



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

Área de Concentração: Ciência de Alimentos

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CEFTIOFUR EM LEITE LIOFILIZADO
UTILIZANDO ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODOS
MULTIVARIADOS: ESTUDO *IN VIVO*

Autor: Zenilda de Jesus Mota

Orientador: Prof. DSc. Sérgio Augusto de
Albuquerque Fernandes

Co-orientador (a): Dra. Rosângela S. Barbosa

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL
FEVEREIRO DE 2026

ZENILDA DE JESUS MOTA

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CEFTIOFUR EM LEITE LIOFILIZADO
UTILIZANDO ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODOS
MULTIVARIADOS: ESTUDO *IN VIVO***

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

Orientador: Prof. DSc. Sérgio Augusto de
Albuquerque Fernandes

Co-orientador (a): Dra. Rosângela S. Barbosa

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL
FEVEREIRO DE 2026

637.127
M871d

Mota, Zenilda de Jesus.

Detecção e quantificação de ceftiofur em leite liofilizado utilizando espectrometria no infravermelho e métodos multivariados: estudo *in vivo*. / Zenilda de Jesus Mota. – Itapetinga-BA: UESB, 2026.
70f.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Área de Concentração: Ciência de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes e coorientação da D. Sc. Rosângela S. Barbosa.

1. Leite – Análise – Resíduo de antibiótico. 2. Leite - Adulteração – Espectroscopia no infravermelho. 3. Leite em pó – Análises multivariados. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque. III. Barbosa, Rosângela S. IV. Título.

CDD (21): 637.127

Catálogo na Fonte:

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

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Leite – Controle de qualidade

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CEFTIOFUR EM LEITE LIOFILIZADO UTILIZANDO ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODOS MULTIVARIADOS: ESTUDO IN VIVO”

Autor (a): ZENILDA DE JESUS MOTA

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

Aprovada 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.

Documento assinado digitalmente
 **WELLINGTON DA SILVA LYRA**
Data: 26/03/2026 06:43:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wellington da Silva Lyra
(UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **CRISTIANE PATRICIA DE OLIVEIRA**
Data: 25/03/2026 23:54:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Cristiane Patrícia de Oliveira
(UESB)

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO AUGUSTO DE ALBUQUERQUE FERNANDES**
Data: 12/03/2026 11:53:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Itapetinga-BA, 04 de março de 2026.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu filho Luís Filipe, meu maior motivo. Te amo!

Ao meu pai, Aloísio, por ser fundamental na construção de quem sou hoje.

À minha mãe, Deni, por fazer parte da minha trajetória.

Aos meus irmãos, amigos e a toda a minha família, pelo carinho, apoio e incentivo.

Aos amigos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Fernandes, pela orientação, apoio e contribuições.

À equipe do NEAL.

Aos colegas e amigos.

A todos os professores do PPGEAL, pela dedicação, competência e conhecimento compartilhado.

Aos integrantes da banca examinadora pelas contribuições e orientações.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, me apoiaram ao longo dessa jornada.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	5
LISTA DE TABELAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
I – REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Panorama da produção leiteira	16
2.2 O leite: Composição Química	16
2.3 Leite em Pó: aspectos gerais	17
2.4 Parâmetros de Qualidade do leite.....	18
2.5 Controle de qualidade do leite em pó.....	19
2.6 Resíduo de antimicrobianos no leite	20
2.7 Metabolismo e farmacocinética do ceftiofur em vacas leiteiras	22
2.7.1 Metabolismo e Biotransformação.....	23
2.8 Técnicas analíticas para a quantificação de antibióticos em leite	25
2.9 Espectroscopia.....	26
2.9.1 Espectroscopia por Infravermelho Próximo NIR	27
2.9.2 Espectroscopia por infravermelho Médio -MIR.....	28
3. Quimiometria	29
3.1 A Análise de Componentes Principais (PCA).....	31
3.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	32
3.3 Pré-processamentos	33
3.4 Espectroscopia no Infravermelho Associada à Quimiometria	33
3.5 A inovação tecnológica	34
II. OBJETIVOS.....	36
3. OBJETIVO GERAL	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Protocolo da CEUA.....	38
4.2 Amostras.....	38

4.3 Delineamento experimental.....	38
4.4 Liofilização das amostras	38
4.5 Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC-MS/MS)	38
4.6 Análise espectral leite por FTIR em leite liofilizado	39
4.6.1. Espectroscopia no infravermelho próximo – NIR.....	39
4.6.2 Espectroscopia no infravermelho médio - MIR	39
4.7 Análises Quimiométricas	40
4.7.1 Aquisição dos Dados	40
4.7.2 Pré-processamento	40
4.7.3 Análise de Componentes Principais (PCA).....	40
4.7.4 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC-MS/MS)	42
5.2 Espectroscopia no Infravermelho Médio (FT–MIR)	44
5.3 Espectro MIR do ceftiofur.....	44
5.4 Análise de Componentes Principais (PCA)	47
5.5 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	50
5.6 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (FT-NIR)	53
5.7 Espectro Ceftiofur NIR	53
5.8 Espectros Médios NIR	54
5.9 Diferenças espectrais entre o leite controle (0 h), 12–84 h e 96–180 h – NIR	55
5.10 Análise de Componentes Principais (PCA) – NIR.....	55
5.11 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) – NIR.....	57
CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE ABREVIACÕES

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATR – Reflectância Total Atenuada (Attenuated Total Reflectance)

CCS – Contagem de Células Somáticas

CF – Ceftiofur

CPP – Contagem Padrão em Placas

DFC – Desfuroilceftiofur

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points

HPLC - LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

LMR – Limite Máximo de Resíduo

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIR – Infravermelho Médio (Mid-Infrared) **MSC** – Correção de Espalhamento Multiplicativo (Multiplicative Scatter Correction)

NIR – Infravermelho Próximo (Near-Infrared)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis)

PC – Componente Principal

PLS – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Squares)

PLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

RAM – Resistência Antimicrobiana

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SGD – Derivada de Savitzky–Golay

SIMCA – Soft Independent Modeling of Class Analogy

SNV – Standard Normal Variate

WHO – World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos do leite cru refrigerado

Tabela 2: Regiões espectrais associadas às principais componentes principais (PC1 e PC2) obtidas por PCA no espectro MIR de leite.

Tabela 3. Sensibilidade e especificidade (%) do modelo PLS-DA aplicado aos espectros MIR, com acurácia global 49,2%

Tabela 4: Regiões espectrais associadas às principais componentes principais (PC1 e PC2) obtidas por PCA no espectro NIR.

Tabela 5. Sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA aplicado aos espectros NIR com acurácia global 51,8%

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais causas de mortes por doenças (A) e a projeção de mortes por resistência aos antibióticos no mundo, até 2050 (B).

Figura 2. Estrutura química do ceftiofur, destacando os principais grupos funcionais responsáveis por sua atividade antimicrobiana e metabolismo.

Figura 3. Conversão metabólica do ceftiofur em desfuroilceftiofur por hidrólise da ligação tioéster.

Figura 4: Absorção seletiva de ondas eletromagnéticas por arranjos atômicos, na qual apenas frequências específicas excitam vibrações características, originando o espectro infravermelho.

Figura 5. Interdisciplinaridade da Quimiometria

Figura 6. Fluxograma do controle de qualidade do leite e a proposta de inovação tecnológica

Figura 7. Resumo gráfico do delineamento experimental e da estratégia analítica adotada no estudo.

Figura 8. Cinética da concentração do antibiótico em leite ao longo do tempo experimental, determinada por cromatografia.

Figura 9. Espectro no infravermelho médio com transformada de Fourier do leite de vacas Jersey (grupo controle, 0h).

Figura 10. Estrutura química do ceftiofur e espectro FTIR de seu padrão na região do infravermelho de 650–4000 cm^{-1} .

Figura 11. Espectros FT-MIR de amostras de leite liofilizado de vacas Jersey em diferentes grupos experimentais.

Figura 12. Espectros FT-MIR médios das amostras de leite liofilizado de vacas Jersey dos grupos controle (0 h) tratamento (12–84 h) e pós-tratamento (96–180 h).

Figura 13. Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada aos espectros MIR das amostras dos grupos controle (0 h), tratamento (12–84 h) e pós-tratamento (96–180 h).

Figura 14. Gráficos de loadings da PC1 e da PC2 dos espectros FT-MIR das amostras de leite.

Figura 15. Análise Discriminante por Mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

Figura 16. Matriz confusão MIR **Figura 17.** Espectrograma no infravermelho próximo (NIR) do leite de vacas Jersey liofilizado.

Figura 18. Espectro do ceftiofur na região do infravermelho próximo (1100–2500 nm). **Figura**

19. Espectros no infravermelho próximo (NIR) do leite de vacas Jersey liofilizado por tempo.

Figura 20. Diferenças espectrais entre o leite controle (0 h), 12–84 h e 96–180 h – Espectroscopia NIR

Figura 21. Análise de Componentes Principais (PCA) – NIR

Figura 22. Gráficos de loadings da PC1 e da PC2 obtidos a partir dos espectros NIR.

Figura 23. Gráfico de escores do modelo PLS-DA aplicado aos espectros NIR

Figura 24. Matriz de confusão obtida para o modelo PLS-DA aplicado aos espectros NIR

RESUMO

A intensificação do uso de antibióticos na pecuária leiteira tem ampliado os riscos à segurança alimentar, especialmente em produtos processados. Um desses compostos é o ceftiofur, antibiótico administrado ao gado, que gera preocupações para a saúde humana quando seus resíduos permanecem no leite e em derivados. O limite máximo de resíduos (LMR) para ceftiofur, expresso como seu metabólito marcador desfuroilceftiofur, é de 100 µg/L no leite, conforme normas do Codex Alimentarius, União Europeia e legislação brasileira. Nesse contexto, a espectroscopia FT-MIR (4000–400 cm⁻¹) e FT-NIR (1100–2500 nm), combinada a métodos quimiométricos, foi aplicada neste estudo para detectar resíduos de ceftiofur em leite liofilizado. As regiões de número de onda NIR, foram selecionadas com base na máxima variabilidade na intensidade dos picos. Foram utilizadas amostras de leite provenientes de 12 vacas Jersey submetidas a tratamento intramuscular com ceftiofur cloridrato (1 mg/kg, por três dias consecutivos), com coletas seriadas realizadas a cada 12 horas entre 0 e 180 horas pós-administração. Uma fração das amostras líquidas foi direcionada à quantificação de ceftiofur e equivalentes de ceftiofur livre por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS), enquanto a porção remanescente foi submetida à liofilização e posterior análise espectroscópica. Os dados foram tratados em linguagem Python, utilizando pré-processamento SNV + primeira derivada. O modelo PLS-DA para discriminação de grupos de amostras de leite em estudo in vivo foi construído com 5 variáveis latentes. Para a região espectral do MIR, a PCA mostrou que PC1 e PC2 explicaram 14,75% e 9,13% da variância, respectivamente. O modelo PLS-DA apresentou acurácia global de 49,2%, sensibilidade de 40,6%, especificidade de 69,4% e precisão de 43,0%. Já para o NIR, a PCA indicou que PC1 explicou 62,27% e PC2 20,97%, totalizando 83,24% de variância explicada. O PLS-DA para o NIR obteve acurácia de 51,8%, sensibilidade de 37,2%, especificidade de 69,9% e precisão de 34,0%. O modelo baseado em NIR apresentou acurácia ligeiramente superior ao MIR, porém ambos os desempenhos ficaram abaixo do desejável para discriminação das amostras. Os resultados mostram que a espectroscopia FT-MIR e FT-NIR associada à quimiometria apresenta capacidade limitada para discriminar resíduos de ceftiofur em leite liofilizado, devido à dominância da matriz láctea e à baixa concentração do contaminante. A técnica pode atuar como ferramenta complementar de triagem, mas não substitui métodos cromatográficos confirmatórios.

Palavras-chave: ceftiofur; leite liofilizado; FTIR; quimiometria; resíduos de antibióticos; LC-MS/MS.

ABSTRACT

The intensification of antibiotic use in dairy farming has increased concerns regarding food safety, particularly in processed products. Among these compounds, ceftiofur, a veterinary antibiotic, poses potential risks to human health when residues persist in milk and its derivatives. The maximum residue limit (MRL) for ceftiofur, expressed as its marker metabolite desfuroylceftiofur, is set at 100 µg/L in milk according to Codex Alimentarius, European Union, and Brazilian regulations. In this context, Fourier Transform Mid-Infrared (FT-MIR, 4000–400 cm⁻¹) and Near-Infrared (FT-NIR, 1100–2500 nm) spectroscopy, combined with chemometric methods, were applied in this study to detect ceftiofur residues in lyophilized milk. NIR spectral regions were selected based on maximum peak intensity variability. Milk samples were obtained from 12 Jersey cows subjected to intramuscular treatment with ceftiofur hydrochloride (1 mg/kg for three consecutive days), with serial collections performed every 12 hours from 0 to 180 hours post-administration. A portion of the liquid samples was analyzed for ceftiofur and free ceftiofur equivalents using high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), while the remaining portion was lyophilized and subjected to spectroscopic analysis. Data processing was performed in Python using standard normal variate (SNV) followed by first derivative preprocessing. A PLS-DA model with five latent variables was developed for sample group discrimination in the *in vivo* study. For the MIR spectral region, principal component analysis (PCA) indicated that PC1 and PC2 explained 14.75% and 9.13% of the variance, respectively. The PLS-DA model achieved an overall accuracy of 49.2%, sensitivity of 40.6%, specificity of 69.4%, and precision of 43.0%. For the NIR region, PCA showed that PC1 and PC2 explained 62.27% and 20.97% of the variance, respectively, totaling 83.24%. The NIR-based PLS-DA model achieved an accuracy of 51.8%, sensitivity of 37.2%, specificity of 69.9%, and precision of 34.0%. Although the NIR model presented slightly higher accuracy than MIR, both approaches demonstrated suboptimal performance for reliable discrimination. These findings indicate that FT-MIR and FT-NIR spectroscopy associated with chemometrics have limited capability to discriminate ceftiofur residues in lyophilized milk, likely due to the dominance of the milk matrix and the low concentration of the contaminant. Therefore, while these techniques may serve as complementary screening tools, they do not replace confirmatory chromatographic methods.

Keywords: Ceftiofur; lyophilized milk; FTIR; chemometrics; antibiotic residues; LC-MS/MS.

I – REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados ocupam posição central na alimentação humana e na economia global, especialmente em países em desenvolvimento, onde representam importante fonte de nutrientes essenciais e renda para milhões de famílias. Do ponto de vista nutricional, o leite fornece proteínas de alto valor biológico, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais fundamentais para o crescimento, manutenção e saúde do organismo humano. Além disso, a cadeia produtiva do leite exerce estratégia na segurança alimentar, geração de empregos e desenvolvimento regional (FOX et al., 2008; FAO, 2025; OECD, 2025).

Entre os derivados lácteos, o leite em pó destaca-se pela elevada estabilidade físico-química, facilidade de armazenamento e ampla participação no comércio internacional. Estima-se que metade da produção mundial de leite em pó é destinada à exportação, tornando esse produto a exigências regulatórias, padrões de qualidade e barreiras sanitárias impostas por diferentes mercados consumidores. Nesse contexto, a qualidade da matéria-prima e o controle rigoroso de contaminantes químicos, especialmente resíduos de antimicrobianos, tornam-se fatores determinantes para a competitividade e segurança do setor lácteo (OECD, 2025; FAO, 2025).

O uso de antibióticos na bovinocultura leiteira é importante para o tratamento de enfermidades, especialmente a mastite, uma das doenças de maior impacto econômico na produção de leite. Entretanto, a utilização inadequada desses fármacos, seja pelo descumprimento dos períodos de carência ou pelo uso indiscriminado, pode resultar na presença de resíduos no leite e em produtos derivados, como o leite em pó. A ingestão de resíduos antimicrobianos está associada a riscos à saúde pública, incluindo reações alérgicas, alterações da microbiota intestinal e, sobretudo, a seleção e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos, reconhecida como uma das principais ameaças globais à saúde humana e animal (FAO, 2011; WHO, 2011; GHIMPETEANU et al., 2022; WHO, 2023).

O monitoramento de resíduos de antimicrobianos em leite é realizado por métodos analíticos de alta sensibilidade, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), considerados padrões de referência. Apesar da elevada precisão, essas técnicas apresentam limitações relacionadas ao custo, tempo analítico, necessidade de infraestrutura especializada e baixa aplicabilidade em sistemas de monitoramento em larga escala ou em tempo real. Nesse cenário, cresce o interesse por métodos alternativos que aliem

rapidez, baixo custo operacional e caráter não destrutivo, especialmente para aplicações de triagem e controle de qualidade (SACHI et al., 2019; CHEN, 2020).

A espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR), associada a ferramentas quimiométricas multivariadas, tem se mostrado promissora para a avaliação da qualidade de alimentos e para a detecção indireta de alterações na matriz láctea associadas à presença de contaminantes. No entanto, ainda há poucos estudos aplicando essas técnicas ao leite liofilizado em condições *in vivo* com ceftiofur, especialmente considerando a baixa concentração do resíduo e a complexidade da matriz. Embora essas técnicas não permitam a detecção direta de resíduos de antibióticos em níveis traço, estudos demonstram que variações sutis no perfil espectral global do leite podem ser exploradas por métodos quimiométricos para discriminar amostras contaminadas e não contaminadas, quando devidamente calibradas e interpretadas em conjunto com métodos de referência.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da espectroscopia FT-MIR e FT-NIR, associada à quimiometria, para discriminar amostras de leite liofilizado contaminadas com resíduos de ceftiofur em um modelo *in vivo*, utilizando cromatografia LC-MS/MS como método de referência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da produção leiteira

O leite é um alimento de elevado valor nutricional e estratégica importância econômica, constituindo-se como fonte essencial de proteínas, lipídios, carboidratos e minerais para a dieta humana (FAO, 2025). Globalmente, mais de 6 bilhões de pessoas consomem leite e seus derivados. A maioria vive em países em desenvolvimento. O aumento da produção de leite está diretamente relacionado à elevação da demanda por nutrientes de alta qualidade nos países em desenvolvimento. Entre 1992 e 2022, a produção mundial de leite cresceu mais de 77%, passando de 524 milhões para 930 milhões de toneladas, e as projeções indicam crescimento contínuo até 2030 (FAO, 2025). O Brasil ocupa a quinta posição entre os maiores produtores mundiais, com produção anual superior a 38 milhões de toneladas em 2023, atrás apenas da Índia, Estados Unidos, Paquistão e China (REPORTLINKER, 2025).

A cadeia produtiva do leite está presente em 98% dos municípios brasileiros, sendo predominantemente realizada em pequenas e médias propriedades, e gerando ocupação para cerca de 4 milhões de pessoas. O país possui mais de 1 milhão de propriedades dedicadas à produção leiteira, e, segundo projeções da Secretaria de Política Agrícola, espera-se que, até 2030, permaneçam em atividade os produtores mais eficientes, capazes de se adequar à nova realidade por meio da adoção de tecnologias, melhorias na gestão e aumento da eficiência técnica e econômica (BRASIL, 2023).

