

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química



UNICAMP

**“EMPREGO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA A
ANÁLISE DIRETA DE TETRACICLINAS EM LEITE BOVINO”**

- Dissertação de Mestrado -

Tiago Pucca Araujo

Orientador: Prof. Dr. Ronei J. Poppi

Campinas
Maio de 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Ar15e	Araujo, Tiago Pucca. Emprego de espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos para a análise direta de tetraciclina em leite bovino / Tiago Pucca Araujo. -- Campinas, SP: [s.n], 2007. Orientador: Ronei Jesus Poppi. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Quimiometria. 2. Infravermelho. 3. Leite bovino. 4. Tetraciclina. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	--

Título em inglês: Application of infrared spectroscopy and chemometric methods for direct analysis of tetracyclines in bovine milk

Palavras-chaves em inglês: Chemometrics, Infrared, Bovine milk, Tetracyclines

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (orientador), Profa. Dra. Ieda S. Scarmínio (UEL), Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi, Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder

Data de defesa: 25/05/2007

Aprendendo a viver

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão. Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais. Descobre que se levam anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.

Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens. Poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso. Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel. Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo. Aprende que com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. Aprende que nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar. E que realmente a vida tem valor e que VOCÊ tem valor diante da vida!

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

· À minha família: aos meus amados pais Antônio e Angélica (fundamentais), a minha grande irmã Mariana, ao Paçoca e avós Carmem e Júlia, ao avô Oliveiros (em memória), à minha madrinha Jandira e primo Guilherme, pelo apoio e incentivo;

· À minha amada namorada Heloísa, pelo incentivo, carinho e suporte, imprescindível para a concretização deste trabalho;

· Aos amigos: Costelinha, Maurício Mikai e Renato Cesquini pelo companheirismo e incentivo;

· Ao Prof. Dr. Ronei J. Poppi pelo enorme apoio, amizade, paciência e pela oportunidade de realização deste trabalho;

· Ao Professor Félix Reyes pelo suporte e conselhos;

· Aos colegas do LAQQA: Alessandra Borin, Luiz Carlos Moutinho Pataca, Danilo Althmann Maretto, Jez William Batista Braga, Marcelo Garcia Trevisan, Gilmore Antônio da Silva, Patrícia Valderrama, Paulo Henrique Março, Luciana Viviani e todos que por lá passaram e que porventura não citei, mas foram igualmente importantes para esta jornada;

· Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à FAPESP, processo 04/05489-9, pelo financiamento no início deste projeto;

· Ao Estado de São Paulo e à Unicamp por conceder a base intelectual e tecnológica para este trabalho e, finalmente,

· À todos os Professores, Funcionários e Colegas do Instituto de Química da Unicamp, que contribuíram, direta ou indiretamente, para o sucesso deste trabalho;

SÚMULA CURRÍCULAR

- Informações Pessoais

Tiago Pucca Araujo

Data de Nascimento: 23/08/1981

Nacionalidade: Brasileira

Estado Civil: Solteiro

Naturalidade: Campinas – SP

e-mail: tiagopucca@gmail.com

- Formação

- *Pós-Graduação (2004-2007)*: Mestrado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

- *Curso Superior (2001-2003)*: Graduação em Química Industrial, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

- *Curso Superior (1999-2002)*: Bacharel em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

- *Curso Técnico (1996-1998)*: Técnico em Química, Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antônio Prado” (ETECAP), Campinas-SP.

- Experiência Profissional

07/2005 – atual: Dupont do Brasil S/A – Assistente Técnico Pleno;

01/2005 – 07/2005: Johnson Diversey Brasil Ltda. – Vendedor Técnico I.;

10/2004 – 01/2005: PPG do Brasil – Assistente Técnico Jr.;

01/2003 – 12/2003: Rhodia Poliamida Ltda. – Estágio de Nível Superior.

- Atividades Acadêmicas

02/2000 – 02/2003: UNICAMP - Iniciação Científica, bolsista PIBIQ/CNPq.

Orientador: Prof. Dr. Ulf Schuchardt – Instituto de Química – UNICAMP.

- Participação em Congressos Nacionais

- U. F. Schuchardt, T. P. Araujo, M. Della, “*Oxidação de hidrocarbonetos com peróxidos de hidrogênio catalisada por heteropolianions fosfomolibdatos contendo vanádio*”. 24ª Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, MG.

RESUMO

EMPREGO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA A ANÁLISE DIRETA DE TETRACICLINAS EM LEITE BOVINO

Autor: Tiago Pucca Araujo

Orientador: Dr. Ronei J. Poppi

Este trabalho trata da aplicação de métodos quimiométricos no desenvolvimento de nova metodologia analítica, sem o auxílio de métodos de separação ou pré-concentração, na análise direta de tetraciclina em leite bovino. Para tanto, foram empregados a técnica de espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e os métodos quimiométricos PLS, iPLS e SIMCA.

Foram tomadas amostras de leite desnatado, que foram dopadas com quantidades progressivas de Tetraciclina, Clorotetraciclina e Oxitetraciclina, três dos antibióticos da classe das Tetraciclinas mais comumente usados em medicina veterinária e, portanto, com maior risco de contaminação do leite destinado a consumo humano. Tal dopagem ocorreu de forma a produzir amostras contendo cada uma das tetraciclinas citadas e também amostras contendo a combinação binária das mesmas.

Para amostras dopadas com um tipo de tetraciclina, obteve-se uma matriz com 40 amostras, e uma matriz com 36 amostras para amostras contendo a combinação binária das três tetraciclinas. A faixa espectral utilizada na obtenção dos espectros foi de 900 a 1800 cm^{-1} , correspondente à região do Infravermelho Médio.

O SIMCA foi empregado na identificação de amostras, classificando-as como pertencentes às matrizes citadas. O grau de acerto na classificação foi de 100%.

A partir da identificação das amostras partiu-se para o desenvolvimento do procedimento de quantificação das tetraciclinas em leite utilizando-se o PLS. A faixa de dopagem das amostras foi de 20 a 500 ppb (parte por bilhão), abrangendo uma ampla faixa, inclusive aquela considerada pelas legislações brasileira, americana e união européia, pois inicialmente não se tinha conhecimento do limite de detecção do método. O iPLS foi utilizado para a identificação e seleção da região espectral com melhor correlação com a quantidade de antibiótico presente na amostra.

Os resultados obtidos foram promissores considerando a baixa concentração que se pretendia detectar: para faixas de trabalho acima de 100 ppb os erros de previsão obtidos foram, em média, inferiores a 13% e para a faixa abaixo de 100 ppb foram, em média, inferiores a 18%. Dessa forma, o método desenvolvido, apesar de não ser estritamente quantitativo, atende aos objetivos de detecção rápida, sem pré-tratamento das amostras e geração de resíduos, além de permitir a identificação, em uma amostra desconhecida de leite, do resíduo de tetraciclina presente.

ABSTRACT

JOB OF SPECTROSCOPY IN THE INFRARED AND CHEMOMETRICS METHODS FOR DIRECT ANALYSIS OF TETRACICLINAS IN BOVINE MILK

Author: Tiago Pucca Araujo

Adviser: Dr. Ronei J. Poppi

This work treats of the application of chemometrics methods in the development of new analytical methodology, without the aid of separation methods or pre-concentration, in the direct analysis of tetracycline in bovine milk. For this purpose, it was used the Infrared Spectroscopy with transformed of Fourier (FT-IR) and the chemometrics methods PLS, iPLS and SIMCA.

Samples of skimmed milk were doped with progressive amounts of Tetracycline, Chlortetracycline and Oxitetracycline, three of the antibiotics of the class of Tetracycline more commonly used in veterinary medicine and, therefore, with larger risk of contamination of the milk destined to human consumption. This procedure was adapted to produce samples containing each one of the mentioned tetracycline and also samples containing the binary combination of the same ones.

For samples doped with a tetracycline type, it was obtained a matrix with 40 samples, and a matrix with 36 samples for samples containing the binary combination of the three tetracyclines. The spectral range used for the spectra obtaining was 900 to 1800 cm^{-1} , corresponding to the Medium Infrared region (MIR - Mid Infrared).

The SIMCA method was used in the identification of samples, classifying them as belonging to the mentioned matrix. The success degree in the classification was of 100%.

For the identification of the samples, the next step was the development of the procedure of quantification of the tetracyclines in milk using the PLS method. The range of dope of the samples was from 20 to 500 ppb (parts per billion), including a wide range, considered by the Brazilian legislations, American and European Union, because initially there was not knowledge of the limit of detection of the method. The iPLS was used for the identification and selection of the spectral range with better correlation with the amount of presented antibiotic in the sample.

The obtained results were promising considering the low concentration that was intended to detect: for concentration above 100 ppb, the errors obtained were, on average, less than 13% and for concentration below 100 ppb were, on average, less than 18%. In that way, the developed method, in spite of not being strictly quantitative, assists to the objectives of fast detection, without pre-treatment of the samples and generation of chemical residues, allowing the identification, in an unknown sample of milk, of the residue of present tetracycline.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxi
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	3
1.1- LEITE	3
1.2 - TETRACICLINAS.....	4
1.3 - RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	6
1.4 - EFEITOS TÓXICOS PROMOVIDOS POR AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	7
1.5 - LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO.....	8
1.5.1 - MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NO LEITE	10
1.6 - OBJETIVOS.....	12
CAPÍTULO II – ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	15
2.1. HISTÓRICO	15
2.2. APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	16
2.3. PRINCÍPIOS DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	18
2.4. ESPECTROSCOPIA DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR)	22
2.5. INSTRUMENTOS PARA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	24
2.5.1. ESPECTROFOTÔMETRO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	25
CAPÍTULO III – MÉTODOS DE ANÁLISE MULTIVARIADA	31
3.1. QUIMIOMETRIA	31
3.2. ORGANIZAÇÃO DOS DADOS.....	32
3.3. PRÉ-TRATAMENTO DOS DADOS	34
3.3.1. FILTRO DE SAVITSKY-GOLAY.....	34
3.3.2. NORMALIZAÇÃO	35
3.3.3. DADOS CENTRADOS NA MÉDIA	35
3.3.4. APLICAÇÃO DE DERIVADA.....	36
3.4. OS MÉTODOS DE ANÁLISE MULTIVARIADA	36
3.4.1. ANÁLISE EXPLORATÓRIA.....	37
3.4.2. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	37
3.4.2.1. CONCEITOS MATEMÁTICOS.....	39
3.4.3. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	41
3.5. MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS – PLS.....	42
3.5.1. ESCOLHA DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.....	46
3.5.2. CÁLCULO DOS ERROS	47
3.5.3. PREVISÃO DO MODELO DE CALIBRAÇÃO.....	47
3.6. MÉTODO DE SELEÇÃO DE VARIÁVEIS	52

3.7. CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS.....	55
<u>CAPÍTULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL</u>	<u>61</u>
4.1 - APARATOS.....	61
4.2 - REAGENTES E SOLUÇÕES.....	61
4.3 - SOLUÇÃO ESTOQUE DE TETRACICLINA	61
4.4 - SOLUÇÃO DE TRABALHO DE TETRACICLINA	62
4.5 - AMOSTRAS.....	62
4.6 - PRÉ-TRATAMENTO DOS ESPECTROS OBTIDOS.....	62
4.7 - PROCEDIMENTO	63
4.7.1 - AMOSTRAS DE LEITE CONTENDO APENAS UM TIPO DE TETRACICLINA	63
4.7.2 - AMOSTRAS DE LEITE CONTENDO DOIS TIPOS DE TETRACICLINA.....	64
<u>CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>69</u>
5.1 - LEITE	69
5.2 - TETRACICLINA EM LEITE	70
5.3 - CLASSIFICAÇÃO DAS TETRACICLINAS.....	71
5.4 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TETRACICLINA (TC).....	73
5.5 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLOROTETRACICLINA (CTC)	76
5.6 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE OXITETRACICLINA (OTC).....	77
5.7 - DETERMINAÇÃO DA SOMA DE TC E CTC	78
5.8 - DETERMINAÇÃO DA SOMA DE TC E OTC	78
5.9 - DETERMINAÇÃO DA SOMA DE CTC E OTC	79
<u>CONCLUSÃO.....</u>	<u>83</u>
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>87</u>

LISTA DE ABREVIATURAS

CV – Validação Cruzada (do inglês, Cross validation).

IPLS – Mínimos Quadrados Parciais por Intervalo (do inglês, Interval Partial Least Squares).

MSEC – Erro Médio Quadrático da Calibração (do inglês, Mean Square Error of Calibration).

MSECV – Erro Médio Quadrático da Calibração estimado por Validação Cruzada (do inglês, Mean Square Error of Cross validation)

MIR – Infravermelho Médio (do inglês, Middle Infrared).

NIPALS – Nonlinear Iterative Partial Least Squares

NIR – Infravermelho Próximo (do inglês, Near Infrared).

ppb – Parte por bilhão.

PC – Componente Principal (do inglês, Principal Component).

PCs – Componentes Principais (do inglês, Principal Components).

PCA – Análise de Componentes Principais (do inglês, Principal Components Analysis).

PCR – Regressão por Componentes Principais (do inglês, Principal Component Regression).

PLS – Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, Partial Least Squares).

RMSEC – Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Calibração (do inglês, Root Mean Square Error of Calibration).

RMSECV – Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada (do inglês, Root Mean Square Error of Cross Validation).

RMSEP – Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão (do inglês, Root Mean Squares Error of Prediction).

VL – Variável Latente.

VLs – Variáveis Latentes.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MÉTODOS DE ANÁLISE E LIMITES DE DETECÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EM LEITE.....	12
TABELA 2 - LIMITES APROXIMADOS PARA AS REGIÕES DO INFRAVERMELHO.....	16
TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE TETRACICLINA EM CADA AMOSTRA DE LEITE E QUANTIDADE DE METANOL ADICIONADA POR AMOSTRA.....	64
TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO DE TETRACICLINAS EM CADA AMOSTRA DE LEITE E QUANTIDADE DE METANOL ADICIONADA POR AMOSTRA.....	66
TABELA 5 - ERROS DE PREVISÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE TC.	75
TABELA 6 - ERROS DE PREVISÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE CTC.....	76
TABELA 7 - ERROS DE PREVISÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE OTC.....	77
TABELA 8 - ERROS DE PREVISÃO PARA A DETERMINAÇÃO DA SOMA DE TC E CTC.....	78
TABELA 9 - ERROS DE PREVISÃO PARA A DETERMINAÇÃO DA SOMA DE TC E OTC.....	79
TABELA 10 - ERROS DE PREVISÃO PARA A DETERMINAÇÃO DA SOMA DE CTC E OTC.....	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURAS MOLECULARES DOS ANTIBIÓTICOS DO GRUPO DAS TETRACICLINAS .	
FIGURA 2 - DIAGRAMA DE ENERGIA POTENCIAL. (1) OSCILADOR HARMÔNICO, (2) OSCILADOR ANARMÔNICO ³⁵	21
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA ATR.	23
FIGURA 4 - COMPONENTES BÁSICOS DE UM EQUIPAMENTO QUE OPERA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ³⁵	24
FIGURA 5 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DO INTERFERÔMETRO DE MICHELSON ³⁵	26
FIGURA 6 – MATRIZ DE DADOS X.	32
FIGURA 7 – ORGANIZAÇÃO DOS DADOS EM UMA MATRIZ A PARTIR DE ESPECTROS NO INFRAVERMELHO.	33
FIGURA 8 – GRÁFICO DOS DADOS NUM SISTEMA BIDIMENSIONAL (CP1 E CP2).	38
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DA DECOMPOSIÇÃO DA MATRIZ DE DADOS X.	40
FIGURA 10 - DECOMPOSIÇÃO EM VARIÁVEIS LATENTES DAS MATRIZES X E Y PARA MODELOS PLS.....	44
FIGURA 11- REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO PLS.	45
FIGURA 12 - GRÁFICO DO MODELO IPLS DO NÚMERO DE INTERVALOS VERSUS RMSECV..	54
FIGURA 13 - GRÁFICOS DO MODELO IPLS: FAIXA ESCOLHIDA PARA A CONSTRUÇÃO DO MODELO PLS.	55
FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UMA MATRIZ COM TRÊS COLUNAS E DIVIDIDA EM DUAS CLASSES.....	58
FIGURA 15 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DE LEITE PURO USANDO ÁGUA COMO REFERÊNCIA.....	69
FIGURA 16 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DE LEITE DESNATADO DOPADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TETRACICLINA (TC).....	70
FIGURA 17 – MODELO SIMCA PARA CADA UMA DAS CLASSES EM ESTUDO. SEPARAÇÃO VISUALIZADA EM TERMOS DE Q E T ²	72
FIGURA 18 - GRÁFICO DE BARRAS DO RMSECV PARA CADA INTERVALO.	74
FIGURA 19 - REGIÃO ESPECTRAL SELECIONADA PELO IPLS.	75
FIGURA 20 - A) SELEÇÃO DA REGIÃO ESPECTRAL; B) REGIÃO ESPECTRAL ESCOLHIDA PARA OS CÁLCULOS.	76
FIGURA 21 - A) SELEÇÃO DA REGIÃO ESPECTRAL; B) REGIÃO ESPECTRAL ESCOLHIDA PARA OS CÁLCULOS.	77

