH, Bradford P. **Medicina interna de grandes animais**. Barueri: Manole, 2006.

SPINOSA, Helenice S.; GÓRNIK, Silvana L.; BERNARDI, Maria M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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

TENÓRIO, C. G. M. S. C.; CERQUEIRA, R. P.; VIEGAS, R. P.; RESENDE, M. F. S.; CLINQUART, D. L.; SANTOS, A. K. R.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de

antimicrobianos no leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 61, n. 2, p. 504 – 510, 2009.

TERRA, Juliana; SANCHES, Rafael O.; BUENO, Maria I. M.S.; MELQUIADES, Fábio L. Análise multielementar de solos: uma proposta envolvendo equipamento portátil de fluorescência de raios X. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. Londrina, v. 35, n. 2, p. 207 - 214, 2014.

TOSCAN, Angelisa; RODRIGUES, Márcio B. Resíduos de antimicrobianos em leite na região sudoeste do Paraná. **Synergusmus scyentifica UTFPR**. Pato Branco, v. 1, n. 10, 2015

TROMBETTA, Alex. Sudoeste, o bilionário do leite paranaense. **Gente do Sul - Agronegócio**. Francisco Beltrão. N. 108, p. 10 -14, 2015.

Unisensor. Disponível em: <www.unisensor.be>. Acesso em: 01/2016.

^aUTFPR Pato Branco. Plano de Gestão de Resíduos de Laboratórios de Química. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**. Pato Branco, 2011.

^bUTFPR Pato Branco. Programa de Gerenciamento de Resíduos Laboratoriais. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**. Pato Branco, 2014.

VALDERRAMA, Patrícia. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo**. 2005. 128 f. Dissertação - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

ZEUlab. Disponível em: <www.zeu-inmunotec.com>. Acesso em: 01/2016.