2.2 O leite: Composição Química

O leite é uma matriz química complexa oriunda da secreção característica dos mamíferos. Trata-se de uma emulsão de glóbulos de gordura e uma suspensão coloidal de micelas de caseína, compostas por caseína, cálcio e fósforo, em fase aquosa que contém lactose, proteínas do soro e minerais (FOX et al., 2008)

A qualidade do leite cru é fundamental para o consumo direto e para a produção de derivados lácteos, sendo uma das principais matérias-primas da indústria de laticínios (SALEEM, 2025). O leite bovino contém cerca de 29–34 g/L de proteína digestível de alta qualidade, e 0,5 L pode suprir 30–40% das necessidades proteicas diárias de um adulto. É fonte de todos os aminoácidos essenciais, com a parte proteica composta por aproximadamente 80% de caseínas e 20% de proteínas do soro, proporção influenciada por raça e contagem de células somáticas (FITZPATRICK et al., 2024). Apresenta pH variando entre 6,6 e 6,8, densidade de

1,028 a 1,033 g/mL, ponto de congelamento em torno de $-0,55^{\circ}\text{C}$ e viscosidade média de 2,0 a 2,2 cP a 20°C . Essas propriedades físico-químicas são amplamente utilizadas como indicadores de pureza, autenticidade e estabilidade. Alterações nesses parâmetros podem sinalizar adulteração, como a adição de água ou a remoção de gordura (GOYAL, 2024).

A tabela abaixo apresenta os parâmetros de composição do leite cru refrigerado estabelecidos pela Instrução Normativa nº 76, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que define o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do produto (BRASIL, 2018).

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos do leite cru refrigerado

Parâmetro	Limite estabelecido (IN 76)
Gordura	3,0 g/100g
Proteína Total	2,9 g/100g
Lactose Anidra	4,3 g/100g
Sólidos não gordurosos	8,4 g/100g
Sólidos Totais	11,4 g/100g
Densidade Relativa a 15°C	1,028 e 1,034 g/cm ³
Índice Crioscópico	$-0,530^{\circ}\text{H}$ e $-0,555^{\circ}\text{H}$

Fonte: Adaptado de Brasil (2018).

Segundo Marinoni (2012), modificações no pH e na temperatura alteram a organização das micelas de caseína, enquanto a variabilidade no tamanho dos glóbulos de gordura influencia o espalhamento da luz no NIR, impactando a absorbância e a linearidade espectral. Esse comportamento demonstra a relevância das técnicas espectroscópicas, como NIR e FTIR, na avaliação de mudanças estruturais e composicionais do leite.

2.3 Leite em Pó: aspectos gerais

O leite em pó é um dos principais derivados da indústria láctea, caracterizando-se pela elevada estabilidade físico-química e pela possibilidade de armazenamento prolongado em condições ambientais. Globalmente, cerca de 50% da produção mundial de leite em pó é destinada ao comércio internacional, o que demonstra sua relevância para a segurança alimentar e para a economia global (OECD, 2025; FAO, 2025). Entre os grandes exportadores, União Europeia, Estados Unidos e Nova Zelândia concentram aproximadamente 69% das exportações de leite em pó integral e 78% das exportações de leite em pó desnatado (OECD, 2025; FAO, 2025). As projeções do USDA confirmam a liderança da Nova Zelândia, com 1,4 milhões de toneladas de leite em pó integral previstas para 2025, seguida pela União Europeia com 190 mil toneladas (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2025).

O Brasil ocupa a quinta posição na produção de leite, com mais de 34 bilhões de litros anuais, distribuídos em 98% dos municípios (MAPA, 2024). No entanto, a participação do leite em pó na indústria nacional é menor em comparação aos grandes exportadores, representando cerca de 20% do leite processado. O consumo doméstico apresenta crescimento entre 2002–2003 e 2017–2018, com aumento de 34% no consumo domiciliar de leite em pó integral, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do IBGE (SIQUEIRA 2021).

Apesar da produção de leite, o Brasil depende de importações de leite em pó. Em 2023, foram importadas 135 mil toneladas de leite em pó integral, volume 60% superior ao de 2022, com predominância da Argentina e Uruguai, que responderam por 91,6% das importações entre janeiro e setembro de 2023 (USDA, 2023).

O leite em pó é um derivado estratégico por três aspectos principais: (i) sua forte participação no comércio internacional e no valor agregado da cadeia de laticínios; (ii) sua estabilidade tecnológica, que permite grande aplicabilidade industrial; e (iii) a demanda sanitária por monitoramento de resíduos de antibióticos, com impacto direto na saúde pública e na competitividade do setor. Dessa forma, o leite em pó se estabelece como produto de importância global, cuja regulação, produção e monitoramento envolvem tanto políticas nacionais elaboradas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) a; Ministério da Saúde (MS), quanto organismos internacionais (FAO, CODEX, USDA, UNIÃO EUROPEIA, OECD e FAO).

2.4 Parâmetros de Qualidade do leite

A qualidade do leite é influenciada por fatores intrínsecos, como genética, estágio de lactação e sanidade animal, e extrínsecos, como manejo, alimentação, clima e higiene. Entre

os fatores intrínsecos, a mastite, inflamação da glândula mamária, reduz a produção e altera a composição do leite, provocando aumento do pH, elevando a atividade de enzimas endógenas, como a plasmina, degradação de micelas de caseína e facilitando a contaminação por microrganismos patogênicos. Além disso, eleva a contagem de células somáticas e bactérias, o que gera impacto diretamente na qualidade e segurança do produto (GUERREIRO et al., 2005; SCHADT, 2023).

No Brasil, a qualidade do leite é regulamentada pelas Instruções Normativas n.º 76 e 77, de 26 de novembro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A IN 76 estabelece os critérios de identidade e qualidade do leite cru refrigerado, do leite pasteurizado e do leite tipo A, com composição mínima (3,0% de gordura; 2,9% de proteína), além da obrigatoriedade de ausência de resíduos de antibióticos. Já a IN 77 fixa limites microbiológicos: contagem padrão em placas (CPP < 300.000 UFC/mL) e contagem de células somáticas (CCS < 500.000 células/mL).

O uso indiscriminado de antimicrobianos, como no tratamento da mastite, representa risco à saúde pública, pois resíduos no leite podem causar reações alérgicas, selecionar microrganismos resistentes e comprometer processos tecnológicos (FAO, 2025; WHO, 2023). O Codex Alimentarius, coordenado pela FAO/OMS, estabelece Limites Máximos de Resíduos (MRLs) para fármacos veterinários em leite e derivados, incluindo 4 µg/L para ampicilina e amoxicilina, 100 µg/L para tetraciclina e oxitetraciclina e 100 µg/L para cefiofur. A União Europeia, por meio do Regulation (EC) N° 470/2009 e do Commission Regulation (EU) N° 37/2010, estabelece padrões equivalentes ou mais restritivos. Esses parâmetros reforçam a necessidade de tecnologias rápidas e econômicas, como a espectroscopia NIR e MIR associada à quimiometria, para monitorar resíduos de forma indireta ou auxiliar na triagem (CHU et al., 2024; WHO, 2011; ALENEZI et al., 2024; CODEX ALIMENTARIUS, 2024; EUROPEAN UNION, 2009; 2010).

2.5 Controle de qualidade do leite em pó

O Código de Práticas de Higiene para o Leite e Produtos Lácteos (CXP 57) recomenda a aplicação de sistemas HACCP e o respeito aos períodos de carência pós-tratamento veterinário, de modo a prevenir a contaminação por resíduos (FAO, 2008). Entretanto, estudos recentes têm identificado amostras de leite em pó e outros derivados com resíduos acima dos MRLs estabelecidos, além de múltiplas contaminações simultâneas, o que configura risco à saúde pública pela indução da resistência antimicrobiana (RAM et al., 2025). Sachi et al. (2019) mostraram que os resíduos são detectados frequentemente em amostras de leite bovino, com

implicação para a segurança alimentar e contribuição para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Aalipour et al. (2025) analisaram amostras de leite comercializado e identificaram que uma proporção relevante delas continha resíduos de antibióticos acima dos limites máximos de resíduos (MRLs) estabelecidos.

No Brasil, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) é responsável pelo monitoramento oficial de resíduos em leite e derivados por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), que estabelece programas de amostragem, substâncias monitoradas e metodologias analíticas validadas, assegurando a conformidade com os Limites Máximos de Resíduos (MRLs) definidos pelo Codex Alimentarius e pelas exigências de mercados importadores (BRASIL, 2023). Portanto, a qualidade da matéria prima, o leite cru, impacta sobre as características do leite em pó desde sua composição até a presença de resíduos e contaminantes.

2.6 Resíduo de antimicrobianos no leite

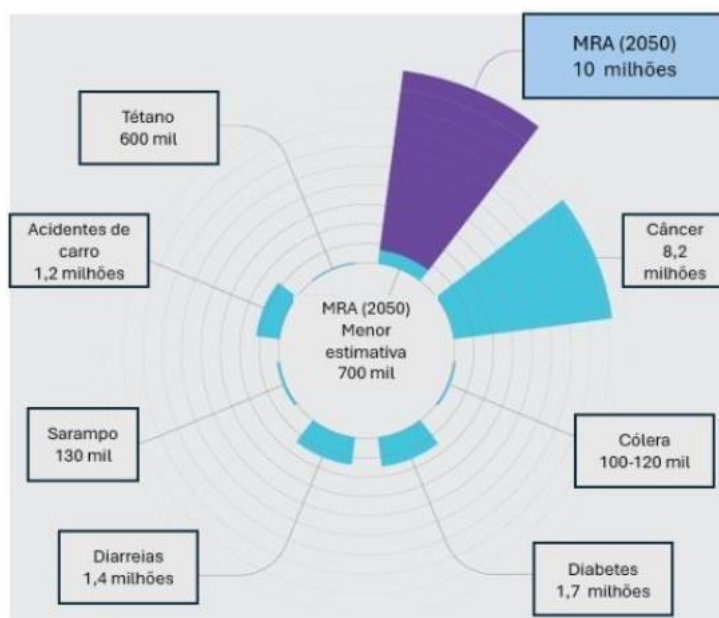
Os antibióticos são produzidos por organismos vivos ou em laboratório e são essenciais para a saúde humana e animal, contudo o uso inadequado na saúde humana animal representa risco crítico para a disseminação de microrganismos resistentes. (ALGAMMAL et al., 2023). A presença de antibióticos no leite se dá por meio do tratamento animal ou por adição fraudulenta de antibióticos diretamente no leite. Os antibióticos são utilizados no manejo de gado leiteiro para o tratamento de doenças e como suplementos alimentares. No entanto, o uso de antibióticos pode resultar na presença de resíduos de medicamentos no leite, especialmente quando não são usados de acordo com as instruções do rótulo (GHIMPETEANU et al., 2022).

A ingestão de resíduos antimicrobianos pode causar reações adversas, como alergias, hipersensibilidade, anemia aplástica, alterações na microbiota intestinal e seleção de bactérias resistentes. Na indústria, resíduos inibem o crescimento de culturas lácteas, comprometem processos fermentativos e geram perdas econômicas (BARBOSA et al, 2011; COSTA et al., 2024; WANG et al, 2024;). Também, a exposição prolongada está ligada ao comprometimento do sistema imunológico, problemas digestivos causados pela destruição da flora intestinal, problemas renais e até efeitos cancerígenos (GHIMPETEANU et al., 2022). Bactérias expostas a baixas doses de antibióticos podem desenvolver resistência aos antibióticos por meio de seleção positiva, mutações espontâneas e alterações de alvo. Genes de resistência antimicrobiana (ARGs) são adquiridos por transferência plasmidial entre bactérias patogênicas. Esses genes são transmitidos aos humanos principalmente pelo consumo de alimentos de

origem animal. A administração de antibióticos em animais seleciona bactérias resistentes, que podem ser amplificadas ao longo da cadeia alimentar (MESFIN et al., 2024).

O uso de antibióticos na produção animal exige monitoramento contínuo para controle de resíduos em alimentos. Abrange diversos setores produtivos, como a suinocultura, a avicultura, a bovinocultura de corte e leite, além da aquicultura (HE et al., 2020). Estudos relatam que o leite se configura como a terceira principal fonte de resíduos de antibióticos na produção animal, ficando atrás apenas das cadeias produtivas de frangos e camarões (ROBLES-JIMENEZ et al., 2022).

Por causa da resistência dos microrganismos aos antibióticos, prevê-se que até 2050, dez milhões de pessoas morram (HUTCHINGS et al., 2019; O'NEILL, 2014), tornando-se com isso, a principal causa de mortes no mundo (Figura 1). O impacto econômico de mais de 100 trilhões de Dólares no mundo. Ainda de acordo com este autor, estas perdas afetarão as populações mais vulneráveis, principalmente na Ásia e África (Figura 1). Ações integradas, internacionalmente, sob o comando da OMS, como novas linhas de pesquisas, desenvolvimento econômico e social, especialmente nos países de menores índices de desenvolvimento, ações educativas de uso adequado de antibióticos na produção animal, dentro outras, são fundamentais na luta com os MRA e seus genes (O'NEILL, 2014).



A

B

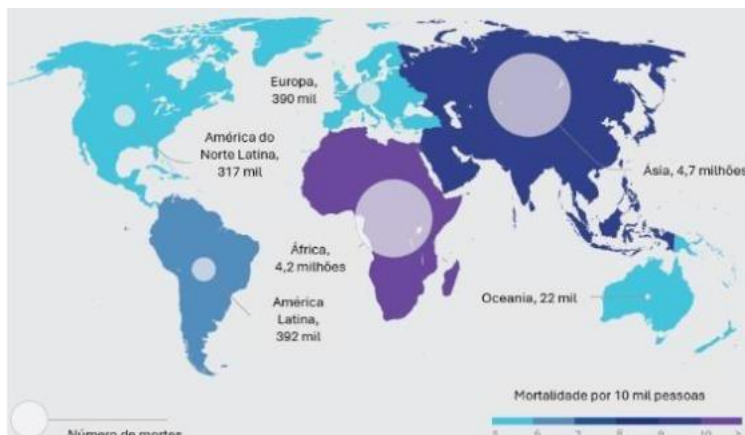


Figura 1. Principais causas de mortes por doenças (A) e a projeção de mortes por resistência aos antibióticos no mundo, até 2050 (B).

Fonte: (O'NEILL, 2014)

Em 2019, estima-se que 5 milhões de mortes humanas foram associadas à resistência bacteriana, das quais 1,3 milhão foram diretamente atribuíveis à resistência antimicrobiana (MURRAY et al, 2022). A Organização das Nações Unidas alerta que a utilização excessiva e indiscriminada de antibióticos na pecuária, aquicultura e agricultura intensifica essa ameaça, sendo que 27 classes diferentes de antimicrobianos são empregadas em animais de produção (FAO, 2025). O monitoramento do uso cresceu nos últimos anos: 118 países reportaram dados quantitativos sobre antimicrobianos entre 2015 e 2017, contra 89 em 2015 (FAO, 2025).

2.7 Metabolismo e farmacocinética do ceftiofur em vacas leiteiras

O ceftiofur (CF) (Figura 2), é uma cefalosporina de terceira geração amplamente utilizada na indústria leiteira para o tratamento de mastite e outras infecções bacterianas, apresentando amplo espectro de ação e elevada eficácia clínica (HORNISH et al, 2002; WANG et al., 2018). Suas características farmacocinéticas são diretamente influenciadas pela estrutura química da molécula, bem como pelo estado fisiológico e sanitário dos animais tratados.

A molécula do ceftiofur apresenta como característica estrutural a presença de uma ligação tioéster na posição 3 do núcleo cefalosporínico, a qual confere instabilidade metabólica controlada.

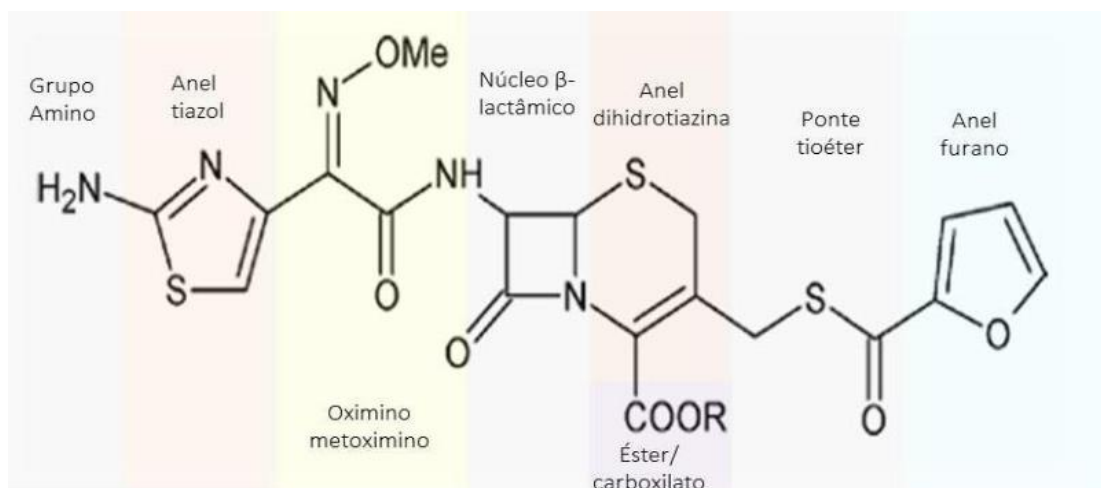


Figura 2. Estrutura química do ceftiofur, destacando os principais grupos funcionais responsáveis por sua atividade antimicrobiana e metabolismo.

Fonte: adaptado de Barbosa et al., 2011

2.7.1 Metabolismo e Biotransformação

Após a administração, a ligação tioéster é rapidamente clivada por hidrólise, dando origem o principal metabólito ativo, o desfuroilceftiofur DFC (Figura 3). O DFC preserva o núcleo β -lactâmico intacto, sendo essa porção responsável pela atividade antimicrobiana da molécula.

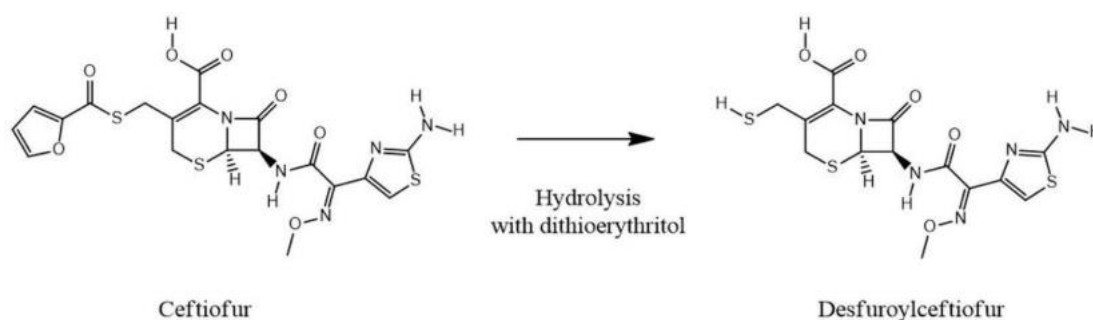


Figura 3. Conversão metabólica do Ceftiofur em Desfuroilceftiofur por hidrólise da ligação tioéster.

Fonte: adaptado de KIM et al. (2011).

O DFC apresenta elevada reatividade com grupos sulfidríla, formando conjugados reversíveis com proteínas plasmáticas, teciduais e aminoácidos, o que resulta na formação de reservatório metabólico capaz de liberar gradualmente o metabólito ativo (OKKER et al., 2002). Esses conjugados explicam a ampla distribuição tecidual do fármaco e a persistência de resíduos biologicamente relevantes em fluidos biológicos, como o leite (WHO, 2011).

