

Análise de Resíduos de Diclofenaco Sódico Veterinário em Leite por Espectroscopia no Infravermelho Próximo

Analisis Of Residues Of Veterinary Sodium Diclofenac in Milk through Near Infrared Spectroscopy

LEANDRO DA CONCEIÇÃO LUIZ^{1*}
MARIA JOSÉ VALENZUELA BELL²
RONEY ALVES DA ROCHA³
THIAGO DE OLIVEIRA MENDES⁴
VIRGÍLIO DE CARVALHO DOS ANJOS⁵

RESUMO

Introdução: O leite é um dos alimentos mais consumidos no mundo, principalmente por crianças e idosos. Em 2007, a Polícia Federal realizou uma operação que apontou um gigantesco esquema de fraudes em leites comercializados no Brasil, constatou-se ainda que 1/3 do leite consumido no Brasil não passava por fiscalização. Muitas são as adulterações: adição de água, soda cáustica, cloreto de sódio, entre outros. No entanto, ainda há outro problema, o da contaminação por fármacos veterinários. Estes podem estar presentes em altas concentrações no leite caso este tenha sido ordenhado dentro do período de carência da vaca. O leite contaminado pode causar sérios danos à saúde do consumidor ou então causar prejuízos para a produção de seus derivados. **Objetivo:** Desenvolver uma técnica complementar para detectar a presença de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leites. **Material e Métodos:** Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico há muitas técnicas de análise multielementar que permitem estudar os componentes químicos de determinadas amostras. O presente trabalho utiliza a técnica de Espectroscopia no Infravermelho Próximo por Transformada de Fourier FT-NIR e a Análise de Componentes Principais PCA para detectar a presença de resíduos do medicamento veterinário em leites. Para isto, simulou-se adulteração do leite com percentuais de (0,1; 0,5 e 10)% de fármaco no leite. **Resultados:** Crioscopia: 0,539 °H com 0,18% de água; leite não ácido pelo teste de Alizarol; pH 6,71; Gordura: 3,25%; Proteína: 3,01%; Lactose: 4,55%; Sólidos: 10,80%. Resíduos do fármaco foram observados via derivada primeira de espectros de refletância, e análise de PCA em níveis inferiores a 1%. **Conclusão:** o sistema FT-NIR pôde detectar os resíduos dos fármacos estudados dentro dos percentuais simulados.

DESCRITORES

Leite. Fármaco. Diclofenaco. Espectroscopia de Luz Próxima ao Infravermelho.

ABSTRACT

Introduction: Milk is one of most consumed food by human beings, especially children and elderly. In 2007, the Federal Police conducted an operation that showed an enormous fraud scheme in industrialized milk in Brazil. In addition, they found out that 1/3 of the milk consumed in Brazil did not pass by inspection. There are several ways to adulterate milk, such as with addition of water, caustic soda, sodium chloride and others. However, there is another issue, that is, milk contamination with veterinary drugs. These drugs may be present in high concentrations in milk, in case the cow was milked in the clearance period. Contaminated milk can cause damages to consumers' health or injury to the production of derivatives. **Objective:** To develop a complementary technique to detect the presence of residues of veterinary drugs in milk samples. **Material and Methods:** currently, given the technological development, there are many techniques based on multielement analysis for studying the chemical components of different samples. This paper uses the technique of Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy and the Principal Components Analysis (PCA) to detect the evidence of residues of veterinary drugs in milk. To this end, we simulated adulteration in milk with percentages of 0.1%, 0.5% and 10% drugs in milk. **Results:** cryoscopy: 0.539 °H with 0.18% water; non-acid milk according to Alizarol test; pH 6.71; Fat: 3.25%; Protein: 3.01%; Lactose: 4.55%; Solids: 10.80%. Drug residues were observed via the first derivative of reflectance spectra and PCA analysis at levels below 1%. **Conclusion:** The result was positive indicating that the FT-NIR system can detected the residues of studied drugs within the simulated percentage.

DESCRIPTORS

Milk. Drug. Diclofenac. Spectroscopy, Near-Infrared.

- 1 Professor Adjunto do Curso de Farmácia da Faculdade Bezerra de Araújo (FABA). Doutorando em Física pelo Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG, Brasil.
- 2 Professora Doutora Associada da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG, Brasil.
- 3 Pós-Doutorando em Física (Espectroscopia e Análise de Fraudes em Alimentos) na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG, Brasil.
- 4 Doutorando em Física na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG, Brasil
- 5 Professor Doutor Associado da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG, Brasil.

