



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E**  
**CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Área de Concentração: Ciência de Alimentos



**ESPECTROSCOPIA ASSOCIADA A QUIMIOMETRIA COMO FERRAMENTA DE**  
**AValiação DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE TILOSINA EM LEITE**

Autor: Alexandre Gomes Marques de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

Co-orientadores: Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Profa. Dra. Larissa Cavalcante de Rezende

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL,  
Março de 2019

**ALEXANDRE GOMES MARQUES DE FREITAS**

**ESPECTROSCOPIA ASSOCIADA A QUIMIOMETRIA COMO FERRAMENTA DE  
AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE TILOSINA EM LEITE**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

Co-orientadores: Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Profa. Dra. Larissa Cavalcante de Rezende

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL,  
Março de 2019

637.127 Freitas, Alexandre Gomes Marques de  
F936e Espectroscopia associada a quimiometria como ferramenta de avaliação da presença de resíduos de tilosina em leite. / Alexandre Gomes Marques de Freitas. - Itapetinga: UESB, 2019. 85p.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes e coorientação do Prof. D.Sc. Leandro Soares Santos e Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Larissa Cavalcante de Rezende.

1. Leite – Análise - Resíduo de antibiótico. 2. Leite - Espectroscopia. 3. Leite – Quimiometria. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque. III. Santos, Leandro Soares. IV. Rezende, Larissa Cavalcante de. V. Título.

CDD(21): **637.127**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Leite – Análise - Resíduo de antibiótico
2. Leite - Espectroscopia
3. Leite – Quimiometria



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

### DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título: ESPECTROSCOPIA ASSOCIADA À QUIMIOMETRIA COMO FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO DE PRESENÇA DE RESÍDUOS DE TILOSINA EM LEITE.**

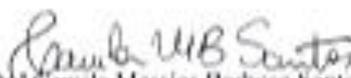
**Autor (a): ALEXANDRE GOMES MARQUES DE FREITAS**

**Orientador (a): Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes**

**Coorientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos**

**Prof.ª Dr.ª Larissa Cavalcante de Rezende**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de *MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS*, pela Banca Examinadora.

  
Prof.ª Dr.ª Camila Messias Barbosa Santos  
Membro - UESB

  
Prof. Dr. Antônio Afonso Pinto Garcia  
Junior  
Membro - UESB

  
Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque  
Fernandes  
Orientador - UESB  
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 12 de março de 2019.

“O homem é do tamanho do seu sonho.”

*Fernando Pessoa*

À minha mãe, por todo amor e carinho a mim dedicados desde sempre.

Ao meu pai, por seu apoio em todos os momentos.

Ao meu filho, Artur, por compreender minha ausência nos seus dois últimos aniversários, em seus jogos, suas apresentações escolares... enfim, no dia-a-dia.

À minha companheira de todos os momentos, Bárbara, pelo incentivo, dedicação e inspiração que naturalmente me proporciona.

Aos meus irmãos, Adriana, Cristiana, Eduardo, Gustavo, Edilma, Nilma, Sérgio (*in memoriam*) e Célia, pelo companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, saúde e força para superar as dificuldades.

Ao professor Sérgio Fernandes, pela orientação, apoio, confiança e amizade.

Ao professor Leandro Soares, pelos ensinamentos e por sua disponibilidade.

À professora Larissa Cavalcante, pelas contribuições ao trabalho.

Aos professores Antônio Amandio e Camila Messias pelas valiosas sugestões para o trabalho.

Ao professor Danilo Leão, pela colaboração e sugestões para o trabalho.

À professora Cristiane Leal, pela colaboração cedendo o liofilizador da Unidade Experimental de Caprinos e Ovinos (UECO).

À professora Sibelle Ferrão, pela colaboração com o FTIR.

Às colegas do Grupo de Estudos em Leite Naiara, Janine, Sara, Tainá e Lenara, pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

Aos colegas de pós-graduação Grazielly, Bem-Hur, Daniele e Acsa, pelas contribuições no desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores, pelos ensinamentos e apoio durante o curso.

Aos colegas de curso, por todos os momentos que passamos juntos.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pela oportunidade de crescimento acadêmico, profissional e pessoal proporcionadas pelo curso.

À FAPESB, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I – REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Leite: composição natural e alterações.....	2
2.2. Presença de resíduos de antimicrobianos em leite.....	3
2.3. Antimicrobianos de uso veterinário.....	4
2.3.1. Tilosina.....	6
2.4. Legislação sobre resíduos de medicamentos de uso veterinário em leite.....	8
2.5. Metodologias para quantificação de resíduos de antimicrobianos em leite.....	10
2.6. Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier.....	12
2.7. Quimiometria.....	15
2.7.1. Análise de Componentes Principais.....	17
2.7.2. Análise Discriminante.....	18
2.7.3. Análise de Regressão Linear Múltipla.....	18
2.7.4. Análise de Regressão por Mínimos Quadrados.....	19
2.8. Espectroscopia no infravermelho associada a ferramentas quimiométricas.....	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
II - OBJETIVOS.....	30
1. Objetivo geral.....	30
2. Objetivos específicos.....	30

III - CAPÍTULO 1	31
1. Introdução	31
2. Material e métodos	32
2.1. Amostras	32
2.2. Delineamento experimental	32
2.3. Preparo das amostras	33
2.4. Reagentes	34
2.5. Análise espectrofotométrica vibracional	34
2.6. Análise estatística multivariada	35
3. Resultados e Discussão	36
3.1. Análise espectrofotométrica vibracional	36
3.1.1. Análise espectrofotométrica vibracional da Tilosina	36
3.1.2. Análise espectrofotométrica vibracional	37
3.2. Análises estatísticas multivariadas	39
3.2.1. Análise de Componentes Principais	40
3.2.2. Análise de Regressão por Mínimos Quadrados	41
3.2.2.1. Amostras com Tilosina de 0 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	41
3.2.2.2. Amostras com Tilosina de 30 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	43
4. Conclusões	44
5. Referências bibliográficas	44
IV - CAPÍTULO 2	48
1. Introdução	48
2. Material e métodos	49
2.1. Amostras	49
2.2. Delineamento experimental	49
2.3. Preparo das amostras	50
2.4. Reagentes	51

2.5. Análise espectrofotométrica vibracional.....	51
2.6 Análise estatística multivariada.....	51
3. Resultados e Discussão.....	51
3.1. Análise espectrofotométrica vibracional.....	51
3.1.1. Análise espectrofotométrica vibracional da Tilosina.....	51
3.1.2. Análise espectrofotométrica vibracional.....	53
3.2. Análises estatísticas multivariadas.....	56
3.2.1. Análise de Componentes Principais.....	57
3.2.2. Análise Discriminante.....	59
3.2.3. Análise de Regressão Linear Múltipla.....	64
3.2.5. Análise de Regressão por Mínimos Quadrados.....	65
4. Conclusões.....	67
5. Referências bibliográficas.....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da tilosina e componentes relacionados.....	7
Figura 2: Representação esquemática de espectrômetro com transformada de Fourier.....	14

### CAPÍTULO 1

Figura 1: Fluxograma das etapas envolvidas no desenvolvimento do método de determinação de Tilosina em leite fluido.....	33
Figura 2: Espectro do padrão de Tilosina na região do infravermelho de 1000-3000 $\text{cm}^{-1}$ .....	36
Figura 3: Espectro de leite fluido puro.....	38
Figura 4: Sobreposição dos espectros das amostras de leite puro e fraudadas com Tilosina.....	39
Figura 5: Gráficos de dispersão em relação a CP 1 e CP 2. I: amostras de leite puro (A), leite fraudado com Tilosina abaixo do LMR (B) e com Tilosina acima do LMR (C). II: amostras de leite puro (A) e leite fraudado com Tilosina (B).....	40
Figura 6: Gráfico de carga de correlação.....	42
Figura 7: Gráfico de correlação de valores observados e preditos.....	42
Figura 8: Gráfico de carga de correlação.....	43
Figura 9: Gráfico de correlação de valores observados e preditos.....	44

### CAPÍTULO 2

Figura 1: Fluxograma das etapas envolvidas no desenvolvimento do método de determinação de Tilosina em leite liofilizado.....	50
Figura 2: Espectro do padrão de Tilosina na região do infravermelho de 650-4000 $\text{cm}^{-1}$ .....	52
Figura 3: Espectro de leite liofilizado puro.....	54
Figura 4: Sobreposição dos espectros das amostras de leite puro e fraudadas com Tilosina.....	55
Figura 5: Gráfico de dispersão das amostras de leite puro (0) e leite fraudado com Tilosina (10 a 100); I em relação a CP1 e CP2; II em relação a CP1 e CP3.....	57

Figura 6: Gráfico de dispersão das amostras de leite puro e fraudadas com Tilosina abaixo do LMR (10 a 50) e acima do LMR (60 a 100); I em relação a CP1 e CP2; II em relação a CP1 e CP3 .....	58
Figura 7: Gráfico de dispersão das amostras de leite puro, leite adulterado com Tilosina e padrão do antibiótico em relação a CP1 e CP2 .....	59
Figura 8: Gráfico de correlação de valores observados e preditos para modelo Stepwise.....	65
Figura 9: Gráfico de carga de correlação.....	66
Figura 10: Gráfico de correlação de valores observados e preditos.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites máximos de resíduos de antibióticos em leite, de acordo com diversos órgão reguladores.....5

Tabela 2: Bandas de absorção de grupos funcionais na região do infravermelho ..... 13

### CAPÍTULO 1

Tabela 1: Volumes da solução de trabalho acrescentada ao leite cru e respectivas concentrações do antibiótico Tilosina.....34

### CAPÍTULO 2

Tabela 1: Bandas de absorção do espectro de Tilosina..... 53

Tabela 2: Picos de absorção de componentes do leite.....54

Tabela 3: Faixas espectrais dos picos observados no espectro do leite fluido.....56

Tabela 4: Função linear discriminante para amostras de leite puro (0) e fraudadas com Tilosina (10, 20, 30, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100).....61

Tabela 5: Função linear discriminante para leite puro (A), leite fraudado com Tilosina abaixo do LMR 10-50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (B) e leite fraudado com Tilosina acima do LMR 60-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (C)...62

Tabela 6: Função linear discriminante para leite puro (A) e leite fraudado com Tilosina (B)...63

Tabela 7: Parâmetros dos modelos de RLM..... 64

Tabela 8: Faixas espectrais testadas e os respectivos parâmetros obtidos ..... 67

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACP: análise de componentes principais.

AD: análise discriminante.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ATR-FTIR: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier Acoplada a Reflectância Total Atenuada.

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.

CP's: Componentes Principais.

FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy.

HPLC: high performance liquid chromatography.

IVTF: infravermelho com transformada de Fourier.

LMR: limite máximo de resíduo.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

PAMVet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos.

PLS: *Partial Least Squares*.

RLM: Regressão Linear Múltipla.

## RESUMO

FREITAS, Alexandre Gomes Marques de. Espectroscopia associada a quimiometria como ferramenta de avaliação da presença de resíduos de Tilosina em leite. Itapetinga, BA: UESB, 2019. p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).\*

O uso inadequado de antibióticos em rebanhos leiteiros pode provocar a presença de resíduos no leite, que causam reações adversas à saúde dos consumidores e gera resistência dos microrganismos aos antibióticos. Técnicas que aumentam a velocidade analítica têm sido buscadas, sendo a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) é promissora. Assim, com o intuito de desenvolver uma metodologia para detecção de resíduos de antibiótico em leite, foram realizados dois estudos empregando a espectroscopia no IVTF associada à quimiometria para desenvolver equações de predição de Tilosina em leite. No primeiro experimento, amostras de leite oriundas de rebanhos (n = 13) de vacas livres de resíduos de antibióticos foram coletadas e a estas foram adicionadas quantidades conhecidas do padrão de Tilosina, obtendo 11 concentrações distintas. Estas amostras foram analisadas em espectrofotômetro de IVTF e os espectros obtidos foram submetidos às análises quimiométricas. Para o segundo experimento foram coletadas amostras de leite de rebanhos (n = 61) de vacas livres de antibióticos. Quantidades pré-estabelecidas do padrão de Tilosina foram acrescentadas a estas amostras, perfazendo um total de 11 concentrações. Em seguida estas amostras foram liofilizadas e analisadas em espectrofotômetro de IVTF e os espectros obtidos foram submetidos às análises multivariadas. Em ambos os estudos, os métodos de classificação não proporcionaram a separação das amostras em função da concentração de Tilosina. No primeiro estudo, a Análise de Regressão por Mínimos Quadrados forneceu modelos com altos valores de correlação, capazes de prever com precisão a concentração de Tilosina em leite líquido, entretanto, no segundo estudo foram obtidos modelos de calibração com baixos valores de correlação, ineficientes para a predição de Tilosina em leite liofilizado.

**Palavras chave:** leite, Tilosina, IVTF, quimiometria.

---

\* Orientador: Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque e Co-orientadores: Santos, Leandro Soares e Rezende, Larissa Cavalcante de.

## ABSTRACT

Inadequate use of antibiotics in dairy herds can lead to the presence of residues in milk, which cause adverse reactions to the health of consumers and generates resistance of the microorganisms to the antibiotics. Techniques that increase analytical velocity have been sought, and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) is promising. Thus, in order to develop a methodology for the detection of antibiotic residues in milk, two studies were carried out using spectroscopy in the FTIR associated to chemometrics to develop equations of prediction of Tylosin in milk. In the first experiment, milk samples from herds ( $n = 13$ ) of cows free from antibiotic residues were collected and to these were added known amounts of the Tylosin standard, obtaining 11 different concentrations. These samples were analyzed in an FTIR spectrophotometer and the spectra obtained were submitted to the chemometric analysis. For the second experiment, milk samples were collected from herds ( $n = 61$ ) of cows free of antibiotics. Pre-established amounts of the Tylosin standard were added to these samples, making a total of 11 concentrations. These samples were then lyophilized and analyzed in an FTIR spectrophotometer and the spectra obtained were submitted to multivariate analysis. In both studies, the sorting methods did not provide the separation of the samples as a function of the Tylosin concentration. In the first study, the Partial Least Squares Analysis provided models with high correlation values, capable of accurately predicting the concentration of Tylosin in liquid milk, however, in the second study, low correlation models, inefficient for the prediction of Tylosin in lyophilized milk.

**Key words:** milk, Tylosin, FTIR, chemometrics.

## I – REFERENCIAL TEÓRICO

### 1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos principais produtos de origem agropecuária produzidos no Brasil e assume importância econômica, nutricional e social. A presença de resíduos e contaminantes no leite compromete sua qualidade e representa riscos à saúde dos consumidores. Dentre as substâncias que deixam resíduos no leite, destacam-se os medicamentos de uso veterinário, especialmente os antibióticos.

O uso profilático ou terapêutico de antibióticos em vacas lactantes é comum para o tratamento das mastites, que provocam redução na produção de leite e alterações em suas propriedades físico-químicas. Diversos tipos de antibióticos são utilizados, como a Tilosina, por exemplo. O tratamento de animais produtores de leite destinado ao consumo humano com antibióticos requer atenção e cuidado, em razão da possibilidade de contaminação do leite por resíduos dos medicamentos.

O uso inadequado de antibióticos em animais lactantes se tornou problema mundial, causado pela quantidade excessiva de resíduos no leite, agravado pela capilaridade da produção de leite em todo o mundo. Assim, desde os locais mais populosos até os mais longínquos, tem sido observada a presença de resíduos de medicamentos de uso veterinário, que ocasiona efeitos indesejáveis em seres humanos, resistência dos microrganismos aos antibióticos existentes e problemas para a indústria de processamento do leite.

A presença de resíduos de medicamentos nos alimentos de origem animal tem sido monitorada por órgãos reguladores nacionais e internacionais. Pesquisadores têm buscado o aumento da eficiência no controle da qualidade de alimentos e neste contexto, o leite comercializado não passa despercebido. Novas técnicas e/ou metodologias têm sido buscadas e desenvolvidas e, de forma geral, visam elevar a rapidez analítica, o que passa pelo aumento no número de amostras de leite avaliadas. Nesse sentido, pesquisadores buscam desenvolver novas metodologias, mais rápidas e eficientes, que poupem tempo e reagentes, possibilitando o aumento desejado na eficiência do controle de qualidade.

Testes qualitativos e quantitativos podem ser empregados para detectar resíduos de medicamentos antimicrobianos em leite e derivados. Atualmente, a técnica oficial para quantificação de resíduos de antibióticos em leite é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

(CLAE ou HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), técnica que envolve custos elevados, necessita muito tempo de análise pela sua complexidade, além do uso de reagentes químicos e geração de resíduos causadores de danos ao meio-ambiente e que aumentam a insalubridade dos laboratórios.

Neste contexto, destaca-se a importância de utilizar novas técnicas, que possibilitem a ampliação das análises de resíduos de antibióticos em leite e que propiciem menores custos e maior rapidez. Assim, após estudo de técnicas analíticas em uso atualmente, foi identificada a espectroscopia no infravermelho médio com Transformada de Fourier associada à quimiometria como passível de uso para a quantificação de resíduos de antibióticos em leite. Esta técnica tem se difundido na área de controle de alimentos por sua rapidez, nenhuma ou pouca manipulação de amostras e por ser não destrutiva.

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para quantificação de resíduos de antibiótico em leite utilizando a espectroscopia no infravermelho médio com transformada Fourier associada a ferramentas quimiométricas (análise de componentes principais e análise discriminante). O antibiótico alvo do estudo desenvolvido é a tilosina, que é utilizada para o tratamento de mastites em vacas, entre outras indicações.

Técnicas espectroscópicas no infravermelho e quimiometria têm sido amplamente empregadas na análise de alimentos, no entanto, poucos estudos relatam o emprego dessas técnicas combinadas para a identificação de resíduos de medicamentos. Diante disto, o estudo proposto tem importância científica, além do ponto de vista social e de saúde pública. Para tal, dois experimentos foram desenvolvidos e são apresentados nos capítulos 1 e 2.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Leite: composição natural e alterações**

O leite, considerado uma das fontes mais completas de nutrientes para os seres humanos, é um alimento de alto valor nutricional, que apresenta em sua composição proteínas, vitaminas, gorduras, carboidratos e sais minerais, sendo a principal fonte de cálcio para alimentação humana (LUIZ et al., 2014).

A composição e qualidade do leite dependem de diversos fatores, tais como espécie, raça, lactação, idade, manejo, alimentação e sanidade dos animais, condições climáticas e

período do ano, entre outros (MAGALHÃES et al., 2006; NORO et al., 2006). O leite pode ter sua composição natural alterada por adulteração, mastite e contaminação por resíduos de medicamentos veterinários (KASEMSUMRAN, THANAPASE e KIATSOONTHON, 2007; LITTERIO et al., 2007; DRACKOVA et al., 2009; DOMINGO et al., 2014; FERNANDES et al., 2014; BOTELHO et al., 2015; POONIA et al., 2017).

A adulteração do leite geralmente é realizada com o uso de água, soro de leite, sal, sacarose, soda cáustica, ureia, peróxido de hidrogênio, dentre outros, principalmente com o objetivo de mascarar qualidade, aumentar o volume e aumentar o lucro econômico (KASEMSUMRAN, THANAPASE e KIATSOONTHON, 2007; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013; DOMINGO et al., 2014), no entanto, a mastite (inflamação da glândula mamária) provoca alterações nas propriedades físico-químicas no leite, como a aumento dos teores de sódio e cloro e redução de cálcio, fósforo, proteína e gordura (COSTA et al., 2013). Em casos de infecções, como a mastite, o uso de antibióticos em animais produtores de leite é imprescindível, contudo, o uso inadequado de antibióticos para o controle de mastites é a principal fonte de resíduos de antimicrobianos no leite e seu monitoramento é essencial (FERNANDES et al., 2014).

## **2.2. Presença de resíduos de antimicrobianos em leite**

Estudos indicam a presença de resíduos de antibióticos em leite (ANVISA, 2009; DRACKOVA et al., 2009; LUIZ et al., 2015). A presença de resíduos de antibióticos representa a principal contaminação química em leite e produtos lácteos, sendo a principal causa dessa contaminação o uso inadequado dos medicamentos veterinários (FERNANDES et al., 2014). A presença de resíduos de antibióticos em leite e derivados pode também ser resultado de fraude, com o objetivo de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis e mascarar a qualidade do produto (RUELA et al., 2005).

A persistência de antimicrobianos no leite após o tratamento é influenciado por vários fatores, como tipo de medicamento, dosagem, via de administração, peso corporal e estado de saúde do animal (LITTERIO et al., 2007). Para evitar a presença de resíduos de medicamentos veterinários no leite é necessário que sejam adotadas boas práticas veterinárias e, principalmente, seja respeitado o período de carência, que é o tempo necessário para que o medicamento eliminado nesse fluido atinja concentrações seguras. O período de carência varia de acordo com o medicamento e é uma informação que deve constar na bula do medicamento, para indicar o tempo que deve ser respeitado entre a última administração do medicamento e o

momento em que é permitido o uso do leite do animal que foi tratado (COSTA et al., 2013; SPINOSA, GÓRNIAC, BERNARDI, 2017).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite causa problemas à indústria de laticínios devido a alterações nos processos de fabricação de derivados lácteos. Pode ocorrer, por exemplo, a inibição de culturas que conferem características sensoriais ao produto lácteos e prejudicar sua qualidade (FONSECA et al., 2009; KANTIANI, FARRÉ e BARCEIÓ, 2009), a coagulação inadequada do leite e maturação imprópria de queijos, a diminuição do crescimento do fermento lácteo e inativação de culturas usadas na produção de iogurtes, leites fermentados, queijos e manteiga (OHI, 2010).