Do ponto de vista farmacocinético, após administração subcutânea, o ceftiofur apresenta biodisponibilidade absoluta de 61,12%, atingindo concentração plasmática máxima (C_{max}) de $0,88 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$ em aproximadamente $1,50 \pm 0,55$ horas (T_{max}). Quando administrado por via intramuscular, a biodisponibilidade aumenta para 70,52%, com C_{max} de $1,09 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$ alcançada em $1,20 \pm 0,26$ horas (WANG et al., 2018). Em relação à distribuição, o ceftiofur e seus metabólitos apresentam ampla penetração tecidual, alcançando concentrações terapêuticas em tecidos uterinos, fluido loquial e glândula mamária. Concentrações máximas de $2,23 \pm 0,82 \mu\text{g/g}$ foram observadas no tecido endometrial aproximadamente 4 horas após a administração, enquanto em carúnculas uterinas os níveis máximos atingiram $0,96 \pm 0,45 \mu\text{g/g}$ em cerca de 8 horas. Essa ampla distribuição está diretamente associada à formação de conjugados proteicos do DFC, que prolongam sua presença nos tecidos (OKKER et al., 2002).

O metabolismo do ceftiofur é extensivo e rápido, seguido por eliminação eficiente. A meia-vida de eliminação ($T_{1/2\lambda z}$) após administração subcutânea é de aproximadamente $8,67 \pm 0,72$ horas, com tempo médio de residência (MRT) de $11,00 \pm 0,30$ horas, indicando rápida depuração sistêmica. O fármaco é eliminado predominantemente pelas vias renal e biliar, principalmente sob a forma de metabólitos conjugados (WANG et al., 2018).

A presença de resíduos do ceftiofur no leite é crítico em vacas lactantes. Após administração intramamária, concentrações detectáveis do fármaco e de seus metabólitos podem permanecer no leite por períodos prolongados. Estudos demonstram que os níveis podem permanecer acima do limite de tolerância estabelecido pela FDA ($100 \mu\text{g/L}$) por até 168 horas (7 dias) após a última administração intramamária (SMITH et al., 2004). Em protocolos de administração prolongada, com duração de oito dias, resíduos foram detectados no leite até 108 horas após a última infusão (HAN et al., 2017).

Diversos fatores fisiológicos e patológicos influenciam o metabolismo e a eliminação do ceftiofur. Vacas com menor produção leiteira apresentam eliminação mais lenta de fármacos intramamários quando comparadas a animais de média e alta produção, refletindo valores mais elevados de $t_{>MIC}$ (tempo acima da concentração inibitória mínima) nos quartos mamários de baixa produção (HAN et al., 2017). Além disso, o estado de doença exerce impacto significativo sobre a farmacocinética do fármaco. Animais acometidos por mastite severa apresentam concentrações plasmáticas iniciais mais elevadas, seguidas por declínio mais acentuado entre 40 e 152 horas após a administração, além de meia-vida plasmática reduzida, maior volume de distribuição e maiores taxas de depuração (GORDEN et al., 2016). O estágio de lactação também influencia o metabolismo do ceftiofur. Vacas em final de lactação

apresentam vias metabólicas mais diversificadas e perfil metabolômico distinto, o que pode alterar a biotransformação e a eliminação do fármaco. Diferenças adicionais são observadas entre vacas primíparas e múltíparas, refletindo variações fisiológicas que afetam a resposta ao tratamento antimicrobiano (VASCO et al., 2024).

Estudos experimentais conduzidos em condições controladas têm demonstrado que a presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode persistir mesmo após o cumprimento dos períodos de retirada indicados pelos fabricantes. Em investigação envolvendo diferentes classes de antibióticos utilizados em vacas lactantes, incluindo β -lactâmicos, tetraciclina e quinolonas, foi observada a detecção de resíduos químicos no leite após o tempo de carência recomendado, evidenciando limitações práticas das informações fornecidas em bula (SILVA et al., 2011)

O ceftiofur, antimicrobiano frequentemente comercializado como antibiótico de descarte zero para bovinos leiteiros, apresentou resultados positivos em testes imunológicos de triagem por até aproximadamente 2 a 3 dias após a administração. Embora o ceftiofur seja rapidamente metabolizado, seus metabólitos biologicamente ativos podem permanecer detectáveis no leite por períodos superior ao esperado, configurando um risco potencial à segurança do consumidor. O estudo demonstrou que a simples diluição do leite contaminado com leite isento de resíduos pode mascarar a detecção analítica dos antibióticos. O estudo reforça que a ausência de detecção não implica necessariamente ausência de resíduo, especialmente quando se utilizam métodos de triagem com limites de sensibilidade específicos. Nesse sentido, métodos analíticos complementares mostra-se eficazes capaz de capturar alterações indiretas no leite, uma vez que a presença de resíduos antimicrobianos pode provocar modificações físico-químicas e estruturais detectáveis mesmo quando as concentrações do fármaco estão abaixo dos limites convencionais de detecção direta (SILVA et al., 2011).

2.8 Técnicas analíticas para a quantificação de antibióticos em leite

Resíduos de antibióticos no leite são estudados desde a década de 1960, com crescente atenção nas últimas décadas devido aos riscos à saúde pública e à resistência antimicrobiana. Dados globais revelam que enquanto nos Estados Unidos a não conformidade é inferior a 1%, países como Brasil, Irã e Argentina apresentam prevalências de até 23%, 19% e 15%, respectivamente, indicando falhas nos sistemas de controle e fiscalização (SACHI et al., 2019).

A detecção de resíduos de antibióticos em leite é realizada por métodos analíticos que variam quanto à sensibilidade, especificidade, custo e aplicabilidade. Testes microbiológicos apresentam baixa sensibilidade e tempo de resposta elevado. Métodos imunológicos, como o

ELISA, são mais rápidos e sensíveis, sendo adequados para triagens iniciais. Técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS/MS), oferecem elevada precisão e capacidade de detecção em níveis traço. Para antibióticos β -lactâmicos, destaca-se ainda o uso de polímeros moleculares impressos como etapa de purificação seletiva, associado à LC-MS/MS, porém necessita de maior especificidade analítica. No entanto, testes rápidos têm ganhado destaque pela praticidade, favorecendo o controle de qualidade. (LUIZ et al., 2018; SACHI et al., 2019).

Nesse contexto, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) destaca-se como uma abordagem promissora para a detecção indireta de resíduos de antibióticos em leite, quando associada à análise quimiométrica multivariada (CHU et al., 2024; FREITAS et al., 2021; SANTANA et al., 2025). Essa técnica é amplamente utilizada na verificação da autenticidade de substâncias, incluindo medicamentos, sendo dividida em três sub-regiões espectrais, Infravermelho próximo, médio e distante, conforme sua proximidade do espectro visível (CHEN et al., 2020).

Um estudo conduzido por Luiz et al. (2018) utilizou a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) associada à quimiometria como ferramenta estatística para discriminar amostras de leite, demonstrando ser possível diferenciar distintos tipos de antimicrobianos dissolvidos no leite. A metodologia mostrou-se eficaz na identificação de amostras reais ordenhadas em diferentes dias após a administração de cloridrato de ceftiofur, antimicrobiano classificado, em princípio, como de período de carência zero. Resultados semelhantes foram obtidos por Freitas et al. (2021), ao aplicarem FTIR associado a métodos de aprendizado de máquina para a detecção de resíduos de tilosina em leite em pó, Santana et al. (2025), na predição de resíduos de ivermectina em leite liofilizado, evidenciando o potencial dessas abordagens para a triagem de contaminantes veterinários em matrizes lácteas.

2.9 Espectroscopia

A espectroscopia vibracional baseia-se na interação entre a radiação eletromagnética e as vibrações moleculares, permitindo a obtenção de informações sobre a composição química e a estrutura das substâncias. As técnicas no infravermelho médio e próximo constituem ferramentas consolidadas na pesquisa científica e no controle industrial, sendo aplicadas na caracterização de materiais e no monitoramento de processos (SIESLER et al., 2002).

A espectroscopia no infravermelho médio (FTIR) e no infravermelho próximo (NIR) tem sido utilizada para a caracterização da composição global do leite, uma vez que essas técnicas são sensíveis às vibrações moleculares associadas aos principais constituintes da

matriz láctea, incluindo proteínas, lipídios e carboidratos (ROHMAN et al., 2011; KIM et al., 2011).

Devido à rapidez, ao caráter não destrutivo e à possibilidade de análise direta das amostras, as técnicas espectroscópicas, são empregadas no controle de qualidade e no monitoramento de processos industriais, incluindo o setor alimentício. O NIR capta informações associadas a sobretons e bandas de combinação, resultando em espectros com elevada sobreposição e menor seletividade estrutural quando comparada ao infravermelho médio, característica anarmônica das vibrações moleculares. Essa característica torna o NIR particularmente adequado para aplicações de triagem e monitoramento rápido em matrizes complexas, como o leite (SIESLER et al., 2002).

A discriminação entre amostras contaminadas e não contaminadas é obtida por meio da exploração de padrões multivariados presentes nos espectros, sem a necessidade de identificação direta de bandas específicas atribuídas aos antibióticos. A análise quimiométrica, incluindo métodos não supervisionados, como a Análise de Componentes Principais (PCA), e métodos supervisionados de classificação, permite avaliar a covariância entre múltiplas variáveis espectrais, possibilitando a diferenciação de grupos de amostras com base em diferenças globais de perfil espectral (GELADI et al., 1986; BRO et al., 2014).

Revisões recentes sobre métodos espectroscópicos aplicados à detecção de resíduos de fármacos veterinários em alimentos destacam que essas técnicas não substituem métodos confirmatórios cromatográficos, mas apresentam elevado potencial como ferramentas de triagem rápida, não destrutiva e de baixo custo, especialmente quando combinadas com modelos quimiométricos adequadamente validados (KIM et al., 2019; CEN et al., 2007). Sivakesava et al. (2002) demonstraram que a espectroscopia FT-MIR associada a análise multivariada pode detectar resíduos em leite com alta sensibilidade e correlação, mesmo em baixas concentrações. Estudos brasileiros sobre diclofenaco sódico em leite mostraram que FT-NIR combinada com Análise de Componentes Principais permite distinguir amostras contaminadas e não contaminadas com base em padrões espectrais (BRO et al., 2014). Dessa forma, o uso integrado de FTIR ou NIR com quimiometria é estratégia potencial para a classificação e o monitoramento de amostras de leite quanto à presença de resíduos de antibióticos (KIM et al., 2019; FREITAS et al., 2021; SANTANA et al., 2025).

2.9.1 Espectroscopia por Infravermelho Próximo NIR

Métodos analíticos avançados são empregados para detectar resíduos de antibióticos em leite, como a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS),

reconhecida por sua alta sensibilidade e seletividade. Mais recentemente, técnicas de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR spectroscopy) associada a quimiometria vêm ganhando destaque como ferramentas rápidas, não destrutivas e ambientalmente sustentáveis (SANTOS et al., 2021; OZCAN et al., 2020).

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) emprega energia de fótons ($h\nu$) na faixa de comprimento de onda de 750–2500 nm para excitar modos vibracionais de compostos orgânicos. O NIR tem sido usada na agricultura para quantificar a composição de nutrientes de culturas e dietas animais, e no controle de qualidade na indústria de alimentos (SANTOS-RIVERA et al., 2021). Siesler et al. (2002) destacaram o uso consolidado do NIR no monitoramento de processos e no controle de qualidade da indústria alimentícia, devido à rapidez e ao caráter não destrutivo da técnica. Ozcan et al. (2020) relataram o emprego da espectroscopia NIR associada à quimiometria na avaliação da autenticidade e da composição de alimentos, evidenciando sua eficiência em sistemas industriais.

O NIR tem maior energia e menor comprimento de onda em comparação ao MIR. As bandas no NIR predominantemente surgem de sobretons e combinações de alongamentos de ligações O–H, C–H e N–H e são mais amplas e fracas do que aquelas observadas no MIR, resultando, portanto, em menor seletividade molecular. As diferenças entre os espectros NIR de diferentes amostras são frequentemente muito sutis e requerem quimiometria. Numerosos métodos quimiométricos estão disponíveis para fornecer uma resposta qualitativa da autenticação. Proteínas, gorduras e lactose produzem bandas de combinação e harmônicos na região do NIR, contudo, essas bandas são mais fracas que no MIR e mais suscetíveis aos efeitos de espalhamento causados pelas partículas do leite, o que dificulta a análise de amostras heterogêneas, como o leite cru (CHEN et al., 2020).

Os espectros de NIR, caracterizados por bandas largas, fracas e sobrepostas, apresentam baixa interpretabilidade e sensibilidade, exigindo a aplicação de métodos quimiométricos multivariados para extração de informações relevantes. A maior penetração da radiação NIR possibilita a análise de produtos em recipientes de vidro ou plástico sem perda significativa de energia, e a menor absorção da água nessa região permite o uso de cubetas com maior caminho óptico, adequadas a sistemas em linha (JIMÉNEZ-CARVELO et al., 2024).

2.9.2 Espectroscopia por infravermelho Médio -MIR

O uso do MIR em produtos lácteos deve-se à forte absorção de constituintes do leite nessa região espectral. Grupos CH de ácidos graxos ($3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$), carbonila de glicerídeos

(1730 cm^{-1}), ligações peptídicas de proteínas (1550 cm^{-1}) e grupos O-H da lactose (1040 cm^{-1}). Nessa faixa, o comprimento de onda supera o diâmetro das partículas dispersas, glóbulos de gordura, micelas de caseína e células somáticas, minimizando efeitos de espalhamento observados no UV. A principal limitação é a intensa absorção da água, superada pelo uso de refletância total atenuada (ATR) e algoritmos de correção. A complexidade espectral requer quimiometria para extração de informações quantitativas e qualitativas, sendo aplicadas técnicas como PLS, PLS-DA, PCA, SIMCA, SVM e ANN. O FT-MIR tem sido empregado na caracterização de leite cru e queijo, permitindo determinação rápida de proteínas, gorduras, lactose, sólidos totais e umidade, além da quantificação, que possibilita aplicações industriais, como detecção de adulterações e avaliação de autenticidade (JIMÉNEZ-CARVELO et al., 2024).

Na espectroscopia no infravermelho médio, cada composto químico absorve radiação em frequências específicas correspondentes às vibrações fundamentais de suas ligações químicas. Quando a frequência da radiação incidente coincide com a frequência natural de vibração de um determinado arranjo atômico, ocorre absorção de energia, promovendo modos vibracionais como estiramentos e deformações angulares. Esses diferentes modos vibracionais estão representados na Figura 4 e constituem a base para a formação do espectro infravermelho característico de cada substância (SKOOG et al., 2007).

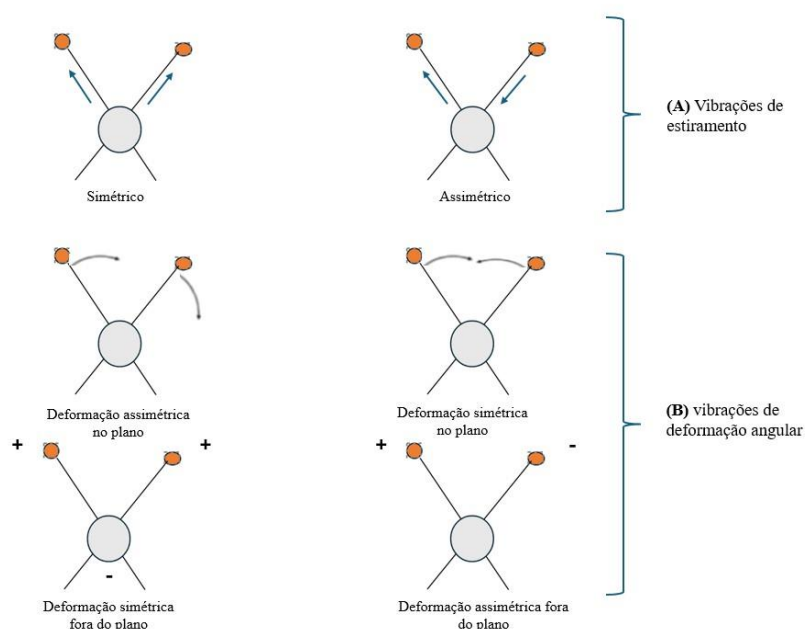


Figura 4. Modos vibracionais moleculares associados à absorção no infravermelho, incluindo estiramentos e deformações angulares, responsáveis pelas bandas características observadas no Fonte: Adaptado de Skoog, Holler e Crouch (2017).

3. Quimiometria

A quimiometria é o campo de estudo que emprega métodos matemáticos e estatísticos com o objetivo de planejar experimentos, extrair informações relevantes a partir de dados químicos complexos. (REBIAI et al., 2021). Desde sua consolidação nas últimas décadas do século XX, essa abordagem vem ganhando destaque pela capacidade de lidar com grandes volumes de dados provenientes de técnicas instrumentais, como espectroscopia e cromatografia, além de métodos emergentes baseados em inteligência artificial (SOZZI, 2025).

Os métodos quimiométricos podem ser classificados em duas categorias principais: (i) não supervisionados, voltados à exploração de padrões e tendências nos dados, como a Análise de Componentes Principais (PCA), e (ii) supervisionados, aplicados à regressão e classificação, tais como Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) e Random Forest (REBIAI et al., 2021; SOZZI, 2025).

As análises quimiométricas, incluindo métodos não supervisionados, como a Análise de Componentes Principais (PCA), e métodos supervisionados de classificação, permitem avaliar a covariância entre múltiplas variáveis espectrais, possibilitando a diferenciação de grupos de amostras com base em diferenças globais de perfil espectral (GELADI et al., 1986; BRO et al., 2014).

Nas análises quimiométricas multivariadas outro avanço relevante é o data fusion, técnica que integra dados provenientes de múltiplas plataformas analíticas, NMR, LC-MS e FTIR, permitindo modelos com robustez para autenticação e rastreabilidade de alimentos.

Na indústria alimentícia, a quimiometria é aplicada para controle de qualidade, autenticação e detecção de adulterações. Em estudos recentes, a associação entre espectroscopia no infravermelho (NIR e MIR) e métodos quimiométricos mostrou alta eficácia na discriminação de produtos naturais e alimentos. Por exemplo, ATR-FTIR associado a PLS-DA permitiu rastrear a origem de *Paris polyphylla*, enquanto análises com NIR possibilitaram quantificar compostos ativos em fitoterápicos e monitorar a qualidade de produtos (REBIAI et al., 2021).

A integração de NIR e MIR com algoritmos supervisionados (PLS, SVM, Random Forest) é aplicada também para avaliar composição química do leite, autenticidade e detectar resíduos de antibióticos, alinhadas aos princípios da pecuária de precisão (SAJI et al., 2024).

A maioria dos métodos não destrutivos é indireta e requer calibração. Nos métodos espectroscópicos, utiliza-se calibração multivariada, em que variáveis medidas são combinadas

para prever parâmetros de interesse. Instrumentos de NIR registram espectros em diversos comprimentos de onda, os quais contêm informações físico-químicas distribuídas em picos sobrepostos e afetados por espalhamento. Assim, dados isolados não permitem calibração adequada, sendo necessário empregar múltiplos comprimentos de onda ou o espectro completo (JIMÉNEZ-CARVELO et al., 2024).

As principais vantagens da quimiometria incluem a redução do tempo de análise, menor consumo de reagentes, abordagem sustentável e capacidade de processar big data analítico (SOZZI, 2025). Contudo, desafios como alta dimensionalidade, necessidade de validação robusta e padronização metodológica permanecem (REBIAI et al., 2021). As tendências indicam maior integração entre quimiometria, inteligência artificial e aprendizado de máquina, ampliando a automação e a acurácia preditiva dos modelos. Sistemas de monitoramento em tempo real, baseados em sensores ópticos combinados com modelos quimiométricos, já são empregados em cadeias produtivas para controle de qualidade e segurança (SAJI et al., 2024).

