

 Leandro da Conceição Luiz <sup>1,2</sup>

 Maria José Valenzuela Bell<sup>1</sup>

 Virgílio de Carvalho dos Anjos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Física, Juiz de Fora, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade Bezerra de Araújo, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

#### Correspondência

Leandro da Conceição Luiz  
mrleandroluiz@hotmail.com

## FT-NIR associado a método quimiométrico para discriminar resíduos de antimicrobianos e antiparasitário no leite

### *FT-NIR coupled to chemometric method to discriminate antimicrobial and antiparasitic residues in milk*

#### Resumo

**Introdução:** O leite é um dos alimentos mais consumidos pelos seres humanos. Proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais fazem parte de sua composição e desempenham importantes funções para a nutrição humana. A prática de adulteração no leite é antiga e ainda se faz presente nos dias de hoje em diversos países, inclusive no Brasil. A fim de obter lucro maior, alguns fornecedores costumam adicionar ao leite: água, amido, citrato, ureia, soda cáustica, cloreto de sódio, sacarose, soro do leite, melamina e outros componentes. No entanto, ainda há outro problema, o da contaminação do leite por medicamentos veterinários. Estes podem causar danos à saúde do consumidor e prejuízos para a produção de seus derivados.

**Objetivo:** O presente trabalho propõe uma metodologia que permite detectar de maneira rápida a presença de resíduos de medicamentos veterinários em leites, dentro do limite máximo de resíduos de cada droga. **Métodos:** Fez-se o uso da espectroscopia no infravermelho próximo por transformada de Fourier associada à análise de componentes principais. A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada não somente para a autenticidade de laticínios, mas para determinar sua qualidade. **Resultados:** Conseguiu-se detectar resíduos de penicilina, oxitetraciclina e enrofloxacin, e também do antiparasitário ivermectina nas amostras de leites.

**Conclusão:** A metodologia detectou de maneira rápida e precisa os resíduos das drogas analisadas, mesmo em concentrações muito baixas. Assim, é uma opção a outras existentes, já utilizadas para tal objetivo.

**Palavras-chave:** Antibiótico. Medicamento. Quimiometria. Ivermectina. Infravermelho.

#### Abstract

**Introduction:** Milk is one of the most consumed foods by humans. Proteins, vitamins, fat, carbohydrates and minerals are part of its composition and play important roles in human nutrition. The practice of adulteration in milk is old and is still present today in several countries, including Brazil. In order to obtain a higher profit, some suppliers usually add to the milk: water, starch, citrate, urea, caustic soda, sodium chloride, sucrose, whey, melamine and other components. However, there is still another problem, that of contamination of milk by veterinary medicines. These can cause damage to the health of the consumer and damage to the production of its derivatives.

**Objective:** The present work proposes a methodology that allows to quickly detect the presence of residues of veterinary medicines in milk, within the maximum residue limit of each drug. **Methods:** The use of spectroscopy in the near infrared by Fourier transform associated with the analysis of principal components was used. Infrared spectroscopy has been used not only for the authenticity of dairy products, but to determine their quality. **Results:** It was possible to detect residues of penicillin, oxytetracycline and enrofloxacin, and also of the antiparasitic ivermectin in the milk samples. **Conclusion:** The methodology fastly and accurately detected the residues of

the analyzed drugs, even in very low concentrations. Thus, it is an option to other existing ones, already used for this purpose.

**Keywords:** Antibiotic. Drugs. Chemometrics. Ivermectin. Infrared.

## INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, o leite é a primeira fonte de alimento, sendo primordial para a saúde futura dos indivíduos. Em humanos, ele continua a fazer parte da alimentação mesmo na fase adulta, seja pela sua ingestão direta, ou por meio de seus derivados.

O leite mais comercializado no Brasil é aquele oriundo de vacas, que apresenta diversos componentes, entre os quais se destacam: proteínas (3,3%), gordura (4,0%), lactose (4,3%), além de vitaminas e sais minerais.<sup>1</sup> As principais proteínas encontradas no leite são a caseína (78%) e a proteína do soro (19%), comumente conhecida como *whey protein*, e outras, totalizando 2,7%.<sup>2</sup>

A proteína do soro é muito utilizada por atletas para fins de ganho de massa muscular, mas durante décadas, ela era a parte do leite dispensada pela indústria de alimentos. Somente a partir da década de 70, os cientistas passaram a estudar suas propriedades. Não somente os atletas, mas também praticantes de atividades físicas, pessoas fisicamente ativas e portadores de doenças utilizam esta proteína para usufruírem de seus benefícios.