A contaminação de alimentos por resíduos de antimicrobianos é um grave problema de saúde pública no mundo, relatos científicos indicam a resistência bacteriana aos antibióticos (LEE et al., 2007; PERICÁS, MAQUIEIRA e PUCHARDES et al., 2010; BRASIL, 2011). Além disso, a exposição prolongada a resíduos de antimicrobianos pode causar efeitos citotóxicos (imunopatológicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos e toxicidade para a medula óssea), efeitos genotóxicos (carcinogênico, mutagênico, teratogênico), desordens reprodutivas, reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis e desequilíbrio da flora intestinal (FONSECA et al., 2009; COSTA et al., 2013; PACHECO-SILVA, SOUZA e CALDAS, 2014).

### **2.3. Antimicrobianos de uso veterinário**

Medicamentos veterinários são substâncias, ou associação de substâncias, usadas para prevenir ou tratar doenças em animais ou como promotores de crescimento. Essas substâncias compreendem uma grande variedade de classes químicas com diversas ações terapêuticas, como antimicrobiana, antiparasitária, inseticida, fungicida e sedativa. Em animais produtores de alimentos são frequentemente utilizados antibióticos para o tratamento de mastite, pneumonia, diarreia e artrite (PACHECO-SILVA, SOUZA e CALDAS, 2014).

Os antibióticos naturais e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico. A classificação dos antibióticos varia entre autores. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os antibióticos são classificados como:  $\beta$ -lactâmicos, Quinolonas, Glicopeptídeos, Oxazolidinonas, Aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina), Macrolídeos, Lincosaminas, Nitroimidazólicos, Cloranfenicol, Estreptograminas, Sulfonamidas, Tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina, doxiciclina e clortetraciclina) e novos antibióticos (Gliciliclinas, Polimixinas, Daptomicinas e

Gemifloxacina) (ANVISA, 2017). Dentre as classes de antibióticos, tetraciclínas,  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e macrolídeos, se destacam devido ao maior uso em animais.

No Brasil, a ANVISA e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) adotam Limite Máximo de Resíduos (LMR) para medicamentos veterinários recomendados pelo Mercosul, *Codex Alimentarius*, União Europeia ou Estados Unidos. O LMR se baseia no tipo e na quantidade de resíduo que não oferece risco de toxicidade para a saúde humana. Estes limites (Tabela 1) são estabelecidos a fim de garantir o uso adequado dos medicamentos, limitar a exposição e proteger a saúde dos consumidores de alimentos provenientes de animais tratados (PACHECO-SILVA, SOUZA E CALDAS, 2014).

Tabela 1: Limites máximos de resíduos de antibióticos em leite, de acordo com diversos órgão reguladores.

Grupo de antibióticos	Substância farmacológica ativa	LMR ( $\mu\text{G}/\text{kg}$ )	Referência
<b>Macrolídeos</b>	<b>Tilosina</b>	<b>50</b>	<b>União Europeia</b>
	Eritromicina	40	MERCOSUL
B-lactâmicos	Ampicilina	4	MERCOSUL
	Amoxiciclina	4	MERCOSUL
Sulfonamidas	Sulfametazina	100	<i>Codex</i>
	Sulfametoxina	100	<i>Codex</i>
	Sulfatiazol	100	<i>Codex</i>
	Sulfadimetoxina	100	MERCOSUL
	Sulfadimidina	10	Estados Unidos
Tetraciclínas	Tetraciclina	100	<i>Codex</i>
	Oxitetraciclina	100	<i>Codex</i>
	Clortetraciclina	100	<i>Codex</i>

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2006.

As substâncias do grupo dos macrolídeos apresentam um anel macrocíclico de lactona, que contém de 14 a 18 átomos, ao qual se ligam um ou mais açúcares através de ligações glicosídicas. Os macrolídeos mais usados são: azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina, miocamicina, roxitromicina (ANVISA, 2017; SANLI et al., 2011), oleandomicina, diritromicina, fluritromicina, josamicina, rosaramicina, roquitamicina,

quitasamicina e tilosina. Esta é a segunda classe de antimicrobianos quantitativamente mais usada nos animais em geral, sendo a primeira as tetraciclinas (COSTA, et al., 2013).

Os macrolídeos têm excelente atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas e micoplasmas (PACHECO-SILVA, SOUZA E CALDAS, 2014; SANLI et al., 2011). A maioria das bactérias Gram-negativas é resistente aos macrolídeos devido à relativa impermeabilidade da membrana externa celular (SHIMADA et al., 2011).

Os macrolídeos são utilizados principalmente no tratamento de doenças respiratórias (SANLI et al., 2011), infecções gastrointestinais e urogenitais, enterite bacteriana, mastite e outras doenças. O uso indevido ou a longo prazo pode causar reações alérgicas, dano ao nervo coclear, perda de audição e sérios danos aos rins e fígado (LI et al., 2015 a). Estas drogas estão entre as mais utilizadas no mundo como promotores de crescimento, especialmente a tilosina e a espiramicina (COSTA et al., 2013).

Entre os antibióticos macrolídeos, a tilosina é uma das mais amplamente usadas (SANLI et al., 2011), sendo empregada como aditivo alimentar (ASHENAFI, HOOGMARTENS e ADAMS, 2011), para prevenir infecções e para acelerar o crescimento do gado (LI et al., 2015 b), tem se destacado no tratamento de vacas lactantes, no combate à mastite (LITTERIO et al., 2007), e não é usado na medicina humana (GRANADOS-CHINCHILLA et. al, 2012). O valor máximo permitido para tilosina em leite é de 50 ppb (SEHATI et al. 2015).

### **2.3.1. Tilosina**

A tilosina é produzida a partir da fermentação de estirpes de *Streptomyces fradiae*. O principal composto produzido é a tilosina A, mas vários componentes relacionados também são produzidos durante o processo de fermentação: tilosina B (desmicosina), tilosina C (macrocina), tilosina D (relomicina), demicinosiltilosina (DMT), lactenocina, 5-O-micaminosiltilonolida (OMT) e 20-diidrotilosina B (DHTB). Impurezas são relatadas na tilosina e são identificadas como tilosina A aldol (TAD) e isotilosina A (isoTA) (ASHENAFI, HOOGMARTENS e ADAMS, 2011).

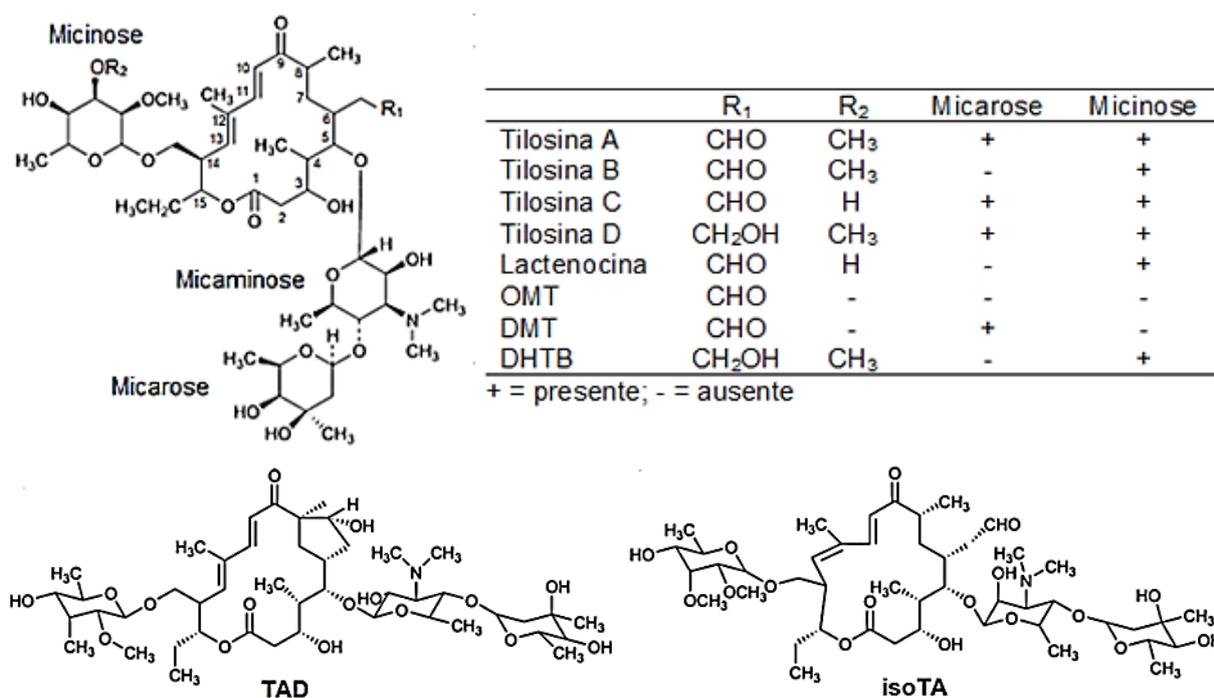


Figura 1: Estrutura química da tilosina e componentes relacionados.

Fonte: Adaptado de ARSIC et al., 2018 e ASHENAFI, HOOGMARTENS e ADAMS, 2011.

O núcleo da tilosina e seus componentes relacionados é um anel macrocíclico de 16 membros, que é uma lactona policética chamada de tilactona (ARSIC et al., 2018). A tilosina A, de fórmula molecular C<sub>46</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>17</sub> e massa molecular 916,1 g/mol, é nomeada pela IUPAC como 2-[(4~{R},5~{S},6~{S},7~{R},9~{R},11~{E},13~{E},15~{R},16~{R})-6-[(2~{R},3~{R},4~{R},5~{S},6~{R})-5-[(2~{S},4~{R},5~{S},6~{S})-4,5-dihidroxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi-4-(dimetilamino)-3-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-16-etil-4-hidroxi-15-[[2~{R},3~{R},4~{R},5~{R},6~{R})-5-hidroxi-3,4-dimetoxi-6-metiloxan-2-yl]oximetil]-5,9,13-trimetil-2,10-dioxo-1-oxaciclohexadeca-11,13-dien-7-il]acetaldeído (PUBCHEM, 2019).

Na tilosina A há três açúcares ligados ao suporte de tilactone: β-D-micaminose e α-L-micarose na forma de dissacarídeo para a posição 5, e um açúcar neutro de β-D-micinose na posição 23. Ao perder a unidade de açúcar micina, a tilosina A se transforma em tilosina B. A tilosina C difere da tilosina A por apresentar uma hidroxila na posição 3 da glicina de micinose ao invés do grupo etoxi. A tilosina D difere da tilosina A por ter grupo -CH<sub>2</sub>OH, em vez de CH<sub>2</sub>CHO, ligado à posição 6 da tilactona (ARSIC et al., 2018). Em meio neutro e alcalino, a tilosina A se decompõe principalmente em tilosina A aldol (PAESEN et al, 1995). A isotilosina A é o produto primário de fotodegradação da tilosina A (CHOPRA et al., 2013).

O medicamento comercialmente conhecido como tilosina, introduzido no mercado em 1961, consiste em uma mistura de quatro componentes estruturalmente similares: tilosina A, tilosina B, tilosina C e tilosina D. A atividade biológica da mistura é atribuída principalmente à tilosina A, constituinte de mais de 80% da mistura, embora todas as quatro tilosinas contribuam para a potência (ARSIC et al., 2018). A depender da origem, as amostras comerciais de tilosina podem conter diferentes substâncias relacionadas (ASHENAFI, HOOGMARTENS e ADAMS, 2011).

Tilosina é um antibiótico de amplo espectro, que apresenta atividade contra a maioria das bactérias Gram-positivas e diferentes membros de *Mycoplasma spp.*, alguns microorganismos Gram-negativos e membros do grupo *Chlamydia spp.* (COSTA et al., 2013). Em alguns países este antibiótico é aprovado para o tratamento de pneumonia e metrite em bovinos, erisipela, pneumonia, enteropatia proliferativa e disenteria em suínos, doenças respiratórias em aves domésticas (GRANADOS-CHINCHILLA et. al, 2012) e no tratamento de micoplasmose em aves e bovinos (ASHENAFI, HOOGMARTENS e ADAMS, 2011).

Em 1998, a União Europeia proibiu o uso de tilosina como promotor de crescimento após estudos concluírem que seu vasto uso na alimentação animal contribui para a seleção de microorganismos resistentes, que podem ser transferidos para o homem e a possível transferência de seus genes de resistência para outros patógenos. No Brasil e nos Estados Unidos é autorizado o uso de tilosina para fins terapêuticos e como promotor de crescimento em animais (COSTA et al., 2013). A tilosina também é aprovado na Argentina, sendo amplamente utilizada na prática veterinária e para tratamento de mastite (LITTERIO et al., 2007).

De acordo com a classe dos macrolídeos, a tilosina apresenta elevada lipossolubilidade e liga-se moderadamente às proteínas séricas (40%), conseqüentemente é largamente distribuída nos líquidos e tecidos do corpo (ARSIC et al., 2018). A tilosina é pouco biodegradável, por isso pode permanecer em produtos alimentícios de origem animal, como leite, carne, ovos e mel (FERRAG-SIAGH et al., 2014). Essa substância pode persistir nos tecidos animais por períodos prolongados e o tempo de excreção da tilosina no leite pode variar de 5 a 9 dias (LITTERIO et al., 2007).

#### **2.4. Legislação sobre resíduos de medicamentos de uso veterinário em leite**

Organismos como a Organização da Nações Unidas (ONU) por meio da Organização das Nações Unidas para Fome e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS)

coordenaram a criação do *Codex Alimentarius*, fórum internacional para normatização de alimentos, no qual são estabelecidas as diretrizes para os limites máximos de resíduos em alimentos (ANVISA, 2017).

No Brasil, dois órgãos coordenam conjuntamente as políticas de segurança de alimentos. O Ministério da Saúde, por meio da ANVISA, e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Contudo, esta dupla competência tem gerado críticas em função de indefinições sobre ações necessárias na área de segurança do alimento. Esses órgãos têm editado legislações que buscam proteger o consumidor. O leite se destaca neste contexto em razão da capilaridade de sua produção e grande consumo no território nacional. Esta também é uma preocupação de entidades de produtores, na perspectiva do comércio internacional do leite, e da sociedade civil, organizada no sentido do consumo de alimento seguro (SPISSO, NÓBREGA e MARQUES, 2009).

A preocupação com a segurança dos alimentos não é recente. Em 1952 foi promulgado o Decreto 30.691/1952, que trata da segurança dos alimentos de origem animal. Com o passar dos anos, a legislação sofreu transformações e melhorias, buscando a proteção da saúde coletiva (SPISSO, NÓBREGA e MARQUES, 2009). Atualmente, dois programas nacionais monitoram a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) coordenado pelo MAPA, e o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet) da ANVISA (LUIZ et al., 2014; PACHECO-SILVA, SOUZA E CALDAS, 2014).

O Plano Nacional de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) foi criado em maio de 1986 pela Portaria Ministerial nº 51, sendo adequado pela Portaria nº 527 em agosto de 1995. No processo do aperfeiçoamento, o PNCR foi ajustado e reeditado em 1999. O PNCR desenvolve atividades com o objetivo de conhecer o potencial de exposição da população aos resíduos nocivos à saúde humana, o que serve para orientar a adoção de políticas nacionais de saúde animal e fiscalização sanitária (BRASIL, 1999). O PAMvet foi criado em 2003, com o objetivo de avaliar o potencial de exposição do consumidor à resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal (ANVISA, 2006).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 77 do MAPA, para cada recebimento do leite, o estabelecimento deve realizar análises para detecção de resíduos de medicamentos veterinários para no mínimo dois grupos de antimicrobianos e esta análise deve ser realizada no leite do conjunto de cada veículo transportador. Também fica definido que o estabelecimento deve analisar o leite para todos os grupos de antimicrobianos que disponham de triagem

analítica. A análise deve ser realizada sempre que houver reintrodução no beneficiamento do leite de vacas que finalizaram o período de carência do tratamento com antimicrobianos (BRASIL, 2018).

A Instrução Normativa Nº 77 define ainda que o leite recebido pelo estabelecimento deve ser coletado para análise em laboratório da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite, com frequência mínima de uma amostra mensal, para avaliação de resíduos de produtos de uso veterinário e outros parâmetros, como contagem de células somáticas, contagem padrão em placas e teores de gordura, proteína total, lactose anidra, sólidos totais e sólidos não gordurosos (BRASIL, 2018).

Técnicas qualitativas e quantitativas podem ser utilizadas para identificação de amostras de leite contaminadas por resíduos de antimicrobianos. Relatos científicos sobre resíduos de antimicrobianos em leite são comuns no Brasil e no mundo e classificam-se em quantificação de resíduos, testes de triagem (FERNANDES et al., 2014), ou novas técnicas de detecção (QIN, XIE e YING, 2015). Na seção a seguir são discutidas algumas das metodologias usadas para a quantificação de resíduos de antimicrobianos em leite.

## **2.5. Metodologias para quantificação de resíduos de antimicrobianos em leite**

A Instrução Normativa Nº 77 do MAPA define que ao menos uma amostra mensal do leite recebido pelos estabelecimentos deve ser coletada para análise de resíduos de produtos de uso veterinário e outros parâmetros em um dos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite, que tem como finalidade o monitoramento de leite, contribuindo para o aperfeiçoamento da qualidade do leite, em conformidade com o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (BRASIL, 2018).

Estudos de avaliação da presença de resíduos de antibióticos em leite são desenvolvidos ao redor do mundo e dividem-se em: i) qualitativos, também denominados como testes de triagem, nos quais são empregados usualmente o Delvotest<sup>®</sup> SP-NT, CMT COPAN<sup>®</sup>, Eclipse<sup>®</sup> 100, Delvotest<sup>®</sup> Accelerator e Charm Cowside<sup>®</sup>, que indicam a presença de resíduos de antibióticos no leite; e ii) quantitativos, que normalmente usam a cromatografia para identificar o tipo e determinar a quantidade exata do resíduo de antibiótico.

A maioria dos testes disponíveis no mercado para a investigação de resíduos de antibióticos em leite é qualitativa. Esses testes de triagem indicam, com boa precisão, se a substância investigada está presente ou não na amostra, indicando os resultados como positivo ou negativo. As indústrias lácteas brasileiras utilizam um conjunto de testes de triagem

comerciais, chamados de kits, para o controle de resíduos. A especificidade e a sensibilidade variam entre os kits, e devem ser consideradas para a obtenção de resultados seguros. A sensibilidade deve ser compatível com o LMR permitido por lei (NERO et al., 2007).

Métodos de triagem baseados em técnicas imunológicas e microbiológicas podem ser qualitativos ou semi-quantitativos. Os métodos biológicos são de execução simples e rápidos, por isso têm sido amplamente empregados na investigação da presença de resíduos de medicamentos veterinários em diversas matrizes. As técnicas microbiológicas baseiam-se na inibição do crescimento de microrganismos em um meio onde pode estar presente o antibiótico (PACHECO-SILVA, SOUZA e CALDAS, 2014), mas não permitem a identificação de substâncias e não apresenta sensibilidade para diversos grupos de antibióticos (BANG-CE et al., 2008). Os métodos imunológicos são mais sensíveis para triagem, além de serem mais simples, rápidos, eficientes e de baixo custo (LI et al., 2015 b).

A técnica oficialmente utilizada para quantificação de antimicrobianos em leite é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). Apesar da alta especificidade, sensibilidade e confiabilidade que a CLAE oferece, esta técnica necessita de instrumentação cara, é dispendiosa, são destrutivos, incluem passos complexos, exige operador altamente qualificado, requer o pré-tratamento de amostras complexas e o uso de reagentes químicos, necessitam de maior tempo de análise e impõe ao operador condições de insalubridade (MORENO-BONDI et al., 2009; CEBI, YILMAZ e SAGDIC, 2017; LUIZ et al., 2014; LI et al., 2015b). Esse conjunto de fatores limita o uso da CLAE a propósitos confirmatórios e inviabilizam seu uso para monitoramento de rotina dos resíduos de medicamentos em alimentos de origem animal (BANG-CE et al., 2008). A eletroforese capilar também tem sido utilizada em quantificações de resíduos de antibióticos em leite (MA et al., 2012), mas se encaixa em algumas das limitações apontadas para a CLAE.