O leite está presente na vida do ser humano desde o seu nascimento, sendo, geralmente, o primeiro alimento. Em sua composição ele apresenta diversos componentes, tais como proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais (principalmente o cálcio), sendo considerado uma das mais completas fontes de nutrientes para os seres humanos^{1,2}. Por ser um alimento muito consumido, especialmente por crianças e idosos, devido ao seu grande valor nutricional, analisá-lo é de grande importância tanto para os consumidores quanto para as indústrias e produtores. Em 2007, foi realizada pela Polícia Federal a operação denominada “Ouro Branco” que teve como objetivo combater crimes contra a saúde pública e relações de consumo³. A operação revelou um gigantesco esquema de fraude na distribuição do leite UHT constatando que 1/3 deste alimento tão consumido no Brasil não passava por fiscalização⁴. Outra preocupação em relação à segurança do leite é o uso de fármacos ou drogas veterinárias nas vacas leiteiras. Sempre que for necessário administrar um medicamento à vaca leiteira, deve-se estar atento para a possibilidade da presença de resíduos no leite. A presença destes é preocupante, pois podem proporcionar consequências à saúde humana, tais como reações alérgicas e tóxicas^{5,2}. O leite contaminado por substâncias químicas, como os fármacos, é considerado adulterado e impróprio para o consumo^{6,2}. Estudos mostraram que o uso inadequado de anti-inflamatórios não somente podem provocar efeitos colaterais tóxicos como também a exposição em longo prazo de fenilbultazona provocou tumores renais em cobaias⁷. Órgãos Públicos se esforçam para tal fiscalização e contam com o auxílio de pesquisas adjacentes. No Brasil, há dois programas nacionais que monitoram a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal. O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) é coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e inclui programas setoriais para análise de carne, leite, ovos, mel e pescado. O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), analisa leites: UHT, em pó e pasteurizado⁸. Há alguns métodos destinados a análise da qualidade do leite, contudo os testes microbiológicos disponíveis são relativamente lentos e inespecíficos para alguns fármacos, como por exemplo, a tetraciclina, enquanto os imunoensaios são muito caros. Já os métodos físico-químicos (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência HPLC e Espectroscopia de Massa) incluem passos complexos, pequenas quantidades de amostras analisadas por unidade de tempo e treinamento de

pessoal⁹. Os métodos empregados para análise de resíduos de fármacos veterinários em leite tendem a priorizar a rapidez do resultado, pois é necessário viabilizar a liberação do lote o mais rapidamente para o processamento¹⁰. A espectroscopia por infravermelho combinada com quimiometria permite analisar matéria-prima sem método demorado de preparação de amostras. Este trabalho apresenta um método que permite analisar a presença de resíduos de medicamentos veterinários em leites. Para isto, simulou-se, em percentuais os resíduos dos medicamentos nas amostras de leite e utilizou-se a técnica de Espectroscopia no Infravermelho Próximo por Transformada de Fourier (FT-NIR) para detectá-los. Finalizando, realizou-se uma Análise de Componentes Principais (PCA) com objetivo de analisar estatisticamente, principalmente os resultados obtidos abaixo de 1%. Pelo fato de ter um baixo percentual de resíduos de fármacos nas amostras analisadas, o que acredita-se estar próximo do real. Esta análise estatística fornece uma melhor observação distintiva dos leites contaminados, quando comparado à análise dos espectros.

Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IR) é uma técnica analítica muito comum usada em diversas áreas. A região infravermelho foi detectada, em 1800 por Sir William Herschell e está situada na faixa de número de ondas entre 14290 e 200 cm^{-1} do espectro eletromagnético. O IR pode ser subdividido de acordo com seu comprimento de onda em: IR Próximo (14290-4000 cm^{-1}), IR Médio (4000-400 cm^{-1}), IR Térmico (400-200 cm^{-1}) e IR Longínquo (1-500 cm^{-1})¹¹. Ao incidir sobre uma molécula a radiação IR altera os modos rotacionais e vibracionais da mesma. A absorção no infravermelho ocorre quando a frequência da radiação, multiplicada pela constante de Planck, tem o mesmo valor da diferença de energia entre dois estados vibracionais, ou seja, o processo envolve uma ressonância entre a diferença de níveis de energia da molécula e a radiação eletromagnética. A técnica utilizada neste trabalho foi a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR- Near Infrared Spectroscopy). A NIR tem sido adotada e bem aceita nas indústrias farmacêuticas em processos de monitoramento e controle de qualidade de produtos¹².

MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM) do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG.

Amostras

Foi feito um levantamento bibliográfico dos fármacos veterinários de uso frequentes em bovinos, devido às patologias mais comuns, tais como a mastite¹³. Verificou-se que há diversos fármacos disponíveis, os mais comuns são os antimicrobianos e anti-inflamatórios¹⁴. Optou-se por escolher o diclofenaco sódico 225,0 mg por estar entre os mais utilizados, ser mais acessível e por possuir reações adversas severas⁷. Para amostras, utilizou-se o leite pasteurizado tipo “A” integral homogeneizado comercializado na região de Juiz de Fora-MG. Antes de iniciar as medidas no FT-NIR foi feita uma análise da “qualidade” do leite que seria misturado ao fármaco. Então, realizou-se os testes de: crioscopia, alizarol, medida de pH, gordura, proteína, lactose e sólidos com três amostras de leites distintos, porém do mesmo fabricante, com mesmo lote e validade. A tabela I mostra os resultados obtidos. Após verificar que o leite estava em condições ideais, cada amostra foi preparada com percentuais nas seguintes proporções (0,1 e 99,9; 0,5 e 99,5; 10 e 90) % de fármaco e leite, respectivamente.

Análise por Infravermelho

Para análise qualitativa das amostras utilizou-se o equipamento de Espectroscopia no Infravermelho Próximo Analisador FT-NIR Multi Propósito MPA da *Bruker* utilizando o *software OPUS*. Foram realizadas 3 medidas, no modo reflectância, com 32 scans cada, para cada amostra simulada, porém em cada medida as amostras foram preparadas novamente. A análise dos espectros foi feita no *software OriginPro 8*.

Análise de Componentes Principais (PCA)

Com a capacidade dos instrumentos analíticos de produzirem conjuntos de dados cada vez maiores e mais complexos e também com a evolução dos computadores que permitem tratá-los agilmente, houve a necessidade de aplicar métodos estatísticos às análises de laboratórios, principalmente em problemas químicos. O PCA é um algoritmo matemático que permite reduzir a dimensionalidade dos dados, mantendo a maior parte da variação no conjunto de dados. Ele analisa essas reduções por instruções para identificar, chamados de componentes principais, ao longo do qual a variação nos dados é máxima^{15,16}. A análise de componentes principais foi feita através do *software The Unscrambler®* versão 9.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da qualidade do leite

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos para análise preliminar feita nas 3 amostras de leite pasteurizado a fim de verificar se os mesmos estavam dentro dos limites esperados.

As figuras a seguir referem-se aos espectros de Leite, Medicamento e Leite+Medicamento obtidos por FT-NIR. Em determinados percentuais a análise direta através dos espectros não é muito eficiente, então fez-se necessário o uso da derivada primeira para que o espectro se tornasse mais distintivo. Os eixos: horizontal inferior e vertical à esquerda se referem ao espectro de reflectância, já os eixos horizontal superior e vertical à direita se referem à derivada primeira.

TABELA 1: Resultados da análise pré-liminar das 3 amostras de leite pasteurizado.

Crioscopia	T = 0,539 °H ± 0,001 PW = 0,18% ± 0,15
Alizarol	Análise visual: Tonalidade rosado leitoso
Acidez	pH = 6,71 ± 0,02 T = 18.1 °C ± 1.06
Gordura	3,25% ± 0,07
Proteína	3,01% ± 0,02
Lactose	4,55% ± 0,06
Sólidos	10,80% ± 0,12

T= temperatura, PW = percentual de água

Leites e medicamentos puros

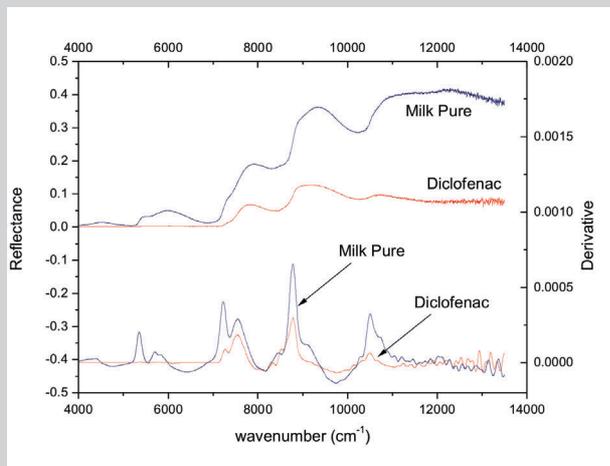


Figura 1. Espectro das amostras individuais de leites e do fármaco puros.