CAPÍTULO I

TETRACICLINA

Capítulo I – INTRODUÇÃO

1.1- Leite

O leite é um fluído biológico complexo, cuja composição e propriedades físico-químicas variam de uma espécie a outra. O leite é composto principalmente por água, além de lipídeos, proteínas e carboidratos. Encontra-se também no leite pequenas quantidades de minerais e outros componentes lipo e hidrossolúveis que são secretados diretamente do plasma sanguíneo, como proteínas sanguíneas e intermediários da síntese mamária.¹

O leite ocupa lugar de destaque quanto à segurança alimentar.¹ Segundo a EMBRAPA, o consumo per capita brasileiro de leite é de 122,6 litros/habitante/ano.²

As infecções no úbere bovino, mesmo que sub-clínicas, induzem a diminuição da concentração de gordura, lactose e caseína, e o aumento no conteúdo de proteínas do soro e de cloretos.³ Em função dessas infecções, os agentes antimicrobianos têm sido bastante utilizados nas criações de bovinos e até em muitos casos, e maneira indiscriminada, seja para fins terapêuticos, principalmente visando à cura da mastite, ou ainda incorporados à alimentação animal como suplemento dietético, visando à promoção do crescimento dos animais.^{4,5} Estes procedimentos podem conduzir à presença de resíduos desses medicamentos, representando um risco à saúde do consumidor sendo, portanto, um sério problema na área econômica e de saúde pública.⁶

Agentes antimicrobianos têm sido utilizados na pecuária por várias décadas, e são administrados por infusão no úbere da vaca para o tratamento de mastite, por injeção parenteral (intramuscular e subcutânea) e intravenosa para o tratamento de diversas doenças, por via oral para o tratamento de enfermidades ou no aparelho genital, no caso de infecções vaginais, cervical e uterina. Diante de tais usos, quando o período de carência não é respeitado, pode haver contaminação do leite destinado a consumo humano com resíduos de agentes antimicrobianos.

A mastite tem sido mundialmente considerada a doença de maior impacto nos rebanhos leiteiros devido à elevada prevalência e aos prejuízos econômicos provocados.⁷

A presença de agentes antimicrobianos no leite, em pequenas quantidades, tem causado problemas na indústria de laticínios, tais como: coagulação inadequada do leite e maturação imprópria de queijos; diminuição de acidez e produção de *flavour* durante a manufatura de manteiga e produtos similares; diminuição do crescimento de fermento lácteo; mascaramento/alteração de resultados em testes de controle de qualidade.⁸ Estes fatos podem gerar produtos de qualidade inferior, que devem ser descartados, ocasionando elevado custo na limpeza dos equipamentos e desperdício de tempo.⁹

Devido à incidência de mastite bovina, durante a elaboração de queijos semi-duros a diminuição no rendimento industrial pode chegar a 4%, ou seja, uma perda final de até 400 kg de queijo para cada 100.000 litros de leite processado, se for considerado o rendimento médio de 1 kg de queijo para cada 10 litros de leite utilizado.¹⁰ As alterações na vida de prateleira (*shelf-life*) ocorrem no leite fluido e em produtos derivados principalmente devido à ação de enzimas proteolíticas, na maioria das vezes termoestáveis, permanecendo ativas mesmo após os processos usuais de pasteurização do leite.^{11,12}

1.2 - Tetraciclina

As Tetraciclina são classificadas como antibiótico de largo espectro de ação antimicrobiana e de preço acessível. Atuam sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, Clamídias, Riquétsias e até sobre alguns protozoários. Por estas razões as Tetraciclina são amplamente usadas em medicina veterinária para prevenir e tratar diversas doenças bem como promover o crescimento de rebanhos.¹³

A primeira tetraciclina descoberta foi a aureomicina, obtida em 1948, a partir de culturas de *Streptomyces aureofaciens*. O antibiótico recebeu nesta época o nome de aureomicina devido à coloração do fungo produtor. Dos grupos dos antibióticos pertencentes à classe das tetraciclinas, três deles são obtidos naturalmente por fermentação de determinados fungos, e os demais por processo semi-sintético.¹⁴

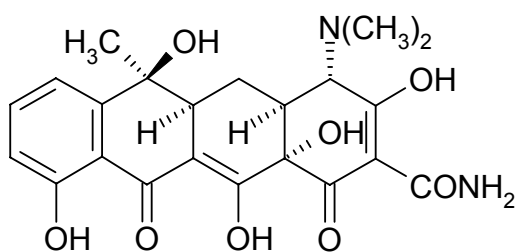
Após a absorção, as tetraciclinas distribuem-se amplamente pelo organismo, atingindo concentrações significativas na pele, pulmão, rins, músculos, fígado, globo ocular e líquidos orgânicos, podendo difundir-se pela placenta.¹⁵

Esses agentes antimicrobianos são secretados no leite pelo processo de difusão, principalmente os compostos de pronunciada lipossolubilidade. Portanto, devido a diferença de pH existente entre plasma e leite, eletrólitos fracos como as tetraciclinas podem se concentrar mais no leite que no plasma.¹⁶

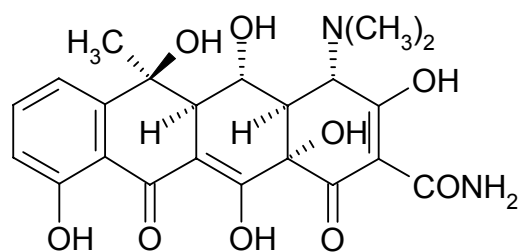
Dos oito tipos comercialmente disponíveis, a clorotetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC) e Tetraciclina (TC) são mais comumente aplicadas em animais a serem destinados a consumo humano.¹³

Geralmente, as tetraciclinas quando administradas por via intramuscular são bastante irritantes e provocam intensa dor local. Assim, somente algumas preparações de oxitetraciclina para uso veterinário são administradas por esta via. As doses orais terapêuticas não são indicadas para ruminantes e cavalos, devido às possíveis rupturas do rumem e alterações da microflora intestinal, embora as doses sub-terapêuticas sejam bem toleradas. As vias mais apropriadas para bovinos são a intravenosa ou a intramamária.¹⁷ Quando administradas na dose de 20 mg kg^{-1} as tetraciclinas são capazes de manter uma ótima concentração bactericida durante 3 dias, com um período mínimo de descarte de leite de 4 dias, após a última aplicação.¹⁷

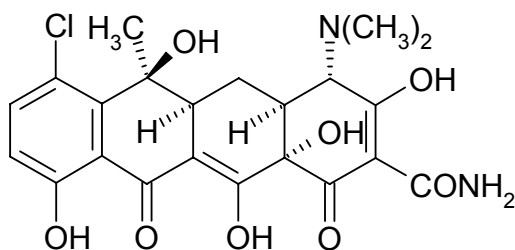
A figura 1 mostra a estrutura dos principais tipos de tetraciclinas usadas na medicina veterinária:



a) Tetraciclina - TC



b) Oxitetraciclina - OTC



c) Clorotetraciclina - CTC

Figura 1 - Estruturas moleculares dos antibióticos do grupo das tetraciclina

1.3 - Resistência Bacteriana

O uso de agentes antimicrobianos tem se tornado uma prática comum no tratamento de infecções bacterianas, tanto em seres humanos quanto em animais.

Determinados agentes antimicrobianos usados em animais, para o tratamento de enfermidades, ou como aditivos em rações animais (doses subterapêuticas), como promotores de crescimento, são também usados para o controle de doenças em medicina humana. O uso destes medicamentos ocasiona uma seleção de bactérias resistentes.¹⁸ Bactérias que eram antes destruídas por ação da penicilina, agora resistem aos mais potentes antibióticos; além disso, as bactérias restritas ao ambiente hospitalar agora estão atuando fora de tais ambientes. Entre as causas desse descontrole destaca-se o uso indiscriminado de antibióticos. Como consequência, tanto medicamentos

considerados clássicos no arsenal terapêutico, como aqueles de introdução recente no comércio, vem se tornando ineficientes. Tal quadro tende a se agravar, principalmente quando se trata de patógenos que infectam tanto animais quanto seres humanos.^{19,20}

A presença de agentes antimicrobianos no leite pode ocasionar a seleção de cepas bacterianas resistentes, além de que a ingestão de resíduos antimicrobianos presentes nos alimentos representa risco à saúde humana, seja exercendo pressão seletiva sobre a flora intestinal, ou favorecendo o crescimento de microorganismos com resistência natural ou adquirida.²¹

Em pesquisa desenvolvida por VASSIL (1999)²², foram avaliadas 320 linhagens de *S. aureus* isoladas de alimentos, inclusive leite, e verificou-se que 27% das amostras foram resistentes a inúmeros antibióticos, ocorrendo com maior frequência para a penicilina (22,5%) seguida da streptomina (14,7%), tetraciclina (7,2%) e ampicilina (6,9%).

A prática de adição de tetraciclina em rações animais para aumentar a taxa de crescimento dos mesmos tem sido largamente criticada, e já causou infecções resistentes em fazendeiros que estiveram em contato direto com os animais e em pessoas que trabalham em matadouros. Por este motivo, países como a Grã-bretanha proíbem o uso das tetraciclins em rações para animais.²³

1.4 - Efeitos tóxicos promovidos por agentes antimicrobianos

Um dos mais importantes efeitos adversos causados por resíduos de agentes antimicrobianos em humanos é a alergia. Muitos medicamentos veterinários induzem reações tipo alérgicas e a maioria dos dados disponíveis estão relacionados à hipersensibilidade a penicilinas, aminoglicosídeos e tetraciclins.⁹

A maioria dos antibióticos administrados em mulheres durante a lactação pode ser detectada no leite materno. As concentrações de tetraciclina no leite correspondem a cerca de 70% das concentrações séricas maternas, estando

associadas a um risco de pigmentação dos dentes do lactente, causando com grande frequência manchas amareladas ou castanhas. Se as doses forem elevadas ou administradas por muito tempo, pode-se observar hipoplasia do esmalte com predisposição às cáries.²³

Resíduos de agentes antimicrobianos de amplo espectro têm sido encontrados com frequência em diversos alimentos de origem animal, porém o leite parece ser o único desses alimentos no qual tais resíduos têm causado reações alérgicas a indivíduos previamente sensibilizados imunologicamente. Reações tóxicas não foram observadas em indivíduos consumidores de outros tipos de alimentos contaminados com resíduos de antibióticos, porém o desenvolvimento de resistência a esses compostos por bactérias patogênicas, tanto para o homem quanto para o animal, ocorre e é observado com frequência.²³

1.5 - Limite Máximo de Resíduo

O controle de resíduos biológicos, agentes antimicrobianos, agroquímicos e contaminantes ambientais possibilitam a garantia de inocuidade de grande parcela dos alimentos ofertada ao consumidor. Vale destacar que nem todos os medicamentos e compostos químicos a que os animais ficam expostos deixam resíduos perigosos à saúde humana e animal, e mesmo aqueles conhecidos como potencialmente nocivos somente permitem tal condição quando ultrapassam o umbral de concentração conhecido como limite de tolerância, limite de segurança ou limite máximo de resíduo (LMR).²⁹

Esses limites são determinados em centros de comprovada idoneidade científica, a partir de apurados estudos toxicológicos de curto, médio e longo prazo, realizados por pesquisadores em animais de laboratório e microorganismos. Após a conclusão desses estudos, organizações internacionais envolvidas com a saúde pública avaliam os resultados e, posteriormente, recomendam os LMR's dos diferentes compostos aprovados à

consideração dos países membros do Codex Alimentarius – Programa das Nações Unidas sobre harmonização de normas alimentares, gerenciado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e WHO (*World Health Organization*).²⁹

O termo LMR pode ser definido como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de um resíduo de presença indesejada, expresso em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é permitido ou reconhecido como aceitável no alimento. O LMR leva em consideração a ingestão diária aceitável (IDA) para cada composto.^{20,30}

De acordo com avaliação realizada pelo *FDA Center for Veterinary Medicine* (CVM), foi estabelecido que o valor de IDA para resíduos totais de tetraciclina, incluindo oxitetraciclina, clorotetraciclina e tetraciclina, deve ser de 25 mg kg⁻¹ de peso corpóreo. Com base nesta avaliação, o limite de tolerância de 100 ppb foi estabelecido para a soma de resíduos das três tetraciclina (oxitetraciclina, clorotetraciclina e tetraciclina) no leite.³¹

A competência para estabelecer os limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos em alimentos no Brasil, é do Ministério da Saúde e do Ministério da Agricultura, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.²⁰ Para medicamentos veterinários, está sendo utilizado o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB)³², Instrução Normativa / MAA nº 42, de 20/12/1999, instituído pelo Ministério da Agricultura, com o objetivo de sistematizar os meios de controle de contaminação desses produtos por resíduos de compostos de uso na agropecuária,³³ juntamente com a Portaria nº 78 de 19 de dezembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Este programa especifica o medicamento, matriz, métodos de análise, número de amostras, laboratório onde foram realizadas as análises e LMR estabelecido para agentes antimicrobianos. Para tetraciclina em leite, a legislação brasileira atribui o mesmo valor estabelecido pela legislação internacional, ou seja, o limite de tolerância de 100 ppb para a soma de resíduos das três tetraciclina (oxitetraciclina, clorotetraciclina e tetraciclina). Para a

doxiciclina, apesar de haver no mercado medicamento disponível com este princípio ativo para o tratamento da mastite bovina, ainda não foi estabelecido valor de LMR.³⁴

1.5.1 - Métodos para determinação de resíduos de agentes antimicrobianos no leite

Há décadas o problema do uso indiscriminado de agentes antimicrobianos e o desrespeito ao período de carência indicado após a última aplicação do medicamento no animal para utilização do leite para consumo vêm sendo relatado em diferentes pesquisas.²⁴

Dos diversos métodos para identificação e quantificação de tais resíduos em alimentos disponíveis no mercado, duas categorias principais devem ser consideradas:

- **Métodos microbiológicos:** são testes que utilizam uma cultura bacteriana sensível a antibióticos (*B. stearothermophilus*, *S. thermophilus*, *B. subtilis*, cultura de iogurte), com respostas entre 02h30min e 8 h, dependendo da cultura utilizada.

Os testes microbiológicos utilizados (exceto para *B. stearothermophilus*) são normalmente menos sensíveis do que a maioria dos testes rápidos e não atendem às exigências das legislações sobre alimentos, e se baseiam em limites máximos de resíduos ou níveis de segurança.²⁵

- **métodos rápidos:** são testes específicos, podendo ser enzimáticos; por método ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos no soro; por cromatografia, dentre outros.

Dentre os testes acima citados, os métodos microbiológico, enzimático e ELISA permitem a identificação de resíduos de antibióticos, porém são limitados quanto à sua quantificação.