Diante deste contexto, há uma demanda para o desenvolvimento de técnicas rápidas, precisas, econômicas e eficazes para testar a adulteração de alimentos e ingredientes alimentícios (CEBI, YILMAZ e SAGDIC, 2017). Novas técnicas têm sido buscadas, no sentido de aumentar velocidade analítica, baratear custos e diminuir o uso de reagentes químicos, contribuindo, assim, para aumentar o volume de amostras de leite analisadas e, conseqüentemente a segurança do alimento (ADLER et al., 2013).

Os métodos para análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite devem, principalmente, priorizar a rapidez do resultado, em busca da rápida liberação do lote para o processamento (LUIZ et al., 2014). Nesse contexto, o desenvolvimento da espectroscopia para uso em análise de alimentos é evidente, seja no infravermelho próximo (DRACKOVA et al.,

2009), infravermelho médio (TOFFANIN et al., 2015), ou no infravermelho longo (QIN, XIE e YING 2015).

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF ou FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) se destaca nesse meio, por ser uma técnica não destrutiva e rápida, sendo amplamente utilizada como eficaz ferramenta para ampla gama de problemas de adulteração em produtos alimentícios (DUARTE et al., 2002; RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; CEBI, YILMAZ e SAGDIC, 2017). A espectroscopia no IVTF tem sido empregada há muitos anos em análises quantitativas e para confirmar a presença de resíduos de medicamentos e outros produtos químicos, sendo uma promissora ferramenta para análise de ampla variedade de amostras sem necessidade de métodos de preparação de amostras (LAHANE et al., 2014).

## 2.6. Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia é baseada na interação entre radiação eletromagnética e matéria. Os espectros de infravermelho fornecem uma descrição da energia que a molécula ou átomo absorve mediante devida excitação. As moléculas podem apresentar três níveis de energia em regiões espectrais diferentes: transições eletrônicas observadas na região ultravioleta ou visível; vibracionais observadas na região do infravermelho; e rotacionais observadas na região de micro-ondas (STUART, 2004; SALA, 2008).

Dentro do espectro eletromagnético, a região do infravermelho compreende a faixa superior à região de micro-ondas e inferior à região ultravioleta ou visível. Esta região pode ser dividida em três partes principais: infravermelho próximo, região de 14000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ; infravermelho médio, região de vibração-rotação de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ; e infravermelho distante, região de rotação de 400 a 50  $\text{cm}^{-1}$  (DOMINGO et al., 2014).

Ao incidir radiação no infravermelho sobre as moléculas ocorrem alterações em seus modos vibracionais. A absorção no infravermelho ocorre quando a frequência da radiação multiplicada pela constante de Planck tem o mesmo valor da diferença de energia entre dois estados vibracionais. Portanto, o processo de absorção no infravermelho envolve uma ressonância entre a radiação eletromagnética e a diferença de níveis de energia vibracionais da molécula (LUIZ et al., 2014).

Ao absorver radiação no infravermelho, as moléculas são excitadas a um estado de maior energia, o que envolve frequências vibracionais, como estiramento, dobramento, torção e balanço das ligações na maioria das moléculas covalentes. Cada tipo de ligação possui sua

própria frequência natural de vibração e as absorções geralmente ocorrem apenas em determinadas regiões do infravermelho. As ligações simétricas não absorvem radiação no infravermelho (PAVIA et al., 2009).

A identificação dos compostos presentes na amostra pode ser feita por meio da associação entre os grupos funcionais e a região do espectro em que cada um deles apresenta absorção da radiação eletromagnética. Os espectros de absorção no infravermelho têm origem nos diferentes modos de vibração e rotação das moléculas (MENDHAM et al., 2011) e têm sido usados para identificar compostos e determinar qualitativa e quantitativamente a composição de amostras (STUART, 2004; SALA, 2008).

A escolha da região do infravermelho depende do tipo de amostra a ser estudada. A região de infravermelho médio é a de maior interesse para fins analíticos, pois nessa região as bandas de absorção podem ser mais facilmente identificadas e associadas a grupos funcionais (Tabela 2) (SALA, 2008; HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

Tabela 2: Bandas de absorção de grupos funcionais na região do infravermelho médio.

Função orgânica	Grupo funcional	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
Éter	C-O	1150-1070
Éster	C-O	1310-1210
	C=O	1750-1730
Cetona	C=O	1750-1660
Aldeído	C-H	2850-2700
	C=O	1740-1685
Álcool	C-O	1200-1100
	O-H	3600-3200
Amina	C-N	1360-1180
Alceno	C=C	1680-1620
Alcano	C-H	2950-2850
	C-C	1200

Fonte: Adaptado de HAGE, 2012.

A espectroscopia no infravermelho apresenta diversas vantagens como técnica de análise, especialmente por sua simplicidade da operação (após a calibração do equipamento, a análise se torna rotineira), rapidez (com o instrumento calibrado é possível obter resultados em

minutos), redução significativa do uso de reagentes químicos (a amostra pode ter pouco ou nenhum preparo) e análise simultânea de vários componentes, mesmo em amostras complexas (LUIZ et al., 2015).

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) tem ampla aplicabilidade, permite analisar moléculas pequenas ou sistemas complexos e utilizar amostras em estados físicos variados, como solução, sólido amorfo ou cristalino, filmes e membranas. No espectrômetro IVTF (Figura 2) a radiação no infravermelho é dividida em dois feixes que passam por processos construtivos e destrutivos. Nestes espectrômetros há um interferômetro, que consiste em um divisor de feixe e dois espelhos (MUKHOPADHYAY, 2004).

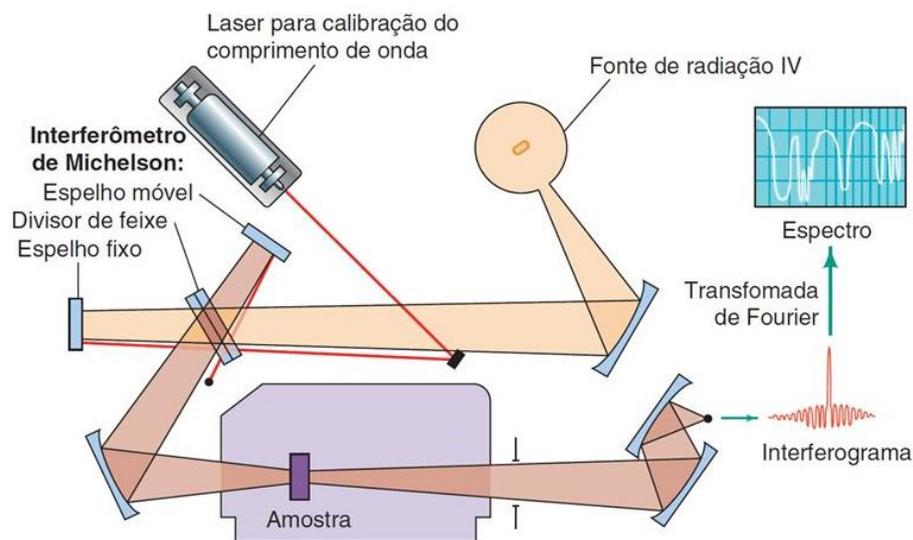


Figura 2: Representação esquemática de espectrômetro com transformada de Fourier.

Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/7305176/>, acessado em 01/10/2017.

O interferômetro de Michelson, no qual um espelho permanece estacionário enquanto o outro espelho se move (MUKHOPADHYAY, 2004), é usado para manipular a energia enviada à amostra que será analisada (HARRIS, 2012) e gerar como sinal um interferograma, que relaciona a variação da amplitude da luz em função da varredura realizada por um espelho móvel infravermelho (FORATO et al., 2010).

A radiação no infravermelho interage com a amostra e suas moléculas absorvem seletivamente em comprimentos de onda específicos. A radiação resultante é então dirigida a um detector (MUKHOPADHYAY, 2004). O sinal do interferograma modificado chega ao detector com informações sobre a quantidade de energia absorvida em cada comprimento de

onda. Aplicando a transformada de Fourier, que é um processo matemático realizado pelo computador que registra o sinal para extrair as frequências individuais que foram absorvidas e então reconstruir e plotar o gráfico fornecido como o espectro de infravermelho da amostra (PAVIA et al., 2009; FORATO et al., 2010).

O tipo mais comum de espectrômetros IVTF comercializado opera na região do infravermelho médio, que pode ser usado para análise de sólidos, líquidos e gases, sendo que os dados são coletados de maneiras diferentes (MUKHOPADHYAY, 2004). Os espectros de infravermelho, que relacionam a intensidade das bandas de absorção (em termos de transmitância ou absorbância) e a posição em número de onda são correspondentes a cada componente da amostra (FORATO et al., 2010).

A espectroscopia no infravermelho tem se destacado em análises de alimentos e controle de qualidade, por ser uma técnica não destrutiva e eficiente na investigação de adulteração de produtos alimentícios (DUARTE et al., 2002; RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; CEBI, YILMAZ e SAGDIC, 2017). A técnica IVTF já foi utilizada em vários estudos para a análise de leite e derivados, tendo sido verificada a eficácia da técnica para a avaliação da composição físico-química e detecção da presença de adulterantes (KAROUI e BAERDEMAKE, 2007; LEI et al., 2010; CASSOLI et al., 2011; POONIA et al., 2017).

A eficiência de métodos de espectroscopia por infravermelho pode ser potencializadas com a combinação da quimiometria (LUIZ et al., 2014). A espectroscopia de infravermelho e a quimiometria demonstram eficácia tanto qualitativa como quantitativamente em análises de diferentes áreas (ROGGO et al., 2007), possibilitando a investigação da composição, qualidade e autenticidade de alimentos. A associação da espectroscopia no infravermelho e a quimiometria proporciona vantagens como a rápida obtenção de resultados, além de requerer uma quantidade mínima de amostra para as análises, não ser destrutiva e mínima geração de resíduos (RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013; DOMINGO et al., 2014; BOTELHO et al., 2015; LUIZ et al., 2015; POONIA et al., 2017; LEITE et al., 2019).

## **2.7. Quimiometria**

A quimiometria emprega fundamentos matemáticos e estatísticos e métodos computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados químicos. A quimiometria é subdividida em diversas áreas, destacando-se: técnicas de planejamento de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada (SOUZA

e POPPI, 2012; FERREIRA, 2015). Nesta seção são apresentadas algumas das técnicas quimiométricas de análise.

A análise multivariada de dados consiste em um conjunto de técnicas estatísticas que possibilitam a análise de múltiplas variáveis simultaneamente. Baseia-se na aplicação de uma série de métodos ou algoritmos a dados de diferentes amostras correlacionadas com diferentes propriedades. A escolha do método de análise depende dos objetivos da pesquisa (HAIR JÚNIOR et al., 2009).

O pré-processamento dos dados é fundamental para a eficiência da análise multivariada. Os principais objetivos dessa etapa são eliminar informações não relevantes e tornar a matriz de dados melhor condicionada para a análise. Há diversos métodos de processamento para dados espectroscópicos, a exemplo: normalizar os espectros, centrar os dados na média, derivar e suavizar os espectros com uso de algoritmo (SOUZA e POPPI, 2012).

Com técnicas de reconhecimento de padrões, também chamados métodos de classificação, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras que sejam semelhantes entre si, partindo de uma gama de informações químicas e detectando tendências nos dados. Desta forma, por exemplo, as amostras são agrupadas de acordo com seus espectros (ROGGO et al., 2007; SOUZA e POPPI, 2012).

As técnicas de calibração multivariada visam estabelecer um modelo que correlacione uma série de informações químicas com uma ou mais propriedades quantificáveis das amostras. Assim, os métodos de regressão possibilitam relacionar o espectro das amostras à concentração. Com a calibração multivariada é possível analisar simultaneamente vários componentes em sistemas simples, bem como definir um elemento de interesse em matrizes complexas (ROGGO et al., 2007; SOUZA e POPPI, 2012; FERREIRA, 2015).

As técnicas quimiométricas podem ser categorizadas como não-supervisionadas ou supervisionadas. As técnicas supervisionadas necessitam de um conhecimento prévio, ou seja, alguma informação inicial sobre a identidade das amostras, desenvolvendo um modelo a partir de conjunto de amostras para treinamento, sendo avaliado o desempenho do modelo posteriormente, com base em um novo conjunto de amostras para validação. Para as técnicas não-supervisionadas não é necessário um conhecimento prévio sobre a natureza das amostras (ROGGO et al., 2007).

### 2.7.1. Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (ACP) é uma das técnicas quimiométricas mais importantes, pois é a base para diversos métodos de reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada, sendo utilizada para a análise multivariada de dados em diversas áreas do conhecimento. Esta técnica tem sido largamente empregada para a análise exploratória de dados (SOUZA e POPPI, 2012).

A técnica ACP busca extrair o máximo de informações contidas numa matriz de dados com  $n$  linhas (amostras) e  $p$  colunas (variáveis). A ACP tem como principais objetivos a redução do número de variáveis e facilitar a interpretação das análises. A técnica ACP explica a variância e covariância de um vetor aleatório (composto de  $p$ -variáveis aleatórias) estabelecendo combinações lineares das variáveis originais (HAIR JÚNIOR et al., 2009; MINGOTI, 2013; HONGYU, SANDANIELO e OLIVEIRA JUNIOR, 2016).

Para facilitar a descrição dos dados, a técnica ACP reduz massa de dados, com menor perda possível da informação. Na ACP, o conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionadas entre si, é transformado em um novo e menor conjunto de variáveis, de mesma dimensão e não correlacionadas, chamadas Componentes Principais (CPs), que são funções lineares das variáveis originais e que têm variância máxima (MINGOTI, 2013; HONGYU, SANDANIELO e OLIVEIRA JUNIOR, 2016).

Cada CP é uma combinação linear das variáveis originais. A primeira CP é traçada no sentido da maior variação no conjunto de dados, enquanto a segunda é traçada ortogonalmente à CP anterior (para que a CP2 descreva a maior porcentagem da variação não explicada pela CP1) e assim por diante (SOUZA e POPPI, 2012).

Os pesos são os coeficientes da combinação que representam a contribuição relativa de cada variável original para a formação dos CPs. Os escores representam as coordenadas das amostras no sistema de componentes principais, representando as relações de similaridade entre as amostras (SOUZA e POPPI, 2012; SOUZA et al., 2013).

A ACP permite reduzir o número de componentes principais a serem analisadas descartando CPs que tenham variância pequena, analisando apenas aquelas que explicam a maior parcela da variação total. Outro critério para a determinação do número de CPs a serem analisadas consiste em se tomar um número de CPs igual ao número de autovalores  $\geq 1$  (STEINER et al., 2008). São identificados padrões nos dados e o resultado da ACP é expresso através de gráficos que facilitam a compreensão de diferenças e semelhanças entre os dados (MINGOTI, 2013).

### 2.7.2. Análise Discriminante

A Análise Discriminante (AD) é uma técnica que permite separar as amostras em diferentes grupos de acordo com suas características conhecidas, em que as variáveis que discriminam os grupos são identificadas e quando é feita uma nova observação, de acordo com suas características, o método prevê o grupo mais adequado a que deve pertencer (FÁVERO et al., 2009).

AD busca estabelecer relações entre uma variável dependente e variáveis independentes e tem por objetivo criar índices que discriminam os grupos, permitindo a identificação de grupos similares e a classificação de novos casos (MINGOTI, 2013). Esta é uma técnica supervisionada, por tanto é necessário um conjunto de treinamento, cuja identidade das amostras seja conhecida (ROGGO et al., 2007; SOUZA e POPPI, 2012).

Para que AD seja aplicada, é necessário estabelecer o conjunto de dados em classes pré-definidas, para que desta forma seja possível obter uma função matemática para discriminação para cada classe. A função de discriminação (equação 1) apresenta um termo constante ( $\beta$ ), coeficientes de ponderação associados a variáveis da equação ( $\beta_1, \dots, \beta_n$ ) e o índice obtido para o objeto na análise ( $a_1, \dots, a_n$ ). Os coeficientes de ponderação são obtidos de acordo com algum critério de agrupamento (PINTO et al., 2005).

$$Y = \beta + \beta_1 * a_1 + \dots + \beta_n * a_n \quad \text{Eq 1}$$

### 2.7.3. Análise de Regressão Linear Múltipla

Para obter o valor de uma variável Y em função de outras variáveis, independentes entre si, pode ser usado um modelo de Regressão Linear Múltipla (RLM) (STEINER et al., 2008). A técnica RLM permite investigar e modelar a relação entre variáveis e tem como principal objetivo estimar parâmetros desconhecidos do modelo através da modelagem nas variáveis. Para isso é necessário conhecer a relação entre as variáveis dependentes e independentes (COELHO-BARROS et al., 2008).

A partir do método de regressão linear obtém-se uma reta ou curva que se aproxima melhor dos dados que são fortemente correlacionados. O modelo que representa a regressão linear múltipla é dado por:  $Y = \alpha + \beta_1.X_1 + \beta_2.X_2 + \dots + \beta_n.X_n + e$ . Y é variável dependente,  $\alpha$  é a constante que representa o intercepto,  $\beta_n$  ( $n = 1, 2, 3, \dots, n$ ) são os coeficientes de cada variável, X são as variáveis explicativas, e é o termo do erro. Esse modelo

é chamado de regressão múltipla por conter mais de um coeficiente de regressão (COELHO-BARROS et al., 2008).

A qualidade do ajuste do modelo, ou seja, a melhor aproximação entre o valor predito e o medido da variável, é dada pelo coeficiente de correlação múltipla ao quadrado ( $R^2$ ). Quanto maior o valor de  $R^2$ , mais assertivo é o modelo e maior é seu poder de explicar a variável dependente (STEINER et al., 2008).

RLM é adequada para sistemas bem comportados, que apresentem respostas lineares, sejam livres de interferentes, sem interações entre analitos e com baixo ruído. A limitação deste método está no fato de usar toda a informação contida na matriz X para a construção do modelo, independentemente de sua relevância (SENA e POPPI, 2000).

#### **2.7.4. Análise de Regressão por Mínimos Quadrados**

A análise de regressão por mínimos quadrados ou *Partial Least Squares* (PLS), tem como principal objetivo obter uma equação que explique de maneira satisfatória a relação existente entre uma matriz de dados (X) com uma ou mais matrizes resposta (Y) das propriedades de interesse. Com isso se faz possível a predição de valores da variável de interesse (GARCIA et al., 2015).

O método PLS utiliza a técnica de análise de componentes principais para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados. Assim, são geradas novas variáveis, chamadas de fatores ou componentes, que descrevem a direção de máxima variância. Os componentes são obtidos por combinações lineares das variáveis originais e são ortogonais entre si (SOUZA et al., 2013). Os componentes são preditores de Y e também descrevem X, assim, X e Y são, ao menos em parte, modelados pelas mesmas variáveis latentes (LUZ, 2003).

As matrizes X e Y são decompostas por PCA. Os valores dos escores são alterados até que o melhor modelo linear seja estabelecido, de modo que seja alcançada a maior covariância entre X e Y. Esse procedimento é realizado em uma série etapas, que são repetidas para cada componente estimado, por meio de um processo iterativo. Sendo assim, o método PLS tem um compromisso entre a explicação da variância em X e a obtenção da maior correlação com Y (SOUZA et al., 2013).

Com PLS é estimado um modelo matemático de regressão linear:  $Y = XB + E$ , em que Y é uma matriz de variáveis resposta, X é uma matriz de variáveis predictoras, B é uma matriz dos coeficientes da regressão, E é a matriz de ruídos (GARCIA et al., 2015). O modelo preditivo

gerado permite correlacionar os espectros das amostras (matriz X) e as concentrações (matriz Y).

Normalmente, o número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo é determinado por validação cruzada. Com o método *leave-one-out* (“um por vez”), uma amostra pertencente ao conjunto de calibração é retirada do processo de construção do modelo. Com este modelo é realizada a previsão da propriedade de interesse para a amostra retirada, empregando um número crescente de variáveis latentes. O procedimento é repetido para todas as amostras e um erro médio é calculado para cada número de variáveis latentes empregado. O número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo é definido como o número de variáveis latentes a partir do qual não diferença significativa no valor do erro médio (SOUZA et al., 2013).

Para o cálculo dos componentes da regressão PLS podem ser usados vários algoritmos, como *Nonlinear Iterative Partial Least Squares* (NIPALS). O NIPALS é um método comumente utilizado para o cálculo das componentes principais de um conjunto de dados, em que os vetores dos pesos e dos escores são calculados iterativamente, um de cada vez, em ordem decrescente de importância (SOUZA e POPPI, 2012). Desta forma, o algoritmo usado examina as matrizes e extrai componentes, que são relevantes para ambos os conjuntos de variáveis (MORELLATO, 2010).

## **2.8. Espectroscopia no infravermelho associada a ferramentas quimiométricas**

O uso de espectroscopia no infravermelho associada à quimiometria tem proporcionado avanços nas áreas de controle de qualidade e segurança do alimento, demonstrando-se rápido, eficaz e confiável para a investigação da composição, verificação da qualidade e autenticidade de alimentos (RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013; POONIA et al., 2017; CEBI, YILMAZ e SAGDIC, 2017; LEITE et al., 2019). Os estudos se concentram na detecção de fraudes na composição de alimentos e, geralmente, são associados à adulterantes. Em leite os estudos incluem a adulteração com água, soro de leite, sal, sacarose, soda cáustica, ureia, peróxido de hidrogênio, dentre outros (KASEMSUMRAN, THANAPASE e KIATSOONTHON, 2007; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013; DOMINGO et al., 2014).