A interdisciplinaridade da quimiometria integra a química, matemática e estatística (Figura 5), amplia as possibilidades de análise e interpretação de dados, especialmente em áreas como química analítica e controle de qualidade.

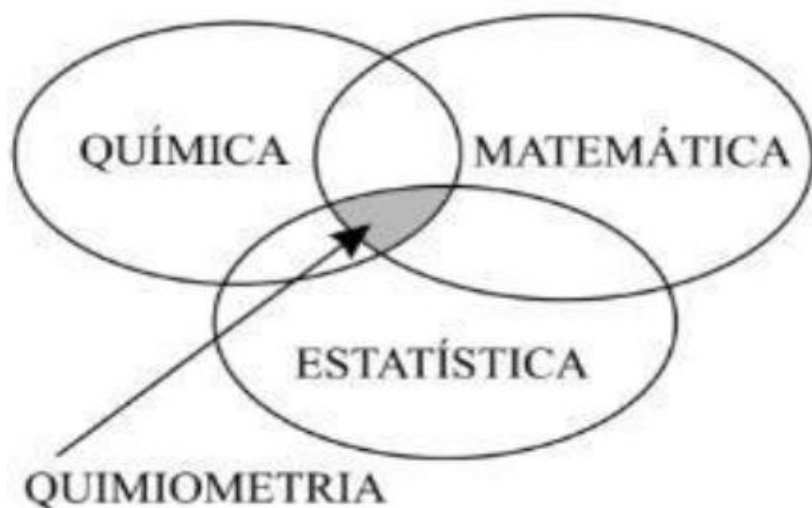


Figura 5: Interdisciplinaridade da Quimiometria

Fonte: Ferreira, 2015

3.1 A Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA, Principal Component Analysis) é uma das ferramentas fundamentais da quimiometria moderna para a exploração de dados multivariados. É uma técnica de redução de dimensionalidade não supervisionada, que transforma variáveis

originais correlacionadas em um novo conjunto de variáveis ortogonais denominadas componentes principais (PCs), organizadas de modo a preservar a maior quantidade de variância possível dos dados originais (WOLD et al., 1987; WANG et al., 2021).

A PCA é útil em aplicações espectroscópicas, como a espectroscopia (NIR e MIR), em que cada amostra pode gerar centenas ou milhares de variáveis. Assim, a técnica permite a representação visual dos dados em espaços de baixa dimensionalidade, como gráficos de escores, revelando padrões latentes, agrupamentos naturais de amostras e possíveis outliers. Além disso, os autovalores e autovetores obtidos permitem interpretar a contribuição relativa de cada variável para a construção dos componentes, fornecendo informações relevantes para a compreensão dos fenômenos químicos subjacentes (KUMAR et al., 2022).

A PCA também representa uma etapa inicial essencial na construção de modelos preditivos e classificatórios, como regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e análise discriminante. Sua aplicação tem sido usada em estudos envolvendo alimentos, fármacos, controle de qualidade industrial e detecção de adulterações químicas (ZHANG et al., 2020).

3.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

A Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) é uma técnica estatística supervisionada derivada do método de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) utilizada especificamente para problemas de classificação em que a variável resposta é categórica. Em PLS-DA, a matriz de resposta Y contém a codificação das classes (por exemplo, 0 e 1), e o algoritmo busca projetar as variáveis preditoras X em um subespaço de menor dimensão que maximize a discriminação entre as classes predefinidas, preservando a informação relevante para a diferenciação de grupos. Essa combinação de extração de variáveis latentes com análise supervisionada torna o método adequado para dados de alta dimensionalidade e multicolinearidade, como espectros obtidos por técnicas espectroscópicas (Lee, Liong & Jemain, 2018). A utilização de PLS-DA alinha a redução dimensional e a capacidade discriminatória em um único modelo. A estrutura latente extraída pelo PLS-DA busca maximizar a covariância entre os preditores e a variável resposta categórica, o que favorece a interpretação dos parâmetros discriminantes e a identificação de padrões subjacentes aos grupos de interesse. Essa propriedade é particularmente importante quando o número de variáveis espectrais supera o número de amostras, como na espectroscopia NIR e MIR (Lee, Liong & Jemain, 2018).

Modelos PLS-DA têm sido aplicados com sucesso em diversas áreas de classificação quimiométrica. Revisões abrangentes sobre o tema (Lee, Liong & Jemain, 2018) demonstram

a versatilidade do método, que tem sido amplamente empregado em áreas como a autenticação de alimentos, a classificação de evidências forenses, a discriminação da origem botânica ou geográfica de produtos (como madeiras e alimentos) e o controle de qualidade farmacêutico. Por exemplo, estudos que utilizam espectroscopia FTIR aplicaram PLS-DA para discriminar amostras adulteradas de amostras puras, evidenciando que o método é capaz de separar com alta acurácia classes definidas com base em variações químicas sutis nos espectros (Sufriadi et al., 2023).

A literatura destaca que a construção de modelos PLS-DA envolve escolhas críticas, como a determinação do número de componentes latentes e as estratégias de validação, que influenciam diretamente a capacidade preditiva e a generalização dos resultados. Revisões como a de Lee, Liong & Jemain (2018) também apontam lacunas no uso de PLS-DA em contextos de classes desequilibradas e sugerem diretrizes para assegurar avaliações mais confiáveis. A qualidade do modelo pode ser avaliada por diversos parâmetros, entre eles a sensibilidade e a especificidade. A sensibilidade do modelo refere-se ao número de amostras previstas como sendo da classe, dividido pelo número de amostras que realmente pertencem de fato à classe. Enquanto a especificidade do modelo corresponde ao número de amostras previstas como não sendo da classe, dividido pelo número real de amostras que não são da classe (ALMEIDA et al., 2013).

3.3 Pré-processamentos

A etapa de pré-processamento visa reduzir interferências físicas nas análises espectrais e melhorar a qualidade dos modelos quimiométricos aplicados (Rinnan, van den Berg & Engelsen, 2009). Métodos como Standard Normal Variate (SNV), Multiplicative Scatter Correction (MSC) e derivadas espectrais baseadas no filtro de Savitzky–Golay são amplamente empregados para corrigir efeitos de espalhamento, deslocamentos de linha de base e ruído instrumental (Barra et al., 2022; Rinnan, van den Berg & Engelsen, 2009). Estudos comparativos têm demonstrado que as derivadas de Savitzky–Golay frequentemente melhoram a performance de modelos quando combinadas com técnicas de correção de espalhamento (Heil et al., 2021). Essas abordagens têm sido aplicadas em diferentes domínios da espectroscopia, incluindo análises UV-Vis e NIR, evidenciando sua importância no tratamento de dados antes da modelagem (Santos et al., 2022). Revisões recentes reforçam a necessidade de selecionar e combinar métodos de pré-processamento de acordo com as características específicas dos dados espectrais, sendo MSC, SNV e derivadas de primeira ordem os mais comuns em quimiometria espectral (Yan, 2025).

3.4 Espectroscopia no Infravermelho Associada à Quimiometria

A espectroscopia no infravermelho (IR), abrangendo as regiões médio (MIR) e próximo (NIR), baseia-se na interação da radiação eletromagnética com as vibrações moleculares da amostra, gerando espectros com informações sobre grupos funcionais e ligações químicas. A complexidade desses espectros, aliada à colinearidade das variáveis e à presença de ruído, exige ferramentas quimiométricas para extração de informações relevantes (FERREIRA, 2015).

A integração da espectroscopia no infravermelho com quimiometria tem transformado as análises químicas, permitindo métodos rápidos, não destrutivos, com baixo consumo de reagentes e menor impacto ambiental. Modelos quimiométricos como PCA (Principal Component Analysis) e PLS-DA são aplicados para classificação de constituintes, autenticação de produtos e monitoramento de processos industriais. É usada em alimentos, fármacos e produtos agrícolas, pela análise simultânea de múltiplos parâmetros, redução do tempo analítico e integração a sistemas online, no contexto da Tecnologia Analítica de Processos (PAT). Entre os desafios estão a padronização de métodos e a necessidade de calibrações robustas, especialmente sob diferentes condições ambientais ou variedades de amostras (BATTEN, 2004; FREITAS et al., 2021; MUNAWAR et al., 2024).

3.5 A inovação tecnológica

O controle de qualidade do leite em pó comercializado internacionalmente se dá, inicialmente, pelo controle de qualidade da matéria prima, o leite cru. No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), instituído pelo Mapa, define os critérios oficiais de amostragem, análise e conformidade para resíduos de medicamentos veterinários em leite e seus derivados, em consonância com os limites estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. De forma complementar, normas internacionais como o Regulamento (UE) nº 37/2010 e os padrões do Codex Alimentarius estabelecem LMRs harmonizados para substâncias farmacologicamente ativas em alimentos de origem animal, servindo como referência para o comércio internacional.

Embora não haja distinção legal específica entre leite fluido e leite em pó quanto aos LMRs de antibióticos, a avaliação da conformidade é realizada com base nos limites estabelecidos para o leite, considerando o produto reconstituído ou critérios de equivalência de

composição, sendo obrigatória a utilização de métodos analíticos validados e reconhecidos oficialmente para fins de controle e fiscalização (BRASIL, 1999, 2022).

O uso da espectroscopia no MIR e NIR associado à quimiometria pode se tornar ferramenta auxiliar nesse complexo problema, por incrementar a velocidade analítica. Nesse contexto, a ideia é o desenvolvimento de modelos de predição e/ou classificação de antibióticos em leite. Oficialmente, o leite em pó deve ser analisado quanto à presença de resíduos de antibióticos, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência. No entanto, o uso da espectroscopia no MIR e NIR têm sido estudadas e apresentam possibilidades de uso analítico na área de resíduos de antibiótico em leite.

Nesse sentido, o ambiente de inovação, proposto inclui o desenvolvimento de modelos de predição e/ou classificação de amostras com resíduos de antibióticos em leite, com o uso da espectroscopia no MIR e NIR (Figura 6, linhas tracejadas). O processo de controle de qualidade do leite e a proposta de inovação tecnológica estão apresentados no fluxograma da Figura 6.

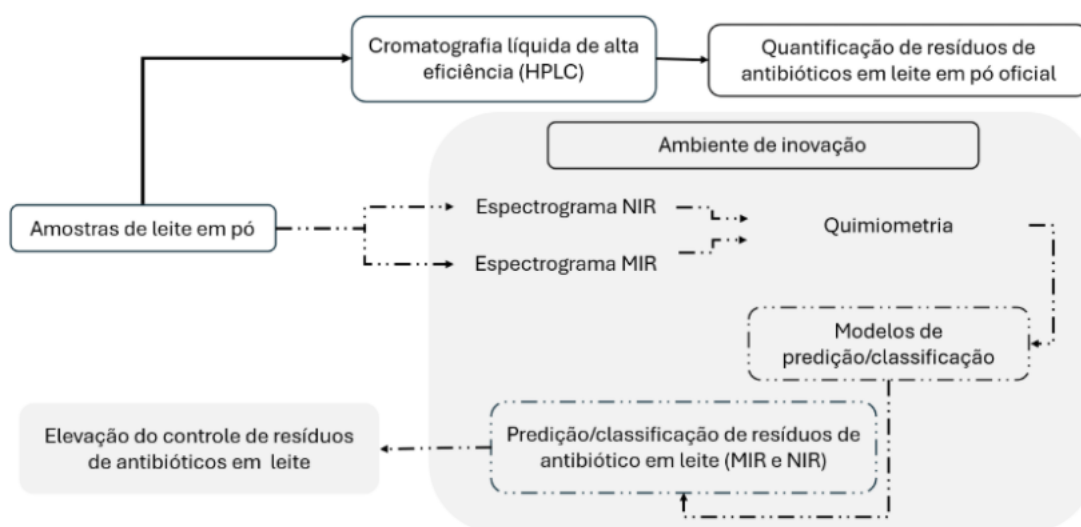


Figura 6. Fluxograma do controle de qualidade do leite e a proposta de inovação tecnológica

Resumo gráfico

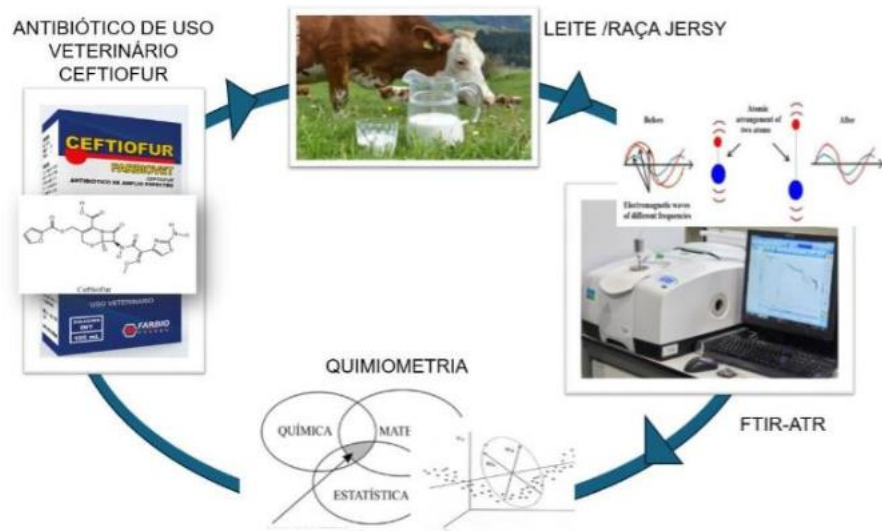


Figura 7. Resumo gráfico do delineamento experimental e da estratégia analítica adotada no estudo

Fonte: Autor

II. OBJETIVOS

3. OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos de predição e/ou classificação de amostras de leite com o uso da espectroscopia no infravermelho médio (FT-MIR) e próximo (NIR), associada a ferramentas quimiométricas multivariadas, como método indireto de detecção e discriminação da presença de resíduos de ceftiofur em amostras de leite liofilizado provenientes de vacas tratadas in vivo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Protocolo da CEUA

Esse projeto está cadastrado na Comissão de Ética e Uso de animais da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia sob número 174/2028.

4.2 Amostras

Foram utilizadas amostras de leite cru de 12 vacas da raça Jersey pertencentes ao rebanho experimental do Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL), na Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Terras Baixas, em Pelotas, RS.

4.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental consistiu em três etapas, com quatro vacas por etapa ($n = 12$). Em cada etapa, as vacas receberam ceftiofur cloridrato (CEF-50®, 50 mg/mL) por via intramuscular, na dose de 1 mg de ceftiofur/kg de peso corporal (1 mL/50 kg), administrada uma vez ao dia, durante três dias consecutivos (IM1, IM2, IM3). O tempo 0 h correspondeu à coleta basal antes da primeira aplicação, seguida de coletas seriadas a cada 12 h até 180 h.

As amostras de leite foram coletadas individualmente de cada vaca em recipientes apropriados, desprezando-se jatos iniciais e homogenizando o leite antes da coleta. Em cada ponto de tempo, foram obtidos 50 mL de leite por animal, os quais foram subdivididos em: Aliquota A (25 mL): destinada à quantificação de resíduos de ceftiofur e CFAE por HPLC-MS/MS; Aliquota B (25 mL): destinada à liofilização e posterior análise por FTIR.

4.4 Liofilização das amostras

As amostras de leite foram inicialmente submetidas ao congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 horas e, posteriormente, liofilizadas a $-48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob pressão de 0,100 mbar, durante 24 h, utilizando um liofilizador FreeZone (Labconco, Kansas, EUA). O processo de liofilização foi adotado com o objetivo de preservar a integridade das amostras para as análises por FTIR, considerando que o leite em estado líquido apresenta menor estabilidade quando comparado ao produto liofilizado.

4.5 Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC-MS/MS)

A quantificação dos resíduos de ceftiofur e de seu metabólito marcador desfuroilceftiofur (DFC) no leite foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS). As análises foram conduzidas sob as seguintes condições: coluna C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm), fase móvel composta por água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (solvente B), em gradiente de eluição (0–2 min: 95% A; 2–6 min: 95→5% A; 6–8 min: 5% A; 8–8,5 min: 5→95% A; 8,5–10 min: 95% A), vazão de 0,3 mL/min, volume de injeção de 10 µL, temperatura da coluna a 40 °C e detecção por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI) no modo positivo. A quantificação foi realizada por curvas analíticas com padrões certificados de ceftiofur e DFC, conforme descrito por Brasil (2022) e pela European Union (2010).

4.6 Análise espectral leite por FTIR em leite liofilizado

As amostras de leite sem tratamento, de leite submetido ao tratamento com ceftiofur e o padrão de ceftiofur foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR-FTIR). O processamento e a análise dos espectros foram conduzidos com os softwares MicroLab e Resolution Pro (Agilent, Santa Clara, EUA). (Karoui e De Baerdemaeker, 2007; Santos et al., 2013).

4.6.1. Espectroscopia no infravermelho próximo – NIR

A temperatura ambiente foi mantida a 25 °C durante as medições. Os espectros foram coletados em um espectrômetro NIR (Spectra Star 2500XL, Unity Scientific, Brookfield, CT, EUA) equipado com uma lâmpada de tungstênio-halogênio como fonte de luz e um detector de arseneto de índio-gálio (InGaAs). Os sinais foram coletados no modo de refletância (%R) e convertidos em absorbância usando $\log 1/R$. As amostras foram colocadas no compartimento e escaneadas na faixa de 1100 a 2500 nm em intervalos de 1 nm. Cada ponto de dados representa a média de 64 varreduras, resultando em 1400 pontos por espectro. Esta metodologia está alinhada com as especificações técnicas do fabricante para análise de produtos lácteos (Metrohm, 2025) e com procedimentos descritos por Lee et al. (2017).

4.6.2 Espectroscopia no infravermelho médio - MIR

A temperatura ambiente foi mantida em 25 °C durante as medições. Os espectros foram obtidos utilizando Espectroscopia de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier e Reflexão Total Atenuada - FTIR-ATR (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., CA, EUA), na faixa espectral de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 1 cm^{-1} , 64 varreduras e leitura através do cristal de diamante. Aproximadamente 0,1 g das amostras foi depositado sobre a superfície do diamante para leitura. A aplicação desta metodologia para análise de leite liofilizado foi adaptada de procedimentos descritos por Karoui e De Baerdemaeker (2007) e Santos et al. (2013).

4.7 Análises Quimiométricas

4.7.1 Aquisição dos Dados

Os dados espectrais foram obtidos a partir de arquivos no formato Excel e recortados para a região espectral de interesse do FT-MIR, compreendida entre 4000 e 650 cm^{-1} . Os grupos experimentais foram definidos com base nos tempos de coleta das amostras: Controle (0 h), Tratamento (12 h a 84 h) e Pós-tratamento (96 h a 180 h). Os espectros foram organizados em planilhas eletrônicas (Microsoft Excel®) e submetidos à visualização e plotagem preliminar no software Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, EUA). Posteriormente, os dados foram importados para a plataforma Google Colaboratory, utilizando a linguagem de programação Python.

4.7.2 Pré-processamento

Foram utilizados scripts desenvolvidos em Python para leitura, organização e pré-processamento dos dados espectrais. Os espectros foram submetidos à correção por Standard Normal Variate (SNV) e à aplicação da primeira derivada, visando à redução de efeitos de espalhamento, variações de linha de base e ruídos instrumentais.