Deve-se considerar que em métodos microbiológicos para a detecção de resíduos de antibióticos em alimentos, depende-se da sensibilidade da cepa

microbiana e do fato que os resíduos nos alimentos estejam parcialmente livres ou complexados à fração protéica, sendo que somente a fração não ligada poderá inibir os microorganismos. Para alguns grupos de agentes antimicrobianos, tais como sulfonamidas e tetraciclinas, a fração ligada à proteína é tão significativa que uma alta taxa de resultados falsos negativos poderá ocorrer em baixas concentrações, ou em concentrações próximas ao limite máximo recomendado.²⁸

A quantificação de resíduos de agentes antimicrobianos envolve a determinação de concentrações muito pequenas, na ordem de mg kg^{-1} ou mg kg^{-1} , o que dificulta os procedimentos analíticos em amostras complexas como alimentos e faz com que a utilização de técnicas cromatográficas seja na maioria das vezes utilizada para tal finalidade.

Dentre as técnicas cromatográficas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais empregada e a que dispõe de maior quantidade de artigos publicados considerando este tipo de análise. Devido às baixas concentrações a serem determinadas, em determinados casos há a necessidade de se concentrar os extratos obtidos para viabilizar a detecção cromatográfica. Dessa forma, concentram-se também os interferentes analíticos co-extraídos, tornando-se necessárias etapas de clarificação desses extratos, normalmente pela utilização de cromatografia preparativa.²⁶

A melhor forma para se monitorar a presença de agentes antimicrobianos no leite seria utilizar um método de triagem para detecção destes compostos, e, em uma segunda fase, um método de confirmação para identificar e quantificar os compostos detectados. O desenvolvimento de tal método é o objetivo deste trabalho.²⁷

Na tabela 1²⁹, estão presentes os nomes de antibióticos detectados em leite e os limites de detecção desses métodos frequentemente utilizados para detecção de tais antibióticos neste alimento.

Tabela 1 - Métodos de análise e limites de detecção de agentes antimicrobianos em leite.

Agentes Antimicrobianos	Princípio de Detecção	Limite de Detecção ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Amoxilina	CLAE	0,01
Ampicilina	CLAE	0,002
Cloranfenicol	CLAE	0,001
	Cromatografia Gasosa (CG)	0,0001
Clorotetraciclina	CLAE	0,015
Cloxacilina	CLAE	0,01
Oxitetraciclina	CLAE	0,015
Penicilina	CLAE	0,005
	Ensaio Radioativo	0,00002
Penicilina G	CLAE	0,005
Sulfadiazina	CLAE	0,005
Sulfametoxina	CLAE	0,005
Sulfametazina	CLAE	0,010
Sulfadiazole	CLAE	0,005
Doxiciclina	CLAE	*
Tetraciclina	CLAE	0,05

* nenhum nível de tolerância e segurança foi estabelecido pelo FDA.

Fonte: Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products (1991)²⁹.

1.6 - Objetivos

Este trabalho tem por objetivo determinar diretamente tetraciclina em leite bovino, em concentrações da ordem de ppb, utilizando calibração multivariada e espectroscopia no Infravermelho. Pretende-se também, dentre amostras de leite contendo um ou mais tipos de tetraciclina, determinar em cada uma delas qual o tipo de tetraciclina presente.

CAPÍTULO II

ESPECTROSCOPIA NO

INFRAVERMELHO

Capítulo II – Espectroscopia no Infravermelho

2.1. Histórico

A espectroscopia compreende o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, cujo principal objetivo é a determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares.

A espectroscopia vibracional divide-se em duas diferentes técnicas: a espectroscopia de absorção no infravermelho e a espectroscopia Raman.^{35,36}

Sir Willian Herschel, um astrônomo, descobriu a radiação Infravermelha em 1800. Sua principal descoberta no campo da astronomia foi o planeta Urano, em 1781, além de várias estrelas e nebulosas.³⁷

Sir Herschel passou a estudar as propriedades físicas da radiação eletromagnética na região do visível, pois acreditava que a compreensão de tais propriedades poderia ajudá-lo em seus estudos a respeito dos corpos celestes.

Sabendo que a luz solar continha todas as cores do espectro e que era também uma fonte de calor, Herschel queria descobrir qual, ou quais, eram as cores responsáveis pelo aquecimento dos objetos. Idealizou um experimento usando um prisma e termômetros com bulbos pretos onde mediu as temperaturas das diferentes cores. Herschel observou um aumento de temperatura à medida que movia o termômetro de violeta para o vermelho no espectro criado pela luz do sol atravessando o prisma. Descobriu que a temperatura mais quente ocorria, de fato, além da luz vermelha. A radiação que causou esse aquecimento não era visível; Herschel denominou essa radiação invisível como “raios caloríficos”.³⁷

A descoberta de Herschel demonstrou existir formas de luz que não podem ser observadas pelo olho humano e abriu caminho para a investigação de outras faixas espectrais como a região do ultravioleta e o infravermelho próximo, médio e distante.³⁷

Nos primórdios, os trabalhos envolvendo espectroscopia no Infravermelho limitavam-se ao estudo de poucas espécies químicas, já que a restrição

instrumental impedia a utilização mais profunda da técnica.³⁸ Inicialmente passou-se a trabalhar com o infravermelho médio na caracterização de bandas de absorção de grupos orgânicos.³⁷

A partir dos anos 70, com o desenvolvimento de equipamentos ópticos e mecânicos mais precisos, como o surgimento de espectrofotômetros com transformada de Fourier, e a evolução da informática e softwares para tratamento dos dados, as aplicações foram ampliadas, e o estudo quantitativo utilizando a região do Infravermelho ganhou espaço.³⁷

A primeira utilização industrial da espectroscopia no infravermelho foi no monitoramento da qualidade e no controle da produção na indústria petroquímica, no período da segunda guerra mundial.³⁹

2.2. Aplicações da Espectroscopia no Infravermelho

A região do espectro correspondente ao infravermelho compreende a radiação com números de onda no intervalo de, aproximadamente, 12800 a 10 cm^{-1} , e pode ser dividido em infravermelho próximo (NIR – do inglês, Near Infrared), médio (MIR – do inglês, Middle Infrared) e distante (FIR – do inglês, Far Infrared). A Tabela 2 apresenta os limites aproximados para cada região³⁵.

Tabela 2 - Limites aproximados para as regiões do Infravermelho

Região	Intervalo de número de onda (ν) – (cm^{-1})	Região em comprimento de onda (λ) – (nm)	Região de frequência (ν) – (Hz)
Próximo (NIR)	12800 – 4000	780 - 2500	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio (MIR)	4000 – 200	2500 - 5000	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante (FIR)	200 – 10	5000 - 100000	$3,8 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

Fonte: Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Princípios de análise instrumental³⁵.

Via de regra, as análises feitas na região do infravermelho não geram subprodutos tóxicos, apresentam simplicidade na preparação de amostras: além de ser um método não destrutivo³⁵. Para as regiões do infravermelho, em geral,

é possível realizar medidas de amostras em todos os estados e formas como, gases, líquidos, sólidos, sistemas binários e terciários como as amostras semi-sólidas, pastas, géis e outras³⁹.

As principais aplicações da região compreendida entre 12800 e 4000 cm^{-1} (NIR), encontram-se na análise quantitativa de materiais industriais e agrícolas e no controle de processos, destacando as aplicações farmacêuticas e petroquímicas.³⁵

A principal desvantagem técnica do uso do NIR é provavelmente, a baixa sensibilidade a constituintes em baixas concentrações, porém fornece resultados de maneira bastante rápida.^{35,37}

A maioria das pesquisas desenvolvidas e o maior número de aplicações encontram-se na região do infravermelho médio. Esta região começou a ser utilizada no final dos anos 50 para a análise qualitativa de compostos orgânicos, devido à grande quantidade de informação que pode ser utilizada para a caracterização funcional dos mesmos. Ainda hoje, a maioria das aplicações do MIR consiste na identificação de compostos orgânicos.³⁵ Existe, nessa região, uma faixa espectral conhecida como região de impressão digital da molécula (1200 a 700 cm^{-1}). Nessa região, pequenas alterações na estrutura de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição dos picos de absorção do espectro. A identificação de compostos pode ser realizada pela comparação do seu espectro MIR com bancos de dados existentes³⁵.

Inicialmente, a utilização do infravermelho distante foi restrita devido a poucas fontes de emissão disponível para este tipo de radiação e, ainda, para essa região, é necessária a utilização de filtros de interferência para evitar que radiações de ordens superiores atinjam o detector. Com o desenvolvimento dos espectrofotômetros com Transformada de Fourier, grande parte do problema encontrado nessa região foi resolvido, tornando a técnica muito mais acessível para o desenvolvimento de aplicações e pesquisas.³⁵

2.3. Princípios da Espectroscopia no Infravermelho

Normalmente, não é possível causar transições eletrônicas em uma molécula incidindo sobre ela radiação infravermelha, já que tal faixa de comprimento de onda não possui energia suficiente para tanto³⁵.

Para que uma molécula possa absorver radiação com comprimento de onda no infravermelho, esta precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. O momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga. Uma molécula que possui essa variação do momento dipolar, ao vibrar sofre uma variação regular do momento dipolar, ocasionando um campo que pode interagir com o campo elétrico associado à radiação infravermelha incidente. Quando a frequência da radiação coincide exatamente com a frequência vibracional natural da molécula, ocorre uma transferência de energia, resultando em uma variação da amplitude da vibração molecular e, conseqüentemente, na absorção de radiação^{35, 39}.

Da mesma forma, a rotação de moléculas assimétricas em torno dos seus centros de massa resulta em uma variação periódica do dipolo que pode interagir com a radiação. Em uma molécula homonuclear, como O₂, N₂ ou Cl₂, nenhuma variação efetiva no momento de dipolo ocorre durante a vibração ou rotação, como consequência, essas substâncias não podem absorver no infravermelho³⁵.

É necessária uma pequena quantidade de energia para causar uma mudança de nível rotacional molecular, da ordem de 100 cm⁻¹. Para um gás, o perfil do espectro no infravermelho consiste normalmente de uma série de linhas aproximadamente espaçadas, isso porque há vários estados rotacionais de energia para cada estado vibracional. Por outro lado, em líquidos e sólidos a rotação de cada molécula está bastante restrita e nestas condições as linhas discretas vibracionais/rotacionais originam bandas vibracionais alargadas³⁵.

As vibrações moleculares são divididas em duas categorias: estiramentos e deformações angulares. A vibração de estiramento corresponde a uma

variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, podendo acontecer de forma simétrica ou assimétrica. As vibrações de deformação angular são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações e podem acontecer no plano ou fora do plano da molécula, de quatro tipos: tesoura (do inglês *scissoring*), balanço (*rocking*), sacudido (*wagging*) e torção (*twisting*). Além dos tipos de vibrações citados, interações ou acoplamentos de vibrações podem ocorrer se as vibrações envolvem ligações de um mesmo átomo central, resultando na alteração das características das vibrações envolvidas^{35,36}.

É possível deduzir o número e a natureza das vibrações em moléculas diatômicas ou triatômicas simples e se essas vibrações vão conduzir a absorções.

O número de vibrações possíveis em uma molécula poliatômica pode ser calculado como se segue. Cada átomo possui 3 graus de liberdade (movimentos nas direções x, y e z) e uma molécula com N átomos irá ter 3N graus de liberdade. Como somente estamos interessados nos movimentos vibracionais, podemos eliminar 3 graus de liberdade translacional, e mais 3 graus de liberdade rotacional, para moléculas não-lineares. Os $3N - 6$ graus restantes representam o número de vibrações possíveis na molécula. Para moléculas lineares, a rotação em torno do eixo de ligação não é possível e 2 graus de liberdade bastam para descrever o movimento rotacional, restando $3N - 5$ graus de liberdade vibracional³⁵.

Considerando que as vibrações acontecem de forma isolada em uma molécula, estas podem ser representadas por um modelo mecânico simples, conhecido como oscilador harmônico. Neste modelo, aproximam-se as características da vibração de estiramento às de um modelo mecânico representado por duas massas ligadas por uma mola. Sob esta óptica, as frequências fundamentais de quaisquer dois átomos ligados podem ser calculadas assumindo que a energia segue o comportamento de um oscilador harmônico que obedece a Lei de Hooke³⁶.

Assim, as massas representam os átomos e a mola representa a ligação química entre eles. Uma perturbação de uma das massas ao longo do eixo da mola resulta em uma vibração denominada de movimento harmônico simples e a força restauradora é proporcional ao deslocamento (lei de Hooke) e tende a restaurar as massas para sua posição original.

A frequência da vibração do modelo é dada por ³⁷:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1)$$

sendo: ν , a frequência da vibração, k a constante de força da ligação e μ a massa reduzida dos dois átomos de massas m_1 e m_2 , definida como:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2)$$

Este modelo funciona bem para o cálculo de frequências fundamentais de moléculas diatômicas simples, apresentando resultados próximos aos valores médios encontrados para o estiramento de uma ligação entre dois átomos em uma molécula poliatômica^{35, 37}.

Porém, para moléculas constituídas de muitos átomos possuindo um grande número de centros de vibração, ou para moléculas apresentando interações entre vários centros, a variedade de vibrações possíveis dá origem a espectros na região do infravermelho que são difíceis, senão impossíveis, de se analisar³⁵.

O modelo do oscilador harmônico não descreve completamente o comportamento de partículas de dimensões atômicas, mas foi considerado para desenvolver as equações de onda da mecânica quântica para a vibração. Assim, diferentemente da mecânica clássica, na qual os osciladores podem ter qualquer energia potencial, os osciladores mecânicos-quânticos podem ter apenas determinadas energias discretas, ou seja, as únicas transições que poderiam

ocorrer seriam aquelas em que o número quântico vibracional muda de uma unidade (regra de seleção: $\Delta v = \pm 1$). Sendo, portanto os níveis vibracionais igualmente espaçados, apenas uma única banda de absorção deveria ser observada para certa vibração molecular^{35,36}.

Devido à complexidade matemática das equações de onda da mecânica quântica, embora permitam obter curvas de energia potencial mais corretas para vibrações moleculares, existe o impedimento de sua aplicação quantitativa, exceto para sistemas muito simples. Qualitativamente, as curvas têm que tomar a forma anarmônica diferenciando do comportamento harmônico em vários aspectos, dependendo da natureza da ligação e dos átomos envolvidos. No entanto, a curva harmônica e a anarmônica são muito parecidas para pequenas variações em torno do centro de massa^{35,36}.

As anarmônidades elétrica e mecânica conduzem a desvios de duas espécies. O primeiro desvio é que os níveis de energia não são igualmente espaçados, como pode ser visto na representação da curva 2 na Figura 2.

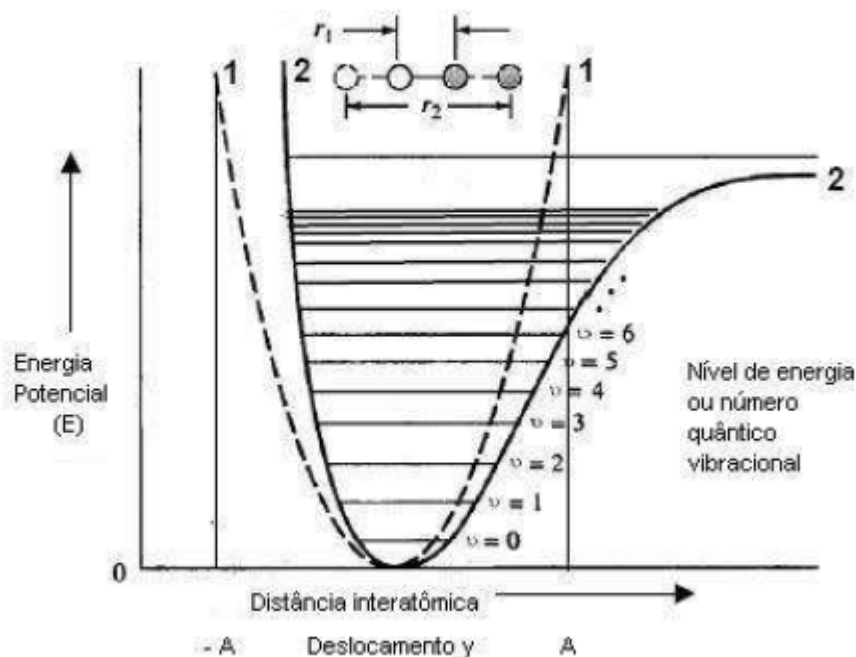


Figura 2 - Diagrama de energia potencial. (1) oscilador harmônico, (2) oscilador anarmônico³⁵.