Estudos recentes sustentam a teoria de que as proteínas do leite, incluindo as do soro, além de seu alto valor biológico, possuem peptídeos bioativos (PBAs), que atuam como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, fatores de crescimento, etc. Os componentes das proteínas e peptídeos do soro do leite, com seus respectivos resíduos de aminoácidos, são: beta-lactoglobulina (BLG) (162 aminoácidos), alfa-lactoalbumina (ALA) (123 de aminoácidos), albumina do soro bovino (BSA) (582 aminoácidos), imunoglobulinas (Ig's), glico-macropéptídeos (GMP) (64 aminoácidos).<sup>3,4</sup> Os sais minerais encontrados em quantidades significativas no leite são: o cálcio (Ca) e fósforo (P), que estão associados às estruturas das micelas de caseína, cloro (Cl), potássio (K), sódio (Na) e magnésio (Mg). Já em pequenas quantidades estão o ferro (Fe), alumínio (Al), bromo (Br), zinco (Zn) e manganês (Mn).<sup>5,6</sup> A lactose, principal carboidrato do leite, é constituída por dois monossacarídeos, glicose e galactose. Ela carrega funções nutricionais importantes, tais como o fornecimento de até 16,8 kJ/g de energia para uma pessoa.<sup>7</sup>

Produtos lácteos como o leite, consumidos mundialmente, possuem alto valor nutricional. No entanto, alguns fornecedores costumam adicionar adulterantes como água, amido, citrato, ureia, soda cáustica, cloreto de sódio, sacarose, soro do leite, melamina, entre outros, a fim de obter lucro maior. Recentemente, adulterações dessa natureza ainda têm sido notificadas, sobretudo em países em desenvolvimento, tais como Paquistão, Brasil, Índia e China.<sup>8</sup> A mais comum é o acréscimo de água no leite, a fim de aumentar seu volume. Entretanto, pesquisas têm mostrado resultados positivos no desenvolvimento de novos equipamentos e técnicas para detectar adulteração no leite com água.<sup>9-11</sup>

Outro fator, também muito importante, que pode levar a um problema de saúde pública e que está ligado à qualidade do leite, é o uso de medicamentos veterinários em vacas leiteiras. Nesse caso, deve ser respeitado o período de carência, prazo de eliminação do medicamento veterinário no leite, após a última aplicação. A presença dessas drogas acima dos limites máximos de resíduos (LMR) é preocupante, pois elas podem trazer consequências danosas à saúde humana, como reações alérgicas e intoxicação.<sup>12</sup>

O leite contaminado por substâncias químicas, como medicamentos, por exemplo, é considerado adulterado e impróprio para o consumo.<sup>13</sup> Um grupo importante de fármacos que podem estar presentes no leite são, principalmente, os antimicrobianos e os anti-inflamatórios, mas resultados das análises divulgados pelo Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) mostram também a presença de antiparasitários em leite.<sup>14</sup> Os resultados encontrados pelo PAMVet mostraram o aparecimento de doramectina em amostras de leite UHT acima do LMR, enquanto que resíduos da ivermectina também foram encontrados, porém abaixo do LMR.<sup>14</sup> Contudo, esses medicamentos não

devem ser administrados em vacas em lactação. Os efeitos adversos desses medicamentos são, em geral, leves e transitórios.

Estudos mostram que o uso inadequado de anti-inflamatórios pode provocar efeito adicional, tal como o surgimento de tumores renais em cobaias, após a exposição por longo prazo de fenilbultazona.<sup>15</sup> As tetraciclina são entre os antimicrobianos mais utilizados em bovinos. Em 2014, Zhang et al.<sup>16</sup> realizaram um estudo na China, alertando que medicamentos veterinários têm sido amplamente usados em tratamento de gado leiteiro, para prevenir e controlar doenças ou para promover o crescimento desses animais, ocasionando a presença de resíduos destas drogas em leites UHT comercializados naquele país. O uso indiscriminado e excessivo desses medicamentos, além de causar reações alérgicas sérias, é a principal causa de resistência antimicrobiana.<sup>16</sup>

Para o monitoramento, as agências controladoras utilizam uma variedade de métodos analíticos confiáveis e precisos para detectar resíduos de medicamentos veterinários em leite, como por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), e os *kits* para detecção de inibidores (resíduos de antibióticos) em leite. Esses métodos, embora sejam confiáveis e precisos, apresentam algumas desvantagens, tais como: lentidão e inespecificidade para alguns fármacos (tetraciclina), alto custo, complexidade, treinamento e pouca quantidade de amostras a ser analisada por período de tempo.<sup>17</sup> Técnicas espectroscópicas combinadas com métodos quimiométricos permitem analisar, interpretar e extrair informações de forma rápida e precisa, com um mínimo de preparação de amostras.<sup>18</sup>

A espectroscopia de infravermelho próximo por transformada de Fourier (FT-NIR) tem sido o método cada vez mais utilizado para determinar autenticidade e adulteração em alimentos. Trata-se de uma técnica analítica, não destrutiva, baseada na interação entre esta onda eletromagnética e a matéria, que permite analisar rapidamente, e de maneira precisa, diversos tipos de amostras.<sup>19,20</sup> A análise de componentes principais (PCA) é um algoritmo matemático que permite reduzir a dimensionalidade de um conjunto de variáveis de dados em um novo conjunto de variáveis, chamado de componentes principais. Isto aumenta a interpretabilidade dos dados sem perder as informações dos dados primários.<sup>21</sup>

A espectroscopia por infravermelho combinada com a quimiometria, campo interdisciplinar que usa métodos como estatística multivariada, matemática e ciências da computação para extrair informações de sistemas químicos, permite analisar a amostra sem método de preparação demorado. Em 2014, a FT-NIR associada à PCA foi utilizada para detectar a presença de resíduos de diclofenaco sódico em leites em percentuais de contaminação simulados.<sup>22</sup> Recentemente, em 2020, Pereira et al.<sup>23</sup> apresentaram uma revisão com as aplicações mais recentes de espectroscopia no infravermelho próximo e médio para avaliação da qualidade dos produtos lácteos.