4.7.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada aos espectros pré-processados. Foram calculadas as cinco primeiras Componentes Principais (PCs) e avaliada a variância explicada por cada componente. Os escores de PC1 e PC2 foram utilizados para visualização da distribuição das amostras, e os loadings correspondentes foram analisados para identificação das regiões espectrais de maior contribuição na separação entre os grupos. A

observação gráfica também foi utilizada para identificação e remoção de amostras discrepantes (outliers) com base na dispersão incomum das amostras no espaço dos componentes.

4.7.4 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) foi usada para a construção dos modelos de classificação das amostras quanto à presença de resíduos de ceftiofur, utilizando os dados previamente pré-processados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC-MS/MS)

A quantificação do ceftiofur no leite foi realizada por HPLC-MS/MS, utilizado como método de referência, seguindo método desenvolvido e validado por Levent et al. (2021). A análise permitiu caracterizar a presença, a dinâmica temporal e a eliminação do fármaco ao longo do período experimental (Figura 8A e 8B). Os pontos representam a média das medições ($n = 12$ por tempo), e as barras indicam o desvio padrão. O eixo Y está apresentado em escala logarítmica devido à ampla variação nas concentrações observadas para melhor visualização das variações de concentração ao longo do experimento. Após o início do tratamento, verificou-se um aumento da concentração do ceftiofur no leite, atingindo valores máximos médios entre 12 h, 36 h e 60h, com picos acima do limite máximo de quantificação, 100 $\mu\text{g/L}$. A partir desse intervalo, observou-se diminuição progressiva, indicando a eliminação do fármaco no leite, comportamento semelhante ao descrito por Han et al. (2017), que relataram a detecção de ceftiofur no leite por até 108 h após a última infusão.

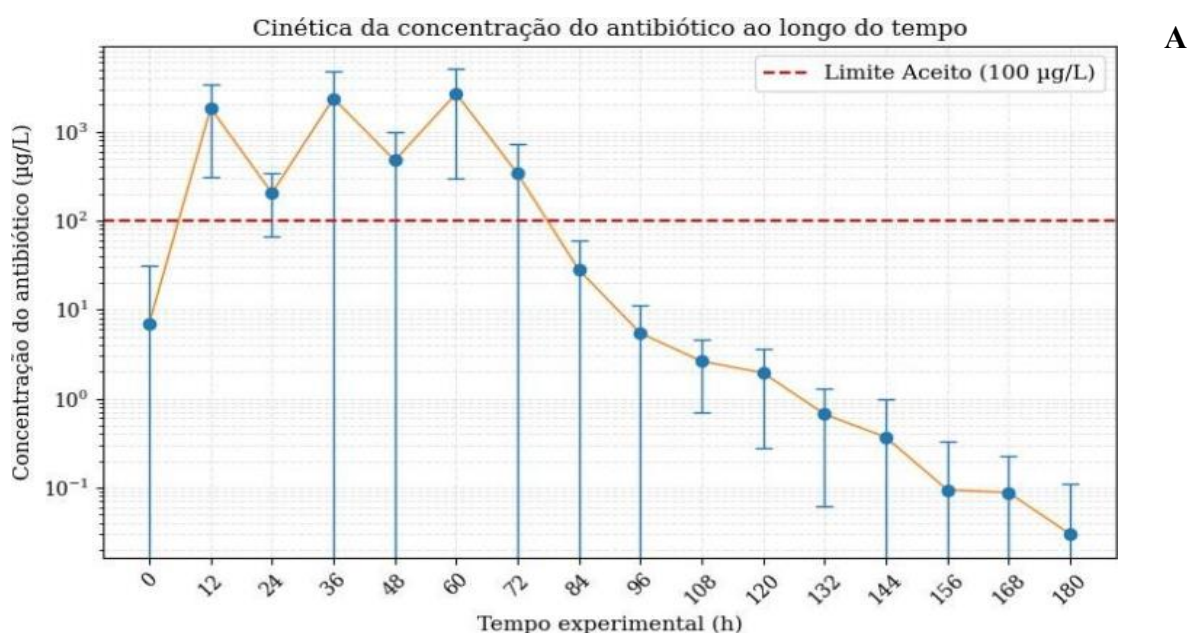


Figura 8 A. Cinética da concentração do antibiótico em leite ao longo do tempo por cromatografia.

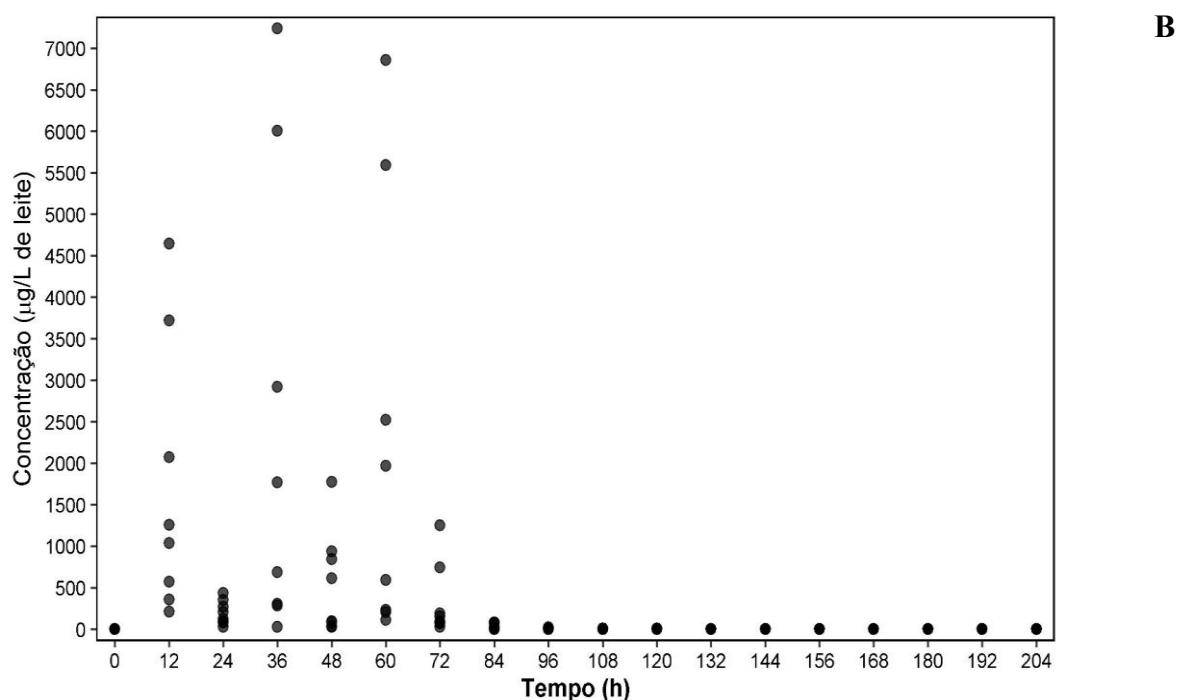


Figura 8 B: Perfil cromatográfico da concentração do antibiótico no leite ao longo do tempo após a administração

O perfil temporal observado neste estudo é coerente com a farmacocinética do ceftiofur, β -lactâmico de terceira geração, em bovinos leiteiros, caracterizado por rápida absorção após administração intramuscular, ampla distribuição tecidual e metabolismo predominantemente hepático, com formação de metabólitos ativos, como a desfuroilceftiofur. Variações no regime de administração, produção leiteira, estado fisiológico e metabolismo individual deslocam a cinética observada, o que se espera em experimentos *in vivo*. (HORNISH et al., 2002; FDA, 2018; LANDONI et al., 2018).

A presença de concentrações detectáveis nos tempos finais (180 h) indica que, embora haja redução progressiva, resíduos podem persistir no leite ao longo do período experimental. Estudos farmacocinéticos demonstram que o ceftiofur pode ser detectado no leite por vários dias após a administração intramamária, mesmo após o período de carência recomendado (HAN et al., 2017; SMITH et al., 2004). Além disso, ensaios de triagem com alta sensibilidade podem indicar a presença de quantidades muito pequenas do fármaco, e a diluição do leite durante a coleta e o processamento pode influenciar sua detecção (DUREL et al., 2019).

O Gráfico 8B confirma a dispersão das concentrações de ceftiofur no leite ($\mu\text{g/L}$) em função do tempo, evidenciando elevada variabilidade entre as amostras, especialmente nos

períodos iniciais após a administração do antibiótico. Observam-se valores mais elevados nas primeiras horas, seguidos por uma tendência geral de redução ao longo do tempo, associada ao processo de eliminação do fármaco pelo organismo. A presença de dispersão residual em alguns tempos indica variações interindividuais na metabolização e excreção do ceftiofur. Esse comportamento reforça a importância do monitoramento temporal para a avaliação do período de carência e da segurança do leite para consumo.

5.2 Espectroscopia no Infravermelho Médio (FT-MIR)

O espectro do leite puro liofilizado no tempo (0 h) foi utilizado como referência do grupo controle (Figura 9). Esse espectro evidencia o perfil vibracional característico do leite e indica a preservação estrutural dos principais constituintes do leite após o processo de liofilização. As bandas observadas refletem contribuições de lipídios, proteínas e carboidratos (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2011; MESGARAN et al., 2020; CENITI et al., 2023; FREITAS et al., 2021; SANTANA et al., 2025).

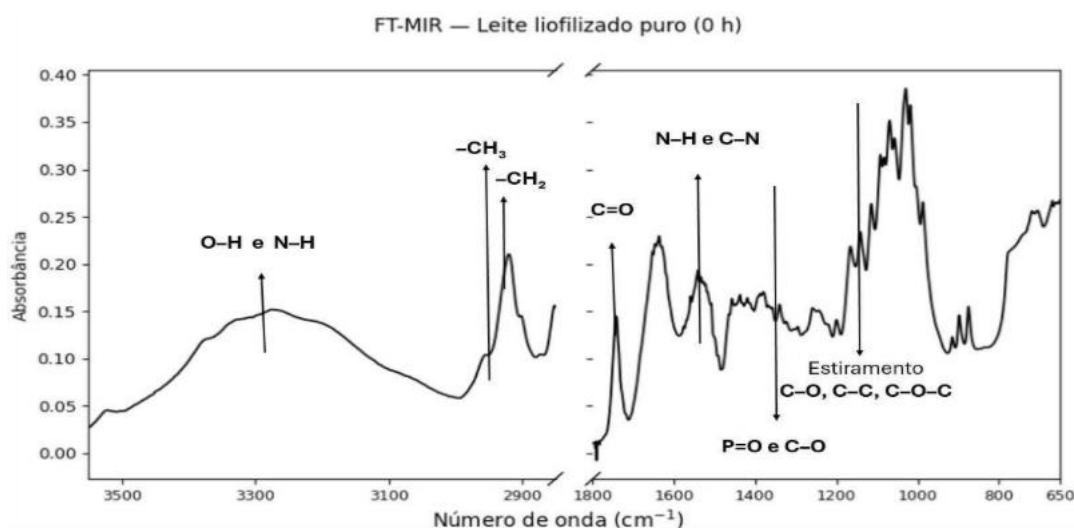


Figura 9. Espectro no infravermelho médio com transformada de Fourier do leite de vacas Jersey (grupo controle, 0h)

5.3 Espectro MIR do ceftiofur

O espectro do ceftiofur foi caracterizado pela associação das bandas de absorção com grupos funcionais presentes na molécula de ceftiofur (Figura 10).

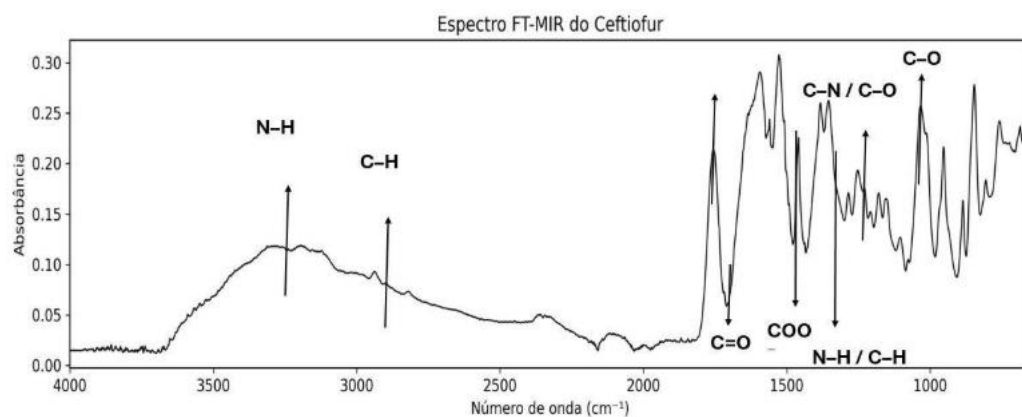


Figura 10. Estrutura química do cefotiofur e espectro FTIR de seu padrão na região do infravermelho de 650–4000 cm^{-1}

Embora os grupos funcionais absorvam em posições específicas no espectro infravermelho, as bandas podem ser influenciadas pela presença de grupos funcionais próximos (FREITAS et al., 2021). O espectro de infravermelho médio (FT-MIR) do cefotiofur apresenta absorções características diretamente relacionadas aos seus grupos funcionais, tais como carbonilas, amidas, carboxilatos e grupos aminados. A banda de absorção observada na faixa aproximada de 3250 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico de grupos $\text{NH}_3^+/\text{N-H}$, consistentes com funções amínicas e amídicas na estrutura do cefotiofur, tal como descrito em dados espectrais de patentes que relatam espectros FTIR de formas cristalinas do fármaco.

As absorções em torno de 1565 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento do grupo carboxilato (COO^-), presente na porção ácida da molécula, enquanto a banda no intervalo de 1750–1700 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento da carbonila característica dos anéis β -lactâmicos (EP 0690864 B1).

Outras bandas de absorção significativas são relacionadas ao estiramento C–H alifático (2850–2960 cm^{-1}), às vibrações C–N e C–O (1180–1280 cm^{-1}) e às regiões de impressão digital (950–650 cm^{-1}), refletindo a presença de ligações heteroatômicas e sistemas cíclicos no esqueleto molecular.

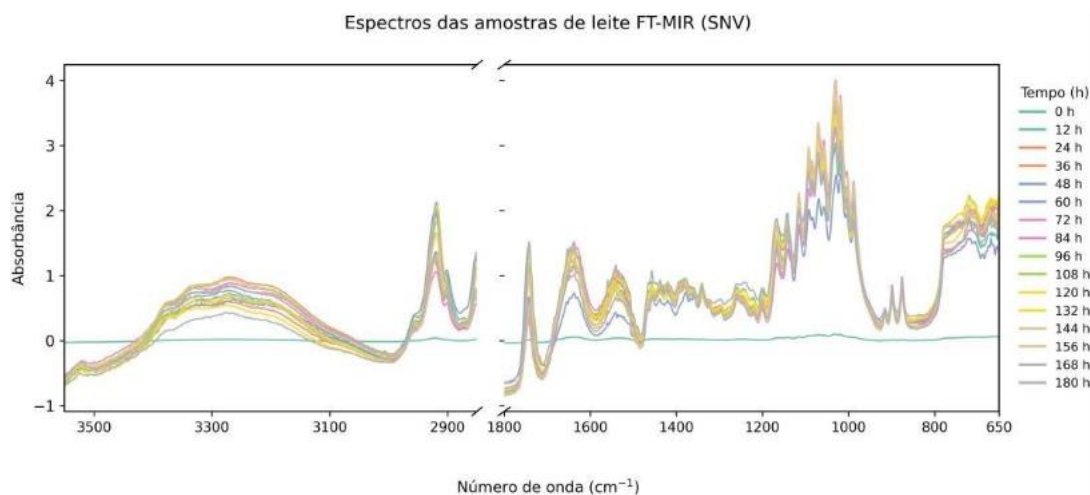


Figura 11. Espectros FT-MIR de amostras de leite liofilizado de vacas Jersey em diferentes grupos experimentais

Na região de $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ observa-se uma banda larga atribuída aos estiramentos O–H, associados à água residual estrutural, com sobreposição de vibrações N–H das ligações peptídicas. Em matrizes liofilizadas, essa banda está relacionada à água ligada à rede proteica, especialmente às caseínas (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

A faixa de $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ é dominada pelos estiramentos assimétrico (2920 cm^{-1}) e simétrico (2850 cm^{-1}) dos grupos --CH_2 , com contribuições de --CH_3 (2950 cm^{-1}), associados às cadeias alifáticas dos ácidos graxos da fração lipídica do leite (Rodriguez- Saona & Allendorf, 2011; Rohman & Man, 2011). Na região de $1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ evidenciam-se as bandas de amida I (1650 cm^{-1}) e amida II (1540 cm^{-1}), associadas às vibrações de estiramento C=O e às deformações N–H das proteínas do leite (VAN DE VOORT et al., 2001; KAROUI et al., 2007).

Na faixa de $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, o espectro apresenta elevada complexidade, atribuída às vibrações C–O, C–C e C–O–C da lactose, com contribuições de grupos fosfato associados às fosfoproteínas e fosfolipídios. Essa faixa apresenta elevada sobreposição de bandas, o que limita sua interpretação por análise univariada direta (NICOLAI et al., 2007; ROHMAN et al., 2011).

Mesgaran et al. (2020) e Ceniti et al. (2023), relatam que, na presença de resíduos farmacológicos em baixas concentrações, as alterações espectrais ocorrem de forma indireta, sem o surgimento de novas bandas evidentes, sendo exploradas por meio de pré-processamentos e métodos quimiométricos. Com o objetivo de avaliar comparativamente o comportamento espectral dos diferentes grupos ao longo do período experimental, os

espectros médios após pré- processamento foram analisados conforme apresentado na Figura 12.

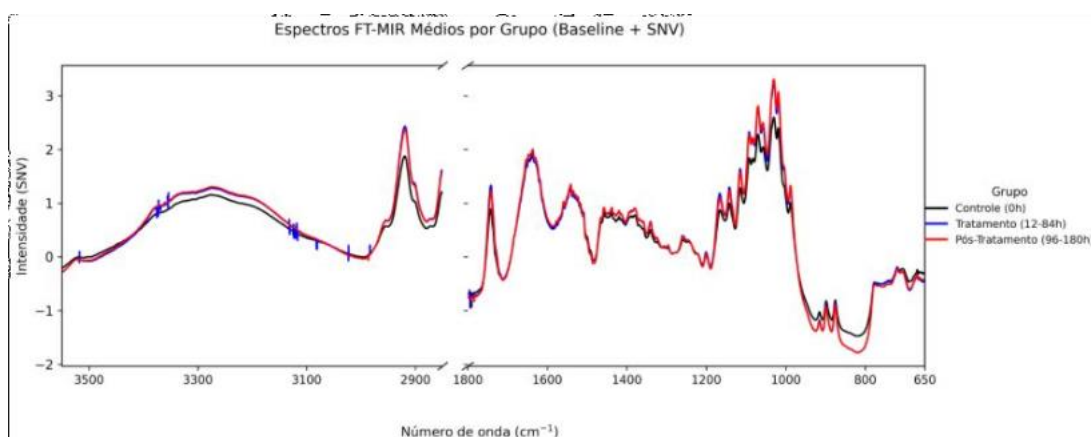


Figura 12. Espectros FT-MIR médios das amostras de leite liofilizado de vacas Jersey dos grupos controle (0 h) tratamento (12–84 h) e pós-tratamento (96–180 h)

Observam-se pequenas variações de intensidade em regiões específicas, principalmente nas faixas de 3000–2800 cm^{-1} , associadas aos estiramentos C–H e de 1800–1500 cm^{-1} , às bandas de amida I e II. Na região de 1200–1000 cm^{-1} , atribuída à lactose, também se observam pequenas variações. Essas alterações ocorreram sem mudar a posição das bandas ou surgimento de novas absorções, indicando que o tratamento com o Ceftiofur não promoveu alterações estruturais no leite (Mesgaran et al., 2020).