90% de Leite adicionado 10% do fármaco

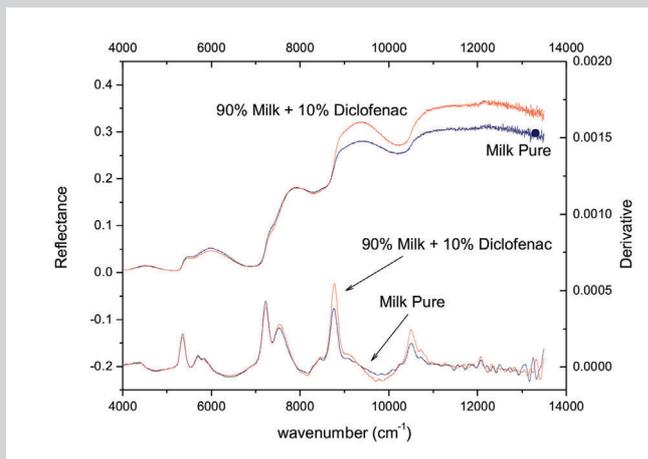


Figura 2. Espectro das amostras com 90% de leite adicionado 10% do fármaco.

99,9% de Leite adicionado 0,1% do fármaco

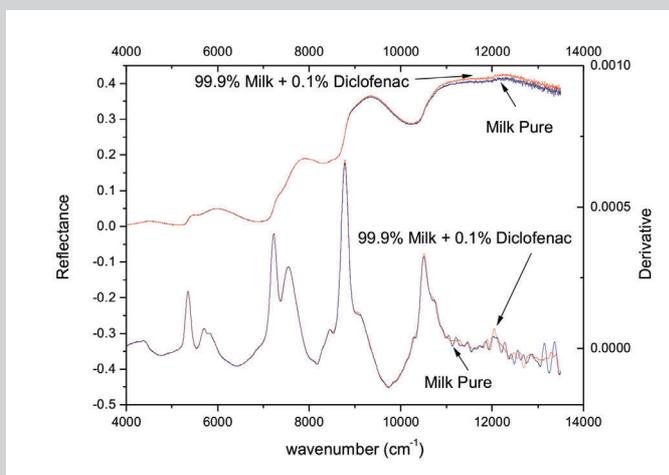
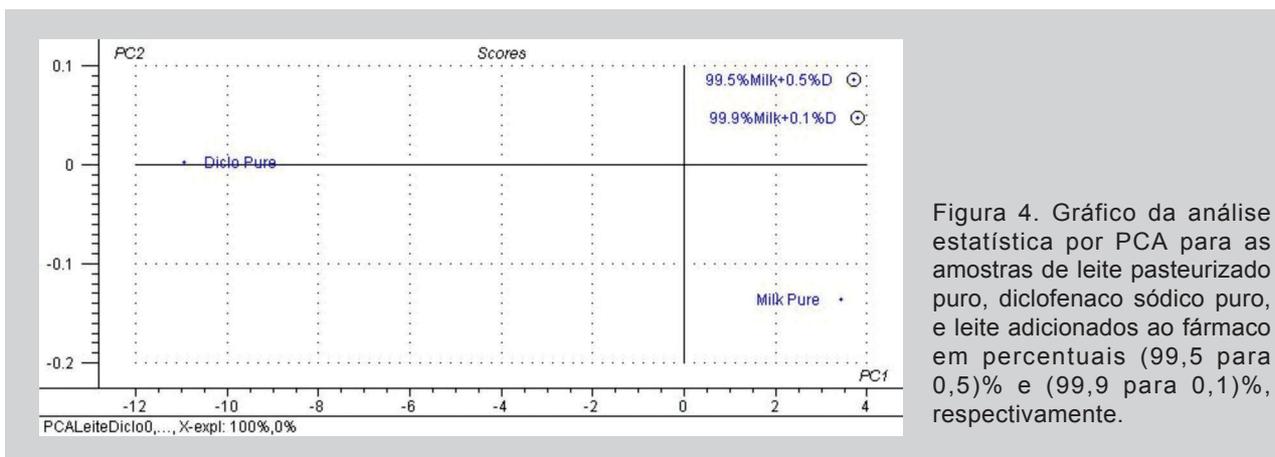


Figura 3. Espectro das amostras com 99,9% de leite adicionado 0,1% do fármaco.