Com base nesse cenário, este trabalho apresenta uma metodologia fundamentada no uso da técnica FT-NIR combinada com a PCA que permite discriminar leites puros de leites com resíduos de medicamentos veterinários, das classes de antimicrobianos e antiparasitário, todos dentro do LMR.

## MÉTODO

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

## Amostras

Para simular a contaminação do leite com os medicamentos veterinários, foram escolhidos aqueles de uso frequente em bovinos, devido às patologias mais comuns. As classes escolhidas foram os antimicrobianos enrofloxacino Baytril® injetável 10%, que possui 10 g de enrofloxacino em 100 mL de veículo (período de carência, 3 dias); terramicina/LA Zoetis/Pfizer® injetável, que tem 20 g de oxitetraciclina em 100 g de veículo (período de carência, 4 dias); pentabiótico reforçado com penicilinas da Zoetis/Pfizer (período de carência, 8 a 10 ordenhas). Como antiparasitário escolheu-se o ivermectina OF, que possui 1 g de ivermectina em 100 mL de veículo (período de carência de 35 dias para abate e não deve ser administrado em gado leiteiro).

Neste trabalho, utilizaram-se duas diferentes amostras de leite pasteurizado tipo “A” integral homogeneizado adquiridos na região de Juiz de Fora-MG, Brasil. Era sabido que esses leites estavam livres de medicamentos veterinários. Então, duas porções foram reservadas, uma para o padrão que serviria de controle, e a outra para amostra autocontrolada com as drogas aqui usadas. Assim sendo, elas foram submetidas a uma análise preliminar para verificar se suas características físico-químicas estão dentro ou não das especificações da Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018 (IN76).

Nessa etapa, as amostras de leite foram levadas ao LPP e analisadas pelo equipamento Lactoscope da Delta Instruments®, para determinação de gordura, proteína, lactose e sólidos totais. Para determinar o ponto de fusão do leite, utilizou-se o crioscópio eletrônico digital ITR MK 540 Flex; a densidade foi medida por meio do lactodensímetro H15 Brasil Q 15°C, enquanto para obter o valor da acidez titulável, utilizou-se o teste de Dornic. Já o pH foi obtido com o medidor de pH de bancada AT355. Cada análise foi realizada em triplicata. Após verificar que as características físico-químicas dos leites usados estavam de acordo com a IN76, manipulou-se a porção autocontrolada, preparando amostras com percentuais dos princípios ativos no leite. Ou seja, para que a medicação ficasse dentro do LMR, a simulação foi feita de acordo com o princípio ativo de cada droga e não em relação ao seu volume, pois a maioria dos medicamentos é constituída pelos princípios ativos acrescidos dos excipientes. Para este propósito, cada medicamento (penicilina G, oxitetraciclina, enrofloxacino e ivermectina) foi primeiramente diluído em água destilada, e finalmente, parte dessa diluição foi adicionada ao leite puro, amostra autocontrolada, a fim de alcançar a concentração do princípio ativo no leite.<sup>24</sup>

## Análise usando FT-NIR

As investigações qualitativas das amostras foram realizadas com o Analisador Multi Propósito FT-NIR da Bruker, operando no modo de reflectância na faixa de 13.500 a 3.700  $\text{cm}^{-1}$  de números de onda com um detector Te-InGaAs e 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução. As amostras foram colocadas em cubetas de borossilicato com 8 mm de espessura. Cada análise foi realizada em triplicata com 32 *scans*. O *software* OPUS® versão 5.5 foi utilizado para aquisição de dados.

## Análise estatística

Os espectros de reflectância, bem como suas respectivas derivadas de primeira ordem, foram construídos com o *software* OriginPro®. Os autovalores foram calculados com o *software* BioEstat versão 5.3. Já as análises de componentes principais foram conduzidas pelo *software* The Unscrambler® versão 9.2. Adobe PhotoShop CS6 foi usado apenas para destacar os clusters na PCA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização do leite

As tabelas 1 e 2 mostram os resultados encontrados nas análises físico-químicas das amostras de leites utilizadas para, posteriormente, simular as contaminações, com antimicrobianos e antiparasitário, a fim de verificar se os mesmos estavam dentro dos limites de referência.

**Tabela 1.** Resultados das características físico-químicas das amostras de leite pasteurizado tipo “A” integral que foi utilizado para simular as contaminações com os antimicrobianos dentro do LMR, Juiz de Fora-MG, Brasil, 2019.