À medida que a energia potencial entre os átomos aumenta, a diferença entre os níveis quânticos vibracionais diminui.

A segunda espécie de desvio é que em números quânticos altos, ΔE se torna menor e a regra de seleção não é seguida rigorosamente e como resultado, aparecem harmônicos que ocorrem em frequências com aproximadamente duas ou três vezes a de uma transição fundamental, isto é $\Delta v = \pm 2$ ou ± 3 , sendo esse tipo de transição conhecida como sobretom (do inglês, “overtone”).

A maioria dos sinais do tipo sobretom ocorre na região do infravermelho próximo e a intensidade dessas transições é cerca de 10 a 1.000 vezes menor que as observadas para transições fundamentais. Este fato é inconsistente com a teoria quântica, uma vez que esta prevê que tais transições seriam proibidas³⁵⁻³⁷.

Quando um fóton excita simultaneamente dois modos vibracionais, ocorrem as chamadas bandas de combinação, ocorrendo principalmente entre 5.500 e 4.000 cm^{-1} . A frequência da banda de combinação é, aproximadamente, a soma ou a diferença das duas frequências fundamentais. Esse fenômeno ocorre quando um quantum de energia é absorvido por duas ligações em vez de uma^{35,36}.

2.4. Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada (ATR)

A reflexão da radiação em uma amostra pode ser de quatro tipos: especular, difusa, interna e total atenuada (ATR - do inglês, *attenuated total reflection*). Focaremos neste trabalho apenas a ATR, uma técnica não destrutiva que permite obter espectros no infravermelho de amostras como líquidos, sólidos insolúveis, filmes, adesivos, pós, pastas, entre outros.^{35,40}

Tal técnica tem por princípio o fato de que quando um feixe de radiação passa do cristal de ATR para a amostra (materiais com diferentes índices de refração) ocorre uma reflexão. A fração do feixe que é refletida aumenta de

acordo com o aumento do ângulo de incidência, até o ponto que se atinge determinado ângulo crítico (α), ocorrendo neste ponto a reflexão completa da radiação incidente.^{35,40}

No processo de reflexão ocorre a atenuação do feixe nos comprimentos de onda das bandas de absorção (fenômeno das ondas evanescentes)⁴⁰. A profundidade de penetração (d_p) pode ser quantitativamente descrita pela equação 3 abaixo³⁵:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \left(\sin^2 \theta_i - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}}} \quad (3)$$

onde:

n_1 : índice de refração (cristal de ATR)

n_2 : índice de refração (amostra)

θ : é o ângulo de incidência

λ : é o comprimento de onda da radiação

Conforme pode ser verificado através da equação 3, a profundidade de penetração da radiação incidente pode variar de uma fração até vários comprimentos de onda, dependendo do comprimento de onda da radiação incidente, dos índices de refração dos dois materiais e do ângulo do feixe incidente em relação à interface.^{35,40}

A radiação penetrante na amostra é conhecida como onda evanescente. O fenômeno da reflectância total atenuada (ATR) está representado esquematicamente na figura 3:^{35,40}

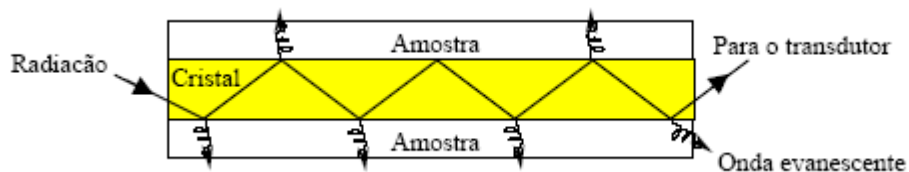


Figura 3 - Representação da ATR.

Os espectros de ATR diferem dos espectros de transmissão de radiação através da amostra, pois as intensidades relativas das bandas de absorção não são iguais, porém geralmente as mesmas bandas são encontradas nos dois tipos de espectros, já que o número de onda de absorção de uma molécula independe do quanto a radiação no infravermelho penetra na mesma.³⁵

Dentre as vantagens da espectroscopia de ATR, a principal é a possibilidade de se obter espectros de materiais que absorvem fortemente na região do Infravermelho, uma vez que a radiação penetra apenas alguns micrômetros na amostra.³⁵

Um dos materiais mais usados para confecção do cristal de ATR e utilizado na obtenção dos espectros apresentados neste trabalho é o ZnSe (insolúvel em água); o seu índice de refração é 2,4 e a sua faixa de trabalho é de 20000 até 650 cm^{-1} . Utiliza-se também o cristal de silício principalmente para amostras altamente espalhadoras; o seu índice de refração é 3,5 e a faixa de trabalho é de 9000 até 400 cm^{-1} .⁴¹

2.5. Instrumentos para Espectroscopia no Infravermelho

Até o início dos anos 80, a maioria dos instrumentos para análise na região do Infravermelho era do tipo dispersivo baseados em redes de difração. Com o surgimento dos equipamentos interferométricos, a maior parte dos instrumentos atuais é baseada na Transformada de Fourier, o que aumentou significativamente o número de aplicações do MID, tanto na área qualitativa como na quantitativa³⁵.

Na figura 4 abaixo tem-se representado o esquema básico dos componentes principais de um equipamento de infravermelho:

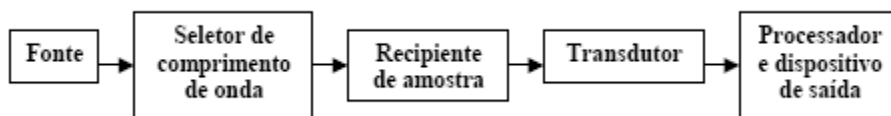


Figura 4 - Componentes básicos de um equipamento que opera na região do infravermelho³⁵.

Normalmente, a fonte de radiação de IV é constituída de óxidos de terras raras moldados em forma adequada, que emitem radiações na região do IV quando aquecidos a altas temperaturas. Outros tipos de fontes utilizadas são: a fonte de filamento incandescente de níquel-cromo; o arco de mercúrio; a lâmpada de filamento de tungstênio; e o laser de dióxido de carbono.^{35,39}

Os recipientes para a amostra variam de acordo com o estado físico da amostra e com a região do espectro de infravermelho que se pretende utilizar para a obtenção do espectro³⁵.

Os transdutores convertem um sinal elétrico de entrada (corrente alternada ou corrente contínua ou temperatura) em um sinal de saída na forma de corrente contínua, proporcional ao sinal de entrada. Os transdutores utilizados na espectroscopia no infravermelho são basicamente de três tipos³⁵: térmicos, piroelétricos e fotocondutores. Os transdutores térmicos geram sinal elétrico proporcional ao aquecimento promovido pela radiação que o atinge; os piroelétricos correspondem a um transdutor térmico, porém bastante especializado, com propriedades térmicas e elétricas características; e, finalmente, o transdutor fotocondutor. Nele, a absorção da radiação é feita pelos materiais componentes do transdutor, e essa absorção promove elétrons não-condutores a níveis mais altos de energia, gerando um gap na banda de valência, e diminuindo a resistência elétrica do semiconductor. A composição dos materiais componente do transdutor varia de acordo com a região de trabalho do infravermelho.³⁵

2.5.1. Espectrofotômetro com transformada de Fourier

Tais espectrofotômetros empregam a operação matemática conhecida como transformada de Fourier para calcular espectros obtidos a partir de um interferograma. O princípio utilizado é o do interferômetro de Michelson⁴².

Um espectrômetro FTIR tem três componentes básicos: o interferômetro de Michelson, a fonte e o detector^{35, 39}.

No fim do século passado, o físico alemão Albert Abraham Michelson (1852-1931) inventou o interferômetro de duplo feixe. Somente com o advento da computação e o uso das transformadas de Fourier para o tratamento dos dados é que o seu uso passou a ser explorado. Os interferômetros substituem o monocromador tradicional e preservam a informação de frequência e intensidade da radiação incidente^{35, 42}.

O interferômetro de Michelson é constituído de um divisor de feixes (beam splitter), um espelho fixo e um espelho móvel. A radiação proveniente da fonte passa através do divisor de feixes, que transmite metade do feixe para um espelho móvel, e a outra metade para um espelho fixo. Estes dois feixes são refletidos nos dois espelhos e recombinaos de forma construtiva ou destrutiva novamente no “beam splitter”, dependendo da posição do espelho móvel em relação ao espelho fixo. O feixe resultante passa através da amostra, onde ocorrem as absorções, e prossegue até o detector. A figura 5 mostra um esquema do interferômetro de Michelson^{35,37}.

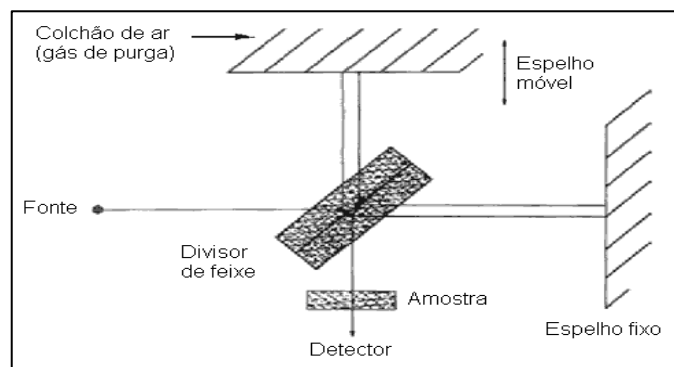


Figura 5 – Esquema simplificado do interferômetro de Michelson³⁵.

Para uma fonte policromática, o perfil de interferência é a soma de ondas senoidais para todas as frequências presentes. Quando não se coloca amostra, obtém-se um espectro de feixe simples, cujo perfil geral é determinado pelas características do divisor de feixe. Normalmente os interferômetros operam memorizando inicialmente este sinal de fundo e em seguida subtraindo-o do espectro da amostra, registrando então a razão entre eles³⁵.

Após o interferograma ser detectado e armazenado é necessário aplicar uma operação matemática, de modo a converter os dados adquiridos num

espectro de infravermelho convencional. Obtém-se um espectro de Transmitância que pode ser convertido em Absorbância. O eixo das abscissas tem unidade cm^{-1} , resultado do algoritmo de Fourier aplicado ao interferograma³⁵.

O interferograma resulta do registro do sinal do detector como função da diferença de caminho entre os dois feixes. O sinal tem que ser tomado a intervalos precisos, correspondentes a passos iguais na diferença de caminho óptico². Um interferômetro bem desenhado tem inúmeras vantagens básicas sobre um instrumento dispersivo clássico. As vantagens dos instrumentos FTIR são descritas a seguir^{35,37,42,53} :

- Simplicidade mecânica: a única parte com movimento no sistema FTIR é o espelho móvel, o que resulta em um pequeno desgaste mecânico e uma alta confiabilidade do sistema. .

- Alta velocidade e sensibilidade: em um interferômetro, todas as frequências são medidas simultaneamente, enquanto que no espectrofotômetro dispersivo elas são medidas sucessivamente. O sinal do interferograma é chamado de “multiplexado” (vantagem de Fellgett), porque o detector observa todas as frequências simultaneamente. Uma única varredura de um espectrômetro FTIR fornece uma medida de igual sensibilidade (relação sinal/ruído) à do espectrômetro dispersivo. Entretanto, a varredura do FTIR dura aproximadamente um segundo enquanto a unidade dispersiva requer de 10 a 15 minutos.

- Vantagem de Jacquinot: a abertura denominada de Jacquinot é localizada na entrada do interferômetro, e limita o feixe até um máximo aceitável para a resolução escolhida. A ausência de fendas permite trabalhar com valores de energia maiores a uma dada resolução, se compararmos com sistemas dispersivos.

- Vantagem de Connes: a escala de frequência de um interferômetro é devida ao laser de hélio-neônio, que age como referência interna em cada deslocamento. A frequência desse laser é conhecida com exatidão, é muito precisa e de estabilidade muito boa em longo prazo. Por isso, ele se torna também um padrão interno de calibração do comprimento de onda. Este fato elimina a necessidade de calibração externa.

- Eliminação da luz espúria (luz que chega ao detector, mas não foi absorvida pela amostra): o interferômetro modula cada frequência do IV, assim, não há luz espúria. Como resultado, a relação linear entre absorbância medida e concentração é válida mesmo para bandas que absorvem fortemente, o que vem a ser grande vantagem na preparação da amostra para análise quantitativa.

- Espectro sem bandas de emissão: A amostra é usualmente disposta depois do interferômetro e antes do detector. Assim, a radiação de frequências de IV emitida pela amostra não é modulada e, portanto, não é detectada, não havendo bandas de emissão no espectro para dificultar sua interpretação.

- Resolução constante: para todos os comprimentos de onda a resolução é a mesma. Em um IV dispersivo a resolução varia por causa dos programas de fendas.

- Continuidade no espectro: por não existir mudanças de redes ou filtros, não acontecem descontinuidades no espectro.

CAPÍTULO III

MÉTODOS DE ANÁLISE

MULTIVARIADA

Capítulo III – Métodos de Análise Multivariada

3.1. Quimiometria

Quimiometria pode ser definida como uma área da química que usa métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para planejar ou selecionar procedimentos ótimos de medidas e experimentos e extrair o máximo da informação química relevante, com a análise dos dados⁴⁵.

Usualmente, as soluções dos problemas em química analítica eram obtidas através de métodos tradicionais de análises por via úmida como, titulação, precipitação, reações específicas, extração, etc; tais métodos tradicionais são ainda muito importantes, porém em alguns casos são considerados lentos e dispendiosos. A utilização de métodos matemáticos para extrair informações a partir de modelos desenvolvidos para os dados disponíveis foram inicialmente desenvolvidos e empregados em outras áreas do conhecimento. A partir dos anos 1970, com o surgimento de métodos instrumentais computadorizados para a análise química, foi possível obter grande quantidade de informações de forma rápida e com boa qualidade. Tais dados, além de grandes dimensões, são às vezes, complexos e variados, não podendo dessa maneira ser explicados por modelos teóricos da química clássica^{45,46}.

O termo quimiometria foi utilizado pela primeira vez por químicos, nos anos setenta, que assim se intitularam, formalizando uma área de estudo de aplicação de métodos matemáticos às ciências químicas. O primeiro a assim se autodesignar parece ter sido S. Wold (Umea University – Suécia), que trabalhava em métodos de reconhecimento de padrões⁴⁵.

A quimiometria divide-se em algumas áreas principais, muito pesquisadas e aplicadas atualmente como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, monitoramento e modelagem de processos multivariados e métodos de inteligência artificial^{47,48}.

A construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem, ou seja, dados que podem ser representados através de um vetor para cada amostra, tem sido a principal linha de pesquisa da quimiometria aplicada à química analítica. A construção desses modelos é denominada de calibração multivariada⁴⁹.

3.2. Organização dos dados

Previamente ao tratamento dos dados, deve-se organizá-los e submetê-los a uma avaliação prévia para saber o tipo de método de análise multivariada mais adequado a ser utilizado, e, dependendo da natureza dos dados, pode ser necessário um tratamento prévio dos mesmos.

O primeiro passo consiste em organizar as informações na forma de uma matriz X , chamada *matriz de dados*, em que as linhas representam as n -amostras e as colunas representam as m -variáveis, como mostra o esquema apresentado na figura 6. Para dados químicos, as variáveis vão corresponder às medidas de alguma propriedade das amostras^{50,51}.

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

Figura 6 – Matriz de dados X .

As notações de álgebra linear também se aplicam à quimiometria. Um vetor é uma matriz que tem somente uma linha ou uma coluna, sendo chamado, respectivamente, de vetor linha ou coluna. Os vetores são designados por letras minúsculas em negrito e as matrizes por letras maiúsculas em negrito. Os elementos das matrizes, dos vetores, ou constantes como o coeficiente de regressão, são representados por letras comuns⁵¹.

Na matriz, representa-se cada variável por um vetor coluna, e cada amostra é representada por um vetor linha^{50,51}. A figura 7 abaixo mostra como espectros no infravermelho são organizados em uma matriz de dados. Neste caso, cada valor de absorbância num dado comprimento de onda forma um elemento de uma linha da matriz. Assim, em cada linha da matriz tem-se o espectro de uma amostra.