Observando as figuras acima é possível identificar com clareza a presença dos resíduos de diclofenaco sódico nos percentuais analisados, até mesmo em 0,1%, através da derivada primeira. No entanto, em percentuais abaixo de 1% a análise do espectro deve ser mais minuciosa pelo fato das alterações nas linhas espectrais serem muito pequenas. Sendo assim, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) nos percentuais abaixo de 1%. A figura 4 mostra o gráfico dos *scores*, com os dois componentes principais (PC1 e PC2) correspondendo 100% da variância observada. Observa-se que os leites contaminados com resíduos de diclofenaco sódico, mesmo em percentuais pequenos, estão agrupados (marcados) na parte superior do quadrante direito, enquanto o leite pasteurizado puro no direito inferior. Esta distinção é quase que imperceptível no espectro das figuras 2 e 3, e muito pouco no espectro da derivada primeira.

CONCLUSÃO

A análise preliminar feita com as amostras de leite, mostrou que todas elas estavam dentro do padrão aceitável para um leite de ótima qualidade, assim qualquer alteração nos mesmos não prejudicariam as medidas feitas posteriormente.

REFERÊNCIAS

1. Mendes TO. *Espectroscopia FT-MIR e calibração multivariada para determinação simultânea dos teores de gordura, proteínas e lactose e adulterações por adição de água em amostras de leite*, [Dissertação de Mestrado]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora; 2011. p67.
2. Pontes Netto D, Lopes MO, Oliveira MCS, Nunes MP, Machinski Junior M, Bosquirol SL, *et al*. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 2005; 27(1): 145-151.

3. Polícia Federal. Resumo de Operações DPF, 2007. Disponível em: http://www.dpf.gov.br/agencia/estatisticas/2007#Ouro_Branco. Acesso em: 18 de dezembro de 2014.
4. Folha. Soda é misturada no leite há 2 anos, dizem funcionários da Coopervale. Folha on line: 25/10/2007. Disponível em: URL: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u339611.shtml>. Acesso em: 15 de dezembro de 2014.
5. Brito MAVP, Lange CC. Resíduos de antibióticos no leite, Comunicado Técnico 44. *Embrapa*; 2005. Disponível em: URL: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/593157>. Acesso em: 15 de dezembro de 2014,
6. Forsythe SJ. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. 1ªed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2002.
7. Gallo P, Fabbrocino S, Dowling G, Salini M, Fiori M, Perrata G, Serpe L. Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*. 2010; 1217(17): 2832-2839.
8. Pacheco-Silva E, Souza JR, Caldas ED. Resíduos de Medicamentos Veterinários em Leite e Ovos. *Química Nova*. 2014; 37(1): 111-122.
9. Sivakesava S, Irudayara J. Rapid Determination of Tetracycline in Milk by FT-MIR and FT-NIR Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*. 2002; 85(3): 487-49.
10. Maluf RS, Ribeiro AB. Resíduos de Antibióticos em Leite. *SaBios: Revista de Saúde e Biologia*. 2012; 7(1): 30-44.
11. Hecht E. *Óptica*. 2ªed. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian. 2002.
12. Arantes JFM. *Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de ivermectina em medicamentos veterinários* [Dissertação de Mestrado]. São Paulo. Universidade Estadual de Campinas; 2011. p133.
13. Costa EO. *Uso de antimicrobianos na mastite*. In: Spinosa HS, Górnaiak SL, Bernardi MM. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 3ª ed Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2002.
14. Vieira TSWJ, Ribeiro MR, Nunes MP, Machinski M, Pontes-Netto D. Detecção de Resíduos de Antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*. 2012; 33(2): 791-96.
15. Ringnér M. What is principal component analysis? *Nature Biotechnology*. 2008; 26 (3): 303-304.
16. Lyra WS, Silva EC, Araújo MCU, Fragoso WD. Classificação Periódica: Um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. *Química Nova*. 2010; 33(7): 1594-1597.

Correspondência

Leandro da Conceição Luiz
 Estrada do Tinguí, 3245, Condomínio Garça Branca, casa
 15, Campo Grande
 Rio de Janeiro – Rio de Janeiro - Brasil
 CEP 23065-010.
 E-mails: mrleandroluiz@hotmail.com/
leandro.dfnae@bol.com.br