Análise	Valores encontrados	Valores de referência <sup>a,b</sup>
Crioscopia	$(-0,536 \pm 0,001) ^\circ\text{H}$	$(-0,555 \text{ a } -0,530) ^\circ\text{H}$
Acidez	$(17,3 \pm 0,6) ^\circ\text{Dornic}$	$(14 \text{ a } 18) ^\circ\text{Dornic}$
Densidade	$(1,031 \pm 0,001) \text{ g/mL}$	$(1,028 \text{ a } 1,034) \text{ g/mL}$
pH a 25 °C	$(6,72 \pm 0,01)$	$(6,60 \text{ a } 6,80)$
Gordura	$(3,65 \pm 0,01) \%$	$\geq 3,00$
Proteína	$(3,14 \pm 0,01) \%$	$\geq 2,90$
Lactose	$(4,50 \pm 0,01) \%$	$\geq 4,30$
Sólidos	$(11,29 \pm 0,01) \%$	$\geq 8,40$

Fonte: LUIZ, 2018. <sup>a</sup>IN76; <sup>b</sup>FAO/TCP/KEN/6611

**Tabela 2.** Resultados das características físico-químicas das amostras de leite pasteurizado tipo “A” integral que foi utilizado para simular as contaminações com o antiparasitário dentro do LMR, Juiz de Fora-MG, Brasil, 2019.

Análise	Valores encontrados	Valores de referência <sup>a,b</sup>
Crioscopia	$(-0,540 \pm 0,001) ^\circ\text{H}$	$(-0,555 \text{ a } -0,530) ^\circ\text{H}$
Acidez	$(16,8 \pm 0,6) ^\circ\text{Dornic}$	$(14 \text{ a } 18) ^\circ\text{Dornic}$
Densidade	$(1,030 \pm 0,001) \text{ g/mL}$	$(1,028 \text{ a } 1,034) \text{ g/mL}$
pH a 25 °C	$(6,71 \pm 0,02)$	$(6,60 \text{ a } 6,80)$
Gordura	$(3,94 \pm 0,01) \%$	$\geq 3,00$
Proteína	$(3,07 \pm 0,01) \%$	$\geq 2,90$
Lactose	$(4,46 \pm 0,01) \%$	$\geq 4,30$
Sólidos	$(11,47 \pm 0,01) \%$	$\geq 8,40$

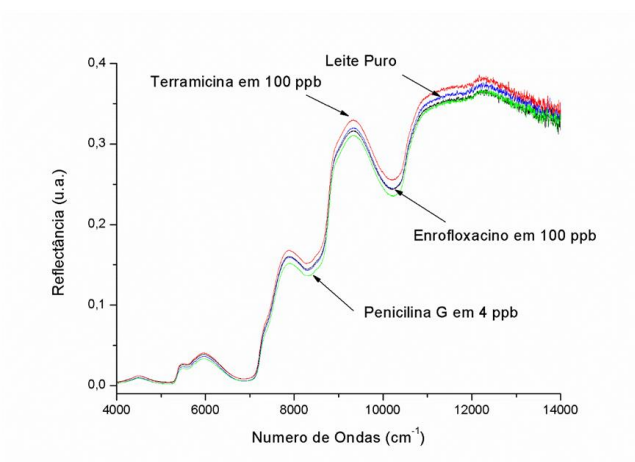
Fonte: LUIZ, 2018. <sup>a</sup>IN76; <sup>b</sup>FAO/TCP/KEN/6611

Comparando os valores encontrados para as amostras de leites com os valores de referência adotados na IN76, verificou-se que todas as amostras estão dentro das especificações, atendendo assim à legislação.

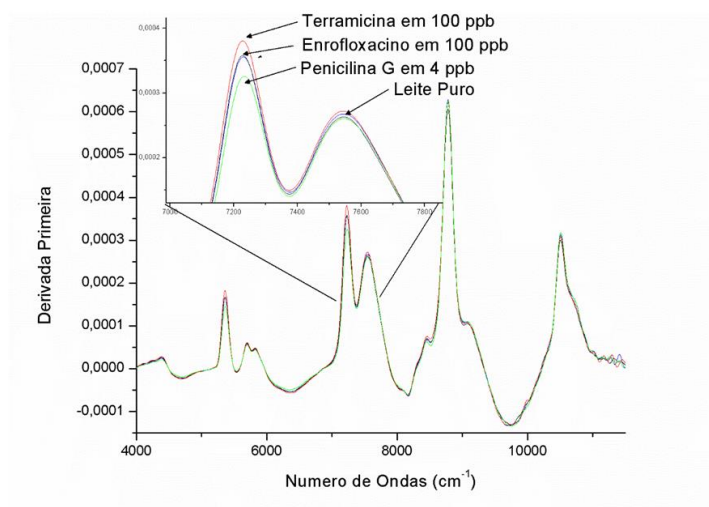
### Espectros vibracionais

As figuras 1 e 2 referem-se aos espectros de reflectância para os valores médios de leite puro, antimicrobianos puros e leite+antimicrobianos (dentro dos LMR), obtidos pela espectroscopia FT-NIR.

**Figura 1.** Espectro de reflectância das amostras de leites puro (controle) e contaminados com os antimicrobianos: enrofloxacino, penicilina G e oxitetraciclina (terramicina), dentro dos LMR.