Em estudo desenvolvido por Luiz et al. (2014) para a avaliação da qualidade do leite pasteurizado tipo “A” integral comercializado na região de Juiz de Fora-MG foi empregando Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier combinado à ACP. Como resultado foi verificada a rápida detecção das amostras contaminadas. O método detectou

facilmente as amostras intencionalmente contaminadas com diclofenaco sódico. Neste trabalho foi evidenciado que a ferramenta quimiométrica empregada foi fundamental para a obtenção dos resultados para as mais baixas concentrações.

Empregando as mesmas técnicas, espectroscopia no infravermelho próximo e Análise de Componentes Principais, Luiz et al. (2015) desenvolveram um método para detectar resíduos de medicamentos veterinários antimicrobianos (penicilina G, terramicina e enrofloxacino) em amostras de leite. Foram avaliadas amostras de leite de diferentes fabricantes e a metodologia utilizada detectou traços dos medicamentos estudados dentro dos percentuais analisados (abaixo de 1 %).

Botelho et al. (2015) empregaram Espectroscopia no Infravermelho Médio acoplado à Refletância Total Atenuada combinada à Análise Discriminante com Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) para o desenvolvimento de um método de triagem para a determinação simultânea de cinco adulterantes comuns em leite: água, amido, citrato de sódio, formaldeído e sacarose. O método proposto foi capaz de quantificar os cinco dos adulterantes pesquisados em um pequeno volume de amostra, 30 mL.

Jawaid et al. (2013) desenvolveram um método para a determinação de melamina em leite líquido e em pó baseado em Espectroscopia de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada combinada a Análise de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais para correlacionar dados espectrais com concentrações de melamina, sendo sugerida uma ferramenta eficaz e rápida para detecção e quantificação de melamina em leite.

Santana (2017) desenvolveu um teste de triagem para detecção de ivermectina em leite de vaca empregando Espectroscopia de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR - FTIR) associada à quimiometria (Análise de Componentes Principais, Análise Discriminante e Redes Neurais Artificiais).

Leite et al. (2019) empregaram Espectroscopia de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada associada a Análise de Componentes Principais e Regressão de Mínimos Quadrados Parciais para determinar adulterações de queijos manteiga pela adição de óleo vegetal (óleo de soja). A ACP diferenciou as amostras adulteradas das autênticas e o modelo de PLS permitiu a previsão da porcentagem de óleo vegetal adicionada nas amostras, demonstrando o bom desempenho da espectroscopia FTIR-ATR associada à quimiometria na detecção de adulterações de queijos manteiga.

Apesar da espectroscopia no infravermelho associada à quimiometria ser amplamente empregada para a investigação da composição, autenticidade e contaminantes em leite e

derivados (LEI et al., 2010; CASSOLI et al., 2011; DOMINGO et al., 2014; BOTELHO et al., 2015; POONIA et al., 2017), poucos são os estudos que empregam estas técnicas combinadas para a identificação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e produtos lácteos. Diante do exposto, propomos o desenvolvimento de um método para determinação de antibiótico (tilosina) em leite de vaca empregando a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier combinada à quimiometria.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, A. A.; DAHL, A. V.; JENSEN, S. K.; THUEN, E.; GUSTAVSSON, A. M.; STEINSHAMN, H. Fatty acid composition, fat-soluble vitamin concentrations and oxidative stability in bovine milk produced on two pastures with different botanical composition. **Livestock Science**, v. 154, p. 93-102, 2013.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos, bases teóricas e uso clínico. 2017. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo1/antimicrobianos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm). Acessado em 07/02/2018.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - PAMVet. **Relatório 2004/2005 - Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo**. Brasília: ANVISA, 2006.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - PAMVet. **Relatório 2006/2007 - Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo**. Brasília: ANVISA, 2009.

ARSIC, B.; BARBER, J.; CIKOS, A.; MLADENOVIC, M.; STANKOVIC, N.; NOVAK, P. 16-membered macrolide antibiotics: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, p. 283-298, 2018.

ASHENAFI, D.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. An improved liquid chromatographic method for the analysis of tylosin and its impurities. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 2631-2638, 2011.

BANG-CE, Y.; SONGYANG, L.; PENG, Z. XIAO-HONG, L. Simultaneous detection of sulfamethazine, streptomycin, and tylosin in milk by microplate-array based SMM-FIA. **Food Chemistry**, v. 106, p. 797-803, 2008.

BOTELHO, B. G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L. S.; SENA, M. M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of Five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLSDA. **Food Chemistry**, v. 181, p. 31-37, 2015.

BRASIL, Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. **Antibióticos**. Projeto Farmácia Estabelecimento de Saúde; Fascículo VI. 2011, 90 p. ISBN 978-85-63931-16-0.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999. Programa Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**. Brasília: Ministério da Agricultura, p.213-227, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77 de 26 de novembro de 2018. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite. **Diário Oficial da União**. Brasília: Ministério da Agricultura, p.10, 2018.

CEBI, C.; YILMAZ, M. T.; SAGDIC, O. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. **Food Chemistry**, v. 229, p. 517-526, 2017.

CHOPRA, S.; SCHEPDAEL, A.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. Characterization of impurities in tylosin using dual liquid chromatography combined with ion trap mass spectrometry. **Talanta**, n. 106, p. 29-38, 2013.

COELHO-BARROS, E. A.; SIMÕES, P. A.; ACHCAR, J. A.; MARTINEZ, E. Z.; SHIMANO, A. C. Métodos de estimação em regressão linear múltipla: aplicação a dados clínicos. **Revista Colombiana de Estadística**, v. 31, n. 1, p. 111-129, jun. 2008.

COSTA, R. P.; SPISSO, B. F.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; FERREIRA, R. G.; CARLOS, B. S.; OLIVEIRA, A. C. Tilosina: um importante antibiótico não monitorado em leite no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 20, n. 2, p. 245-259, 2013.

DOMINGO, E.; TIRELLI, A. A.; NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C.; PINTO, S. M. Melamine detection in milk using vibrational spectroscopy and chemometrics analyses: A review. **Food Research International**, v. 60, p. 131-139, 2014.

DRACKOVA, M; NAVRATILOVA, P; HADRA, L; VORLOVA, L. HUDCOVA, L. Determination Residues of Penicillin G and Cloxacillin in Raw Cow Milk Using Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy. **Acta Vet. Brno.**, v. 78, p. 685-690, 2009.

DUARTE, M. L.; FERREIRA, M. C.; MARVÃO, M. R.; ROCHA, J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 1-8, 2002.

- FÁVERO, L. P.; BELFIORE, P.; SILVA, F. L.; CHAN, B. L. **Análise de dados: modelagem multivariada para tomada de decisões**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, 646 p.
- FERNANDES, S. A. A., MAGNAVITA, A. P. A., FERRÃO, S. P. B.; GUALBERTO, S. A.; FALEIRO, A. S., FIGUEIREDO, A. J.; MATARAZZO, S. V. Daily ingestion of tetracycline residue present in pasteurized milk: a public health problem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 6, n. 21, p. 3427-3434, 2014.
- FERRAG-SIAGH, F.; FOURCADE, F.; SOUTREL, I.; AIT-AMAR, H.; DJELAL, H.; AMRANE, A. Electro-Fenton pretreatment for the improvement of tylosin biodegradability. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 8534-8542, 2014.
- FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. 1ª ed. Salvador, BA: Vento Leste, 2015
- FONSECA, G. P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SILVA, R.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 451-453, 2009.
- FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; OSIRO, D.; BICUDO, T. C.; COLNAGO, L. A. **A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, Documentos 51, 2010, 14 p.
- GARCIA, S. R.P.; CHAVES-NETO, A.; ORO, S. R.; MAFIOLETI, T. R.; NEUMANN-JÚNIOR, C. Modelo de regressão por mínimos quadrados parciais para dados de monitoramento de barragens. **Revista Engenharia**, v. 11, p. 1-20, 2015.
- GRANADOS-CHINCHILLA, F.; SÁNCHEZ, J.; GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ, C. A Novel Green Chemistry Method for Nonaqueous Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Detection of First-, Second-, and Third-Generation Tetracyclines, 4-Epitetracycline, and Tylosin in Animal Feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7121-7128, 2012.
- HAGE, D. S. **Química analítica e análise quantitativa**. 1ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2012.
- HAIR JÚNIOR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6ª ed. Bookman, 2009.
- HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. São Paulo: Bookman, 2009.

- HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; OLIVEIRA JUNIOR, G. J. Principal Component Analysis: theory, interpretations and applications. **Engineering and Science**, v. 1, n. 5, p. 83-90, 2016.
- JAWAID, S.; TALPUR, F. N.; SHERAZI, S. T. H.; NIZAMANI, S. M.; KHASKHELI, A. A. Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR–Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3066-3071, 2013.
- KANTIANI, L; FARRÉ, M; BARCEIÓ, D. Analytical methodologies for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and feed samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 729-744, 2009.
- KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. D. E. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 621-640, 2007.
- KASEMSUMRAN, S.; THANAPASE, W.; KIATSOONTHON, A. Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. **Analytical Sciences**, v. 23, p. 907-910, 2007.
- LAHANE, S. B.; DEOKATE, U. A.; AHIRE, S. Available Analytical Method for Macrolide Antibiotic. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 26, n. 2, p. 256-261, 2014.
- LEE, J. B.; CHUNG, H. H.; CHUNG, Y. H.; LEE, K. G. Development of an analytical protocol for detecting antibiotic residues in various foods. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1726-1731, 2007.
- LEI, Y.; ZHOU, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; SUN, S.; NODA, I. 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.
- LEITE, A. I. N.; PEREIRA, C. G.; ANDRADE, J.; VICENTINI, N. M.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. **LWT Food Science and Technology**, v. 109, p. 63-69, 2019.
- LI, X.; SHEN, J. WANG, Q.; GAO, S.; PEI, X.; JIANG, H.; WEN, K. Multi-residue fluorescent microspheres immunochromatographic assay for simultaneous determination of macrolides in raw milk. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 407, p. 9125-9133, 2015 a.
- LI, X.; WEN, K.; CHEN, Y.; WU, X.; PEI, X.; WANG, Q.; LIU, A.; SHEN, J. Multiplex immunogold chromatographic assay for simultaneous determination of macrolide antibiotics in raw milk. **Food Anal. Methods**, v. 8, p. 2368-2375, 2015 b.

LITTERIO, N. J.; CALVINHO, L. F.; FLORES, M. M.; TARABLA, H. D.; BOGGIO, J. C. Microbiological screening test validation for detection of tylosin excretion in milk of cows with low and high somatic cell counts. **Journal of Veterinary Medicine Series**, v. 54, n. 1, 2007.

LUIZ, L. C.; BELL, M. J. V.; ROCHA, R. A.; MENDES, T. O.; ANJOS, V. 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.

LUIZ, L. D.; BELL, M. J. V.; ROCHA, R. A.; MENDES, T. O.; ANJOS, V. 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, Supl. 1, 2015.

LUZ, E. R. Predição de propriedades de gasolinas usando espectroscopia FTIR e regressão por mínimos quadrados parciais. 2003. 109 f. Dissertação de Mestrado em Química – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

MA, T.; VICKROY, T. W.; SHIEN, J.; CHOU, C. Improved nonaqueous capillary electrophoresis for tetracyclines at subparts per billion level. **Electrophoresis**, v. 33, n. 11, p. 1679-1682, 2012.

MAGALHÃES, H. R.; FARO, L.; CARDOSO, V. L.; PAZ, C. C. P.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 415-421, 2006.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: Análise Química Quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2013.

MORELLATO, S. A. Modelos de regressão PLS com erros heteroscedásticos. 2010. 49 f. Dissertação de Mestrado em Estatística – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D.; HERRANZ, S.; RODRIGUEZ, E. An overview of sample preparation procedures for LC–MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 4, p. 921-946, 2009.

MUKHOPADHYAY, R. Product Review: Portable FTIR spectrometers get moving. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 19, p. 369A-372A, 2004.

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

NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R.; DÜRR, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1129-1135, 2006.

OHI, M. **Princípios Básicos para Produção de Leite Bovino**. Curitiba: Editora UFPR, 2010.

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

PAESEN, J.; CYPERS, W.; PAUWELS, K.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, p. 1153-1159, 1995.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. 4th Edn. Philadelphia: Brooks Cole, 2009.

PERICÁS, C. C.; MAQUIEIRA, A.; PUCHARDES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 1038-1049, 2010.

PINTO, L. F. B.; ALMEIDA, F. Q.; QUIRINO, C. R.; CABRAL, G. C.; AZEVEDO, P. C. N.; SANTOS, E. M. Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise discriminante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n.2, p. 600-612, 2005.

POONIA, A.; JHA, A.; SHARMA, R.; SINGH, H. B.; RAI, A. K.; SHARMA, N. Detection of adulteration in milk: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 23-42, 2017.

PUBCHEM, Open Chemistry Database. **Tylosin**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280440#section=Top>. Acessado em: 10/02/2019.

QIN, J; XIE, L; YING, Y. Determination of tetracycline hydrochloride by terahertz spectroscopy with PLSR model. **Food Chemistry**, v. 170, p. 415-422, 2015.

- RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 467-483, 2011.
- ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683-700, 2007.
- RUELA, A. C. I.; LIMA, A. J.; SOUZA, V. C. S.; JUNQUEIRA, G. R. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 139-146, 2005.
- SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2008. 276p.
- SANLI, S. PALABIYIK, I. M. SANLI, N. GUZEL-SEYDIM, Z. B.; ALSANCAK, G. Optimization of the Experimental Conditions for Macrolide Antibiotics in High Performance Liquid Chromatography by Using Response Surface Methodology and Determination of Tylosin in Milk Samples. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 66, n. 9, p. 838–847, 2011.
- SANTANA, V. R. Validação de metodologia para detecção e quantificação de ivermectina em leite de vaca com uso de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR - FTIR). 2017. 62 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2017.
- 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**, v. 138, p. 19-24, 2013.
- SEHATI, N.; DALALI, N.; SOLTANPOUR, S.; DORRAJI, M. S. S. Application of hollow fiber membrane mediated with titanium dioxide nanowire/reduced graphene oxide nanocomposite in preconcentration of clotrimazole and tylosin. **Journal of Chromatography A**, v. 1420, p. 46-53, 2015.
- SENA, M. M.; POPPI, R. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 547-556, 2000.
- SHIMADA, T.; LI, X.; ZILLES, J. L.; MORGENROTH, E.; RASKIN, L. Effects of the Antimicrobial Tylosin on the Microbial Community Structure of an Anaerobic Sequencing Batch Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 2, p. 296-305, 2011.

SOUZA, A. M.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013.

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

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

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

STEINER, M. T. A.; CHAVES NETO, A.; BRAULIO, S. N.; ALVES, V. Métodos estatísticos multivariados aplicados à engenharia de avaliações. **Gestão & Produção**, v. 15, n. 1, p. 23-32, 2008.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 2004.

TOFFANIN, V.; DE MARCHI, M.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; CASSANDRO, M. Effectiveness of mid-infrared spectroscopy for prediction of the contents of calcium and phosphorus, and titratable acidity of milk and their relationship with milk quality and coagulation properties. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 68-73, 2015.

## II – OBJETIVOS

### 1. Objetivo Geral

Desenvolver metodologia de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier combinada a ferramentas quimiométricas para a detecção de Tilosina em leite.

### 2. Objetivos Específicos

- Analisar amostras de leite de vaca, com e sem adição de padrão de tilosina, por meio da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.
- Obter os espectros de referência para o leite fluido e o leite liofilizado sem adulteração e para a Tilosina.
- Analisar os dados espectroscópicos obtidos empregando métodos quimiométricos.
- Estabelecer uma equação de predição para tilosina em leite.

### III – CAPÍTULO 1

## DETERMINAÇÃO DE TILOSINA EM LEITE FLUIDO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO ASSOCIADA À QUIMIOMETRIA

Alexandre Gomes Marques de Freitas, Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, Leandro Soares Santos, Larissa Cavalcante de Rezende

### 1. Introdução

O Brasil é um dos 10 maiores produtores de leite do mundo. Em 2016 o Brasil foi o quinto maior produtor de leite e responsável por 4% da produção mundial. Em 2017 a produção mundial de leite foi de 828 milhões de toneladas (FAO, 2019), 798 bilhões de litros de leite, sendo o Brasil responsável por 35,1 bilhões, quadruplicando a produção nacional ao longo de quatro décadas (EMBRAPA, 2018).

A presença de contaminantes no leite compromete sua qualidade. A principal contaminação química em leite e produtos lácteos é a presença de resíduos de antibióticos, causado principalmente pelo uso inadequado desses medicamentos veterinários (FERNANDES et al., 2014). O uso e os resíduos de antibióticos devem ser cuidadosamente monitorados para minimizar consequências ambientais e sanitárias da liberação de antibióticos para agroecossistemas e proteger a saúde dos consumidores (GRANADOS-CHINCHILLA et. al, 2012).

Tilosina é um antibiótico macrolídeo pouco biodegradável e é um potencial contaminante de alimentos de origem animal (FERRAG-SIAGH et al., 2014). A detecção de macrolídeos em matrizes alimentícias é normalmente realizada por cromatografia líquida com detector UV (MCGLINCHEY et al., 2008). Nesse contexto, a análise é um desafio, já que para a análise de misturas complexas faz-se necessária a extração do analito antes da análise (ARSIC et al., 2018).

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier é uma técnica alternativa, de maior rapidez, que necessita de mínimo preparo da amostra, requer pouca amostra e não é destrutiva (DUARTE et al., 2002; RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; CEBI, YILMAZ e SAGDIC, 2017). Esta técnica é excelente para análises quantitativas, pois as intensidades das bandas de absorção do espectro são proporcionais à concentração de seus respectivos grupos funcionais (HAMED e ALLAM, 2006).

As vantagens das técnicas de espectroscopia no infravermelho podem ser potencializadas com a associação à quimiometria. Estudos têm demonstrado que a espectroscopia no infravermelho associada a ferramentas quimiométricas é uma técnica eficaz e confiável para a investigação da composição, qualidade e autenticidade de alimentos, identificação e quantificação de contaminantes e adulterantes, proporcionando avanços em diversas áreas (RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013; DOMINGO et al., 2014; BOTELHO et al., 2015; POONIA et al., 2017; LEITE et al., 2019).

Diante disto, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia para determinação de Tilosina diretamente em leite fluido, empregando Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier e ferramentas quimiométricas para análise dos dados.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Amostras**

Foram coletadas amostras de leite cru (1 L) oriundas de vacas de grupo sanguíneo Holandês/Zebu.

### **2.2. Delineamento experimental**

As amostras foram coletadas em 13 propriedades rurais e conduzidas sob refrigeração até o Centro de Estudos em Leite. Em laboratório, as amostras foram subdivididas em 11 alíquotas, às quais foi acrescentada a solução de Tilosina em quantidades pré-estabelecidas (diferentes volumes para obter as concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para posterior análise em espectrofotômetro no infravermelho médio com transformada de Fourier (IVTF). Os dados espectrais obtidos foram padronizados e submetidos a métodos estatísticos multivariados: Análise de Componentes Principais e Análise de Regressão por Mínimos Quadrados (Figura 1).

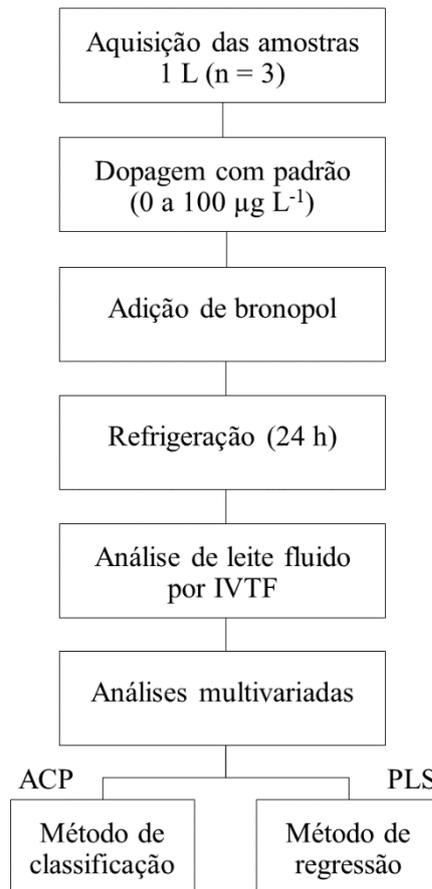


Figura 1: Fluxograma das etapas envolvidas no desenvolvimento do método de determinação de Tilosina em leite fluido.

### 2.3. Preparo das amostras

A solução estoque do padrão Tilosina foi preparada na concentração de 5,0 g L<sup>-1</sup> em água ultrapura. A solução de trabalho do padrão (concentração 100,0 mg L<sup>-1</sup>) foi preparada pela diluição de 2,0 mL da solução estoque para 100 mL usando-se leite. As amostras foram adulteradas por meio da adição sucessiva de quantidades pré-estabelecidas do padrão de Tilosina (Tabela 1).