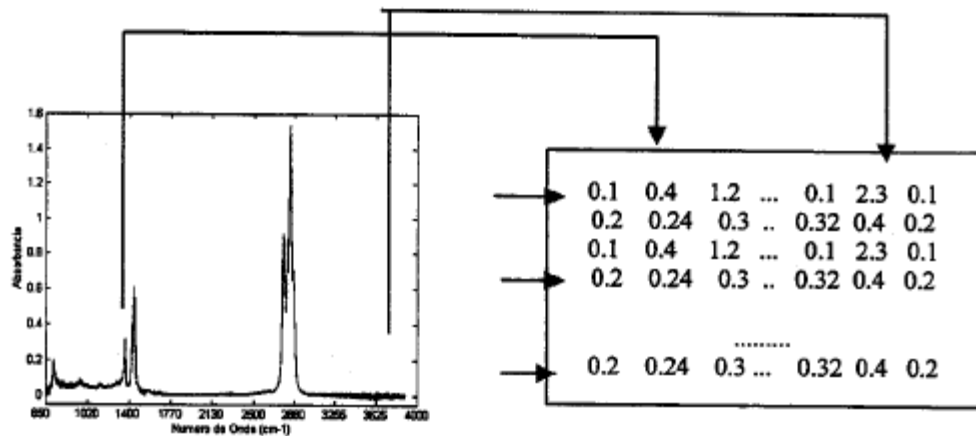


Figura 7 – Organização dos dados em uma matriz a partir de espectros no infravermelho.

Uma adequada organização e avaliação dos dados são essenciais para que a análise multivariada seja feita de forma correta. Para tanto, alguns fatores devem ser levados em consideração. Deve-se investigar a forma como os dados foram gerados, os métodos de medidas utilizados e a confiabilidade destes dados⁵⁰.

Outro fator importante é a representatividade do grupo de amostras disponíveis que se deseja analisar. De nada adianta um conjunto extenso de dados com informações interessantes se o grupo de amostras não for representativo o suficiente para fornecer as informações adequadas ao tratamento que se propõe fazer⁵¹.

Outra etapa prévia importante num tratamento de dados é a etapa do *pré-tratamento*. Muitas vezes os dados são expressos em grandezas diferentes, ou apresentam muitos ruídos, e dependendo do tipo de informação que se deseja

extrair, isto poderá ou não comprometer a análise. Um tratamento prévio dos dados muitas vezes resolve este tipo de problema⁵¹.

3.3. Pré-tratamento dos dados

Atualmente, existe um grande número de trabalhos utilizando a espectroscopia no infravermelho em análises quantitativas. Porém, apesar da espectroscopia no infravermelho fornecer um grande número de dados, parte destes não possuem informações correlacionadas diretamente com o(s) analito(s), o que pode ocasionar distorções ao modelo, e conseqüentemente a conclusões errôneas nas análises⁵².

Para minimizar este problema têm sido utilizados diversos métodos de pré-processamento, como normalização, correção da linha de base, cálculo da derivada, correção multiplicativa de sinal, escalonamento e filtragem digital para remoção de ruído⁵³.

Outro procedimento bastante empregado é a seleção de variáveis, o qual permite eliminar os termos que não são relevantes na modelagem, gerando um subconjunto com um menor número de variáveis, e que apresente maior sensibilidade e linearidade para o(s) analito(s)⁵⁴.

3.3.1. Filtro de Savitsky-Golay

Basicamente, o filtro de Savitsky-Golay ajusta um polinômio a certa janela com um número fixo de pontos do espectro. O valor dado pelo polinômio no ponto de interesse corresponde ao valor filtrado. Em seguida, há um deslocamento de um ponto nesta janela, ajustando-se outro polinômio (da mesma ordem), e assim sucessivamente ocorre o deslocamento até o final do espectro⁵².

Os filtros exponenciais e de média deslizando consideram aproximações lineares ao sinal. Contudo alguns sinais podem ser melhor modelados com

aproximações quadráticas ou cúbicas⁵².

3.3.2. Normalização

A normalização dos dados consiste em dividir cada variável pelo seu valor médio. Dessa forma, para cada linha da matriz de dados é obtido o respectivo valor médio, através da soma de todas as variáveis e divisão pelo número total das mesmas, e a seguir, divide-se cada variável desta mesma linha pelo valor médio encontrado. Para as demais linhas da matriz é feito o mesmo procedimento⁵⁴.

A equação 4 é utilizada para o cálculo da normalização média⁵⁴:

$$\mathbf{x}_{(i,k)} = \frac{\mathbf{x}_{(i,k)}}{\bar{\mathbf{x}}} \quad (4)$$

onde, $\mathbf{x}_{(i,k)}$ é o valor da variável presente na linha i e na coluna k , e $\bar{\mathbf{x}}$ é o valor médio correspondente à linha.

3.3.3. Dados Centrados na Média

Consiste em fazer com que para cada variável seus valores tenham média zero. Para centrar os dados na média, obtêm-se para cada coluna o valor médio e, em seguida, subtrai-se este valor de cada variável dessa mesma coluna. Desta forma, ocorre a mudança do sistema de coordenadas para o centro dos dados. A equação 5 é utilizada para centrar os dados na média^{52, 55}.

$$\mathbf{x}_{(i,j)cm} = \mathbf{x}_{(i,j)} - \bar{\mathbf{x}}_j \quad (5)$$

onde, $\mathbf{x}_{(i,j)cm}$ corresponde ao valor centrado na média para a variável j na amostra i ; $\mathbf{x}_{(i,j)}$ é o valor da variável j na amostra i ; e $\bar{\mathbf{x}}_j$ é a média das amostras na coluna j , calculado pela equação 6⁵²:

$$\bar{\mathbf{x}}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathbf{x}_{(i,j)} \quad (6)$$

Na equação 6, n é o número de amostras.

3.3.4. Aplicação de derivada

A aplicação da primeira ou segunda derivada sobre os dados espectrais brutos é um procedimento que pode destacar ombros espectrais, bem como minimizar o efeito de inclinações provocadas na linha de base dos espectros, devido à morfologia das partículas.^{53,56}

Ao aplicarmos as operações de derivação aos espectros, as informações contidas ao longo dos diferentes comprimentos de onda são geralmente acentuadas. Não só os sinais espectrais, mas também os ruídos tornam-se acentuados, portanto, deve-se ter cuidado com a qualidade dos espectros com os quais se deseja aplicar o cálculo das derivadas⁵⁶.

3.4. Os Métodos de Análise Multivariada

Existem diversos tipos de técnicas de estatística multivariada, com as mais variadas aplicações. Tais métodos podem ser classificados em dois tipos principais: os métodos de *análise exploratória* e os métodos de *calibração multivariada*.⁵⁷

A aplicação de um ou outro método, ou até mesmo da combinação dos dois depende da natureza do problema que se deseja resolver, ou do tipo de informação que se deseja obter.⁵⁷

3.4.1. Análise Exploratória

Ao nos depararmos com um conjunto de dados, principalmente aquele muito extenso, é necessário uma análise prévia inicial para avaliarmos a qualidade das informações disponíveis.

Os métodos de análise exploratória têm por objetivo fazer a avaliação inicial dos dados para descobrir que tipo de informação pode-se extrair deles, e assim definir as diretrizes para um tratamento mais aprofundado. Isto é feito através da utilização de algoritmos que permitem reduzir a dimensão dos dados, ou organizá-los numa estrutura que facilite a visualização de todo o conjunto, de forma global. Para realizar esta análise inicial, os dois métodos estatísticos mais conhecidos são a *Análise de Componentes Principais (PCA)* e a *Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)*.⁵⁷

Neste capítulo trataremos somente da PCA, que foi utilizada no tratamento dos dados a serem apresentados neste trabalho.

3.4.2. Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA foi introduzida na química por Malinowski no final dos anos 1960, com o nome de Análise de Fatores, e a partir da década seguinte uma série de aplicações foi desenvolvida, o que a tornou muito conhecida e explorada⁵⁸.

A análise de componentes principais é uma técnica de estatística multivariada cujo objetivo é reduzir a dimensão dos dados originais, permitindo a fácil visualização das informações mais importantes em um número menor de fatores, ou *componentes principais*⁵⁹.

Na PCA, as coordenadas das amostras são reescritas num novo sistema de eixo, mais conveniente à análise dos dados, chamados de componentes principais ou *fatores*⁵⁹.

Neste novo sistema de eixos, cada uma das componentes principais é gerada a partir da combinação linear das m -variáveis originais, e são ortogonais entre si, ou seja, são completamente não correlacionadas (figura 8).

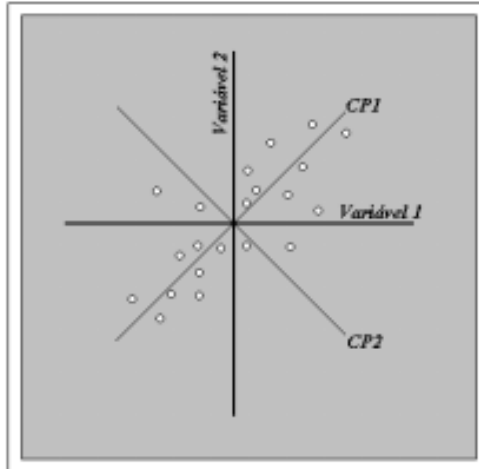


Figura 8 – Gráfico dos dados num sistema bidimensional (CP1 e CP2).

De forma geral e bem simplificada, as combinações lineares das m -variáveis originais que geram cada componente principal podem ser representadas pela equação 7^{59,60}.

$$PC_i = x_{i1}p_1 + x_{i2}p_2 + \dots + x_{im}p_m \quad (7)$$

Nesta equação, x_j (para $j = 1, 2, \dots, m$) são as variáveis originais e p_{ij} (para $j = 1, 2, \dots, m$) são os coeficientes que medem a importância de cada variável na i -ésima componente principal (CP_i), ou seja, o *peso* que cada variável tem naquela combinação linear. Estes pesos nada mais são do que o cosseno do ângulo entre o eixo da componente principal e o eixo da variável original, e, portanto seu valor estará sempre entre 1 e -1. Quanto mais próximo de ± 1 , maior a influência que esta determinada variável tem na descrição desta componente principal, e quanto mais próximo de zero este coeficiente estiver, menor a influência da variável naquela componente principal^{59,61}.

A projeção de cada amostra i ($i = 1, 2, \dots, n$) neste novo sistema de eixos fornece os *escores*, e cada amostra terá então um valor de *escore* para cada um dos novos eixos (as CPs)⁵⁹.

O gráfico dos escores poderá revelar agrupamentos ou tendências das amostras analisadas, que poderiam ser de difícil visualização no caso das variáveis originais.

Como dito anteriormente, os *pesos* (os coeficientes p_{ij}) são capazes de mostrar quais variáveis originais tem maior importância na combinação linear de cada componente principal. Através disto pode-se saber, por exemplo, que variáveis contribuem para a descrição deste ou daquele conjunto de amostras^{60,61}.

Normalmente, as últimas PCs modelam ruído inerente aos dados, sendo assim, a eliminação dessas PCs frequentemente aumenta a relação sinal/ruído. Um procedimento básico para melhorar a análise de modo a reduzir a dimensão dos dados é a escolha do número de componentes principais a serem utilizadas na descrição do sistema. A escolha do número de componentes principais permite descrever até mais de 90% da variância dos dados com um número muito menor de fatores do que das variáveis originais. A escolha das componentes principais a serem utilizadas na descrição dos dados é feita levando-se em conta a porcentagem de variância descrita pelas CPs e a variância residual.^{62,63}

Para a determinação do número correto de PC o método mais utilizado consiste no método de Validação Cruzada (CV – do inglês, Cross Validation), a ser discutido nos próximos itens⁵⁹.

3.4.2.1. Conceitos Matemáticos

Em termos matemáticos a PCA corresponde à decomposição da matriz de dados $\mathbf{X}$, de dimensão $n \times m$, no produto de duas matrizes: a matriz dos *scores* $\mathbf{T}$ e a transposta da matriz dos *pesos* $\mathbf{P}^T$, como mostra a equação 8, que pode ser representada pelo esquema da figura 9⁵⁹.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T \quad (8)$$

Os vetores linha da matriz dos *scores* $\mathbf{T}$ correspondem às projeções das n amostras, ou objetos, da matriz original $\mathbf{X}$, nos novos eixos formados, ou seja,

cada vetor coluna da matriz dos escores corresponde às coordenadas das amostras em cada *componente principal* gerada⁵⁹.

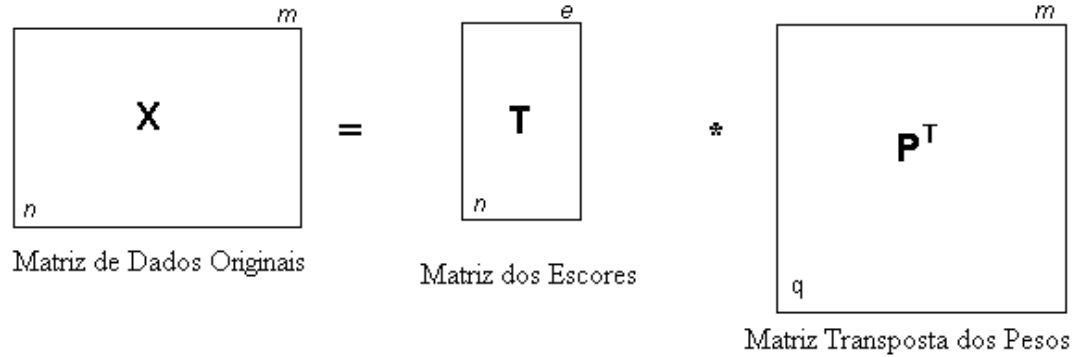


Figura 9 - Representação da decomposição da matriz de dados X .

Desta forma, o número n de linhas da matriz original é igual ao número de linhas da matriz dos escores e o número de colunas corresponde ao número e de componentes geradas.

Na matriz dos pesos P , cada vetor coluna corresponde aos pesos que cada variável possui na combinação linear das m componentes geradas. Então esta matriz possui q linhas (o número de componentes principais armazenadas) e m colunas (as variáveis originais).

A cada componente modelada certa quantidade de informação permanece sem ser explicada, ou seja, uma quantidade de variância continua não descrita. A esta quantidade de variância não descrita chamamos de *resíduos* e podem ser organizados na forma da matriz dos resíduos E . Podemos então reescrever a equação 8 como descrito na equação 9⁵⁹.

$$X = T P^T + E \quad (9)$$

Este resíduo é calculado pela subtração de cada elemento da matriz original X dos produtos da matriz dos escores e da matriz transposta dos pesos, como na equação.

3.4.3. Calibração Multivariada

A calibração pode ser definida como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e valores para uma propriedade de interesse correspondente⁶⁴.

Quando existe apenas uma resposta instrumental por amostra, por exemplo, um valor de absorvância para o analito que está sendo investigado, os métodos de calibração e previsão são ditos *univariados*, isto é, dependem de apenas uma variável (no caso, a resposta instrumental) que será relacionada em termos matemáticos ao teor de apenas um analito. A calibração univariada tem sido utilizada com sucesso em técnicas onde a lei de *Beer* pode ser aplicada e que não há a presença de interferentes, como por exemplo, em determinações de um único analito através de métodos espectroscópicos.⁶¹

A calibração e a previsão *multivariadas* são processos utilizados quando o instrumento fornece mais de uma resposta por amostra e também é possível analisar mais de um analito simultaneamente, o que não seria possível utilizando um método univariado⁶³.

Um modelo de calibração, na verdade, é uma função matemática (f) que relaciona dois grupos de variáveis, uma delas denominada dependente (Y) e a outra denominada independente (X):

$$Y = f(X) = X^* b \quad (10)$$

, onde b corresponde ao coeficiente de regressão do modelo, e são determinados matematicamente a partir dos dados experimentais. Esta etapa representa a calibração e por isso o conjunto de dados empregado para essa finalidade é chamado de conjunto de calibração.⁶⁶

Após a calibração, promove-se a validação do modelo construído. Nesta etapa, as variáveis independentes obtidas, para um outro conjunto de amostras, são utilizadas em conjunto com o coeficiente de regressão, para calcular os valores previstos para a variável dependente. No conjunto de validação utilizam-se amostras cujas variáveis dependentes sejam conhecidas para que seja possível estabelecer uma comparação entre os valores previstos pelo modelo e

os valores conhecidos previamente através de uma metodologia padrão, o que permitirá a avaliação sobre o desempenho do modelo de calibração proposto.⁶⁶

A função que ajusta as variáveis dependentes e independentes pode ser linear ou não, dependendo da complexidade do sistema em estudo.