5.4 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada aos espectros FT-MIR para investigar variabilidade dos dados e avaliar diferenças entre os grupos experimentais associadas à presença de ceftiofur no leite. Antes da aplicação da PCA, os espectros foram submetidos à normalização pelo método Standard Normal Variate (SNV) e à primeira derivada, para reduzir os efeitos de espalhamento e variações de linha de base. As duas primeiras componentes principais explicaram 23,88% da variância total dos dados espectrais, sendo 14,75% atribuídos à PC1 e 9,13% à PC2. A Figura 13 apresenta o gráfico de escores (PC1 vs PC2) obtido das amostras avaliadas, no qual observou-se sobreposição entre os grupos controle (0 h), tratamento (12- 84 h) e pós-tratamento (96- 180 h), sendo observada sobreposição entre as amostras.

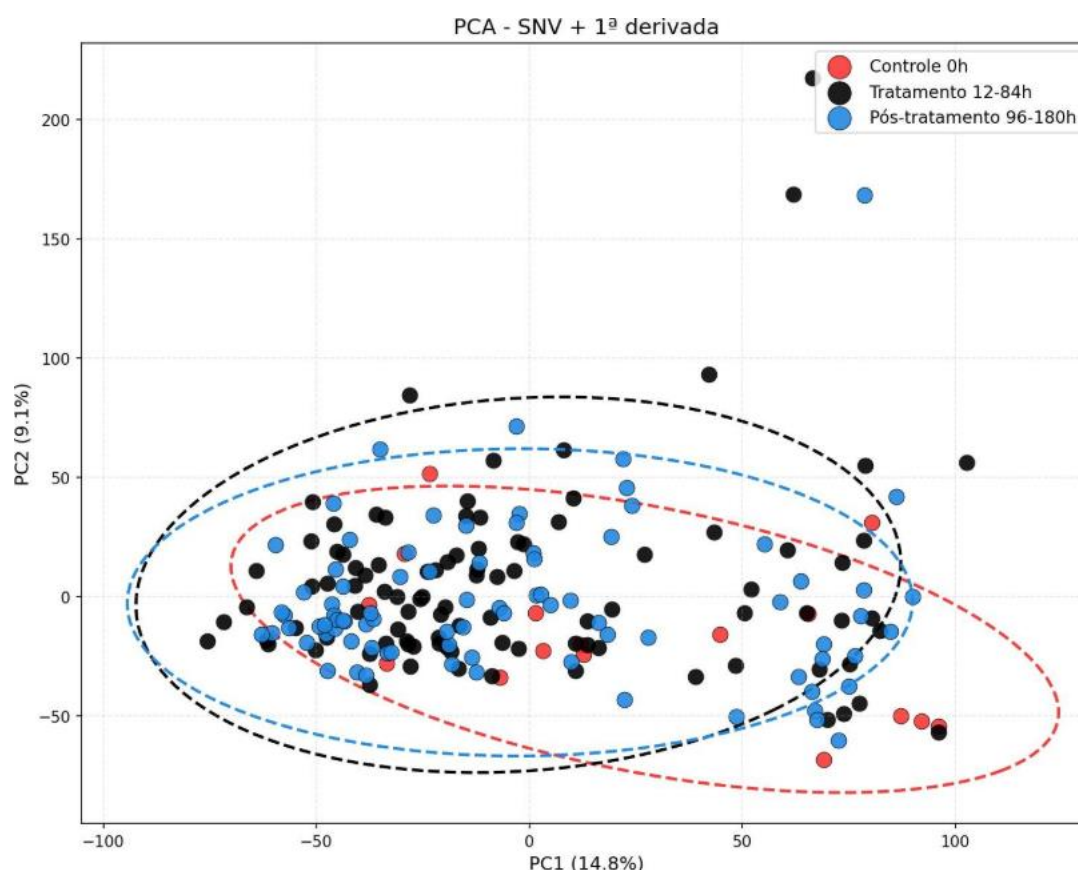


Figura 13. Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada aos espectros MIR das amostras dos grupos controle (0 h), tratamento (12–84 h) e pós-tratamento (96–180 h)

A tabela 2 mostra as regiões espectrais associadas às Componentes Principais. Para a PC1, a região mais significativa é em torno de 1355 cm^{-1} . São nessas bandas que se encontram os loadings de maior magnitude para a PC1. Para a PC2, a região mais influente está em torno de 1750 cm^{-1} .

Tabela 2: Regiões espectrais associadas às principais componentes principais (PC1 e PC2) obtidas por PCA no espectro MIR de leite.

Componente	Variância	Comprimento de onda	Grupos funcionais atribuídos
PC1	14,75%	1355 cm^{-1}	Vibrações de CH_2 e CH_3 de cadeias de ácidos graxos.
PC2	9,13%	1749 cm^{-1}	Triglicerídeos/ grupo carbonila C=O dos ésteres.

Fonte: Elaborada pelo autor com base nos loadings da PCA.

Com o objetivo de identificar as regiões espectrais associadas à variabilidade observada, foram analisados os gráficos de loadings. A Figura 14 apresenta os gráficos de loadings da PC1 e da PC2 obtidos dos espectros FT-MIR.

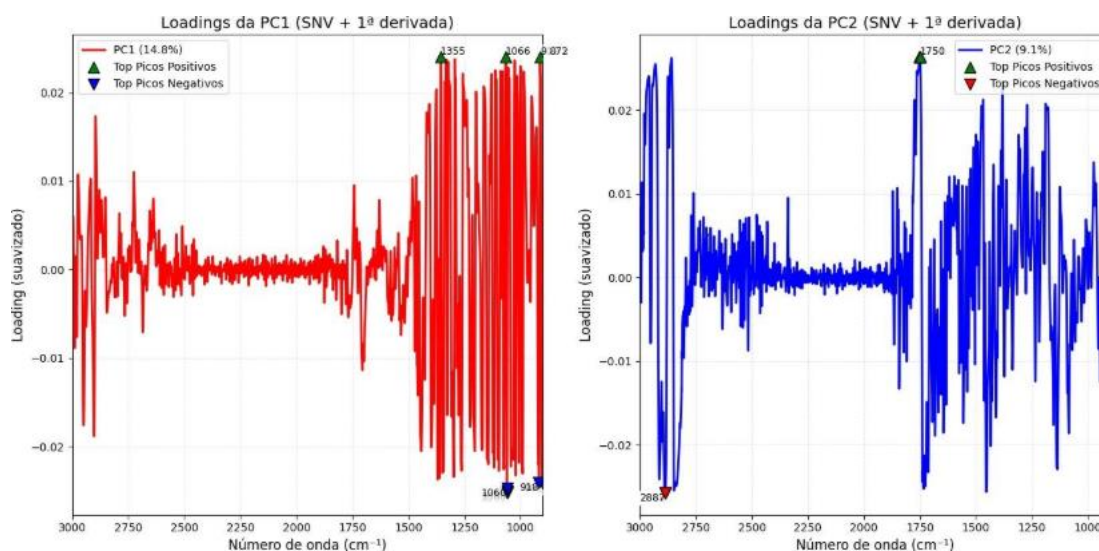


Figura 14. Gráficos de loadings da PC1 e da PC2 dos espectros FT-MIR das amostras de leite

A análise de loadings indicou que a PC1 foi influenciada principalmente pela região em torno de 1355 cm^{-1} , associada à fração proteica do leite, enquanto a PC2 apresentou maior contribuição das regiões próximas a 1750 cm^{-1} e 2858 cm^{-1} , atribuídas a grupos carbonila e estiramento C-H relacionados à fração lipídica. A ausência de separação clara entre os grupos controle, tratamento e pós-tratamento na PCA pode estar relacionada à composição do leite e à baixa contribuição espectral dos resíduos de ceftiofur quando comparados aos principais constituintes do leite, como proteínas e lipídios.

Esse comportamento é coerente com estudos de espectroscopia no infravermelho médio aplicados ao leite, que demonstram que a resposta espectral é predominantemente governada pelos constituintes majoritários da matriz, como proteínas e lipídios, podendo mascarar variações associadas a compostos presentes em baixas concentrações (KAROUI et al., 2007).

Estudos que empregaram espectroscopia no infravermelho associada à análise multivariada para detecção de antibióticos em leite também relataram limitações de métodos não supervisionados na discriminação das amostras. Nessas condições, a aplicação de

métodos supervisionados é mais adequada para maximizar a separação entre os grupos (LUIZ et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2020).

Métodos supervisionados, como PLS-DA, são amplamente empregados em quimiometria quando o objetivo é discriminação de classes previamente definidas, uma vez que maximizam a covariância entre variáveis espectrais e a informação de classe (BALLABIO et al., 2013).

5.5 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

O modelo PLS-DA aplicado aos espectros FT-MIR apresentou acurácia global de 49,2%, sensibilidade de 40,6% e especificidade de 69,4%. Esse desempenho está próximo da classificação aleatória (50%), indicando baixa capacidade discriminatória. Resultados semelhantes foram relatados por Luiz et al. (2018) ao detectar resíduos de antimicrobianos em leite por FTIR, nos quais a acurácia também ficou abaixo de 60% para concentrações próximas ao limite máximo de resíduos. Essa limitação pode ser explicada pela dominância espectral dos constituintes majoritários do leite (proteínas, lipídios e lactose), que mascaram as variações sutis associadas ao ceftiofur, presente em concentrações traço ($\mu\text{g/L}$) enquanto os componentes da matriz estão em g/L (Sachi et al., 2019; Ceniti et al., 2023).

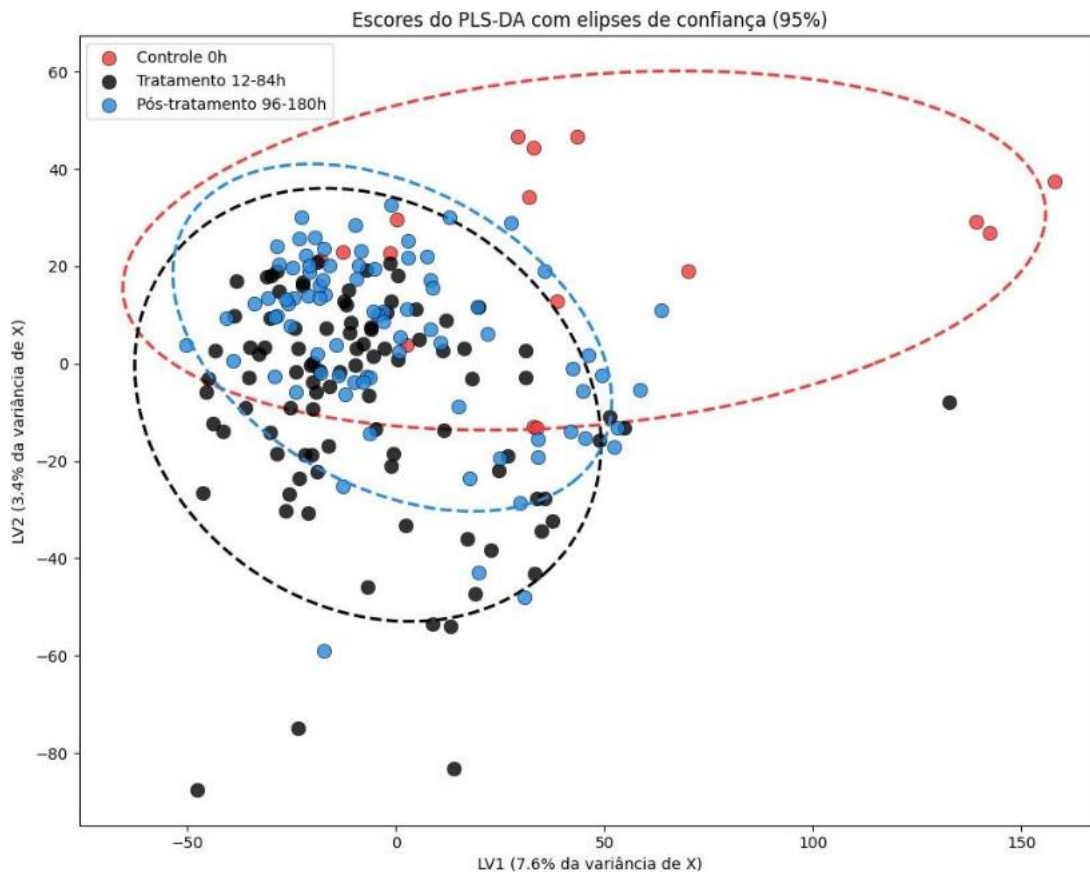


Figura 15. Análise Discriminante por Mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

Observa-se sobreposição entre os grupos, e uma leve tendência parcial de separação do grupo controle ao longo da primeira variável latente, especialmente em relação ao grupo controle.

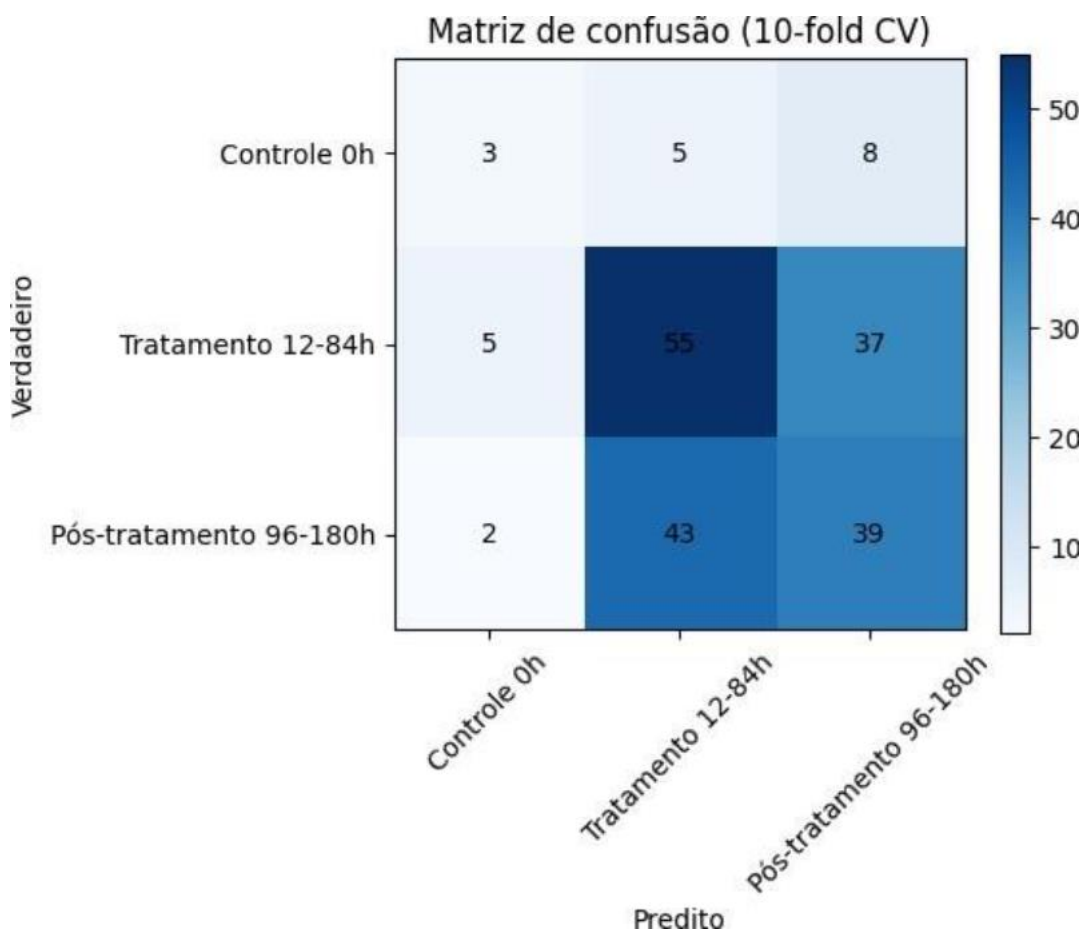


Figura 16. Matriz confusão MIR

Observa-se maior número de classificações corretas para o tratamento (12-84 h), enquanto o grupo controle (0 h) apresentou menor desempenho na classificação, com elevada taxa de confusão em relação aos demais grupos. A tabela 2 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade obtidos para cada grupo e as médias macro do modelo PLS-DA.

Tabela 3. Sensibilidade e especificidade (%) do modelo PLS-DA aplicado aos espectros MIR, com acurácia global 49,2%

Grupo	Sensibilidade (%)	Especificidade
Controle (0 h)	18,8	96,1
Pós -tratamento (96 –180 h)	46,4	60,2
Tratamento (12-84 h)	56,7	52,0
Média	40,6	69,4

Fonte: Elaborada pelo autor com base nos loadings da PCA.

Os valores de sensibilidade e especificidade indicam desempenho moderado do modelo PLS-DA, com maior capacidade de identificação das amostras do grupo tratamento em comparação aos grupos Controle e Pós-tratamento. Esses resultados estão de acordo com o comportamento observado na PCA, que não evidenciou separação clara entre os grupos, indicando que as variações espectrais associadas ao ceftiofur são sutis em relação aos principais constituintes do leite. Assim, a complexidade da matriz e a baixa intensidade do sinal limitam o desempenho do modelo.

Estudos que aplicam PLS-DA a dados espectroscópicos de alimentos indicam que o desempenho do modelo depende da magnitude da diferença química entre os grupos e da concentração do analito em relação à matriz, sendo comum a ocorrência de sobreposição quando as variações são sutis (RODRÍGUEZ-PULIDO et al., 2013).

5.6 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (FT-NIR)

A Figura 17 apresenta o espectro no infravermelho próximo (NIR) do leite de vacas Jersey liofilizado. O espectro evidencia o perfil vibracional característico do leite na região do NIR, refletindo a contribuição predominante de água, proteínas, lipídios e carboidratos.

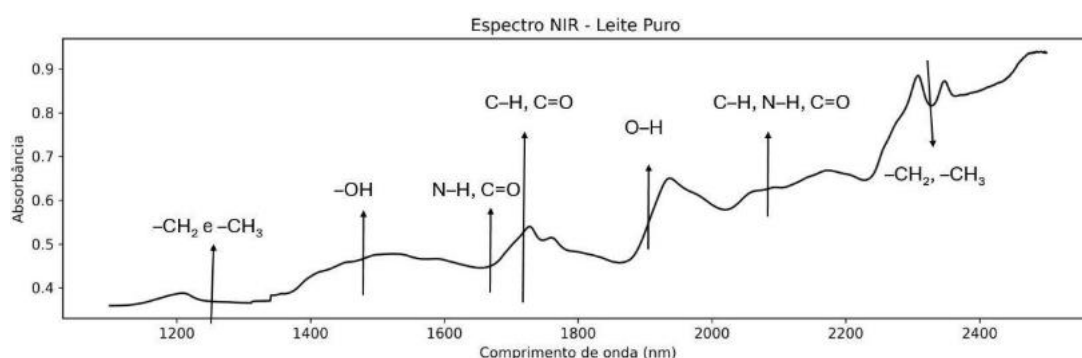


Figura 17. Espectrograma no infravermelho próximo (NIR) do leite de vacas Jersey liofilizado.

5.7 Espectro Ceftiofur NIR

A figura 18 apresenta o espectro no infravermelho próximo do ceftiofur. Observam-se bandas associadas a estiramentos O-H e N-H (1400-1550 nm) e bandas relacionadas a vibrações C-H e combinações envolvendo C=O, compatíveis com compostos orgânicos nitrogenados e sulfurados e com moléculas farmacêuticas contendo anéis β -lactâmicos e grupos tioésteres (CIURCZAK et al., 2021; PASQUINI et al., 2018).