Em balões volumétricos de 50 mL foram adicionados diferentes volumes da solução de trabalho, sendo avolumados com leite, de modo a obter as concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg L<sup>-1</sup> do padrão para cada amostra e um branco, sem adição do padrão. A faixa de concentração utilizada (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg L<sup>-1</sup>) foi definida de acordo com os Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos em legislação para alimentos. A concentração máxima foi estabelecida como o dobro do LMR estabelecido para a Tilosina em leite: 50 µg L<sup>-1</sup> (ANVISA, 2006).

Tabela 1: Volumes da solução de trabalho acrescentada ao leite cru e respectivas concentrações do antibiótico Tilosina.

Alíquota	Volume da solução de trabalho (mL)	Concentração de Tilosina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
1	0	0
2	0,05	10
3	0,10	20
4	0,15	30
5	0,20	40
6	0,25	50
7	0,30	60
8	0,35	70
9	0,40	80
10	0,45	90
11	0,50	100

As amostras de leite, com e sem adição de padrão, foram transferidas para recipientes plásticos próprios e compatíveis com o equipamento contendo iguais quantidades do bactericida Bronopol<sup>®</sup> (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol). Todas as amostras foram guardadas sob refrigeração por 24 h para a realização das análises espectrofotométricas por IVTF na sequência.

#### 2.4. Reagentes

O padrão analítico de Tilosina, de alta pureza, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). A água ultrapura foi obtida em sistema de purificação da marca ELGA LabWater (High Wycombe, Inglaterra), modelo Purelab Option-Q.

#### 2.5. Análise espectrofotométrica vibracional

As amostras de leite fluido puras e fraudadas com Tilosina foram analisados na região do infravermelho médio de  $1000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  em equipamento da marca Bentley Instrument Inc, modelo DairySpec FT (Minnesota, USA). O padrão sólido de Tilosina foi analisado na mesma região espectral em equipamento Agilent, modelo Cary 630 (Santa Clara, USA). Os dados

espectroscópicos foram obtidos com os softwares Microlab e Resolution Pro, da Agilent (Santa Clara, USA), e usados para posterior caracterização dos espectros.

## 2.6. Análise estatística multivariada

Os dados obtidos nas análises espectrofotométricas foram pré-processados para que fossem eliminadas diferenças das unidades de medida das variáveis. Utilizando-se o programa Microsoft Office Excel®, versão 2010, os dados foram padronizados para média igual a zero e desvio padrão igual a 1, de acordo com a equação:

$$\text{Variável padronizada} = \frac{\text{variável original} - \text{média}}{\text{desvio padrão}}$$

Os dados padronizados foram organizados em matrizes através de vetores em linha e coluna. Na matriz absorvância cada espectro é representado como um vetor linha. Na matriz concentração os valores de concentração de antibiótico para cada amostra são representados como vetores coluna. As matrizes foram organizadas em pares, de forma que cada matriz absorvância tem uma matriz concentração correspondente. O programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc.) foi utilizado para realizar as quimiométricas: Análise de Componentes Principais e Análise de Regressão por Mínimos Quadrados.

Para a Análise de Regressão por Mínimos Quadrados, foi utilizado o algoritmo de Kenstone para dividir os dados em dois conjuntos, um de treinamento (70% dos dados) e outro de validação (30% dos dados). O conjunto treinamento, ou conjunto de calibração, dispõe de amostras cujas propriedades são conhecidas e são representativas das amostras reais a serem analisadas. Este conjunto de amostras é usado para o desenvolvimento do modelo de calibração. O conjunto validação deve dispor de amostras independentes das usadas na calibração e suas propriedades também devem ser conhecidas (ROGGO et al., 2007).

Na regressão por PLS, o número de componentes determina a complexidade do modelo e é necessário verificar a significância de cada componente adicionada ao modelo e parar de adicionar componentes quando sua inclusão não for significativa. Para a avaliação do número de variáveis latentes que devem fazer parte do modelo foi utilizada a técnica de validação cruzada, que ajusta o modelo com uma observação retirada da amostra. Com o modelo estimado, calcula-se a previsão para essa observação retirada. Esse processo é repetido até que todas as observações da amostra sejam retiradas, suas previsões calculadas e obtém-se com isso uma estatística de erro, que é a soma dos quadrados das diferenças entre os valores observados e os previstos, sendo estes valores a soma dos quadrados dos resíduos da predição (PRESS),

que estima a capacidade preditiva do modelo. Desta forma, com as estatísticas de erro para o número de componentes pode-se avaliar qual o número ideal de componentes que minimiza essa estatística (GARCIA et al., 2015).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Análise espectrofotométrica vibracional

##### 3.1.1. Análise espectrofotométrica vibracional da Tilosina

O perfil espectroscópico da Tilosina foi caracterizado relacionando-se a posição das bandas de absorção (número de onda) e seus componentes (Figura 2).

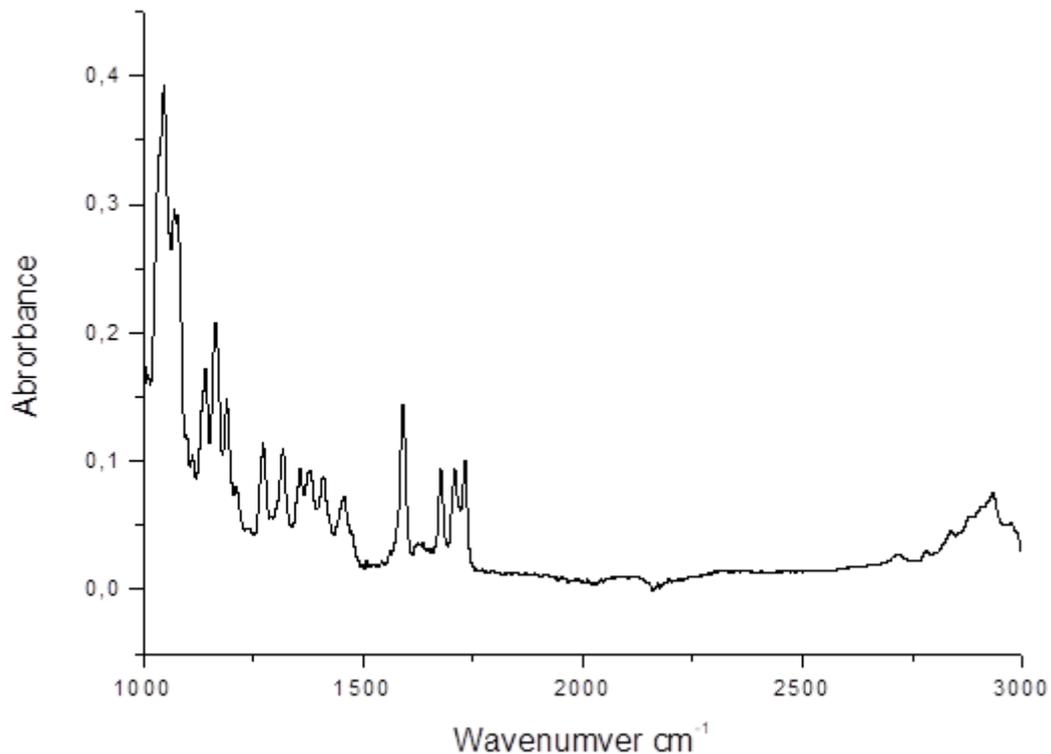


Figura 2: Espectro do padrão de Tilosina na região do infravermelho de 1000-3000  $\text{cm}^{-1}$ .

No espectro é possível observar diversas bandas de absorção, cujas posições (número de onda) devem ser associadas aos grupamentos da molécula de Tilosina, que apresenta em sua estrutura grupos funcionais éter, éster, aldeído, cetona, álcool e amina (terciária), além de insaturações. A identificação das bandas absorção foi realizada com base nos dados da

literatura, que relacionam os grupos funcionais a bandas específicas no espectro infravermelho. No entanto, deve-se considerar que as bandas podem ser influenciadas por efeitos de conjugação ou efeito indutivo, ou seja, a posição da banda pode ser alterada pela presença de grupos substituintes e próximos (ROHMAN e MAN, 2010).

O pico de absorção na região de 1620-1680  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído à deformação de C=C. O pico de absorção na região de 1420  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído à deformação angular de  $\text{CH}_2$  adjacente a carbonila. Na região de 1370-1390  $\text{cm}^{-1}$ , o pico é associado à deformação angular de  $\text{CH}_3$ . A banda de absorção de 2700-2850  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a vibrações de deformação axial C-H de aldeídos. Pico na região 2850-2960 é associado à deformação de C-H de alifáticos. Picos de absorção na região de 1180-1280  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos ao estiramento C-N em compostos alifáticos (STUART, 2004; PAVIA et al., 2009).

A banda de absorção de 1050-1300  $\text{cm}^{-1}$  é associada ao estiramento C-O, de modo que o pico em 1100  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído a álcoois secundários, a região de 1070-1150  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a éteres alifáticos, e os ésteres insaturados produzem duas bandas de absorção: 1020-1075 e 1200-1275  $\text{cm}^{-1}$ . A banda de absorção de 1660-1750  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a estiramentos simétricos C=O, sendo a região de 1730-1750  $\text{cm}^{-1}$  associada a ésteres, de 1700-1730  $\text{cm}^{-1}$  a aldeídos e de 1650-1700  $\text{cm}^{-1}$  a cetonas (STUART, 2004; PAVIA et al., 2009).

De acordo com Paesen et al. (1995), o pico de absorção em 1720  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído ao grupo carbonila da lactona. Segundo Yin, Guo e Peng (2018), os picos nas bandas de 1560, 1510 e 1460  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídos a estiramentos de C=O e C=C e o pico na região de 1380  $\text{cm}^{-1}$  atribuído à deformação axial de C=O.

### **3.1.2. Análise espectrofotométrica vibracional do leite fluido**

As amostras de leite cru fraudadas e não fraudadas com Tilosina (10 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram analisadas com o uso da espectroscopia na região do infravermelho médio de 1000-3000  $\text{cm}^{-1}$  com transformada de Fourier. A caracterização do perfil espectroscópico do leite puro (Figura 3) foi realizada relacionando a posição (em número de onda) das bandas de absorção e os componentes da amostra. Da mesma forma, as amostras fraudadas (Figura 4).

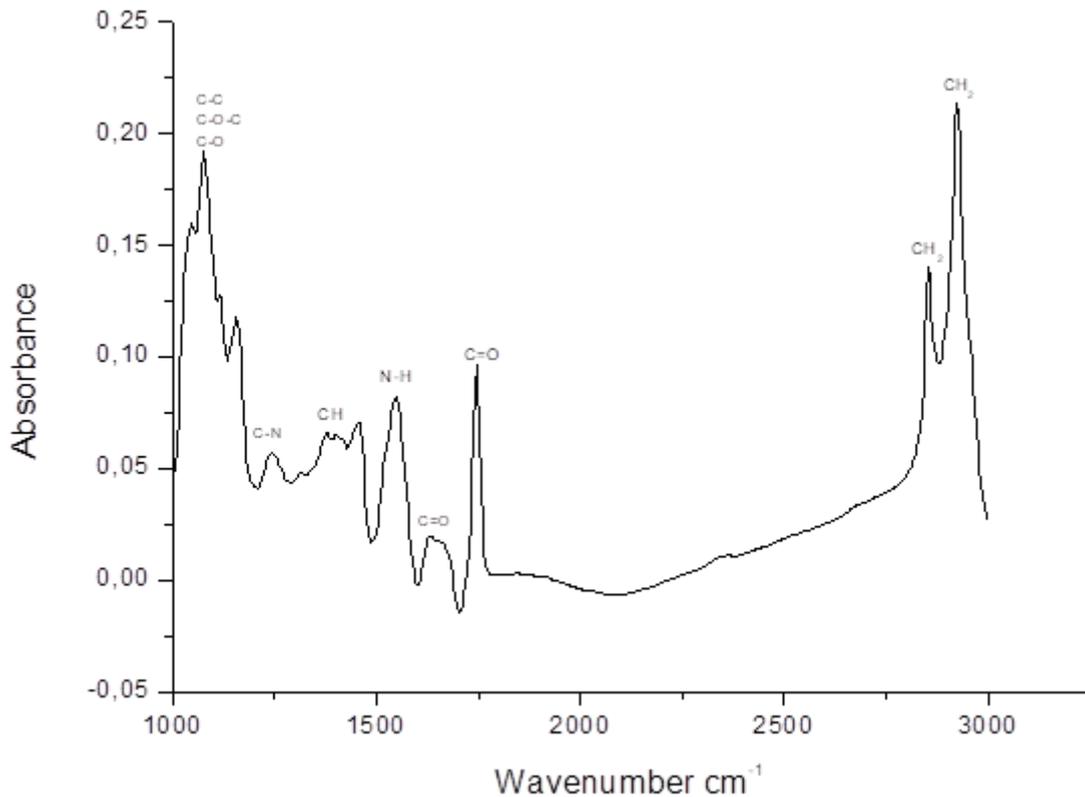


Figura 3: Espectro de leite fluido puro.

Analisando o espectro é possível identificar a presença de bandas de absorção associadas a características estruturais das moléculas orgânicas presentes no leite, como lactose, lipídeos e proteínas. O pico de absorção em  $1745\text{ cm}^{-1}$  é atribuído a estiramentos simétricos  $\text{C}=\text{O}$ . O pico em  $1660\text{-}1820\text{ cm}^{-1}$  também atribuído ao grupamento  $\text{C}=\text{O}$ . Picos de absorção em  $2350$ ,  $2850$  e  $2920\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos ao grupamento  $\text{CH}_2$ . Picos em  $1376$  e  $1458\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos ao estiramento  $\text{C-H}$ . Tais bandas de absorção caracterizam moléculas de gordura presentes no leite e decorrem de vibrações de ácidos graxos. Os lipídeos também originam picos em  $1160\text{ cm}^{-1}$ , em razão do estiramento  $\text{C-O}$  (STUART, 2004; GRELET et al., 2015).

As bandas que caracterizam a lactose encontram-se na região de  $1030\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ . Os picos de absorção em  $1023$  e  $1148\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos ao estiramento  $\text{C-O-C}$ . A caracterização das proteínas é baseada nas bandas de absorção das amidas. Pico de absorção na região de  $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$  é associado a amidas primárias e secundárias, sendo atribuído ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$ . Na região de  $1541\text{-}1547\text{ cm}^{-1}$ , o pico é associado a amida terciária e é atribuído a deformação angular  $\text{O}=\text{C-N}$  e a estiramentos  $\text{C-N}$  e  $\text{C=O}$ . Essa mesma região é associada deformação angular  $\text{N-H}$  de amins primárias e secundárias (STUART, 2004; GRELET et al., 2015).

A sobreposição dos espectros de todas as amostras de leite fluido, puras e fraudadas com Tilosina ( $10\text{-}100\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) foi realizada para comparar os perfis do leite puro e do leite adulterado e verificar como a adulteração é expressa no espectro (Figura 4).

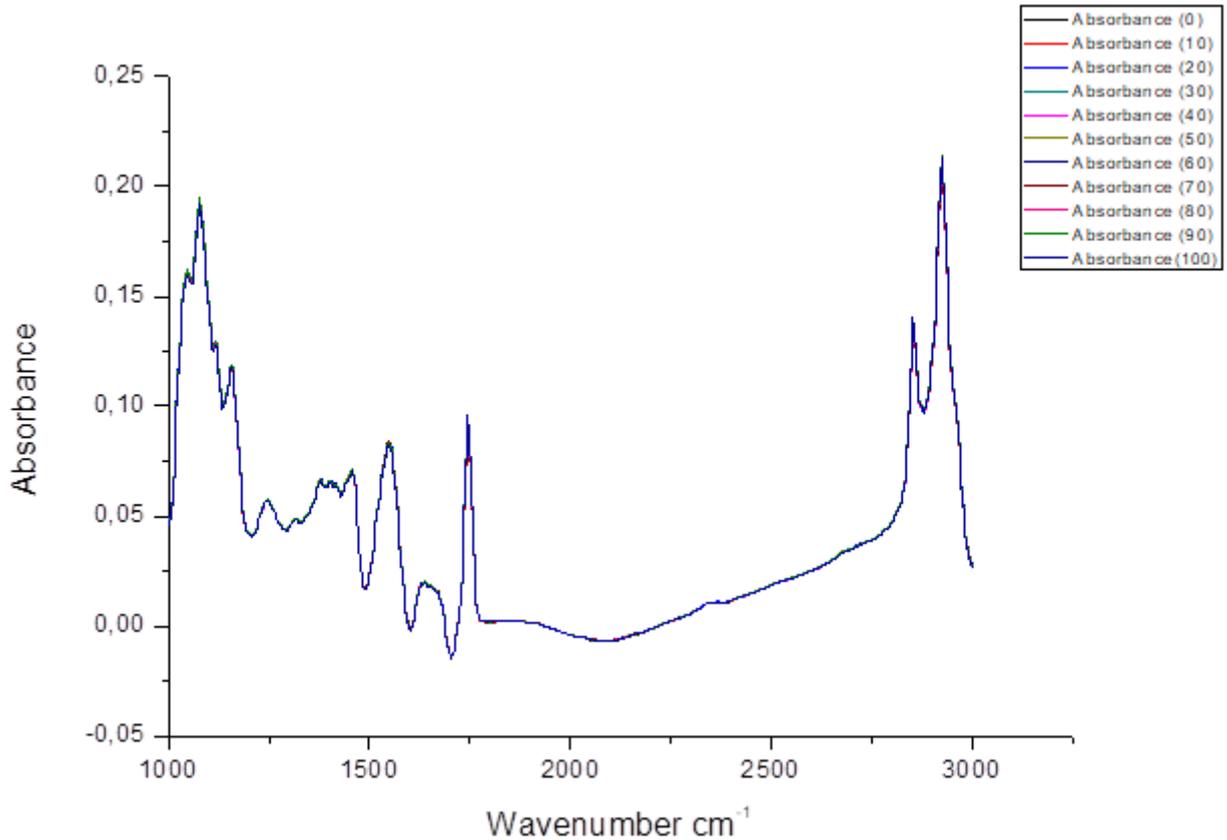


Figura 4: Sobreposição dos espectros das amostras de leite puro e fraudadas com Tilosina.

Os espectros obtidos nas amostras puras e adulteradas não se diferenciam (Figura 4) indicando que a quantidade de padrão adicionada não foi suficiente para que as características espectrais da Tilosina (picos característicos do adulterante) fossem expressas nos espectros, não sendo possível reconhecer visualmente a contaminação de leite por resíduos de Tilosina apenas pela observação dos espectros das amostras de leite analisadas.

### 3.2. Análises estatísticas multivariadas

Através das análises espectroscópicas foram observados 16 picos de absorção em determinados números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1043, 1072, 1111, 1161, 1248, 1316, 1379, 1405, 1458, 1542, 1631, 1673, 1744, 2340, 2853, 2925. Os dados espectrais foram organizados de modo que as variáveis independentes são os valores espectrais e as variáveis dependentes

correspondem as concentrações da substância de interesse nas amostras. Inicialmente, os dados espectroscópicos foram padronizados centrados na média. Após a organização do conjunto de dados, foram aplicadas as análises multivariadas, o método de classificação Análise de Componentes Principais e o método de calibração multivariada Análise de Regressão por Mínimos Quadrados.

### 3.2.1. Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais foi inicialmente aplicada para três grupos de amostras: leite puro (A), leite fraudado com Tilosina abaixo do LMR, 10-50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (B) e leite fraudado com Tilosina acima do LMR, 60-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (C). Os dois componentes principais (CP1 e CP2) explicam 83,83% do comportamento dos dados, dos quais 69,42% é explicado pela CP1 e 14,41% pela CP2. A partir da relação dos escores obtidos com as componentes principais 1 e 2, foi possível gerar um gráfico (Figura 5-I) para apresentar o comportamento das amostras de leite puro e amostras fraudadas.