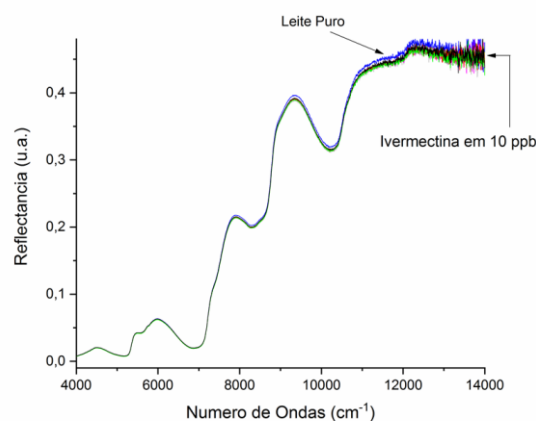


**Figura 2.** Derivada primeira do espectro de reflectância dos leites puro (controle), e contaminados com os antimicrobianos: enrofloxacino, penicilina G e oxitetraciclina (terramicina), dentro dos LMR.



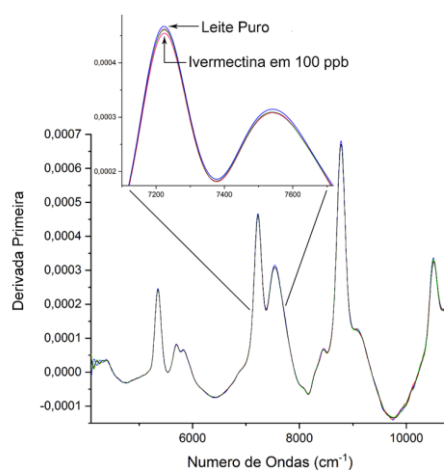
A figura 3 mostra o espectro de reflectância FT-NIR para os valores médios de leite puro e leite+antiparasitário, com redução de concentração do medicamento de 100 parte por bilhão (ppb), 50 ppb, 40 ppb, 30 ppb, 20 ppb até chegar no LMR de 10 ppb.

**Figura 3.** Espectro de reflectância das amostras de leites puro (controle) e contaminados com o antiparasitário ivermectina em concentrações de medicamento no leite de: 100 ppb, 50 ppb, 40 ppb, 30 ppb, 20 ppb e 10 ppb, este último o LMR para este medicamento.



A figura 4 se refere a derivada primeira do espectro da figura 3 com uma ampliação, entre os valores de números de ondas 7100 cm<sup>-1</sup> a 7800 cm<sup>-1</sup>, a fim de aumentar a zona de observação nesta faixa espectral.

**Figura 4.** Espectro de reflectância com ampliação na faixa entre 7100 cm<sup>-1</sup> e 7800 cm<sup>-1</sup> das amostras de leites puro (controle) e contaminados com o antiparasitário ivermectina em concentrações de medicamento no leite: 100 ppb, 50 ppb, 40 ppb, 30 ppb, 20 ppb e 10 ppb, este último o LMR para este medicamento.

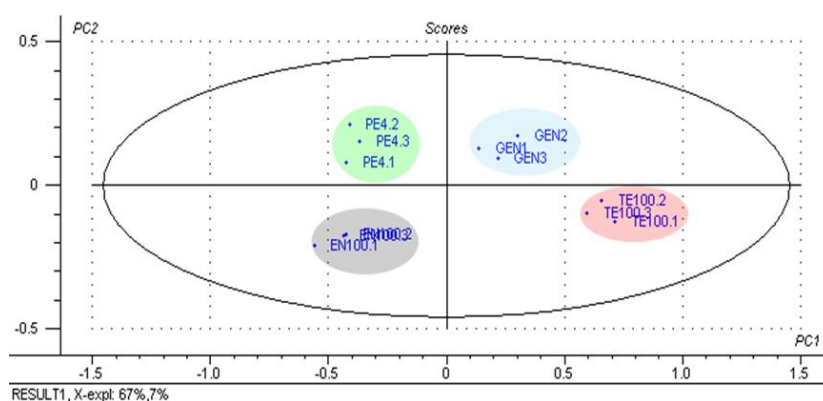


Nas figuras 1, 2, 3 e 4, dentro da faixa de número de ondas utilizada, torna a discriminação entre as amostras analisadas, de maneira direta por uma análise visual do espectro, não muito eficiente, pelo fato de as concentrações dos medicamentos veterinários serem muito pequenas, na ordem de ppb (mcg/L ou µg/L). Observa-se na figura 4 que, mesmo ampliando determinada região de interesse, a análise via este espectro só consegue distinguir claramente a amostra de leite puro, controle (linha superior) da amostra de leite adicionada à ivermectina em 100 ppb (linha inferior). As amostras com concentrações menores e próximas ficaram entre essas duas linhas.

## Análise de componentes principais

A figura 5 representa o gráfico *hotelling scores* da PCA, mostrando os dados de agrupamento (*clustering*) para amostras de leite puro (controle), leite com: 100 ppb de enrofloxacino; 100 ppb de oxitetraciclina; e leite com 4 ppb de penicilina G.