Em calibração multivariada, mais de uma resposta instrumental pode ser relacionada com a propriedade de interesse. Esses métodos de calibração possibilitam a análise mesmo na presença de interferentes, desde que esses interferentes estejam presentes nas amostras utilizadas para a construção do modelo de calibração. Outras possibilidades apresentadas por esse tipo de calibração são determinações simultâneas e análises mesmo sem resolução.

62,66

3.5. Mínimos Quadrados Parciais – PLS

O Método dos mínimos quadrados parciais – PLS (do inglês “*Partial Least Squares*”) ou a regressão por PLS (PLSR) é considerado o método de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem. Este método não requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras, podendo realizar a previsão de amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes por ocasião da construção do modelo (vantagem de primeira ordem).⁶⁰

O método PLS consiste em decompor as matrizes de dados **X** (variáveis independentes) e **Y** (variáveis dependentes) em uma soma de produtos de dois vetores (os escores e os pesos).³⁵

Sabe-se que é possível representar uma matriz de dados, sem a perda de informação estatística útil, pela sua matriz de “scores”, com a vantagem de não haver correlação entre as variáveis. Tal representação matemática é feita na regressão por PLS. Ou seja, tanto a matriz de variáveis independentes (**X**) como a das variáveis dependentes (**Y**) são representadas por seus escores, utilizando

a redução de variáveis. Diversos algoritmos podem ser utilizados para tanto, como é o caso do PCA.^{60,62}

O modelo resultante é o seguinte:

$$\begin{aligned} \mathbf{X} &= \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \\ \mathbf{Y} &= \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \end{aligned} \quad (11)$$

, onde os elementos das matrizes $\mathbf{T}$ e $\mathbf{U}$ são os escores de $\mathbf{X}$ e $\mathbf{Y}$ respectivamente; e os elementos de $\mathbf{P}$ e $\mathbf{Q}$ são os “pesos”. As matrizes $\mathbf{E}$ e $\mathbf{F}$ correspondem aos erros, ou seja, o quanto o modelo perde de informação com a redução de variáveis em relação aos dados originais.^{60,67}

Uma relação entre os dois blocos (variáveis independentes $\mathbf{X}$ e variáveis dependentes $\mathbf{Y}$) pode ser realizada correlacionando-se os escores do bloco $\mathbf{X}$ ($\mathbf{T}$) com os escores do bloco $\mathbf{Y}$ ($\mathbf{U}$) para cada componente principal. Um modelo linear é utilizado para esta relação³⁵:

$$\mathbf{u} = b_l \mathbf{t}_l \quad l=1,2,\dots,n \quad \text{para } n \text{ componentes principais.} \quad (12)$$

onde, b_n é o coeficiente de regressão do modelo linear para cada componente principal, obtido através de:

$$b_l = \frac{\mathbf{u}_l^T \mathbf{t}_l}{\mathbf{t}_l^T \mathbf{t}_l} \quad (13)$$

, sendo $\mathbf{u}$ e $\mathbf{t}$ os elementos das matrizes $\mathbf{U}$ e $\mathbf{T}$, respectivamente.

A Figura 10 ilustra a decomposição das matrizes $\mathbf{X}$ e $\mathbf{Y}$ no produto das matrizes de escores e pesos. A decomposição pode ser realizada através de diversos algoritmos, que procedem a referida decomposição por passos diferentes chegando ao final em resultados praticamente iguais. Um exemplo desses algoritmos é o NIPALS (do inglês, *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*).⁶⁸

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{c} m \\ \boxed{\mathbf{X}} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\mathbf{t}_1} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{\mathbf{p}_1^T} \\ 1 \end{array} + \dots + \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\mathbf{t}_I} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{\mathbf{p}_I^T} \\ 1 \end{array} + \begin{array}{c} m \\ \boxed{\mathbf{E}_X} \\ n \end{array} \\
 \\
 \begin{array}{c} z \\ \boxed{\mathbf{Y}} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\mathbf{u}_1} \\ n \end{array} \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\mathbf{q}_1^T} \\ 1 \end{array} + \dots + \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\mathbf{u}_I} \\ n \end{array} \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{\mathbf{q}_I^T} \\ 1 \end{array} + \begin{array}{c} z \\ \boxed{\mathbf{E}_Y} \\ n \end{array}
 \end{array}$$

Figura 10 - Decomposição em variáveis latentes das matrizes **X** e **Y** para modelos PLS.

Porém, tal modelo não é o mais adequado, já que as componentes principais seriam calculadas para os dois blocos separadamente, podendo resultar em uma relação não muito satisfatória entre os escores dos dois blocos.

Para que se encontre uma melhor correlação possível é necessário manipular a informação desses dois blocos simultaneamente. No PLS isto é feito por uma leve rotação das componentes principais, com conseqüente mudança nos valores dos escores.

Devido ao fato de ocorrer tal rotação, o termo componente principal passa a não ser mais utilizado, e no lugar deste, o termo designado é o de variáveis latentes^{60,62}. As variáveis latentes já não descrevem a direção de maior variância, como no caso das componentes principais, mas sim uma direção próxima que correlaciona o compromisso entre a habilidade das variáveis latentes em descrever as amostras nos espaços individuais e o aumento na correlação entre **t** e **u**. A figura 11 exemplifica o modelo de calibração baseado no PLS^{60,62}.

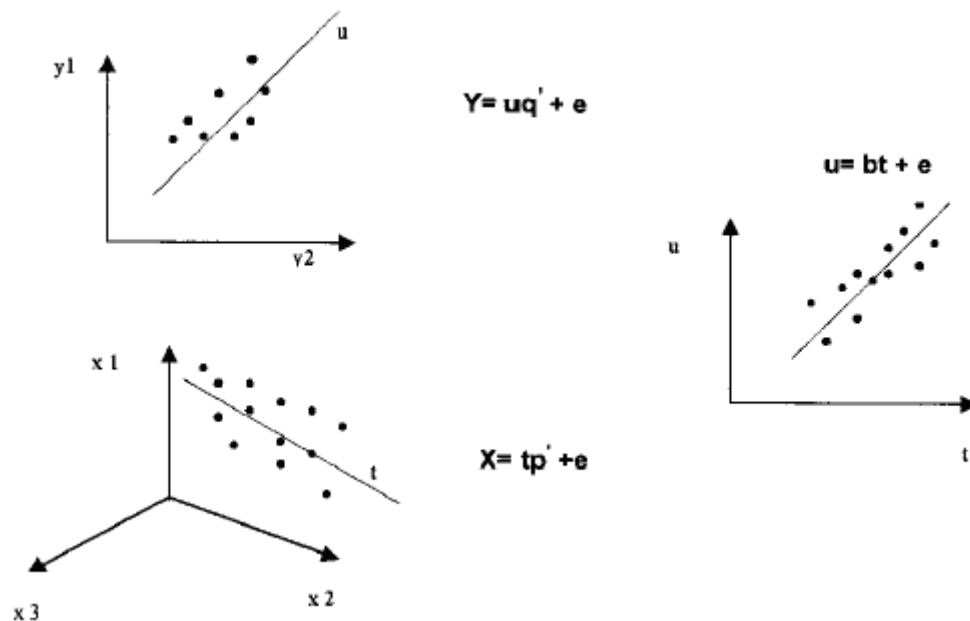


Figura 11- Representação geométrica do PLS.

Nessa figura, tem-se uma variável latente modelando os dados de **X** (variáveis independentes) e **Y** (variáveis dependentes). Os dados de **X** são formados por três variáveis e os dados de **Y** por duas.

Assim, pode ser produzida uma relação mista entre os dois blocos^{35,68}:

$$Y = TBQ' + F \quad (14)$$

O modelo final consiste das matrizes dos “escores” **T** e **U** que são linearmente relacionadas por um coeficiente **B**.

No final do processo a variância explicada pela primeira VL será maior que a variância explicada pela segunda VL e a terceira VL explicará uma variância menor que a segunda VL, e assim sucessivamente até o número de VLs definido e o algoritmo, geralmente, converge rapidamente⁶⁰.

Neste trabalho, os modelos PLS foram construídos usando o PLS_Toolbox versão 2.0 (Eigenvector Research) para Matlab 6.1 (MathWorks).

3.5.1. Escolha do Número de Variáveis Latentes

O número de variáveis latentes utilizadas em um modelo é de fundamental importância nos resultados a serem obtidos. A utilização de um número menor de variáveis latentes poderá fornecer resultados não satisfatórios, uma vez que toda a informação disponível dos dados originais não estará sendo utilizada. Ao passo que se for utilizada uma quantidade muito grande de variáveis latentes, ocorrerá a modelagem de ruídos, podendo ocasionar em problemas no modelo⁵³.

Para a determinação do número correto de variáveis latentes (LV), do inglês *Latent Variables*, o método mais utilizado consiste no método de Validação Cruzada (CV – do inglês, *Cross Validation*). Tal método é baseado na habilidade de previsão de um modelo construído por parte de um conjunto de dados, seguido pela previsão do restante do conjunto de dados, que é realizada pelo modelo construído⁵³.

A validação cruzada pode ser realizada em blocos, ou seja, um número determinado de amostras é deixado de fora no processo de construção do modelo e a seguir essas amostras são previstas pelo modelo construído, ou ainda por um caso conhecido como “leave-one-out” (deixe uma fora por vez), em que uma amostra é deixada de fora no processo de construção do modelo e a seguir essa amostra é prevista pelo modelo construído. Em ambos os casos, o processo é repetido até que todas as amostras tenham sido previstas e a raiz quadrada do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV) é calculada.^{53,68}

O cálculo é realizado para o número de componentes de 1 até A, e os resultados de RMSECV são apresentados em um gráfico em função do número de LV. O comportamento típico para esses gráficos é a observação de um mínimo ou um patamar, que indica a melhor dimensionalidade do modelo de regressão, ou seja, o melhor número de LV que produziu o menor erro de previsão sem perda significativa da variância dos dados^{69,70}.

3.5.2. Cálculo dos Erros

A eficiência dos modelos de calibração multivariada pode ser avaliada pelo cálculo dos valores da raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE – do inglês, *root mean square error*) e erro relativo (E).⁵³

Tais valores expressam a exatidão do modelo, ou seja, a proximidade entre o valor calculado pelo modelo (y_{prev}) e o valor verdadeiro ou obtido por um método de referência (y_{real}). Os erros são definidos como:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_{prev} - y_{real})^2}{n}} \quad (15)$$

, sendo n o número de amostras.

$$E = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{prev} - y_{real})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{real})^2}} \times 100\% \quad (16)$$

RMSEC é o RMSE calculado a partir das amostras de calibração, isto é, uma medida do erro na modelagem. RMSECV a partir das amostras da validação cruzada e RMSEP das amostras do conjunto de previsão⁵³.

3.5.3. Previsão do Modelo de Calibração

A parte fundamental da regressão é a verificação de sua validade, ou seja, se o modelo construído é capaz de prever corretamente ou com pequena margem de erro os valores das concentrações das novas amostras.

Utilizando o exemplo dos dados produzidos por amostras submetidas à análise na região do infravermelho, a etapa de previsão do modelo desenvolvido é feita da seguinte forma: forma-se uma nova matriz com os valores das intensidades em cada número de onda dispostos em coluna, e cada linha desta

matriz representando uma amostra (matriz $\mathbf{X}_{\text{teste}}$)⁶⁸.

Formada tal matriz deve-se aplicar a este conjunto os mesmos pré-tratamentos matemáticos aplicados ao conjunto de calibração.

O passo seguinte consiste em obter os vetores de escores ($\mathbf{t}$) e os resíduos ($\mathbf{e}$) da matriz $\mathbf{X}_{\text{teste}}$ utilizando os pesos ($\mathbf{p}$), calculados na fase de treinamento.^{53,68}

$$\mathbf{X}_{\text{teste}} = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a \mathbf{p}_a^T + \mathbf{e} \quad (17).$$

para “A” variáveis latentes na modelagem

Com os valores dos escores ($\mathbf{t}$) da matriz $\mathbf{X}_{\text{teste}}$, além dos coeficientes de regressão $\mathbf{b}$ e os pesos $\mathbf{q}$ do bloco $\mathbf{Y}$ calculados na fase de calibração, pode-se fazer a estimativa das concentrações da seguinte forma⁵³:

$$\mathbf{Y} = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a \mathbf{b}_a \mathbf{q}_a^T \quad (18)$$

para “A” variáveis latentes.

3.5.4. Detecção de Amostras Anômalas – Outliers

Anomalias são elementos muito diferentes ou que apresentam erros grosseiros quando comparados à maioria dos dados, portanto, é necessária a identificação e eliminação destes elementos já no processo de calibração, pois caso contrário pode-se obter um modelo não representativo. Estas amostras anômalas também podem ser encontradas nos dados utilizados para a previsão do modelo⁵³.

A ocorrência de anomalias pode ser devida a várias razões: erros instrumentais, experimentais, presença de compostos químicos não pertencentes ao grupo que está sendo analisado ou de diferentes composições químicas, além de outras fontes. Assim, tem-se que as anomalias podem ser

encontradas nas amostras, nas variáveis e na relação entre amostra e variáveis.

A forma mais importante de anomalia corresponde àquelas provenientes das amostras. Uma amostra difere da outra por ter uma composição diferente ou por algum erro experimental, instrumental, etc. Uma variável anômala é proveniente de dados de alguma amostra que diferem do conjunto total de calibração por causa de ruídos, erros na medição e/ou métodos inadequados para análise de determinada amostra ou porque esta reflete alguma propriedade única.⁵³

Nas últimas décadas, métodos estatísticos robustos têm sido desenvolvidos a partir da identificação e remoção automática das anomalias. No entanto, tal procedimento deve ser tomado com alguma cautela, pois algumas vezes a presença de uma amostra diferente das demais pode conter, ao invés de erros, informações importantes que não são encontradas nos outros dados e, dessa forma, sua presença irá contribuir muito para o desenvolvimento do modelo⁵³.

Amostras com alto ou baixo nível de analito são, geralmente, amostras muito diferentes do restante do conjunto, porém, em casos onde o modelo de calibração é linear, amostras deste tipo devem ser mantidas no modelo, pois correspondem a amostras informativas. Outros tipos de anomalias que não podem ser explicadas devem ser eliminados. A identificação do problema pode estar na análise experimental ou instrumental, sendo necessário repetir os procedimentos⁵³.

Os métodos utilizados para detecção e eliminação de anomalias neste trabalho foram baseados nos estudos de “leverages” e análise residual.

3.5.5. Leverage

Em um espaço m-dimensional, quanto mais próximo dois pontos estiverem, mais semelhantes serão as amostras ou variáveis relativas a esses pontos. A “leverage” retrata exatamente isso: a similaridade entre as amostras no espaço das componentes principais. A “leverage” pode ser interpretada

como a distância entre um ponto ou variável e o centro do modelo, ou seja, o quão distante um ponto ou uma variável está quando comparada com o conjunto total ⁷¹.

A “leverage” de um objeto descreve sua influência ou a contribuição deste para o modelo de calibração. Uma “leverage” próximo a zero indica que a amostra ou variável correspondente têm muito pouca influência no modelo de calibração. A observação contrária, ou seja, altas “leverages”, indicam que determinado ponto tem alta influência no modelo. Com isso, tem-se que as “leverages” indicam se uma amostra é ou não diferente das demais, porém outras considerações devem ser feitas antes da eliminação de uma amostra com alta “leverage” ⁷¹.

Nos modelos de regressão, como o PLS, a “leverage” (h_i) pode ser encontrada através da seguinte expressão ⁷¹:

$$h_i = 1/I + \sum_{a=1}^A \left(\frac{\hat{\mathbf{t}}_{ta}^2}{\hat{\mathbf{t}}_a' \hat{\mathbf{t}}_a} \right) \quad (19)$$

, que corresponde à distância mahalanobis de um objeto ao centro do modelo.