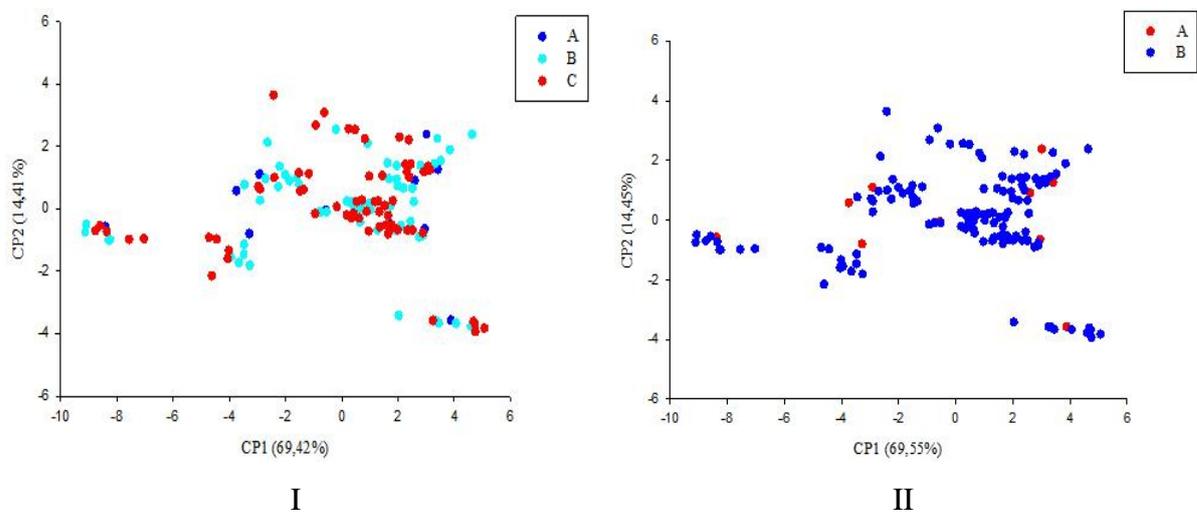


Figura 5: Gráficos de dispersão em relação a CP 1 e CP 2. I: amostras de leite puro (A), leite fraudado com Tilosina abaixo do LMR (B) e com Tilosina acima do LMR (C). II: amostras de leite puro (A) e leite fraudado com Tilosina (B).

Pode-se observar que não houve separação das amostras por nível de concentração. Como estes resultados foram ineficientes, um novo estudo foi realizado com apenas dois grupos: leite puro (A) e leite fraudado com Tilosina, 10-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (B). Os dois componentes principais (CP1 e CP2) explicam 84% do comportamento dos dados, sendo que 69,55% é

explicado pela CP1 e 14,45% pela CP2. Esta análise também não foi eficiente para a separação dos grupos, muito embora tenha melhorado a identificação das amostras (Figura 5-II).

Em ambos os casos não houve separação das amostras por nível de concentração, nem tão pouco a separação das amostras de leite puro das adulteradas. A não formação de grupos pode estar relacionada ao número de amostras analisadas, uma vez que a amostragem estatística pode não dar uma imagem real completa e reproduzível, e às baixas concentrações usadas neste estudo, de modo que o espectrofotômetro utilizado pode não ter sensibilidade adequada e as diferentes quantidades de Tilosina adicionadas ao leite não reproduzem diferenças significativas nos espectros.

### **3.2.2. Análise de Regressão por Mínimos Quadrados**

Em um teste preliminar, todos os dados padronizados (0 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram submetidos a Análise de Regressão por Mínimos Quadrados, sendo verificado que para as concentrações de 0 a 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  os valores reais divergiram muito dos valores preditos para algumas amostras, comprometendo o ajuste do modelo gerado. Em razão disto, os dados foram separados em dois grupos: amostras com Tilosina de 0 a 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  e amostras dopadas com 30 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Tilosina. Novamente, os dados padronizados foram submetidos à análise de PLS, desta vez divididos em dois grupos (0 a 20 e 30 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sendo ambos divididos em dois conjuntos, um de treinamento (70%) e outro de validação (30%).

#### **3.2.2.1. Amostras com Tilosina de 0 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$**

Analisando o conjunto de treinamento verificou-se que 15 fatores foram extraídos. Para selecionar os fatores para o ajuste adequado do modelo foi levado em consideração a significância dos fatores. Para tanto, deve-se avaliar a variação percentual explicada pelos fatores. Todos os fatores apresentaram  $p > 0,1$ , ou seja, são estatisticamente significativos. Os 15 fatores explicam 99,99% da variação da resposta, enquanto é explicado 98,79% da variação do preditor. Diante disto, todos os 15 fatores foram selecionados para fazer parte do modelo.

No gráfico de carga de correlação (Figura 6) pode-se observar que as variáveis relacionadas ao espectro são altamente correlacionadas, apresentando-se na maioria aglomerada com relação positiva para o fator 1, enquanto algumas estão negativamente relacionadas ao fator 1, e a maioria relacionada positivamente ao fator 2. As amostras não apresentaram grande correlação com estes fatores, estando no centro do gráfico.

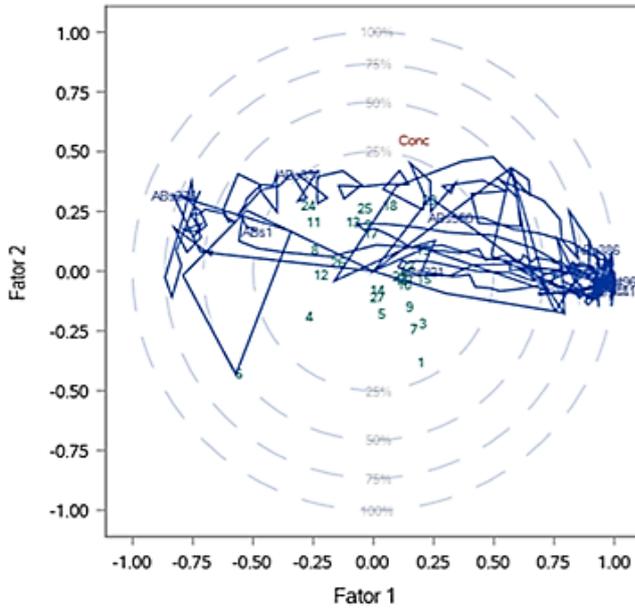


Figura 6: Gráfico de carga de correlação.

Ao avaliarmos a correlação entre os valores preditos e as concentrações estudadas observamos que o modelo apresentou  $R^2 = 0,9999$  e  $R = 0,9999$ , indicando alta correlação entre o antibiótico estudado e os dados espectrais, assim como entre os valores observados e preditos, e que o modelo foi capaz de prever a concentração de Tilosina no leite nas concentrações estudadas (Figura 7).

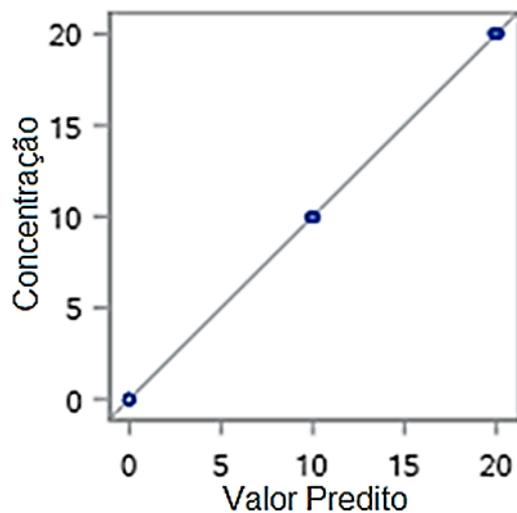


Figura 7: Gráfico de correlação de valores observados e preditos.

### 3.2.2.2. Amostras com Tilosina de 30 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$

Analisando o conjunto de treinamento 15 fatores foram extraídos e selecionados para o ajuste adequado do modelo com base em suas significâncias sendo avaliada a variação percentual explicada pelos fatores. Os 15 fatores apresentaram  $p > 0,1$ , ou seja, são estatisticamente significativos. Os 15 fatores explicam 98,82% da variação da resposta, enquanto 97,33% da variação do preditor é explicada. Diante disto, os 15 fatores foram selecionados para fazer parte do modelo.

O gráfico de carga de correlação (Figura 8) mostra que as variáveis relacionadas ao espectro são correlacionadas e estão, na maioria, aglomeradas com relação negativa para o fator 1, enquanto algumas estão positivamente relacionadas a este fator. Em relação ao fator 2, a maioria está relacionada negativamente, mas algumas estão positivamente relacionadas a este fator. Por sua vez, as amostras no centro do gráfico não apresentaram grande correlação com os fatores.

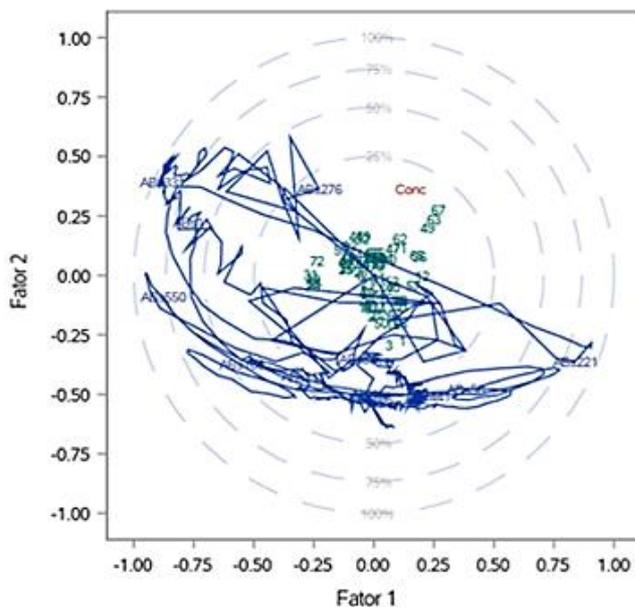


Figura 8: Gráfico de carga de correlação.

Na Figura 9 é apresentado o gráfico de correlação entre os valores preditos e as concentrações observadas. O modelo apresentou  $R^2 = 0,9882$  e  $R = 0,9941$  indicando alta correlação entre as concentrações e os dados espectrais e entre os valores observados e preditos. Desta forma, é possível afirmar que, na faixa de concentração estudada, o modelo apresentou

capacidade de predição para a concentração de Tilosina em leite menor ou igual ao LMR e acima.

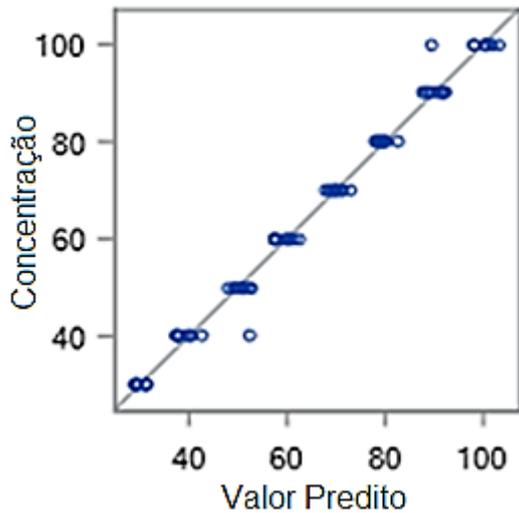


Figura 9: Gráfico de correlação de valores observados e preditos.

A análise de regressão por mínimos quadrados (PLS) demonstrou-se adequada para o objetivo proposto neste estudo. Diante dos resultados obtidos é possível afirmar que há uma boa correlação entre as concentrações de antibiótico e os dados espectrais. Os modelos gerados apresentaram alta correlação entre os valores observados e preditos, sendo capazes de prever, com precisão, a concentração de Tilosina no leite fluido.

#### 4. Conclusões

A análise de componentes principais não obteve sucesso na separação das amostras de leite puro e fraudado em função da concentração de Tilosina. A espectroscopia no IVTF associada a análise de regressão por mínimos quadrados pode ser usada como ferramenta para a predição de Tilosina em leite fluido.

#### 5. Referências bibliográficas

ARSIC, B.; BARBER, J.; CIKOS, A.; MLADENOVIC, M.; STANKOVIC, N.; NOVAK, P. 16-membered macrolide antibiotics: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, p. 283-298, 2018.

BOTELHO, B. G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L. S.; SENA, M. M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of Five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLSDA. **Food Chemistry**, v. 181, p. 31-37, 2015.

CEBI, C.; YILMAZ, M. T.; SAGDIC, O. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. **Food Chemistry**, v. 229, p. 517-526, 2017.

DOMINGO, E.; TIRELLI, A. A.; NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C.; PINTO, S. M. Melamine detection in milk using vibrational spectroscopy and chemometrics analyses: A review. **Food Research International**, v. 60, p. 131-139, 2014.

DUARTE, M. L.; FERREIRA, M. C.; MARVÃO, M. R.; ROCHA, J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 1-8, 2002.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Anuário Leite 2018**. Embrapa Gado de leite, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36560390/anuario-do-leite-2018-e-lancado-na-agroleite>. Acessado em: 12/02/2019.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Gateway to dairy production and products**. Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/>. Acessado em: 23/03/2019.

FERNANDES, S. A. A., MAGNAVITA, A. P. A., FERRÃO, S. P. B.; GUALBERTO, S. A.; FALEIRO, A. S., FIGUEIREDO, A. J.; MATARAZZO, S. V. Daily ingestion of tetracycline residue present in pasteurized milk: a public health problem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 6, n. 21, p. 3427-3434, 2014.

FERRAG-SIAGH, F.; FOURCADE, F.; SOUTREL, I.; AIT-AMAR, H.; DJELAL, H.; AMRANE, A. Electro-Fenton pretreatment for the improvement of tylosin biodegradability. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 8534-8542, 2014.

GARCIA, S. R.P.; CHAVES-NETO, A.; ORO, S. R.; MAFIOLETI, T. R.; NEUMANN-JÚNIOR, C. Modelo de regressão por mínimos quadrados parciais para dados de monitoramento de barragens. **Revista Engenho**, v. 11, p. 1-20, 2015.

GRANADOS-CHINCHILLA, F.; SÁNCHEZ, J.; GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ, C. A Novel Green Chemistry Method for Nonaqueous Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Detection of First-, Second-, and Third-Generation Tetracyclines, 4-

Epitetracycline, and Tylosin in Animal Feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7121-7128, 2012.

GRELET, C.; FERNÁNDES PIERNA, J. A.; DARDENNE, P.; BAETEN, V.; DEHARENG, F. Standardization of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1-11, 2015.

HAMED, S. F.; ALLAM, M. A. Application of FTIR Spectroscopy in the Determination of Antioxidant Efficiency in Sunflower Oil. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 2, p. 27-33, 2006.

LEITE, A. I. N.; PEREIRA, C. G.; ANDRADE, J.; VICENTINI, N. M.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. **LWT Food Science and Technology**, v. 109, p. 63-69, 2019.

MCGLINCHEY, T. A.; RAFTER, P. A.; REGAN, F.; MCMAHON, G. P. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, n. 1, p. 1-15, 2008.

PAESEN, J.; CYPERS, W.; BUSSON, R.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Isolation of decomposition products of tylosin using liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 699, p. 99-106, 1995.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. 4th Edn. Philadelphia: Brooks Cole, 2009.

POONIA, A.; JHA, A.; SHARMA, R.; SINGH, H. B.; RAI, A. K.; SHARMA, N. Detection of adulteration in milk: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 23-42, 2017.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 467-483, 2011.

ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683-700, 2007.

ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. **Food Research International**, v. 43, p. 886-892, 2010.

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**, v. 138, p. 19-24, 2013.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 2004.

YIN, Y.; GUO, X.; PENG, DAN. Iron and manganese oxides modified maize straw to remove tylosin from aqueous solutions. **Chemosphere**, n. 205, p. 156-165, 2018.

## IV – CAPÍTULO 2

# EMPREGO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO ASSOCIADO À QUIMIOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DE TILOSINA EM LEITE LIOFILIZADO

Alexandre Gomes Marques de Freitas, Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, Leandro Soares Santos, Larissa Cavalcante de Rezende

### 1. Introdução

A produção mundial de leite no ano de 2017 foi de 828 milhões de toneladas, sendo o Brasil um dos 10 maiores produtores mundiais. O Brasil foi o quinto maior produtor de leite do mundo em 2016, responsável por 4% da produção mundial. Estima-se que do uso de leite para produtos lácteos, 42,9% é de leite fresco e outros, 25,2% é para produção de queijo, 23,1% é para produzir manteiga, 5,1% é para leite em pó desnatado e 3,7% para leite em pó integral (FAO, 2019).

O leite em pó tem vida útil muito maior do que o leite líquido, além de ter menores custos de transporte e armazenamento. As técnicas de controle de qualidade para o leite em pó são complicadas e demoradas, portanto, há a necessidade de desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficientes para monitorar a qualidade do leite em pó (LEI et al., 2010).

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF ou FTIR) tem sido empregada para análise de alimentos e controle de qualidade, destacando-se por ser uma técnica não destrutiva e eficiente na investigação de adulteração de produtos alimentícios (DUARTE et al., 2002; RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; CEBI, YILMAZ e SAGDIC, 2017). Essa técnica já foi utilizada em vários estudos para a análise de leite e derivados, tendo sido verificada a eficácia da técnica para a avaliação da composição, detecção da presença de adulterantes e contaminantes e verificação de autenticidade (LEI et al., 2010; CASSOLI et al., 2011; BOTELHO et al., 2015; POONIA et al., 2017).

A associação da espectroscopia no infravermelho e a quimiometria tem proporcionado avanços para segurança de alimentos e controle de qualidade, demonstrando-se rápido, eficaz e confiável para a investigação da composição de alimentos, verificação de autenticidade, identificação e quantificação de contaminantes alimentares e adulterantes em produtos alimentícios (RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; SANTOS, PEREIRA-FILHO e

RODRIGUEZ-SAONA, 2013; DOMINGO et al., 2014; POONIA et al., 2017; CEBI, YILMAZ e SAGDIC, 2017; LEITE et al., 2019).

Apesar do exposto, há uma quantidade limitada de estudos sobre a contaminação de leite por resíduos de antibióticos empregando a técnica IVTF e a quimiometria. Diante disto, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de Tilosina em leite, empregando a espectrometria no infravermelho médio associada a técnicas quimiométricas.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Amostras**

Foram coletadas amostras de leite cru (1 L) oriundas de vacas de grupo sanguíneo Holandês/Zebu.

### **2.2. Delineamento experimental**

As amostras foram coletadas em 61 propriedades rurais (Figura 1) e conduzidas sob refrigeração até o Centro de Estudos em Leite. Cada amostra foi subdividida em 11 alíquotas para a dopagem, sendo acrescentada a solução de Tilosina em volumes pré-estabelecidos para obter as concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Após a dopagem, as amostras foram congeladas e liofilizadas para posterior análise em espectrofotômetro no infravermelho médio com transformada de Fourier (IVTF). Os dados espectrais obtidos foram padronizados e submetidos a métodos quimiométricos de classificação e de regressão.

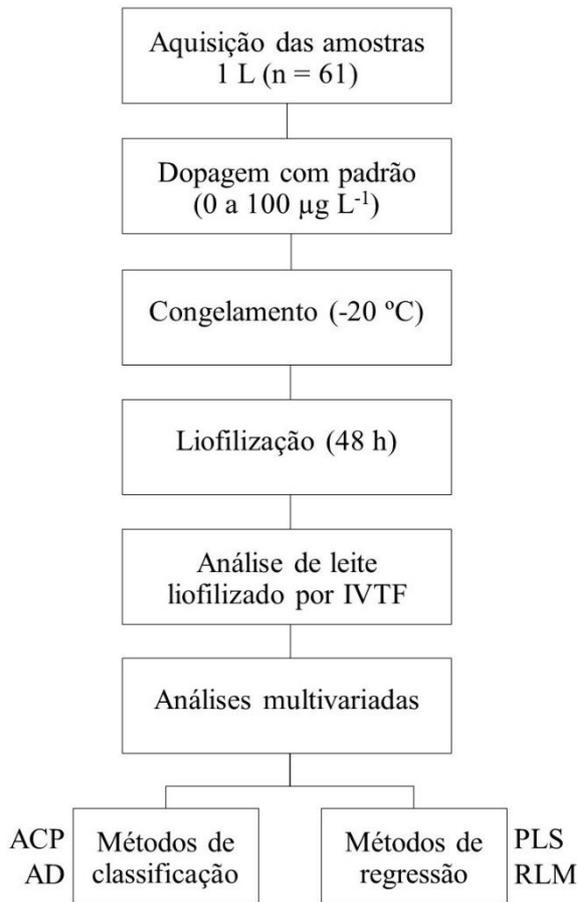


Figura 1: Fluxograma das etapas envolvidas no desenvolvimento do método de determinação de Tilosina em leite liofilizado.

### 2.3. Preparo das amostras

A solução estoque de Tilosina foi preparada em água ultrapura, na concentração de 5,0 g L<sup>-1</sup>. A solução de trabalho (100,0 mg L<sup>-1</sup>) foi preparada pela diluição de 2,0 mL da solução estoque para 100 mL em leite. As amostras de leite cru foram adulteradas pela adição de volumes pré-estabelecidas da solução de trabalho de Tilosina, sendo avolumadas para 50 mL em balões volumétricos, obtendo assim as concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg L<sup>-1</sup> do padrão para cada amostra. Para cada amostra foi separado um branco analítico, uma alíquota sem adição de Tilosina.

As amostras de leite, com e sem adição de padrão, foram transferidas para frascos eppendorf® de 2 mL e congeladas a -20 °C para posterior liofilização à -48 °C ± 2 °C e 0,100 mBar por 48 horas em liofilizador de bancada Labconco modelo FreeSone 4,5 L (Kansas, USA).

A faixa de concentração utilizada (0 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foi definida de acordo com os LMR, sendo a concentração máxima o dobro do LMR estabelecido para a Tilosina em leite: 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ANVISA, 2006).