**Figura 5.** Gráfico *hotelling scores* da análise estatística (PCA) mostrando os dados de agrupamento (*clustering*) para amostras de leite puro (controle), GEN1, GEN2 e GEN3; leite com 100 ppb de enrofloxacino, EN100.1, EN100.2 e EN100.3; 100 ppb de oxitetraciclina, TE100.1, TE100.2 e TE100.3; e leite com 4 ppb de penicilina G, PE4.1, PE4.2 e PE4.3.

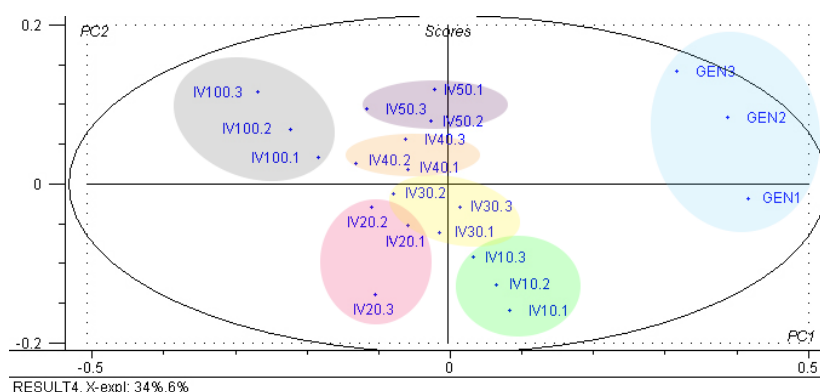


Analisando a figura 5, observa-se claramente a formação de *clusters* (agrupamentos) resultantes do alto grau de similaridade entre os grupos das amostras. Quatro grupos são apresentados, um em cada quadrante. O grupo 1 refere-se às amostras de leite puro (controle) e está localizado no primeiro quadrante. O grupo 2, *cluster* localizado no segundo quadrante, representa um grupo de amostras contaminadas com 4 ppb de penicilina G. O terceiro quadrante contém elementos do grupo 3 que está relacionado às amostras de leite contaminadas com 100 ppb de enrofloxacino, enquanto o quarto quadrante está ocupado pelo grupo 4, contendo amostras de leite contaminadas com 100 ppb de oxitetraciclina. Entre os elementos de cada grupo, nenhum está muito distante um do outro, descartando a presença de *outliers*, isto é, amostras isoladas que podem ser duvidosas. A PCA discriminou com precisão as amostras em grupos, apesar de as concentrações dos antimicrobianos no leite serem muito baixas. Da PC1, pode-se observar que a penicilina G e o enrofloxacino têm o mesmo score em contraposição à oxitetraciclina e ao leite puro. Portanto, a PC1 representa o grau de contaminação do leite com antibióticos.

O grupo de dados contendo leite puro está próximo do centro do eixo. Os *clusters* contaminados têm diferentes distâncias e diferentes posições do centro. Isto está relacionado ao fato de as concentrações dos medicamentos serem diferentes. Por exemplo, amostras com 100 ppb de medicação (grupos 3 e 4) têm posição semelhante. Pelo raciocínio acima, infere-se que PC2 está relacionado à similitude do leite.

A figura 6 apresenta o gráfico *hotelling scores* da PCA, mostrando os dados de possível agrupamento (*clustering*) para amostras de leite puro (controle) e leite com: 100 ppb; 50 ppb; 40 ppb; 30 ppb; 20 ppb e 10 ppb de ivermectina.

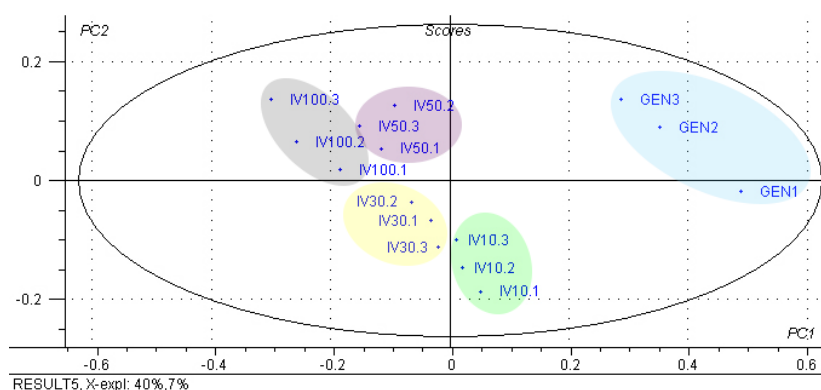
**Figura 6.** Gráfico *hotelling* scores da análise estatística (PCA) mostrando os dados de agrupamento (*clustering*) para amostras de leite puro (controle), GEN1, GEN2 e GEN3; leite adicionado o antiparasitário ivermectina em: 100 ppb, IV100.1, IV100.2 e IV100.3; 50 ppb, IV50.1, IV50.2 e IV50.3; 40 ppb, IV40.1, IV40.2 e IV40.3, 30 ppb, IV30.1, IV30.2 e IV30.3, 20 ppb, IV20.1, IV20.2 e IV20.3 e 10 ppb, IV10.1, IV10.2 e IV10.3, este último o LMR para este medicamento.