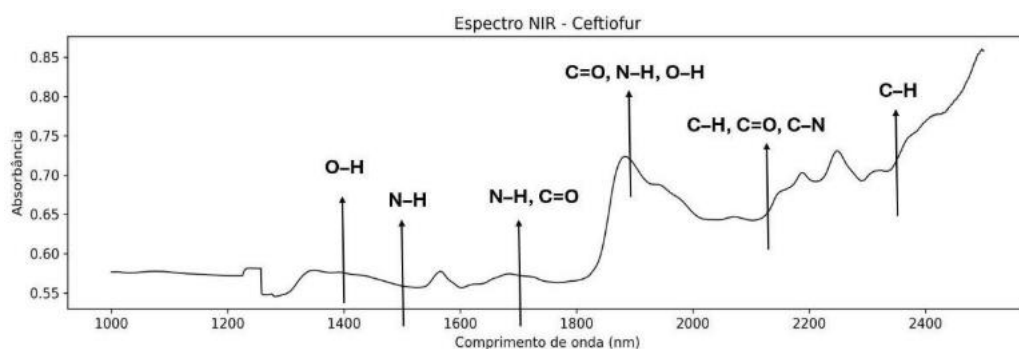


Figura 18. Espectro do cefotiofur na região do infravermelho próximo (1100–2500 nm)

5.8 Espectros Médios NIR

A Figura 19 apresenta os espectros NIR das amostras de leite ao longo do tempo (0–180 h), evidenciando elevada similaridade entre os perfis espectrais. Os espectros médios indicam a presença de água residual e de grupos O–H e N–H, evidenciando a contribuição desses constituintes mesmo após o processo de liofilização. As principais bandas são observadas nas regiões próximas a 1200–1300 nm, associadas a sobretons de C–H relacionados às cadeias lipídicas, em torno de 1400–1450 nm, atribuídas a vibrações O–H associadas à água residual e às hidroxilas da lactose, e entre 1500–1700 nm, correspondentes a bandas de combinação envolvendo N–H e C=O, associadas às proteínas do leite.

Observa-se manutenção do formato das bandas ao longo de todo o período experimental, sem deslocamentos significativos de picos, indicando estabilidade global do leite.

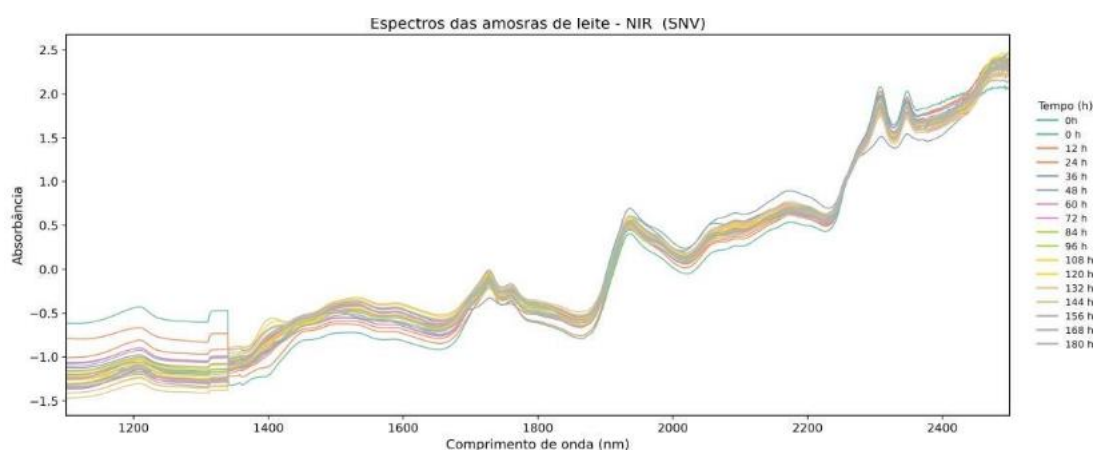


Figura 19. Espectros no infravermelho próximo (NIR) do leite de vacas Jersey liofilizado por tempo.

Ao longo do período experimental, observa-se pequenas variações de intensidade global dos espectros, sem alterações estruturais evidentes nas principais bandas de absorção. Esse

comportamento indica que as possíveis influências do tratamento se manifestam de forma sutil no domínio NIR.

5.9 Diferenças espectrais entre o leite controle (0 h), 12–84 h e 96–180 h – NIR

A figura 20 apresenta os espectros médios NIR das amostras de leite liofilizado dos grupos controle (0 h), tratamento (12–84 h) e pós-tratamento (96–180 h). Observa-se sobreposição entre os grupos ao longo do espectro, refletindo a dominância das vibrações O–H, N–H e C–H características do leite.

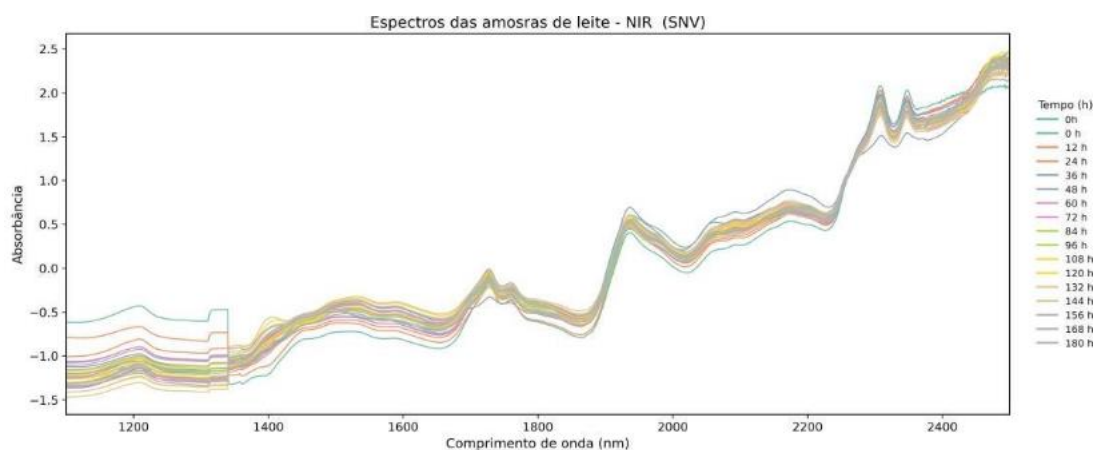


Figura 20. Diferenças espectrais entre o leite controle (0 h), 12–84 h e 96–180 h – Espectroscopia NIR

Apesar da semelhança dos perfis, verificam-se pequenas variações de intensidade das bandas em regiões específicas, especialmente entre 1300–1400 nm, 1700–2000 nm e 2100–2400 nm. Essas variações indicam modificações espectrais sutis relacionadas ao tempo de exposição ao tratamento.

5.10 Análise de Componentes Principais (PCA) – NIR

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada aos dados espectrais NIR com o objetivo de avaliar a variabilidade dos dados e investigar a separação entre os grupos experimentais. As duas primeiras componentes principais explicaram 83,24% da variância total dos dados espectrais, sendo 62,27% atribuídos à PC1 e 20,97% à PC2. A figura 21 apresenta o gráfico de escores (PC1 vs PC2) obtido a partir dos espectros NIR, no qual se observa sobreposição entre os grupos controle, tratamento e pós-tratamento.

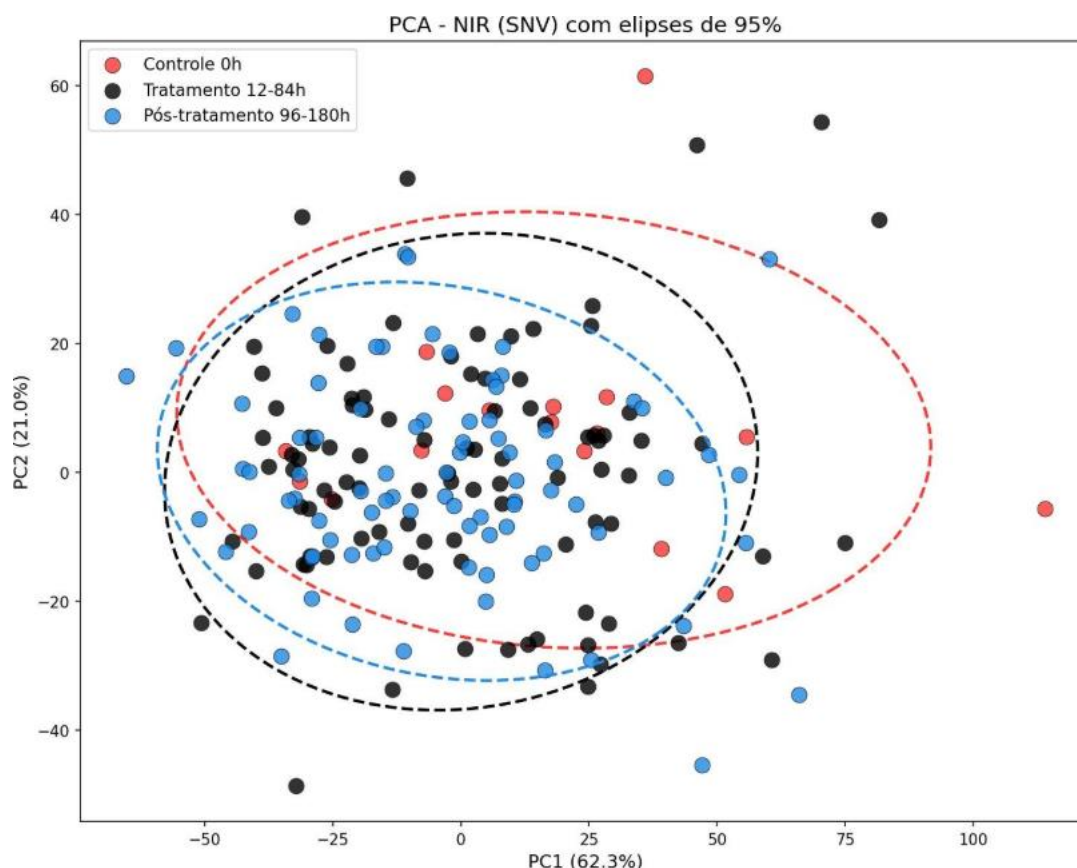


Figura 21. Análise de Componentes Principais (PCA) – NIR

A tabela 4 mostra as regiões espectrais associadas às Componentes Principais. Para a PC1, a região mais significativa é em torno de 1218 nm. São nessas bandas que se encontram os loadings de maior magnitude para a PC1. Para a PC2, o pico que mais caracterizam a variância capturada pela PC2 está em torno de 1718 cm^{-1} .

Tabela 4: Regiões espectrais associadas às principais componentes principais (PC1 e PC2) obtidas por PCA no espectro NIR.

Componente	Variância	Comprimento de onda	Grupos funcionais atribuídos
PC1	62,27%	1218 nm	Segundo overtone de estiramento C-H (grupos CH, CH ₂ e CH ₃) de ácidos graxos
PC2	20,97%	1718 nm	Primeiro overtone de estiramento C-H (grupos CH, CH ₂ e CH ₃) de cadeias de ácidos graxos.

A literatura confirma que, tanto no NIR quanto no MIR, as bandas de absorção que mais contribuem para a variância espectral (PC1 e PC2) estão associadas majoritariamente à fração lipídica.

Embora as duas primeiras componentes expliquem elevada proporção da variância dos dados, não foi observada separação clara entre os grupos, sendo verificada ampla sobreposição entre as amostras. A Figura 22 apresenta os gráficos de loadings da PC1 e da PC2 obtidos a partir dos espectros NIR.

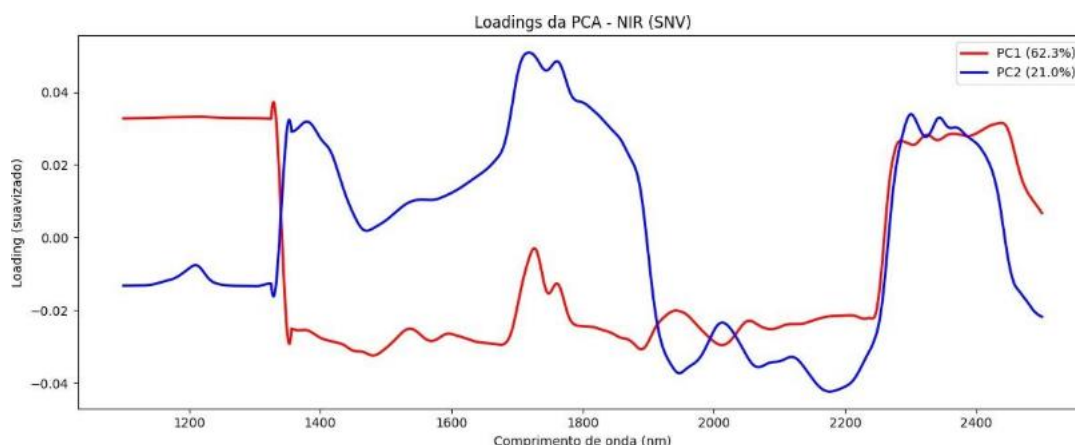


Figura 22. Gráficos de loadings da PC1 e da PC2 obtidos a partir dos espectros NIR

A análise dos landings indicou que a PC1 Foi influenciada principalmente pela região em torno de 1215 nm, associada a vibrações relacionadas a grupos C-H, enquanto a PC2 apresentou maior contribuição da região próxima a 1720 nm, relacionada a bandas de absorção de O-H. As regiões espectrais observadas estão associadas a vibrações de grupos C-H e O-H, frequentemente relacionadas a lipídios e água em produtos lácteos, conforme descrito em estudos sobre espectroscopia NIR aplicada ao leite (OSBORNE et al., 1993; NICOLAI et al., 2007).

Apesar de elevada variância explicada pelas duas primeiras componentes principais, a PCA aplicada aos espectros NIR não evidenciou separação clara entre os grupos analisados, indicando que as variações espectrais associadas ao ceftiofur são sutis em relação às contribuições dos principais constituintes do leite. Esse comportamento é semelhante ao observado em estudos que empregam espectroscopia NIR associada à análise multivariada para avaliação de contaminantes em matrizes alimentares, nos quais métodos não supervisionados apresentam limitações discriminação das amostras (GRELET et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2020).

5.11 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) – NIR

O modelo PLS-DA aplicado aos espectros FT-NIR apresentou acurácia global de 51,8%, sensibilidade de 37,2% e especificidade de 69,9%. Assim como observado para o MIR, o desempenho ficou próximo ao acaso (50%), confirmando a dificuldade de discriminação das amostras. Estudos semelhantes, como o de Freitas et al. (2021) na detecção de tilosina em leite em pó por NIR, também relataram acurácias modestas (entre 55% e 65%) para concentrações próximas ao limite máximo de resíduos. A baixa sensibilidade (37,2%) indica que o modelo teve dificuldade em identificar corretamente as amostras contaminadas, possivelmente devido ao desbalanceamento do número de amostras entre as classes (controle com apenas 17 amostras, tratamento com 96 e pós-tratamento com 84) e à dominância espectral dos componentes majoritários do leite, que suprimem as variações sutis induzidas pelo ceftiofur (Sachi et al., 2019; Ceniti et al., 2023).

A figura 23 apresenta o gráfico de escores do modelo PLS-DA aplicado aos espectros NIR, com elipses de confiança de 95%.

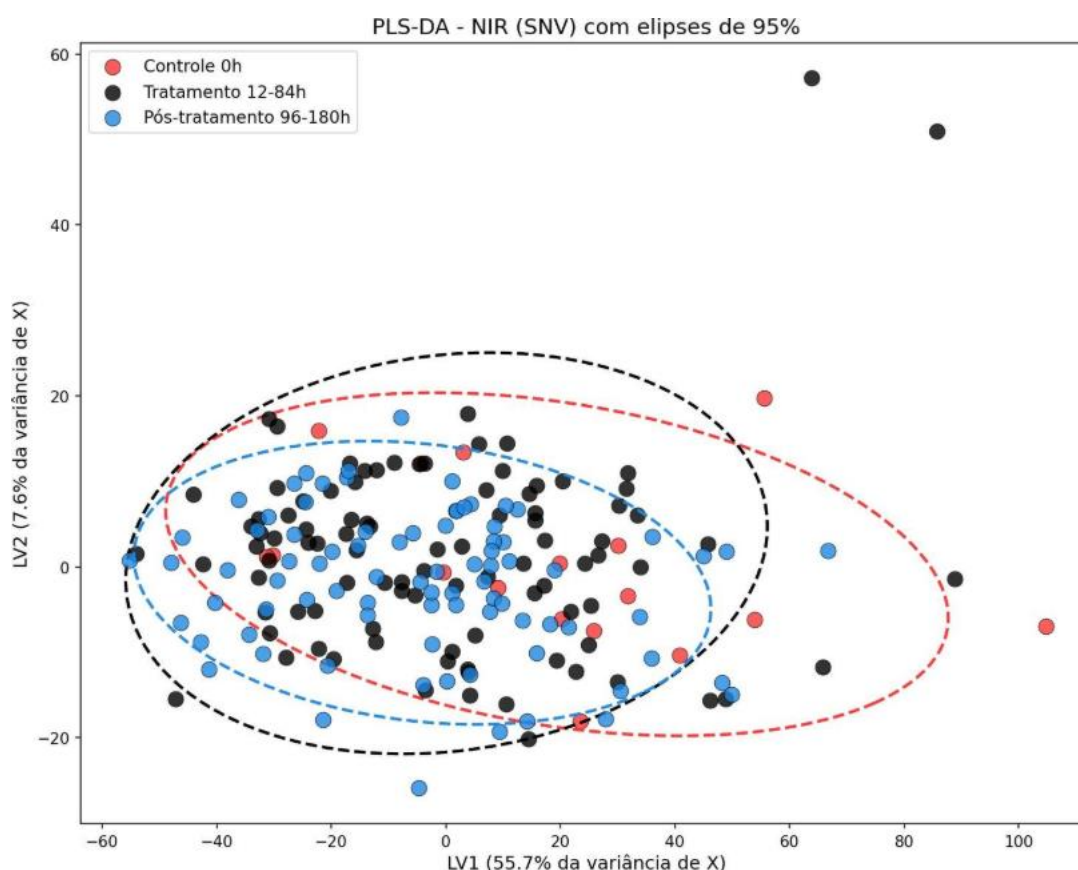


Figura 23. Gráfico de escores do modelo PLS-DA aplicado aos espectros NIR

Observa-se sobreposição entre os grupos, com tendência de melhor discriminação do grupo tratamento ao longo da primeira variável latente. A Figura 24 apresenta a matriz de

confusão obtida para o modelo PLS-DA aplicado aos espectros NIR, construída a partir da validação cruzada em 10 partições.