## **2.4. Reagentes**

O padrão analítico de Tilosina, de alta pureza, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). A água ultrapura foi obtida em sistema de purificação da marca ELGA LabWater (High Wycombe, Inglaterra), modelo Purelab Option-Q.

## **2.5. Análise espectrofotométrica vibracional**

As amostras de leite liofilizado e o padrão sólido de Tilosina foram analisados na região do infravermelho médio de 650-4000  $\text{cm}^{-1}$  em equipamento Agilent, modelo Cary 630 (Santa Clara, USA). Os dados espectroscópicos foram obtidos com os softwares Microlab e Resolution Pro, da Agilent (Santa Clara, USA), e usados para posterior caracterização dos espectros.

## **2.6 Análise estatística multivariada**

Os dados obtidos nas análises espectrofotométricas foram pré-processados utilizando o programa Microsoft Office Excel<sup>®</sup>, versão 2010, padronizados para média igual a zero e desvio padrão igual a 1. O algoritmo de Kenstone foi utilizado para dividir o conjunto de dados em dois grupos: treinamento e validação. O programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc.) foi utilizado para realizar as Análise de Componentes Principais, Análise Discriminante, Análise de Regressão Linear Múltipla e Análise de Regressão por Mínimos Quadrados.

# **3. Resultados e Discussão**

## **3.1. Análise espectrofotométrica vibracional**

### **3.1.1. Análise espectrofotométrica vibracional da Tilosina**

O espectro da Tilosina (Figura 2) foi caracterizado pela identificação das bandas absorção e associação aos grupos funcionais presentes na molécula de Tilosina, que apresenta as funções éter, éster, aldeído, cetona, álcool e amina (terciária), além de insaturações. Na

Tabela 1 são descritas as faixas dos picos observados no espectro e os grupos funcionais a que são atribuídos (PAESEN et al. 1995; STUART, 2004; PAVIA et al., 2009; YIN, GUO e PENG 2018). Vale destacar que, apesar dos grupos funcionais absorverem em posições (números de onda) específicas no espectro infravermelho, as bandas podem ser influenciadas pela presença de grupos funcionais próximos (ROHMAN e MAN, 2010).

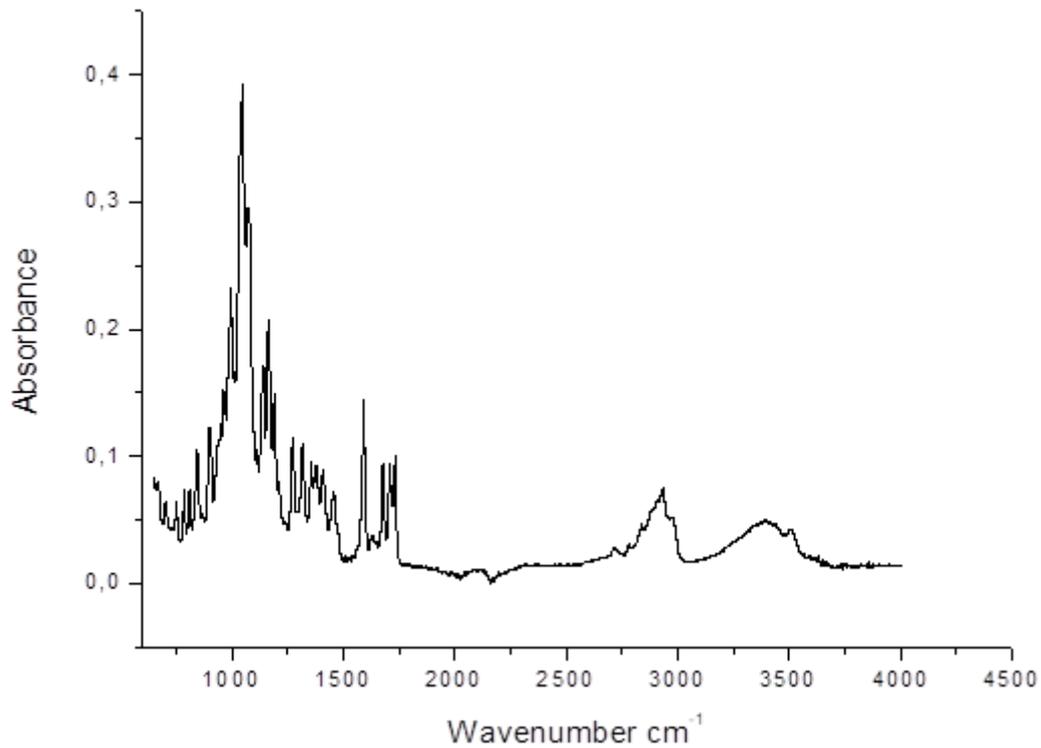


Figura 2: Espectro do padrão de Tilosina na região do infravermelho de 650-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Tabela 1: Bandas de absorção do espectro de Tilosina.

Faixa espectral (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Observação
670-970	CH=CH	Deformação angular
		C-H no plano: 960-970 cm <sup>-1</sup>
		C-H fora do plano: 675-730 cm <sup>-1</sup>
1050-1300	C-O	Estiramento
		Álcool (secundário: 1100 cm <sup>-1</sup> )
		Éter (alifático: 1070-1150 cm <sup>-1</sup> ) Éster (insaturado: 1070-1150 e 1200-1275 cm <sup>-1</sup> )
1180-1280	C-N	Alifáticos, estiramento
1370-1390	CH <sub>3</sub>	Deformação angular
1380	C=O	Deformação axial
1420	CH <sub>2</sub>	Deformação angular
1460	C=C	Estiramento
1560	C=O	Estiramento
1620-1680	C=C	Deformação axial
1660-1750	C=O	Estiramento simétrico
		Éster (1750-1730 cm <sup>-1</sup> )
		Aldeído (1730-1700 cm <sup>-1</sup> )
		Cetona (1700-1660 cm <sup>-1</sup> ) Lactona (1720 cm <sup>-1</sup> )
2700-2850	C-H	Aldeído, deformação axial
2850-2960	C-H	Alifáticos, deformação axial
3200-3600	O-H	Deformação axial

### 3.1.2. Análise espectrofotométrica vibracional do leite liofilizado

Os espectros das amostras de leite liofilizadas, puras e com Tilosina (10 a 100 µg L<sup>-1</sup>), foram caracterizados relacionando as bandas de absorção (em número de onda) às características estruturais das moléculas orgânicas presentes no leite (lactose, lipídeos, proteínas e carboidratos), conforme dados da literatura (STUART, 2004; PAVIA et al., 2009; LEI et al., 2010; GRELET et al., 2015). A Figura 3 o espectro das amostras de leite puro liofilizado e os principais picos de absorção atribuídos aos constituintes do leite são descritos na Tabela 2.

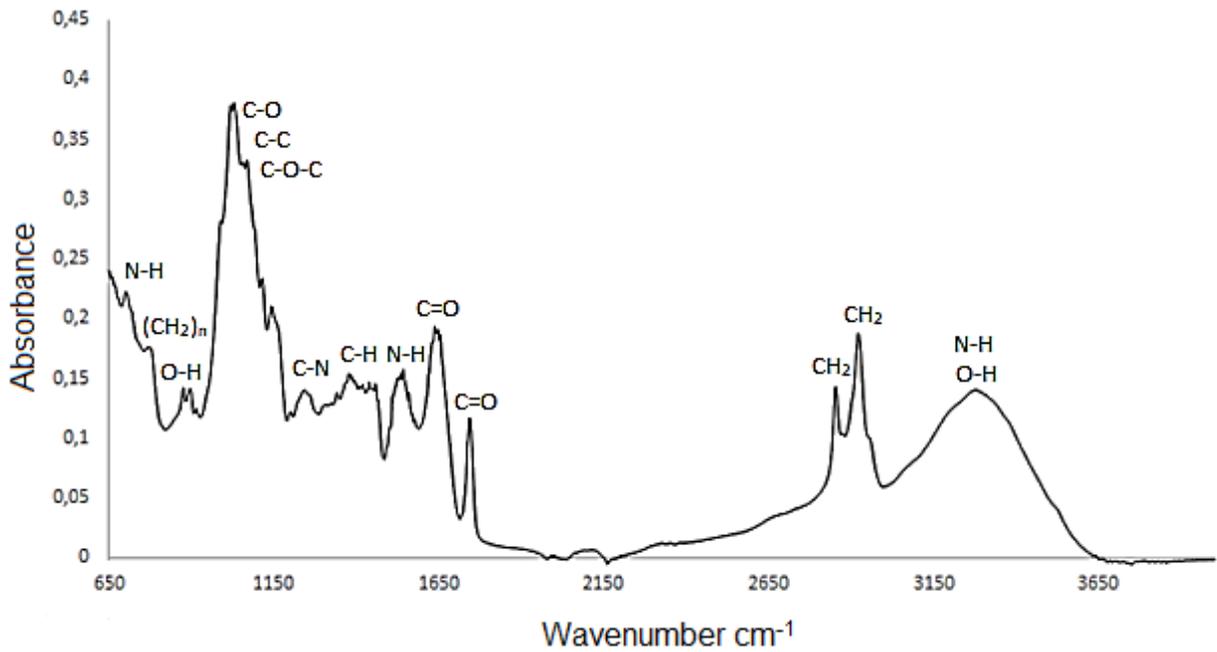


Figura 3: Espectro de leite liofilizado puro.

Tabela 2: Picos de absorção de componentes do leite.

Componente do leite	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Observação
Gorduras	1160	C-O	Vibrações de ácidos graxos
	1376 e 1458	C-H	
	1747	C=O	
	2350, 2855 e 2925	CH <sub>2</sub>	
	900 e 3200-3600	O-H	
Óleo	722	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	
Proteínas	700	N-H	Amidas
	3070-3320		
	1541-1547	N-H	Amida secundária
	1650-1660	C=O	Amida primária
	1241-1251	C-N	Amida terciária
Carboidratos	800-1000	Anel de carboidrato	
Lactose	1030-1150	C-O	
		C-C C-O-C	
	3528	O-H	

Para comparar os perfis do leite puro e do leite adulterado foi realizada a sobreposição dos espectros de todas as amostras de leite liofilizado, puras e fraudadas com Tilosina (10-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sendo avaliado como a adulteração é expressa no espectro (Figura 4).

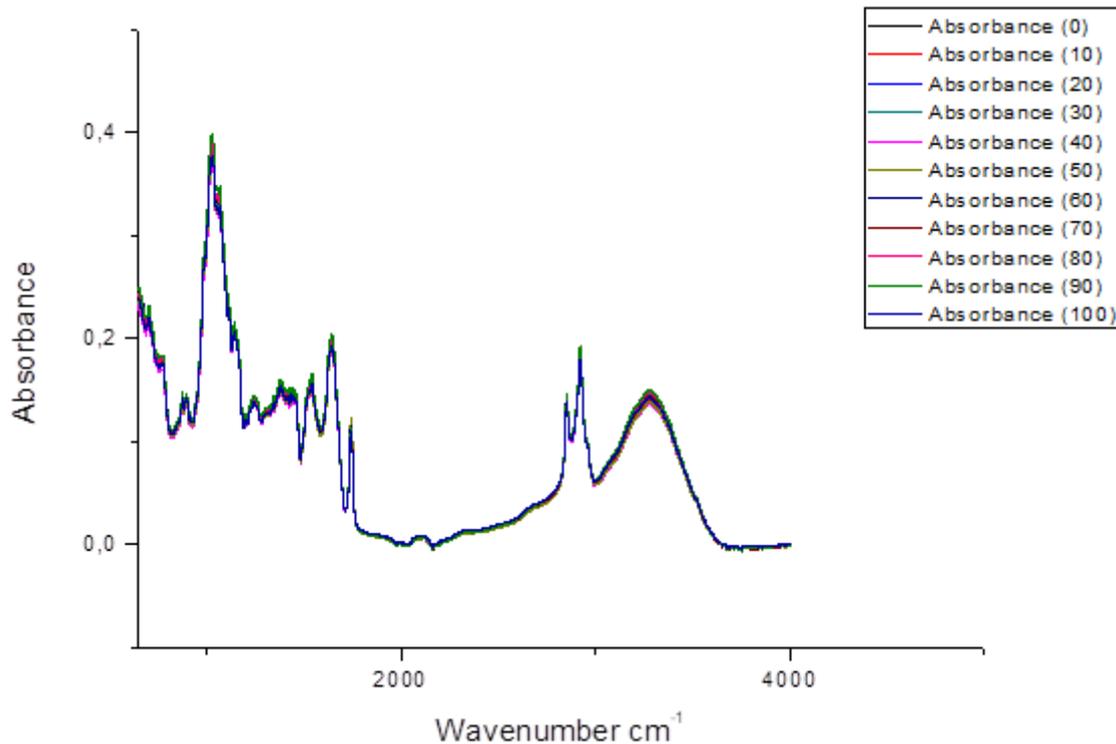


Figura 4: Sobreposição dos espectros das amostras de leite puro e fraudadas com Tilosina.

Na sobreposição dos espectros de leite liofilizado puro e fraudado é possível observar visualmente que há diferenças entre os espectros. Cada banda de absorção foi analisada, sendo verificado que não há tendência de aumento ou diminuição de absorção em função do aumento da concentração de Tilosina na amostra.

Na banda de absorção característica da lactose ( $1030\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ ) absorbâncias maiores foram obtidas para as amostras com 90 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Tilosina, enquanto as menores foram das amostras de 40 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Outra banda atribuída à lactose ( $3100\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$ ), as maiores absorbâncias também foram observadas para as amostras com 90 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Tilosina, e as menores absorbâncias para as amostras de 40 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Para a banda de absorção característica de gordura ( $2855\text{ e }2925\text{ cm}^{-1}$ ), foram obtidas absorbâncias menores para as amostras com 100 e 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Tilosina e maiores para as amostras de 50 e 60  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Em outra banda característica de gordura ( $1747\text{ cm}^{-1}$ ), maiores absorbâncias foram obtidas para as amostras com 50 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Tilosina e as menores absorbâncias para as amostras com 100 e 80  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

As bandas de absorção específicas das proteínas (1541 e 1650  $\text{cm}^{-1}$ ) tiveram absorbâncias menores para as amostras com 40 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Tilosina. As maiores absorbâncias foram obtidas para as amostras com 90 e 80  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a primeira banda, enquanto 90 e 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a segunda banda.

Portanto, não foi possível identificar como a Tilosina se liga aos componentes do leite, nem tão pouco inferir sobre o comportamento das amostras.

### 3.2. Análises estatísticas multivariadas

Através das análises espectroscópicas foram observados 20 picos de absorção em determinadas faixas espectrais (Tabela 3), observando o valor médio do máximo do pico.

Tabela 3: Faixas espectrais dos picos observados no espectro do leite fluido.

Pico	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	De	Até
1	3055,4	3471,01
2	2861,08	2966,44
3	2826,89	2874,83
4	2186,8	2196,3
5	1722,85	1766,9
6	1699,77	1719,51
7	1564,65	1702,93
8	1440,5	1470,8
9	1300,96	1334,78
10	1256,82	1288,89
11	1181,57	1202,88
12	1152,95	1177,91
13	1123,48	1148,35
14	1018,16	1064,34
15	975,74	1008,03
16	884,27	917,45
17	825,3	864,89
18	776,85	797,05
19	740,46	763,13
20	692,83	719,44

Os dados espectrais foram organizados de modo que as variáveis independentes são os valores espectrais e as variáveis dependentes correspondem as concentrações da substância de interesse nas amostras. Os dados foram padronizados centrados na média e submetidos as técnicas multivariadas: Análise de Componentes Principais, Análise Discriminante e Análise de Regressão por Mínimos Quadrados.

### 3.2.1. Análise de Componentes Principais

Foi aplicada a ACP para amostras de leite liofilizado, puras e fraudadas com Tilosina de 10 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Inicialmente foi verificado que as variáveis (bandas de absorção) 2, 3, 11, 12 e 13 são redundantes e a variável 4 não apresenta alta correlação com as principais componentes, portanto, essas variáveis foram descartadas da análise.

As duas componentes principais (CP1 e CP2) explicam 84,08% do comportamento dos dados, sendo que 72,30% é explicado pela componente principal 1 e 11,78% explicado pela componente principal 2. Foi verificado que todas as variáveis possuem alta correlação com CP1, exceto C5 que possui alta correlação com a CP3. A componente principal 3 explica 7,57% do comportamento dos dados, explicando junto com a CP1 79,87%.

A partir da relação dos escores obtidos com CP1 e CP2 (Figura 5-I) e da relação de CP1 e CP3 (Figura 5-II) foram gerados gráficos para apresentar o comportamento das amostras de leite puro e amostras adulteradas nas 10 diferentes concentrações.

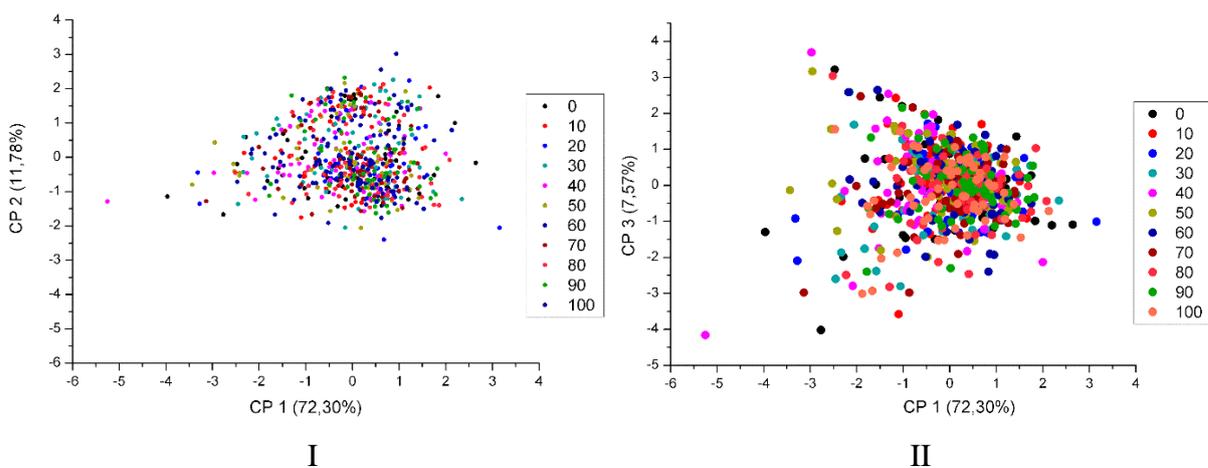


Figura 5: Gráfico de dispersão das amostras de leite puro (0) e leite fraudado com Tilosina (10 a 100); I em relação a CP1 e CP2; II em relação a CP1 e CP3.

Pode-se observar que não houve separação das amostras por nível de concentração (Figura 5). Em razão disso, um novo estudo foi realizado, separando as amostras em três grupos: leite puro, amostras fraudadas com antibiótico abaixo do LMR (de 10 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e acima do LMR (de 60 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Neste estudo foram descartadas as variáveis 11, 12 e 13 por serem redundantes e a variável 4 por não apresentar alta correlação com as principais componentes.

As componentes principais (CP1 e CP2) explicam 81,85% do comportamento dos dados, sendo que 66,25% é explicado pela componente principal 1 e 15,60% explicado pela componente principal 2. As variáveis 2, 3 e 5 possuem alta correlação com CP2 e as demais possuem alta correlação com CP1. A componente principal 3 explica 10,33% do comportamento das amostras, explicando 76,58% junto com a CP1.

A partir da relação dos escores obtidos com as CPs 1 e 2 (Figura 6-I) e da relação das CP1 com CP3 (Figura 6-II) foram gerados os gráficos para apresentar o comportamento das amostras de leite puro e fraudadas com Tilosina acima e abaixo do LMR.

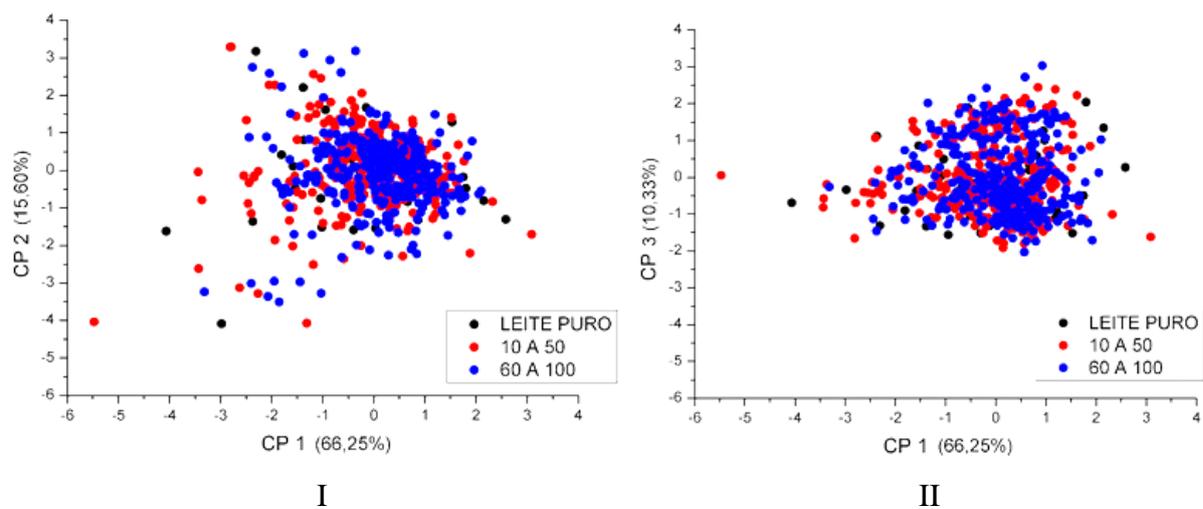


Figura 6: Gráfico de dispersão das amostras de leite puro e fraudadas com Tilosina abaixo do LMR (10 a 50) e acima do LMR (60 a 100); I em relação a CP1 e CP2; II em relação a CP1 e CP3.