Na figura 6, é clara a discriminação entre as amostras de leite puro daquelas contaminadas, sobretudo a com maior concentração da droga, 100 ppb. Observa-se que na PC1, eixo vertical, as amostras com a menor concentração, 10 ppb (IV10.1, IV10.2 e IV10.3), estão mais próximas das amostras de leite puro (GEN1, GEN2 e GEN3), controle. Isto ocorre porque estas amostras são as mais semelhantes às de leite puro, devido à concentração do medicamento na amostra supostamente contaminada ser a menor. Como já citado, o oposto também ocorre com aquelas contaminadas com maior concentração de medicamento, 100 ppb, onde elas se encontram mais afastadas das amostras de leite puro, em relação à PC1. As concentrações da droga abaixo de 50 ppb até alcançarem o LMR (10 ppb) aparentam formar um grande *cluster*, mas dentro do mesmo, é possível verificar outros pequenos, correspondendo a cada concentração do medicamento no leite (50 ppb, 40 ppb, 30 ppb, 20 ppb e 10 ppb). Isto se deve à diferença entre as concentrações, que são muito pequenas, 10 ppb.

A figura 7 também se refere à simulação da contaminação do leite puro com ivermectina, mas agora aumentando a diferença entre suas concentrações.

**Figura 7.** Gráfico *hotelling* scores da análise estatística (PCA) mostrando os dados de agrupamento (*clustering*) para amostras de leite puro, controle, GEN1, GEN2 e GEN3; leite adicionado o antiparasitário ivermectina em: 100 µg/L (100 ppb), IV100.1, IV100.2 e IV100.3; 50 µg/L (50 ppb), IV50.1, IV50.2 e IV50.3; 30 µg/L (30 ppb), IV30.1, IV30.2 e IV30.3 e 10 µg/L (10 ppb), IV10.1, IV10.2 e IV10.3, este último o LMR para este medicamento.



Novamente há formação de *cluster*. Na PC1, as amostras de leite puro se localizam no grupamento da direita, bem afastadas do maior grupamento, ao centro, referentes aos leites contaminados. As amostras com 100 ppb se encontram mais distantes quando comparadas às de leite puro, controle, indicando que não há relação forte de similaridade entre elas. As amostras com menores concentrações de medicamento, 10 ppb (LMR), são as mais próximas do leite puro, indicando forte relação entre elas. As amostras com valores intermediários, 30 ppb e 50 ppb, estão bem próximas, em relação à PC1, o que é de se esperar, pois a diferença de concentração é pequena.

Observa-se, no entanto, que o ponto médio das amostras de 30 ppb é cerca de -0,05 no eixo horizontal da PC1, enquanto que para as amostras de 50 ppb seria aproximadamente -0,15, no mesmo eixo. Como as amostras de leite puro estão localizadas em pontos positivos, cerca de 0,4, as amostras de 30 ppb estariam mais próximas das amostras controle, leite puro. Isto é fato, pois possuem menos concentração de medicamento quando comparadas às de 50 ppb.

## CONCLUSÃO

A técnica de FT-NIR associada à PCA se destacou por ser rápida, feita em poucos segundos, e também de fácil operação. A análise via PCA foi fundamental para discriminar a amostra controle, de leite puro, do leite contaminado com os medicamentos veterinários: antimicrobianos e antiparasitário, mesmo em baixas concentrações, 10 ppb e 4 ppb, respectivamente. Isto mostra que a metodologia aqui empregada pode ser estudada para ser utilizada como técnica complementar as outras existentes, já utilizadas para detecção de resíduos de fármacos veterinários em leite.

Ao propor novas técnicas de análise, surgem novas possibilidades para pesquisas semelhantes, o que contribui para o aumento na inspeção, colaborando para a fiscalização e oferecendo alternativas para laboratórios de análise.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de fomentos do Brasil, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (310899/2018-4), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (RED 00521-16). Luiz, L.C agradece a agência Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (PNPD 2871/2011) pela bolsa de pós-doutorado.

## REFERÊNCIAS

1. Pontes Netto D, Lopes MO, Oliveira MCS, Nunes MP, Machinski Junior M, Bosquioli S L, Benatto A, Benini A, Bombardelli ALC, Vedovello Filho D, Machado E, Belmonte IV, Alberton M, Pedroso PP, Scucato ES. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. Acta Scientiarum. Animal Sciences 2005;27(1):145-151. DOI: 10.4025/actascianimsci.v27i1.1260
2. Tavanti VK, Bassi IG, Ferreira GCC, et al. Composição e a capacidade de coagulação de leites de vacas holandesas e girolandas. Revista do Instituto de Laticínio Candido Tostes 2009;370(64):5-9. [acesso em 09 de novembro de 2020] Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/92>:

3. Almeida CC. Avaliação de Suplementos Nutricionais à Base de Whey Protein. Niterói. Dissertação [Mestrado em Medicina Veterinária] - Universidade Federal Fluminense; 2014.
4. Haraguchi FK, Abreu WC, PAULA H. Proteínas do Soro do Leite: Composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. Rev. Nutr [online] 2006;19(4):479-488. DOI: 10.1590/S1415-52732006000400007.
5. Neves VA, Souza KAFD. Análise de alimentos: pesquisa dos componentes do leite. Experimentos de Bioquímica. UNESP. [acesso em 09 de novembro de 2020] Disponível em: [http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/analise\\_leite/analise\\_leite.htm](http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/analise_leite/analise_leite.htm)
6. Morzelle MC. Composição Química do Leite. Notas de Aula, ESALQ/USP; 2016. [acesso em 09 de novembro de 2020] Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1810879/mod\\_resource/content/1/Aula%202.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1810879/mod_resource/content/1/Aula%202.pdf)
7. Pereira MCS, Brumano LP, Kamiyama CM, Pereira JPF, Rodarte MP, Pinto MAO. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes 2012;67(389):57-65. DOI: 10.5935/2238-6416.20120079
8. Handford CE, Campbell K, Elliott CT. Impacts of milk fraud on food safety and nutrition with special emphasis on developing countries. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2016;15(1):130-142. DOI: 10.1111/1541-4337.12181
9. Brandão MP, Neto MG, Anjos VC, Bell MJV. Detection of adulteration of goat milk powder with bovine milk powder by front-face and time resolved fluorescence. Food Control 2017;81:168-172. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.06.008
10. Nascimento WWG, Souza MPO, Valente ACMM, Anjos VC, Furtado MAM, Bell M. J. V. Results from portable and of low-cost equipment developed for detection of milk adulterations. Food Sci. Technol 2017; 37(spe):38-74. DOI: 10.1590/1678-457x.06617
11. Nascimento WWG, Souza MPO, Valente ACMM, Anjos VC, Furtado MAM, Bell M. J. V. Resultados a partir de equipamento portátil e de baixo custo desenvolvido para detecção de adulterações em leite. Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos 2019;2:274-281. DOI: 10.22533/at.ed.99719091031
12. Brito MAVP, Lange CC. Resíduos de antibióticos no leite. Embrapa; 2005. Comunicado Técnico 44. [acesso em 09 de novembro de 2020] Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/65413/1/COT-44-Residuos-de-antibioticos.pdf>
13. Forsythe SJ. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed; 2002.
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal: Documento de base para discussão regulatória, Brasília; 2018. [acesso em 09 de novembro de 2020] Disponível em: <http://terraviva.com.br/site/2018/outubro/3010med1.pdf>
15. Gallo P, Fabbrocino S, Dowling G, Salini M, Fiori M, Perrata G, Serpe L. Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography 2010;1217(17):2832-2839. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.02.047

16. Zhang YD, Zheng N, Han, RW, Zheng BQ, Yu ZN, Li, SL, Zheg, SS. Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and Quinolones in Pasteurized Milk and UHT milk in China's market. *Food Control* 2014;36:238 – 242. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.08.012
17. Sivakesava S, Irudayara J. Rapid Determination of Tetracycline in Milk by FT-MIR and FT-NIR Spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 2002;85(3):487-493. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74099-X
18. Brandão MCMP, Carmo AP, Bell MJ, Anjos VC. Characterization of Milk by Infrared Spectroscopy. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 2010;65(373):30-33. [acesso em 09 de novembro de 2020] Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/viewFile/121/125>
19. Leite AIN, Pereira CG, Andrade J, Vicentini NM, Bell MJV, Anjos V. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. *LWT* 2019;109:63-69. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.04.017
20. Pereira CG, Leite AIN, Andrade J, Bell MJV, Anjos V. Evaluation of butter oil adulteration with soybean oil by FT-MIR and FT-NIR spectroscopies and multivariate analyses. *LWT* 2019;107:1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.072>
21. Jolliffe IT, Cadima J. Principal Component Analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions Series A, Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2016;374,(2065). DOI: <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
22. Luiz LC, Bell MJV, Rocha RA, Mendes TO, Anjos VC. Análise de Resíduos de Diclofenaco Sódico Veterinário em Leite por Espectroscopia no Infravermelho Próximo. *Rev. Bras. Ciências Saúde* 2014;18(3),219-224. DOI:10.4034/RBCS.2014.18.03.05
23. Pereira CG, Luiz LC, Bell MJV, Anjos V. Near and Mid Infrared Spectroscopy to assess Milk Products Quality: A Review of Recent Applications. *Journal of Dairy Research & Technology* 2020; 3:014. DOI:10.24966/DRT-9315/100014
24. Luiz LC, Bell MJV, Rocha RA, Leal NL, Anjos VC. Detection of Veterinary Antimicrobial Residues in Milk through Near-Infrared Absorption Spectroscopy. *Journal of Spectroscopy* 2018;ID5152832,1-6. DOI: 10.1155/2018/5152832.

#### **Colaboradores**

Luiz, LC trabalhou em todas as etapas, desde a concepção do estudo até a revisão final; Bell MJV e Anjos VC trabalharam na análise e interpretação dos dados, bem como na revisão do texto.

Conflito de Interesses: Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

---

Recebido: 24 de janeiro de 2020

Aceito: 10 de setembro de 2020