Na equação 19, $\mathbf{t}_{ta}$ é o valor do *score* para o objeto i , $\hat{\mathbf{t}}_a$ são os vetores escores calculados na fase de calibração, A é o número de variáveis latentes, e o termo $1/I$ representa a contribuição a partir da intersecção, para o caso de modelos de regressão.

A identificação de anomalias através das “leverages” é feita através de um gráfico que possui em um dos eixos os valores das “leverages”, e em outro, as amostras numeradas em sequência ⁷¹.

3.5.6. Análise Residual em Y

Os resíduos constituem em uma outra forma de se detectar anomalias. Estes correspondem a desvios entre os dados de referência e os estimados pelo modelo. Resíduos grandes significam que o modelo não está conseguindo modelar os dados de forma adequada. Os resíduos podem ser calculados tanto para **X** quanto para **Y**, porém para este trabalho somente utilizou-se a análise residual em **Y**⁶⁰.

Os valores referentes aos dados de **Y** são conhecidos nos dados de calibração e, em alguns casos, também nos dados de validação. Desse modo, os resíduos podem ser calculados através da diferença entre o valor de referência y_{ij} e o valor previsto $\hat{y}_{ij}$ pelo modelo, segundo a equação abaixo⁶²:

$$f_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_{ij} \quad (20)$$

Através dos resíduos pode-se calcular a variância residual. A variância residual é definida como a média quadrática residual corrigida pelo número de graus de liberdade⁶²:

$$RESVAR = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^i f_{ij}^2 \quad (21)$$

O número de graus de liberdade ($n-1$ na equação acima) é definido depois de feita a regressão. A variância dos resíduos de Y expressa como muito da variação permanece nas respostas observadas depois de construído o modelo.

3.5.7. O gráfico de influência

O gráfico de influência mostra em uma coordenada a variância residual de **X** ou de **Y** contra a “leverage” (se a variância de **X** for usada, a influência é no espaço **X**, e se a variância de **Y** for usada, a influência é na relação de regressão entre **X** e **Y**)^{60,71}.

Esses gráficos são construídos para mostrar dois tipos de diagnósticos de anomalias simultaneamente, mas podem ser usados também para encontrar quais amostras tem mais influência no modelo.

Amostras com altas “leverages” e alta variância residual são mais influentes e, em geral, este é o pior caso representando uma anomalia (neste caso tais amostras devem ser excluídas do modelo de calibração)⁷¹.

3.6. Método de Seleção de Variáveis

Os métodos de calibração multivariada podem ser aplicados para determinações seletivas e seguras do analito usando dados espectrais, em que o analito e a composição da matriz amostral estão variando.

No método PLS a informação significativa contida nos espectros está concentrada em algumas VLs que são aperfeiçoadas para produzir a melhor correlação com a informação de interesse. Porém, o método pode ser incapaz em determinadas situações de determinar claramente somente as características espectrais cruciais para a construção de modelos de previsão.⁶²

Alguns métodos têm sido descritos recentemente na literatura para implementar seleção de região espectral para melhorar significativamente o desempenho dos métodos de calibração de espectros totais. Esses métodos são chamados métodos de seleção de variáveis, que escolhem regiões específicas do espectro (um comprimento de onda ou um conjunto de comprimentos de onda) em que a colinearidade não é tão importante, enquanto gera modelos mais estáveis robustos e mais simples de interpretar.⁷²⁻⁷⁴

Na prática, a filosofia está baseada na identificação de um subconjunto dos dados inteiros que produzirão erros de previsão mais baixos. Assim, em espectros vibracionais, por exemplo, pode-se eliminar os comprimentos de onda que apenas induzem a ruídos, informações irrelevantes ou não-linearidades.⁶²

Os métodos de seleção de variáveis existentes se diferem com relação ao procedimento realizado para a seleção da região espectral. Dentre os métodos utilizados atualmente podemos destacar o método de mínimos quadrados parciais por intervalos (iPLS – do inglês, Interval Partial Least Square)^{72,75}, o método de eliminação de variáveis não informativas por mínimos quadrados parciais (UVE-PLS – do inglês, *Elimination of Uninformative Variables in Partial Least Square*)⁷⁶ e algoritmo genético (GA – do inglês, *Genetic Algorithm*)⁶. Somente será discutido em detalhes o método iPLS, utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

3.6.1. PLS por Intervalos (i-PLS)

O método iPLS é uma extensão iterativa para o PLS, que desenvolve modelos locais PLS em subintervalos equidistantes de toda a região do espectro.

O principal objetivo deste método é prever informação relevante nas diferentes subdivisões do espectro global, de forma a remover as regiões espectrais cujas variáveis se apresentam como supostamente de menor relevância e/ou interferentes. A partir deste ponto, um novo modelo PLS é construído a partir das variáveis selecionadas.⁷⁵

Os modelos locais PLS para cada região do espectro subdividido são comparados com o modelo PLS desenvolvido para todo o espectro (modelo global) em um gráfico baseado no parâmetro de validação RMSECV (erro quadrático médio da validação cruzada), calculado para cada um dos modelos. O espectro é dividido em tantas partes quanto se desejar, até que, através de tentativa e erro, chega-se a uma divisão ótima, ou seja, obtêm-se regiões do espectro com menor RMSECV do que o modelo global. Outro parâmetro

utilizado é o r^2 (coeficiente de correlação), que é a inclinação da reta do gráfico dos valores reais e previstos pelo modelo. Amostras e/ou medidas anômalas detectadas pelo PLS devem ser geralmente removidas antes da aplicação do iPLS⁷⁵.

As regiões espectrais com valores de parâmetro de validação menor que o modelo global são selecionadas para a construção de modelos PLS que são comparados com a eficiência do modelo PLS global.

As Figuras 12 e 13 exemplificam para o modelo de calibração de amostras de leite desnatado dopado com tetraciclina, os gráficos do iPLS. Nessa seleção de variáveis foi utilizado o programa iPLS (Lars Norgaard, Chemometrics Group - KVL, Dinamarca, 2004) do iToolbox para Matlab 6.1 (MathWorks).

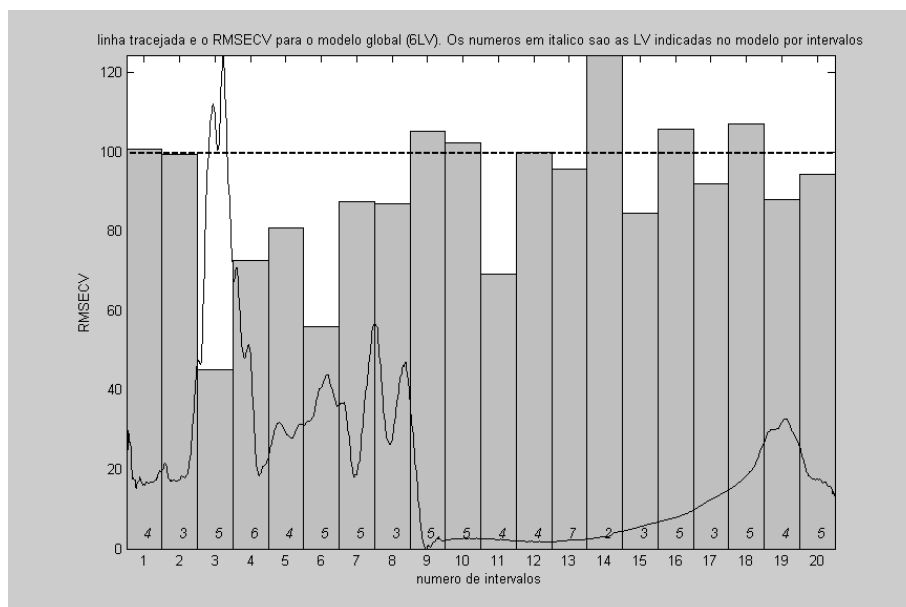


Figura 12 - Gráfico do modelo iPLS do número de intervalos versus RMSECV.

Na figura 12, é apresentada a divisão dos dados em 20 subgrupos. Para cada subgrupo é desenvolvido um modelo de PLS, e os resultados de RMSECV são mostrados como barras na figura. Os números no interior das faixas no gráfico da Figura 12, são os números de VLs indicados pelo modelo iPLS para serem usados na construção dos modelos com as variáveis selecionadas em

cada intervalo. A linha horizontal tracejada indica o valor de RMSECV para o modelo global (utilizando todas as variáveis). Pode-se notar que o 3º intervalo apresenta o menor valor de RMSECV e por isso selecionado para o desenvolvimento do modelo de calibração. Na figura 13, é apresentada a faixa das variáveis escolhidas (117 a 174).

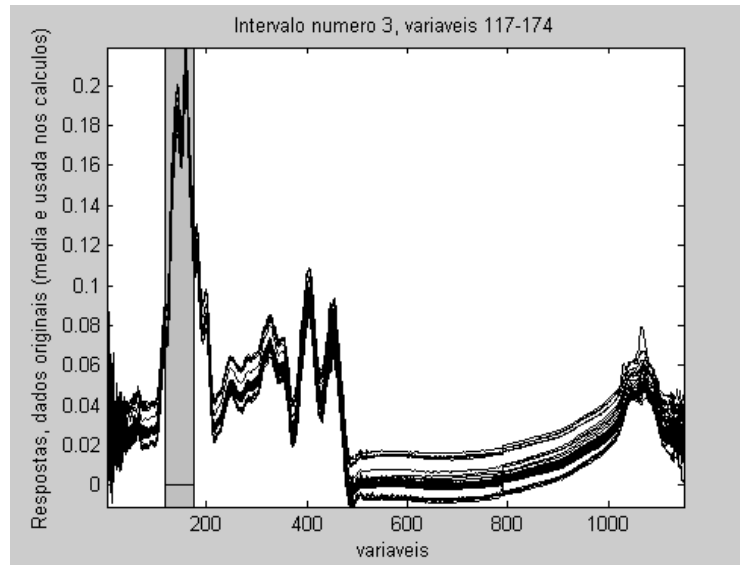


Figura 13 - Gráficos do modelo iPLS: faixa escolhida para a construção do modelo PLS.

Assim, no exemplo do modelo de calibração de amostras de leite contaminado com tetraciclina, o modelo PLS deve ser construído a partir de 57 variáveis do espectro original (variáveis 117-174), ao invés das 1150 variáveis iniciais.

3.7. Classificação de amostras

Ao contrário do método tradicional de regressão para prever uma ou diversas variáveis quantitativas, o método de classificação de variáveis é útil quando a resposta é uma variável categórica que pode ser interpretada em termos de diversas classes às quais determinadas amostras podem pertencer. O principal objetivo da classificação é identificar com segurança que determinada amostra pertence a determinado grupo de amostras com

características semelhantes em uma população⁶².

A classificação também pode ser usada para distinguir dentre as variáveis mais importantes a serem mantidas em um modelo (variáveis que caracterizam a população), ou para encontrar “outliers” (amostras que não são típicas da população)^{62,78}.

Exemplos do uso de classificação das amostras são⁷⁸:

- Predizer se um produto atende os requisitos de qualidade necessários a uma população;
- Modelar várias espécies próximas de plantas e animais de acordo com características facilmente observáveis para poder decidir se novos indivíduos pertencem a algum dos grupos modelados;
- Modelar várias doenças de acordo com um conjunto de sintomas facilmente observáveis, sinais clínicos ou parâmetros biológicos, tal que futuros diagnósticos possam ser enquadrados em algum dos grupos modelados.

O método utilizado neste trabalho para caracterização de grupos de amostras foi o SIMCA (do inglês “*Soft Independent Modeling of Class Analogy*”).

3.7.1 SIMCA - *Soft Independent Modeling of Class Analogy*

Nesse método, são desenvolvidos modelos baseados na Análise de Componentes Principais (PCA) para cada classe. Em termos geométricos, cada modelo descreve um envelope ou “caixa” ao redor de cada classe de modo que objetos desconhecidos (novas amostras) podem ser classificados como pertencentes àquela classe em particular se ficarem dentro desses envelopes. A dimensão de cada envelope é dada pela variância das amostras em torno dos componentes principais.^{78,79}

O SIMCA é um método para classificação que considera informações da distribuição da população, estima um grau de confiança da classificação e pode prever novas amostras como pertencentes a uma ou mais classes ou nenhuma classe.

Para fazer a classificação o SIMCA utiliza o espaço das componentes principais de cada classe. Desta forma, a classe n passa a ser representada pela equação a seguir^{80,81}:

$$\mathbf{X}_n = \mathbf{T}_n \mathbf{P}_n^t + \mathbf{E}_n \quad (22)$$

, onde $\mathbf{X}_n$ são os dados da classe, $\mathbf{T}_n$ a matriz contendo as coordenadas nas componentes principais da classe n , $\mathbf{P}_n^t$ a matriz de transformação linear e $\mathbf{E}_n$ a matriz de resíduos.

Na construção do modelo de classificação o SIMCA calcula, para cada classe em separado, o desvio padrão dos resíduos. Para o espaço descrito pelas componentes principais, são calculadas as variâncias das amostras, em cada eixo. Estes dois parâmetros são usados na classificação de novas amostras.

O objetivo do SIMCA é criar um espaço limitado para cada classe. Isto pode ser mais bem compreendido para uma classe descrita por duas componentes principais. Em termos geométricos, os resíduos desta classe correspondem às distâncias das amostras ao plano das componentes principais. Desta forma, o cálculo do desvio padrão dos resíduos dá origem a dois planos paralelos aos destes componentes, isto é, um acima e outro abaixo. Considerando a variância em cada componente principal e os planos, referentes ao desvio padrão dos resíduos, pode-se dizer que a classe está limitada por uma caixa, uma hipercaixa, no caso de três ou mais componentes, e um cilindro para uma componente principal.^{79,80}

A classificação de uma nova amostra é feita através de sua projeção nas componentes principais de cada classe, onde são calculados as variâncias e seu resíduo. Assim, naquelas classes onde o resíduo é menor ou igual, o mesmo é

válido para as variâncias, a amostra é classificada positivamente. Com isto, a amostra pode ser colocada em uma ou mais classes. Em caso contrário, desvio ou variâncias maiores, a amostra é classificada como não pertencente à classe⁸⁰.

A Figura 14 apresenta um exemplo de uma matriz, com três colunas (variáveis x_1 , x_2 e x_3), dividida em duas classes. A primeira é representada por duas componentes principais, onde v_1 é a variância na primeira componente principal $Cp1$, v_2 a variância na segunda componente $Cp2$ e o desvio padrão dos resíduos é representado por e ⁷⁹⁻⁸¹. A segunda classe é representada, na figura, por um único componente principal.

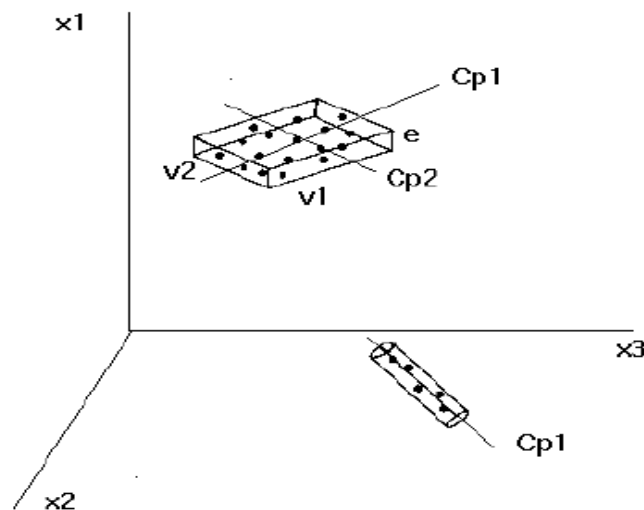


Figura 14 – Representação gráfica de uma matriz com três colunas e dividida em duas classes.

CAPÍTULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo 4 – Parte Experimental

4.1 - Aparatos

Os espectros foram obtidos em um espectrômetro da marca Bomen MB100 utilizando um cristal de ATR de Seleneto de Zinco a 23° C. As medidas foram tomadas com resolução de 4 cm⁻¹, 64 varreduras por espectro e ganho do detector máximo (E). O software empregado para as medidas foi o GRAMS/32 AI versão 6, e os espectros foram importados para o Matlab versão 6.5. O PLS toolbox ,versão 2.0, desenvolvido e disponibilizado por Eigenvector Research, foi utilizado para o desenvolvimento dos cálculos. Todos os programas foram rodados em um computador IBM compatível, AMD Thunderbird 1,3 MHz com 128 MB de memória RAM.