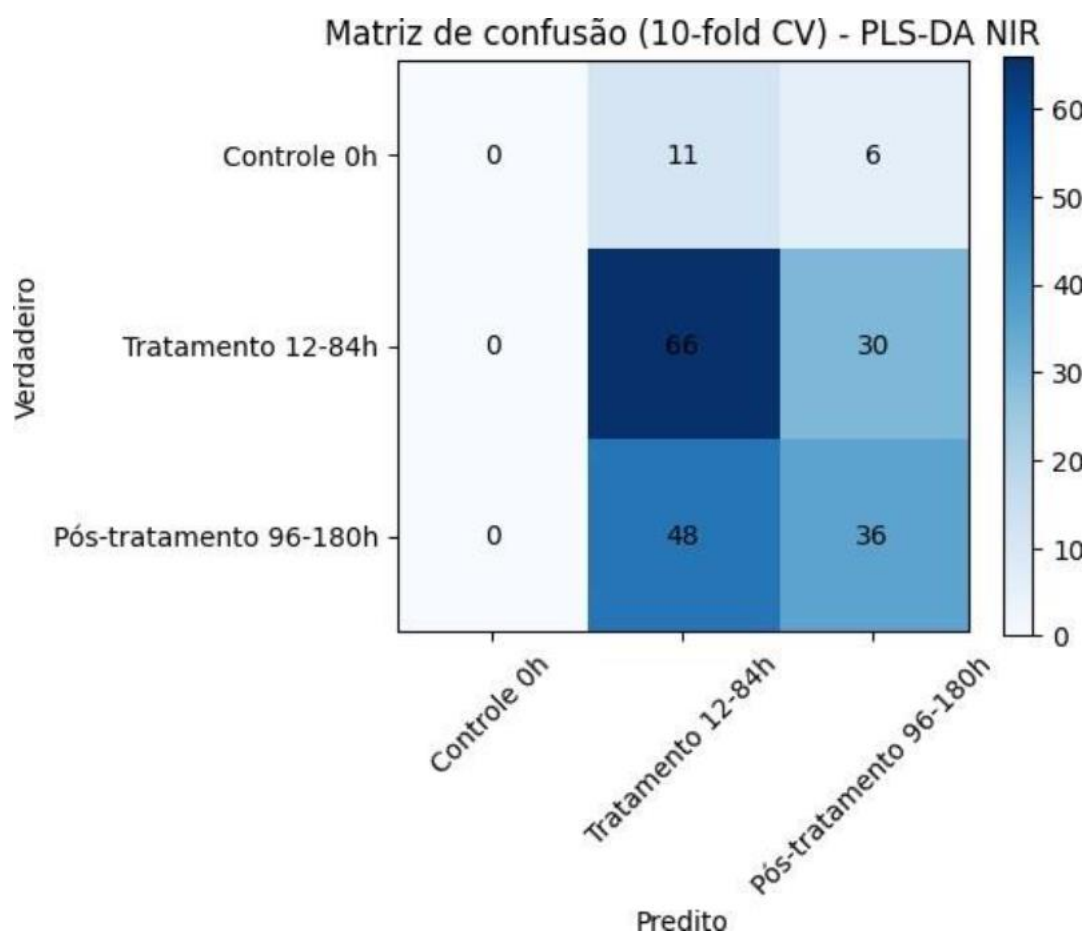


Figura 24. Matriz de confusão obtida para o modelo PLS-DA aplicado aos espectros NIR

Observa-se maior taxa de classificação correta para o grupo tratamento, enquanto o grupo controle não apresentou classificações corretas no modelo NIR, sendo predominantemente confundido com os demais grupos.

Tabela 5. Sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA aplicado aos espectros NIR com acurácia global 51,8%

Grupo	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Controle	0,0	100
Tratamento	68,8	41,6
Pós -tratamento	42,9	68,1
Média	37,2	69,9

Os valores obtidos indicam desempenho moderado do modelo NIR, com maior capacidade de identificação das amostras do grupo tratamento e limitação na discriminação do grupo Controle. De forma geral, tanto os modelos baseados em espectroscopia no infravermelho médio quanto no infravermelho próximo apresentaram desempenho moderado na discriminação das amostras em função da presença de ceftiofur.

Em ambos os casos, observou-se elevada sobreposição entre os grupos, indicando que as variações espectrais associadas ao resíduo são sutis em relação às contribuições dos principais constituintes do leite. Esses resultados evidenciam limitações das técnicas espectroscópicas associadas exclusivamente à análise multivariada para a detecção indireta de resíduos em matrizes complexas.

Estudos que aplicaram PLS-DA a dados espectroscópicos de alimentos também relataram desempenho dependente da concentração do analito e da complexidade da matriz (BALLABIO et al., 2013; RODRÍGUEZ-PULIDO et al., 2013).

CONCLUSÃO

A espectroscopia FT-MIR e FT-NIR, associada à quimiometria, apresentou desempenho moderado na discriminação de resíduos de ceftiofur em leite liofilizado, com acurácia em torno de 50% para ambos os modelos PLS-DA. A Análise de Componentes Principais não separou os grupos experimentais, confirmando que as alterações espectrais induzidas pelo antibiótico são sutis e mascaradas pelos constituintes majoritários do leite.

Os modelos supervisionados tiveram melhor desempenho para o grupo tratamento (período de maior concentração do fármaco), mas classificaram mal as amostras controle e pós-tratamento. Este estudo evidencia que a detecção indireta de resíduos de antibióticos em matrizes lácteas complexas por espectroscopia vibracional é um desafio analítico significativo. A metodologia não substitui métodos confirmatórios como a cromatografia, mas pode atuar como ferramenta complementar de triagem rápida e de baixo custo, contribuindo para o controle de qualidade na cadeia produtiva do leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALIPOUR, Fathollah; MIRLOHI, Maryam; JALALI, Mohammmd. Prevalence of antibiotic residues in commercial milk and its variation by season and thermal processing methods. **International Journal of Environmental Health Engineering**, v. 2, n. 1, p. 41, 2013. DOI: 10.4103/2277-9183.122429

ALMEIDA, M. R. et al. Determinação da autenticidade de biodiesel por espectroscopia de infravermelho médio e análise discriminante. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1316-1321, 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013000900007

ALENEZI, Maha S. et al. Antibiotic residues in milk and milk-based products served in Kuwait hospitals: Multi-hazard risk assessment. **Antibiotics**, v. 13, n. 11, p. 1073, 2024. DOI: 10.3390/antibiotics13111073

ALGAMMAL, Abdelazeem et al. Emerging multidrug-resistant bacterial pathogens superbugs: A rising public health threat. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1135614, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1135614

BALLABIO, Davide; CONSONNI, Viviana. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3790-3798, 2013. DOI: 10.1039/C3AY40582F

BARRA, I. et al. A review on the use of chemometrics for the authentication of functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 17, p. 4701-4718, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2021.1879729

BARBOSA, R. S. et al. Metabolism and residue depletion of ceftiofur in dairy cows. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, p. 1-10, 2011.

BATTEN, G. D. Near infrared reflectance spectroscopy in agriculture. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, p. 1009-1024, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Institui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa nº 162, de 1º de julho de 2022. Estabelece as Ingestões Diárias Aceitáveis (IDA), as Doses de Referência Aguda (DRfA) e os Limites Máximos de Resíduos (LMR) para insumos farmacêuticos ativos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. **Projeções do agronegócio: Brasil 2023–2033**. Brasília: MAPA, 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico que fixa a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 30 nov. 2018. Seção 1, p. 9.

BRO, Rasmus; SMILDE, Age K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 2812-2831, 2014. DOI: 10.1039/C3AY41907J

CIURCZAK, Emil W. et al. (Ed.). **Handbook of near-infrared analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2021.

CEN, Haiyan; HE, Yong. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 2, p. 72-83, 2007. DOI: 10.1016/j.tifs.2006.09.003

CENITI, Carlotta et al. Recent advances in the determination of milk adulterants and contaminants by mid-infrared spectroscopy. **Foods**, v. 12, n. 15, p. 2917, 2023. DOI: 10.3390/foods12152917

CHEN, C. Infrared spectroscopy in food analysis. **Food Chemistry**, v. 315, 126286, 2020.

CHU, C. et al. Rapid screening of veterinary drug residues in milk using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Food Control*, v. 149, 109658, 2024.

CODEX ALIMENTARIUS. **Maximum residue limits for veterinary drugs in foods**. Rome: FAO/WHO, 2024.

COSTA, Lucyana Vieira et al. Antibiotic Residues in Raw Cow's Milk: A Systematic Review of the Last Decade. **Foods**, v. 13, n. 23, p. 3758, 2024. DOI: 10.3390/foods13233758

DUREL, L.; GALLINA, G.; PELLET, T. Assessment of ceftiofur residues in cow milk using commercial screening test kits. **Veterinary Record Open**, v. 6, 2019. DOI: 10.1136/vetreco-2018-000329

EUROPEAN UNION. Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council. **Official Journal of the European Union**, 2009.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EU) No 37/2010. **Official Journal of the European Union**, 2010.

PHARMACIA & UPJOHN COMPANY. Crystalline ceftiofur free acid. EP 0690864 B1. 24 fev. 1998. (Patente que descreve espectro FT-IR e atribuições de bandas específicas para ceftiofur e suas formas cristalinas).

FAO. **Code of hygienic practice for milk and milk products (CXC 57)**. Rome, 2008.

FAO. **The global dairy sector: facts and figures**. Rome, 2025.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Editora Unicamp, 2015.

FDA – U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Freedom of Information Summary: NADA 140-338 – Ceftiofur Crystalline Free Acid**. Center for Veterinary Medicine (CVM), 2018.

FITZPATRICK, J. et al. Milk proteins: structure and nutritional relevance. **International Dairy Journal**, v. 145, 105698, 2024.

FOX, Patrick F.; MCSWEENEY, Paul L. H.; PAUL, L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998.

FREITAS, M. P. et al. Partial least squares regression applied to spectroscopic food analysis. **Food Analytical Methods**, v. 14, p. 1800-1812, 2021.

GELADI, Paul; KOWALSKI, Bruce R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986. DOI: 10.1016/0003-2670(86)80028-9

GHIMPEȚEANU, Oana Mărgărita et al. Antibiotic use in livestock and residues in food—A public health threat: A review. **Foods**, v. 11, n. 10, p. 1430, 2022. DOI: 10.3390/foods11101430

GOYAL, A.; RANVIR, S.; MALIK, R. K. Physicochemical properties and quality attributes of milk and dairy products. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, p. 1-15, 2024.

GORDEN, Patrick J. et al. Altered plasma pharmacokinetics of ceftiofur hydrochloride in cows affected with severe clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 505-514, 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-10239

GRELET, C.; FERNANDEZ PIERNA, J. A.; DARDENNE, P.; BAETEN, V.; DEHARENG, F. Standardisation of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 2150-2160, 2015.

SPECTRABASE. Ceftiofur (Compound ID Cz1XUQrzlwS). Disponível em: <https://spectrabase.com/>. Acesso em: 11 de outubro de 2025.

GUERREIRO, P. K. et al. Mastite bovina e qualidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1605-1612, 2005.

HAN, Rongwei et al. Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride in milk after an 8-day extended intramammary administration in healthy and infected cows. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187261, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187261

HE, Ya et al. Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. **NPJ Clean Water**, v. 3, n. 1, p. 4, 2020. DOI: 10.1038/s41545-020-0051-0

HEIL, K.; SCHMIDHALTER, U. An Evaluation of Different NIR-Spectral Pre-Treatments to Derive Soil Parameters. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1423, 2021. DOI: 10.3390/s21041423

HORNISH, Rex E.; KATARSKI, S. F. Cephalosporins in veterinary medicine – ceftiofur use in food animals. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 7, p. 717-731, 2002.

HOUDOUIN, V. et al. Feature extraction and discriminant methods for spectroscopic classification. **Pattern Recognition**, v. 136, 109213, 2023. DOI: 10.2174/1568026023393679

HUTCHINGS, Matthew I.; TRUMAN, Andrew W.; WILKINSON, Barrie. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008

JIMÉNEZ-CARVELO, A. M. et al. Infrared spectroscopy and chemometrics in food authentication. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 173, 117128, 2024.

KAROUİ, Romdhane; DE BAERDEMAEKER, Josse. 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. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.05.042

KIM, S. et al. Determination of ceftiofur metabolites in milk by infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 1, p. 1-10, 2011.

KIM, Min-Gon; KIM, Min-Suk; LEE, Hyun-Joo; LIM, Jae-Sung. Spectroscopic techniques for the detection of veterinary drug residues in foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 87, p. 1-13, 2019.

KUMAR, R. et al. Principal component analysis in chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 225, 104560, 2022.

LANDONI, M. F.; ERRECALDE, J. O. Pharmacokinetics of cephalosporins in domestic animals. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 4, p. 481-498, 2018. DOI: 10.1111/jvp.12501

LANDONI, M. F.; ERRECALDE, J. O. Pharmacokinetics of cephalosporins in domestic animals. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 6, p. 479-492, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2008.00982.x

LEE, L. C.; LIONG, C.-Y.; JEMAIN, A. A. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. **Analyst**, v. 143, n. 15, p. 3526-3539, 2018. DOI: 10.1039/C8AN00599K

LEVENT, et al. A novel and sensitive LC-MS/MS method for the quantitation of ceftiofur in pharmaceutical preparations and milk samples. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 24, n. 3, p. 386-399, 2021.

LUIZ, M. T. B. et al. Detection of antimicrobials in milk using FTIR and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 257, p. 33-40, 2018.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário da pecuária brasileira**. Brasília: MAPA, 2024.

MARINONI, L. **Aplicações da espectroscopia no infravermelho próximo na análise de alimentos lácteos**. 2012. Tese (Doutorado) – Università degli Studi di Parma, Parma, 2012.

MESFIN, Y. et al. Antibiotic resistance genes in food systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 146, p. 104-116, 2024.

MESGARAN, M. D.; ALIZADEH, A.; HAMEDANI, A. Application of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics for monitoring antibiotic residues in milk. **Food Chemistry**, v. 320, 126635, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126635

METROHM. **Milk powder analysis by near-infrared spectroscopy (Application Note AN-NIR-123)**. Metrohm AG, 2025.

MUNAWAR, A. et al. PLS regression applied to food spectroscopy. **Food Analytical Methods**, v. 17, p. 1203-1216, 2024.

MURRAY, C. J. L. Global burden of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 399, p. 629-655, 2022.

NICOLAI, B. M. et al. NIR spectroscopy in food analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 1-12, 2007.

OECD; FAO. **OECD-FAO agricultural outlook 2025–2034**. Paris/Rome: OECD Publishing, 2025.

OKKER, H. et al. Tissue distribution of ceftiofur metabolites. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, p. 123-130, 2002.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations**. London: Review on Antimicrobial Resistance, 2014.

OSBORNE, B. G.; FEARN, T.; HINDLE, P. H. **Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis**. Harlow: Longman Scientific & Technical, 1993. 227 p. ISBN 978-0582053530.

OZCAN, M. M. et al. Application of near-infrared spectroscopy for detection of contaminants in milk. **Food Chemistry**, v. 318, 126475, 2020.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: a mature analytical technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 8-36, 2018.

RAM, A. et al. Occurrence of antimicrobial residues and resistance risks in powdered milk. **Food Control**, v. 156, 110092, 2025.

REBIAI, R. et al. Chemometrics in food authentication. **Food Chemistry**, v. 344, 128587, 2021.

REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009. On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**, L15, p. 1-72, 2010.

RINNAN, Å.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009. DOI: 10.1016/j.trac.2009.07.007

REPORTLINKER. **Global milk production and dairy market outlook**. Lyon: ReportLinker, 2025.

ROBLES-JIMENEZ, L. et al. Worldwide traceability of antibiotic residues from livestock in wastewater and soil: A systematic review. **Animals**, v. 12, n. 1, 2022.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for rapid authentication of food. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 467-483, 2011.

RODRÍGUEZ-PULIDO, F. J. et al. Application of NIR spectroscopy and PLS-DA to classify olive oils according to their geographic origin. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1630-1635, 2013.

ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C. Application of FTIR spectroscopy. **Food Research International**, v. 44, p. 295-300, 2011.

SACHI, S. et al. Antibiotic residues in milk: a global perspective. **Food Control**, v. 96, p. 32-44, 2019.

SAJI, Rakendhu et al. Application of FTIR spectroscopy in dairy products: A systematic review. **Food and Humanity**, v. 2, p. 100239, 2024. DOI: 10.1016/j.foohum.2024.100239

SALEEM, M. Milk quality and composition. **Dairy Science & Technology**, v. 105, p. 1-15, 2025.

SANTANA, L. R.; FREITAS, A. G. M.; FERNANDES, S. A. A. Application of FTIR spectroscopy and machine learning for detection of ivermectin residues in milk. **Ciência Rural**, v. 55, e20240215, 2025. DOI: 10.1590/0103-8478cr20240215

SANTOS, R. C.; FONSECA, L. M.; PIRES, C. A.; PEREIRA, D. B. C. Evaluation of milk powder by FTIR spectroscopy and chemometrics. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 441-448, 2013.

SANTOS, R. B. et al. Application of NIR spectroscopy and chemometrics for milk quality assessment. **Food Analytical Methods**, v. 14, p. 2150-2160, 2021.

SANTOS-RIVERA, A. et al. Historical development of near-infrared spectroscopy in food analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 1-15, 2021.

SACHI, S.; FERDOUS, J.; SIKDER, M. H.; HUSSANI, S. M. A. K. Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 6, n. 3, p. 315-332, 2019.

SCHADT, H. Mastitis and milk quality. **Journal of Dairy Research**, v. 90, p. 1-9, 2023.

SIESLER, H. W. et al. **Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 978-3527295946.

SMITH, G. W.; GEHRING, R.; RIVIERE, J. E.; YEATTS, J. L.; BAYNES, R. E. Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride after intramammary administration in lactating dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 11, p. 1827-1830, 2004. DOI: 10.2460/javma.2004.224.1827

SANTOS, M. C. et al. UV-Vis spectroscopy and chemometrics in the food authentication domain: A review. **Food Research International**, v. 158, p. 111523, 2022. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111523

SILVA, J. A. et al. Resíduos de antibióticos no leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, p. 45-52, 2011.

SIQUEIRA, K. B.; NETO, R. S. Mercado de leite em pó no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 59, e249123, 2021.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J.; DEBROY, C. Detection of adulteration in milk using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3153-3161, 2002. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74368-4

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 7. ed. Boston: Cengage Learning, 2017.

SOZZI, G. Chemometrics and data fusion in food science. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 177, 117474, 2025.

SUFRIADI, E. et al. Partial Least Squares-Discriminant Analysis Classification for Detection of Adulteration of Patchouli Oil Using FTIR Spectroscopy. **ACS Omega**, v. 8, n. 12, p. 11234-11243, 2023. DOI: 10.1021/acsomega.3c00080

TEIXEIRA, C. M.; BARROS, D. C.; SILVA, F. G. Limitations of principal component analysis in the detection of low concentrations in complex biological samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 230, 118051, 2020.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dairy outlook**. Washington, DC: USDA, 2024.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Global dairy production and trade**. Washington, DC: USDA, 2025.

VAN DE VOORT, F. R.; SEDMAN, J.; EMO, G.; ISMAIL, A. A. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for routine analysis of milk. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 1, p. 28-35, 2001.

VASCO, D. S. et al. Influence of lactation stage on the pharmacokinetics of ceftiofur in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 107, p. 1-12, 2024.

WANG, B.; XIE, K.; LEE, K. Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods: Sample Preparation and Analytical Methods. **Foods**, v. 10, n. 3, art. 555, 2021.

WANG, J. et al. Pharmacokinetics of ceftiofur in dairy cows. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, p. 1-10, 2018.

WANG, X. et al. Advances in PCA and discriminant analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 231, 104703, 2024.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of veterinary drug residues in food**. Rome: WHO, 2011.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global antimicrobial resistance and use surveillance**. Geneva: WHO, 2023.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

YAN, H. Recent advances in spectral preprocessing for multivariate analysis: A comprehensive review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 256, p. 105321, 2025. DOI: 10.1016/j.chemolab.2024.105321

ZHANG, Y. et al. PCA-based discrimination of food matrices. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 220-231, 2020.