Esta análise também não foi eficiente para a separação dos grupos de amostras fraudadas e das amostras puras (Figura 6). Mais uma tentativa de separação foi realizada, desta vez para as amostras de leite puro, leite fraudado e o padrão Tilosina. Com base no primeiro estudo de ACP, as variáveis (picos) 2, 3, 4, 11, 12 e 13 foram descartadas.

A componente principal 1 explica 72,30% e a componente principal 2 11,78%, explicando juntas 84,08% do comportamento dos dados. A partir da relação dos escores obtidos com as CPs 1 e 2 foi gerado um gráfico (Figura 7) para apresentar o comportamento das amostras. Mais uma vez não foi verificada a separação das amostras puras e fraudadas.

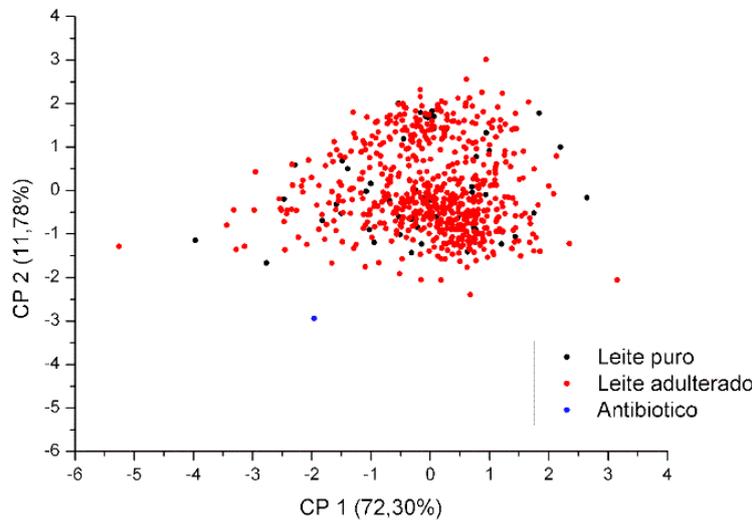


Figura 7: Gráfico de dispersão das amostras de leite puro, leite adulterado com Tilosina e padrão do antibiótico em relação a CP1 e CP2.

Nenhuma das análises de ACP aplicada obteve sucesso na separação das amostras de leite liofilizado em função da concentração de Tilosina. Conforme observado com a sobreposição dos espectros de leite liofilizado, puro e fraudado, as amostras não apresentaram um padrão de comportamento para a presença de Tilosina em diferentes concentrações de 10 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , o que pode justificar a não formação dos grupos.

### 3.2.2. Análise Discriminante

Inicialmente foi utilizado o algoritmo de Kenstone para separar o conjunto de dados em dois conjuntos: treinamento (70%) e validação (30%). Como foi verificado na Análise de Componentes Principais, as variáveis (bandas de absorção) 2, 3, 11, 12 e 13 são redundantes e a variável 4 não apresenta alta correlação com as principais componentes. Portanto, assim como na análise ACP, essas variáveis foram descartadas para as análises discriminante.

Foi aplicada a análise discriminante para amostras de leite liofilizado, puras e fraudadas com Tilosina de 10-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Na etapa de treinamento obteve-se taxa de classificação de

18,60%, 23,26%, 18,60%, 13,95%, para as amostras com concentração 0, 10, 20 e 30, respectivamente. Para as concentrações 40 e 50 a taxa de classificação foi de 16,28%. Para as concentrações 60, 70 e 80 obteve-se taxa de classificação de 6,98%, 9,30%, 6,98%, respectivamente. A taxa de 37,21% foi obtida para as concentrações 90 e 100. Com os dados do treinamento foi gerada a função linear discriminante (Tabela 4). As variáveis 8 e 10 apresentam maior influência na geração das regras de discriminação.

Tabela 4: Função linear discriminante para amostras de leite puro (0) e fraudadas com Tilosina (10, 20, 30, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100).

Variável	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Constante	-113,595	-113,661	-115,543	-115,887	-111,838	-114,829	-114,736	-113,695	-114,661	-117,005	-110,686
1	143,101	144,267	171,898	160,502	165,627	159,244	177,888	136,989	149,414	137,205	154,252
5	482,981	498,274	512,838	486,541	501,029	504,041	482,652	482,914	487,328	478,358	473,571
6	-305,106	-343,603	-307,503	-368,519	-246,772	-206,467	-262,068	-355,800	-327,899	-460,104	-257,779
7	-98,154	-59,198	-56,542	-68,399	-56,289	-75,765	-86,287	-52,0699	-64,372	-65,237	-99,241
8	537,750	629,438	404,082	565,759	457,494	548,869	496,363	507,364	483,659	519,046	434,030
9	1367	1212	1351	1334	1153	1232	1260	1272	1384	1341	1527
10	-844,717	-894,156	-776,151	-862,339	-711,642	-878,909	-751,596	-812,644	-828,493	-767,055	-829,274
14	-247,541	-256,046	-221,066	-256,358	-229,284	-260,073	-190,929	-226,053	-233,725	-224,344	-237,610
15	48,673	48,510	-4,466	34,2781	25,999	70,772	-18,566	10,023	22,623	25,683	20,621
16	-195,096	-202,699	-185,116	-198,229	-214,232	-215,821	-233,567	-172,547	-201,616	-80,086	-283,692
17	1047	1143	1136	1122	1158	1082	1199	1125	1121	1053	1090
18	183,483	243,032	157,9369	226,928	151,074	230,425	130,496	214,477	174,637	99,488	275,044
19	58,887	91,582	65,408	48,562	125,391	97,259	91,147	53,321	81,173	128,961	-60,112
20	-139,190	-217,775	-153,635	-171,817	-196,539	-185,847	-184,492	-165,079	-183,264	-208,881	-118,575

A discriminação das amostras do conjunto de validação nos respectivos grupos (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100) se deu com base nas regras de discriminação geradas na etapa de treinamento, utilizando as funções matemáticas que são combinações lineares das variáveis utilizadas (Tabela 4). Na etapa de validação foram obtidas baixas taxas de acerto: 0% para as concentrações 20, 70 e 80; 5,56% para as concentrações 0, 10 e 60; 11,11% para a concentração 50; 16,67% para as concentrações 30, 40 e 90; 27,78% para concentração 100.

Como não houve separação das amostras por nível de concentração, um novo estudo foi realizado. AD foi aplicada para três grupos de amostras: leite puro (A), leite fraudado com Tilosina abaixo do LMR 10-50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (B) e leite fraudado com Tilosina acima do LMR 60-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (C). Na etapa de treinamento obteve-se uma taxa de classificação de 93,33% para o grupo A, 66,20% para o grupo B e 48,11% para o grupo C. A função linear discriminante gerada com os dados de treinamento é apresentada a seguir (Tabela 5). As variáveis (bandas de absorção) 8, 9 e 17 apresentam maior influência para a geração das regras de discriminação.

Tabela 5: Função linear discriminante para leite puro (A), leite fraudado com Tilosina abaixo do LMR 10-50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (B) e leite fraudado com Tilosina acima do LMR 60-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (C).

Variável	A	B	C
Constante	-95,678	-96,764	-96,757
1	49,184	83,424	86,105
5	280,301	287,74	267,512
6	-327,768	-353,46	-384,292
7	-143,400	-124,06	-138,549
8	826,913	782,245	780,899
9	496,606	421,525	481,877
10	-455,236	-372,517	-338,436
14	-162,027	-120,798	-109,346
15	-97,893	-170,989	-178,171
16	237,313	212,686	209,109
17	845,759	946,268	933,857
18	174,895	240,407	234,153
19	-193,343	-284,226	-307,281
20	109,614	119,283	114,972

A discriminação das amostras do conjunto de validação nos respectivos grupos (A, B e C) se deu com base nas regras de discriminação geradas na etapa de treinamento, utilizando as funções matemáticas que são combinações lineares das variáveis utilizadas (Tabela 5). Na etapa de validação, a taxa de acerto foi de 61,54%, 23,91% e 50,55% para os grupos A, B e C, respectivamente. Muitas amostras de leite liofilizado adulteradas com Tilosina foram erroneamente classificadas como sendo leite puro. Portanto, não foi eficiente a discriminação das amostras de leite liofilizado puras e adulteradas com Tilosina em diferentes níveis de concentração.

Mais uma vez, os resultados na análise discriminante não foram satisfatórios, pois o percentual de acerto foi baixo para todos os grupos. Em razão disto, a AD foi dois grupos de amostras: leite puro (A) e leite fraudado com Tilosina (B). Obteve-se uma taxa de classificação de 60,47% para o grupo de amostras de leite puro e 60,42% para o grupo de amostras de leite fraudado na etapa de treinamento. Com os dados do treinamento foi gerada a função linear discriminante (Tabela 6).

Tabela 6: Função linear discriminante para leite puro (A) e leite fraudado com Tilosina (B).

Variável	A	B
Constante	-0,088	-0,001
1	-0,326	0,033
5	-0,120	0,012
6	0,153	-0,015
7	-1,029	0,104
8	0,178	-0,018
9	1,407	-0,141
10	-0,622	0,063
14	-0,605	0,061
15	1,596	-0,161
16	-0,836	0,084
17	-0,555	0,056
18	-0,872	0,088
19	0,774	-0,078
20	0,699	-0,070

As variáveis C7, C9 e C15 apresentaram maior influência na geração das regras de discriminação, que foram usadas para a discriminação das amostras do conjunto de validação. Nesse estudo também foi observado baixa taxa de acerto. Na etapa de validação a taxa de acerto foi 33,33% para amostras de leite puro e 52,46% para amostras de leite fraudado.

A discriminação dos grupos de amostras de leite liofilizado puro e fraudado com Tilosina não foi satisfatória em nenhum dos estudos apresentados. Como discutido anteriormente, os espectros das amostras de leite liofilizado não apresentaram um padrão de comportamento em função da concentração de antibiótico presente, o que pode justificar a não separação das amostras de acordo com o nível de Tilosina.

### 3.2.3. Análise de Regressão Linear Múltipla

As amostras de leite liofilizado, puras e dopadas com Tilosina (0 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), foram separadas em dois conjuntos de dados (treinamento e validação) usando o algoritmo de Kenstone. Foi então aplicada a análise de Regressão Linear Múltipla, em busca de modelo matemático de combinação linear capaz de prever a concentração de Tilosina em amostras de leite liofilizado com base nos dados espectrais. Foram testados os métodos Backward, Forward e Stepwise para estimar os parâmetros de cada modelo (Tabela 7) e avaliar qual o mais adequado.

Tabela 7: Parâmetros dos modelos de RLM.

Método	R <sup>2</sup>	R	RMSE
Forward	0,0002	0,0141	33,204
Backward	0,0002	0,0141	32,714
Stepwise	0,0010	0,0316	32,415

RMSE - *Root Mean Square Error*, raiz do erro médio quadrático.

Comparando os métodos aplicados verificou-se que o método Stepwise é o que melhor prediz a concentração de antibiótico nas amostras, pois apresentou maior R e R<sup>2</sup> e menor RMSE, indicando que há um melhor ajuste do modelo e uma maior correlação entre os valores reais e os preditos pelo modelo. O gráfico na Figura 8 apresenta a correlação das concentrações preditas com as concentrações reais utilizando o método Stepwise.

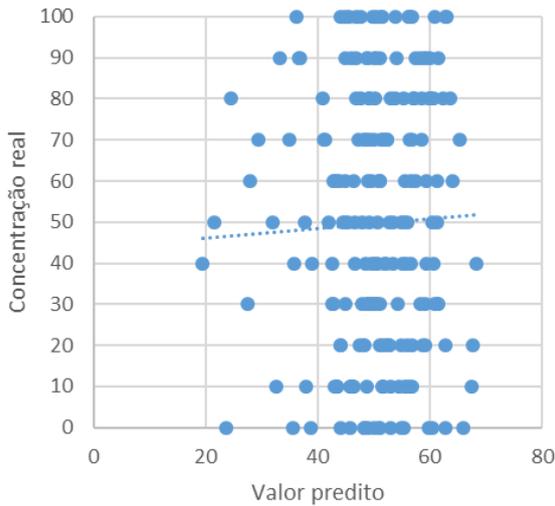


Figura 8: Gráfico de correlação de valores observados e preditos para modelo Stepwise.

Para todos os modelos foi verificado uma baixa correlação, portanto não há uma relação linear entre a concentração de antibiótico adicionado ao leite e a intensidade das bandas de absorção, comportamento este que já havia sido observado com a sobreposição dos espectros das amostras de leite liofilizado, puras e fraudadas com Tilosina.

### 3.2.5. Análise de Regressão por Mínimos Quadrados

Inicialmente os dados foram divididos em dois conjuntos, um de treinamento (70%) e outro de validação (30%), utilizando o algoritmo de Kenstone. Foi então aplicada a análise de Regressão por Mínimos Quadrados, em busca de modelo matemático capaz de prever a concentração de Tilosina em amostras de leite liofilizado com base nos dados espectrais. O número de variáveis latentes que devem fazer parte do modelo foi determinado por validação cruzada.

Foi aplicada a análise PLS para amostras de leite liofilizado, puras e fraudadas com Tilosina de 10-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Analisando o conjunto de treinamento verificou-se que 15 fatores foram extraídos. Os fatores foram selecionados para o ajuste adequado do modelo com base nas suas respectivas significâncias. Para tanto, foi avaliada a variação percentual explicada pelos fatores. Apenas 4 fatores apresentaram  $p > 0,1$  e foram selecionados para fazer parte do modelo. Esses 4 fatores explicam 98,40% da variação do preditor, entretanto, estes fatores explicam apenas 3,25% da variação da resposta.

No gráfico de carga de correlação (Figura 9) pode-se observar que as amostras estão dispostas no centro do gráfico, indicando que não apresentaram grande correlação com os

fatores. As variáveis relacionadas ao espectro são relacionadas positivamente com o fator 1, enquanto em relação ao fator 2, a maioria está relacionada negativamente.

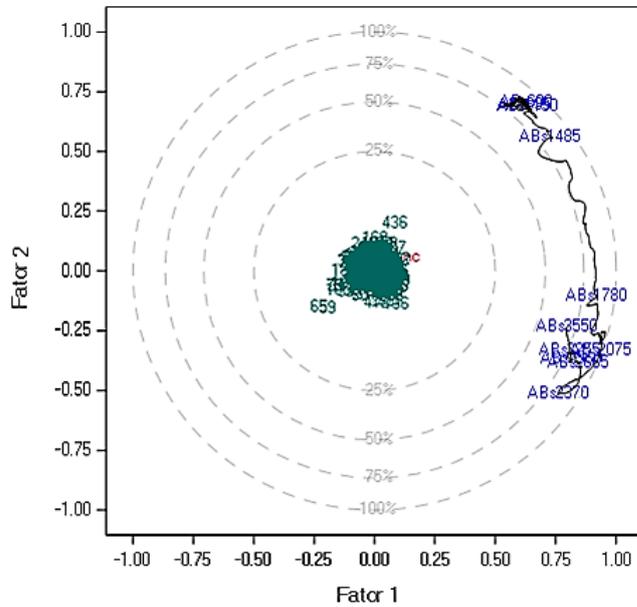


Figura 9: Gráfico de carga de correlação.

Na Figura 10 é apresentado o gráfico de correlação entre os valores preditos e as concentrações observadas. O modelo apresentou  $R^2 = 5 \times 10^{-5}$  e  $R = 0,007$ , indicando uma baixa correlação entre as concentrações e os dados espectrais e entre os valores observados e preditos.

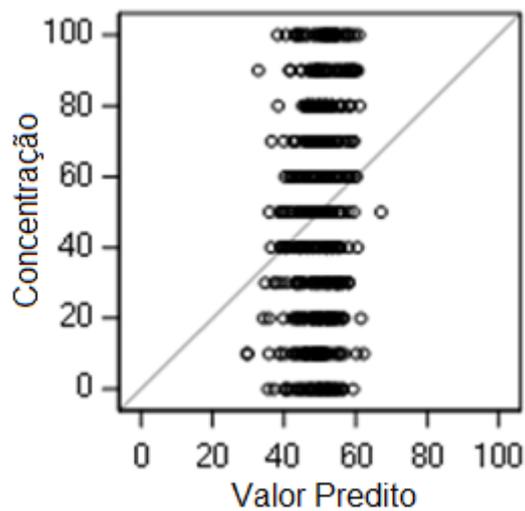


Figura 10: Gráfico de correlação de valores observados e preditos.

Foram testadas várias faixas espectrais a fim de identificar a faixa de maior sensibilidade, em que características espectrais da Tilosina são expressas, bem como obter um modelo com melhor capacidade de predição da concentração de Tilosina no leite liofilizado. Os parâmetros de cada modelo (Tabela 8) foram comparados para avaliar qual o mais adequado.

Tabela 8: Faixas espectrais testadas e os respectivos parâmetros obtidos.

Tentativa de calibração	Faixa espectral (cm <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	R	RMSE
1	650 a 3550	5x10 <sup>-5</sup>	0,007	32,920
2	650 a 1700	7,3x10 <sup>-4</sup>	0,027	32,820
3	1000 a 1600	0,0009	0,030	32,620
4	2500 a 3520	0,0025	0,050	31,760
5	3000 a 3400	0,0025	0,050	31,748
6	2150 a 2850 e 3100 a 3650	0,0032	0,057	31,736

Em nenhuma das faixas testadas foi verificada a correlação entre as variáveis preditas e as reais, nem tão pouco foi alcançada uma boa predição. Os resultados desta análise corroboram com os resultados das demais análises quimiométricas empregadas, tendo sido verificado que não há uma relação linear entre a concentração de Tilosina adicionado ao leite e a intensidade das bandas de absorção.

#### 4. Conclusões

Os métodos de classificação Análise de Componentes Principais e Análise Discriminante não foram eficientes na separação das amostras de leite em função da concentração de Tilosina. Os métodos de calibração multivariada RLM e PLS forneceram modelos de baixa correlação, inadequados para a predição das concentrações de Tilosina em leite liofilizado.

#### 5. Referências bibliográficas

BOTELHO, B. G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L. S.; SENA, M. M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of Five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLSDA. **Food Chemistry**, v. 181, p. 31-37, 2015.

- CASSOLI, L. D.; SARTORI, B.; ZAMPAR, A.; MACHADO, P. F. An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 480-485, 2011.
- CEBI, C.; YILMAZ, M. T.; SAGDIC, O. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. **Food Chemistry**, v. 229, p. 517-526, 2017.
- DOMINGO, E.; TIRELLI, A. A.; NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C.; PINTO, S. M. Melamine detection in milk using vibrational spectroscopy and chemometrics analyses: A review. **Food Research International**, v. 60, p. 131-139, 2014.
- DUARTE, M. L.; FERREIRA, M. C.; MARVÃO, M. R.; ROCHA, J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 1-8, 2002.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Gateway to dairy production and products**. Disponível em: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/>. Acessado em: 23/03/2019.
- GRELET, C.; FERNÁNDES PIERNA, J. A.; DARDENNE, P.; BAETEN, V.; DEHARENG, F. Standardization of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1-11, 2015.
- LEI, Y.; ZHOU, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; SUN, S.; NODA, I. 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.
- LEITE, A. I. N.; PEREIRA, C. G.; ANDRADE, J.; VICENTINI, N. M.; BELL, M. J. V.; ANJOS, V. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. **LWT Food Science and Technology**, v. 109, p. 63-69, 2019.
- PAESEN, J.; CYPERS, W.; BUSSON, R.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Isolation of decomposition products of tylosin using liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 699, p. 99-106, 1995.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. 4th Edn. Philadelphia: Brooks Cole, 2009.

POONIA, A.; JHA, A.; SHARMA, R.; SINGH, H. B.; RAI, A. K.; SHARMA, N. Detection of adulteration in milk: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 23-42, 2017.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 467-483, 2011.

ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. **Food Research International**, v. 43, p. 886-892, 2010.

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**, v. 138, p. 19-24, 2013.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 2004.

YIN, Y.; GUO, X.; PENG, DAN. Iron and manganese oxides modified maize straw to remove tylosin from aqueous solutions. **Chemosphere**, n. 205, p. 156-165, 2018.