4.2 - Reagentes e Soluções

Utilizou-se para o desenvolvimento deste trabalho os seguintes antibióticos da classe das tetraciclinas: clorotetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC) e tetraciclina (TC). Tais reagentes foram adquiridos do fabricante Sigma Aldrich com pureza superior a 99,9%. Em todas as preparações experimentais que se fizeram necessárias utilizou-se água deionizada (Milipore[®]) e metanol para HPLC do fabricante Sigma Aldrich, com pureza mínima de 99,8%.

4.3 - Solução estoque de tetraciclina

Uma solução estoque de concentração 1,00 mg/mL foi preparada pela dissolução de cada um dos tipos de tetraciclinas em metanol e armazenadas em vidro a 20 °C e protegida da luz por no máximo 2 semanas.

4.4 - Solução de trabalho de tetraciclina

Para a solução de trabalho, partiu-se da diluição de 100 μL de solução estoque em 10 mL de metanol obtendo-se assim a concentração de 0,01 mg/mL de tetraciclina. A solução de trabalho era preparada imediatamente antes do seu uso na dopagem do leite, em frasco protegido da luz, e o excedente preparado desta solução descartado em recipiente adequado para tal finalidade.

4.5 - Amostras

4.5.1 - Leite dopado com um tipo de tetraciclina

Foram preparadas 40 amostras de leite Shefa desnatado, lote V089N18, dopadas com quantidades progressivas de tetraciclina. Produziram-se 3 conjuntos, cada um contendo 40 amostras, para cada um dos tipos de tetraciclina (TC, OTC e CTC).

4.5.2 - Leite dopado com dois tipos de tetraciclina

Foram preparadas amostras de leite desnatado Shefa, lote V089N18, dopado com quantidades progressivas de dois tipos de tetraciclina. A partir da combinação das 3 tetraciclina, combinadas duas a duas em 6 níveis de concentração diferentes, obteve-se três conjuntos de 36 amostras cada.

4.6 - Pré-tratamento dos Espectros obtidos

Para todos os espectros obtidos aplicou-se o procedimento de acerto da linha base e suavização (*smooth* – através do filtro Savitsky-Golay), utilizando-se as ferramentas disponíveis no software *PLS Toolbox*[®].

4.7 - Procedimento

4.7.1 - Amostras de leite contendo apenas um tipo de tetraciclina

A partir da solução de trabalho de 0.01 mg/mL de cada tetraciclina em metanol, procedeu-se a dopagem do leite, para 10 mL de amostra. Devido ao fato de ter-se preparado a solução estoque em metanol, por questão de solubilidade das TCs, na dopagem foi necessário que se mantivesse a concentração deste reagente constante em cada uma das amostras de leite, sendo assim, para cada quantidade calculada de adição do estoque em leite, adicionou-se uma quantidade complementar de metanol para que a concentração se mantivesse constante em 500 µl de metanol em 10 mL de leite.

Na tabela 3 tem-se a concentração de tetraciclinas obtida, o volume de estoque necessário para obtenção de tal concentração e o volume de metanol adicionado em cada amostra.

Tabela 3 – Concentração de tetraciclina em cada amostra de leite e quantidade de metanol adicionada por amostra.

# amostra	Concentração Tetraciclina (ppb _v)	Volume estoque (μL)	Volume de metanol complementar (μL)
1	5,0	5,0	495,0
2	17,5	17,5	482,5
3	30,0	30,0	470,0
4	42,5	42,5	457,5
5	55,0	55,0	445,0
6	67,5	67,5	432,5
7	80,0	80,0	420,0
8	92,5	92,5	407,5
9	105,0	105,0	395,0
10	117,5	117,5	382,5
11	130,0	130,0	370,0
12	142,5	142,5	357,5
13	155,0	155,0	345,0
14	167,5	167,5	332,5
15	180,0	180,0	320,0
16	192,5	192,5	307,5
17	205,0	205,0	295,0
18	217,5	217,5	282,5
19	230,0	230,0	270,0
20	242,5	242,5	257,5
21	255,0	255,0	245,0
22	267,5	267,5	232,5
23	280,0	280,0	220,0
24	292,5	292,5	207,5
25	305,0	305,0	195,0
26	317,5	317,5	182,5
27	330,0	330,0	170,0
28	342,5	342,5	157,5
29	355,0	355,0	145,0
30	367,5	367,5	132,5
31	380,0	380,0	120,0
32	392,5	392,5	107,5
33	405,0	405,0	95,0
34	417,5	417,5	82,5
35	430,0	430,0	70,0
36	442,5	442,5	57,5
37	455,0	455,0	45,0
38	467,5	467,5	32,5
39	480,0	480,0	20,0
40	500,0	500,0	0,0

Utilizou-se como branco, água deionizada (milipore®) com 500 μL de metanol. O branco foi medido a cada 4 amostras.

4.7.2 - Amostras de leite contendo dois tipos de tetraciclina

As amostras foram preparadas a partir da mesma solução de trabalho e seguindo o mesmo raciocínio de manter o volume de metanol em solução constante. As tetraciclina foram combinadas duas a duas gerando três conjuntos de amostras, como já citado anteriormente. Seis níveis de

concentração foram escolhidos: 20, 100, 200, 300, 400 e 480 ppb. A partir deste ponto tais níveis foram combinados dois a dois gerando 36 amostras.

O volume final das amostras preparadas foi de 10 mL. Para as amostras nas quais a adição somada da solução de trabalho foi de até 500 μ L, adicionou-se uma quantidade complementar de metanol em cada uma para que a concentração de metanol se mantivesse constante em 500 μ L de metanol para 10 mL de solução. Para as soluções cuja dopagem ocorreu com um volume somado de solução de trabalho de cada uma das TCs maior que 500 μ L, adicionou-se uma quantidade de metanol tal que sua concentração se mantivesse constante na solução em 960 μ L para cada 10 mL de amostra. Na tabela 4 abaixo se apresentam as soluções obtidas a partir deste raciocínio.

Tabela 4 – Concentração de tetraciclinas em cada amostra de leite e quantidade de metanol adicionada por amostra.

Concentração (ppb _v) TC #1	Concentração (ppb _v) TC #2	Volume de solução de trabalho adicionado (μL) TC#1	Volume de solução de trabalho adicionado (μL) TC#1	Concentração total (ppb) TC#1 + TC#2 em 10 mL de leite	Volume de metanol adicionado (μL) *
20	20	20	20	40	460
100	20	100	20	120	380
200	20	200	20	220	280
300	20	300	20	320	180
400	20	400	20	420	80
480	20	480	20	500	0
20	100	20	100	120	380
100	100	100	100	200	300
200	100	200	100	300	200
300	100	300	100	400	100
400	100	400	100	500	0
480	100	480	100	580	380
20	200	20	200	220	280
100	200	100	200	300	200
200	200	200	200	400	100
300	200	300	200	500	0
400	200	400	200	600	360
480	200	480	200	680	280
20	300	20	300	320	180
100	300	100	300	400	100
200	300	200	300	500	0
300	300	300	300	600	360
400	300	400	300	700	260
480	300	480	300	780	180
20	400	20	400	420	80
100	400	100	400	500	0
200	400	200	400	600	360
300	400	300	400	700	260
400	400	400	400	800	160
480	400	480	400	880	80
20	480	20	480	500	0
100	480	100	480	580	380
200	480	200	480	680	280
300	480	300	480	780	180
400	480	400	480	880	80
480	480	480	480	960	0

*A adição de metanol em cada amostra foi feita para que a concentração de metanol se mantivesse constante em cada solução preparada. Aqui, utilizaram-se dois níveis: 500 μL e 960 μL de metanol (500 μL para soluções com concentração somada de TCs até 500 ppb e 960 μL para soluções com concentração somada de TCs de até 960 ppb).

As mesmas condições instrumentais para obtenção dos espectros com somente uma das tetraciclinas presentes em solução foram utilizadas. Utilizou-se como branco, água deionizada (milipore®) com 500 μL de metanol, para amostras onde a soma de tetraciclinas presentes era de até 500 ppb e 960 μL de metanol para amostras nas quais a soma de tetraciclinas presentes era de até 960 ppb. O branco foi medido a cada 4 amostras.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E

DISCUSSÃO

Capítulo V – Resultados e Discussão

5.1 - Leite

O leite é uma mistura bastante complexa de diferentes componentes. Contém grandes quantidades de lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais, bem como células somáticas e bactérias^{1,2}. Tais componentes do leite têm influência significativa na detecção das diferentes tetraciclina em leite. Assim sendo, necessita-se considerar a complexidade do leite ao se desenvolver um procedimento de detecção quantitativa de tetraciclina por espectroscopia de infravermelho em tal matriz^{2,4}.

A faixa do espectro de IV utilizada foi de 900 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} correspondente à região do Infravermelho Médio.

A figura 15 abaixo mostra um espectro no infravermelho (IV) do leite puro desnatado usando água como referência.

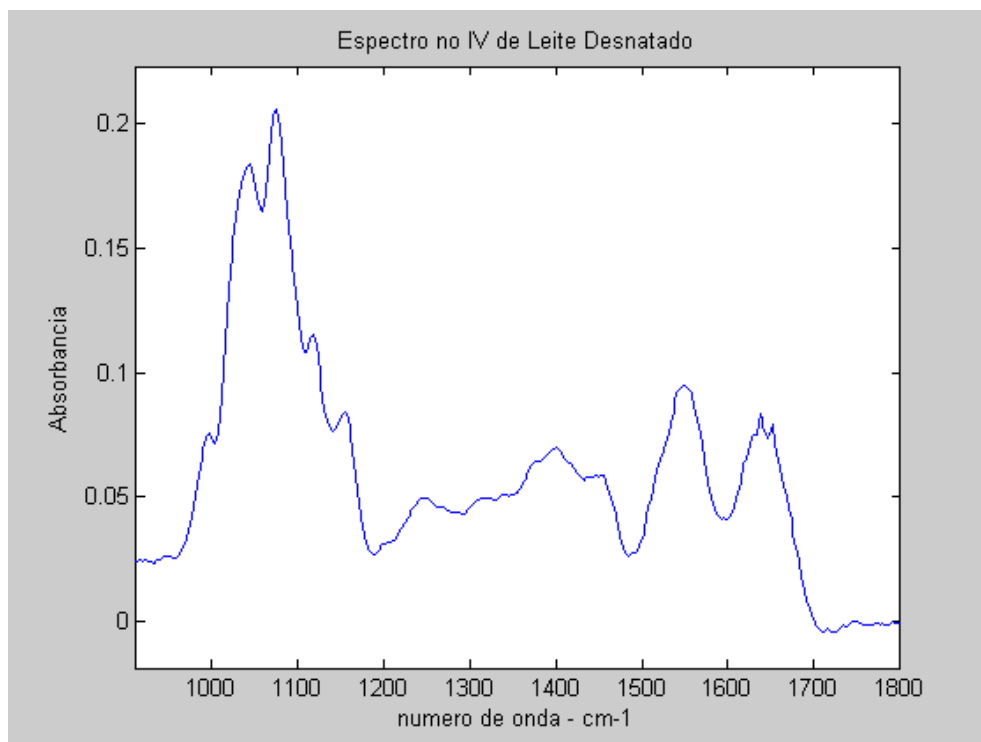


Figura 15 - Espectro no infravermelho de leite puro usando água como referência.

A região entre 1700 e 1500 cm^{-1} é dominada por bandas de proteínas, e a região compreendida entre 1450 e 1200 cm^{-1} é característica de grupos carboxílicos de proteínas.

A característica vibracional de mono e polissacarídeos geralmente ocorre na região entre 1200 e 900 cm^{-1} devido à ligação C-O relacionado ao açúcar²².

5.2 - Tetraciclina em Leite

A figura 16 abaixo mostra o espectro no Infravermelho de amostras de leite desnatado dopado com diferentes concentrações de tetraciclina.

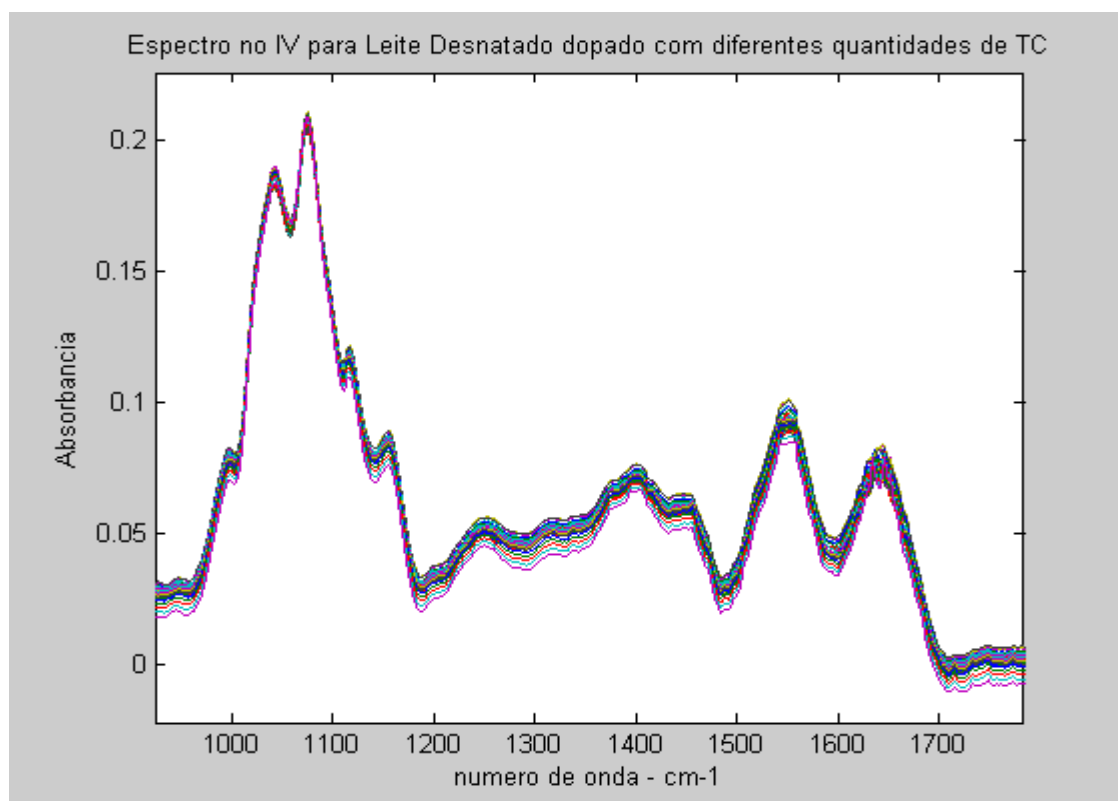


Figura 16 - Espectro no Infravermelho de leite desnatado dopado com diferentes concentrações de Tetraciclina (TC).

5.3 - Classificação das tetraciclina

Após a obtenção dos espectros no Infravermelho das amostras de leite dopadas com tetraciclina (TC, CTC e OTC), bem como das misturas binárias das mesmas, deu-se início ao desenvolvimento de um modelo de classificação supervisionada baseada nos espectros utilizando o método SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogies*)^{18,19}. Nesse método, são desenvolvidos modelos baseados na Análise de Componentes Principais (PCA) para cada classe. Em termos geométricos, cada modelo descreve um envelope ou “caixa” ao redor de cada classe de modo que objetos desconhecidos (novas amostras) podem ser classificados como pertencentes àquela classe em particular se ficarem dentro desses envelopes. A dimensão de cada envelope é dada pela variância das amostras em torno dos componentes principais.

Para tal procedimento, definiu-se 6 classes distintas, como segue:

- Classe 1: TC
- Classe 2: CTC
- Classe 3: OTC
- Classe 4: mistura de TC + CTC
- Classe 5: mistura de TC + OTC
- Classe 6: mistura de CTC + OTC.

Foram escolhidas 155 amostras para o desenvolvimento do modelo de classes e outras 72 amostras foram deixadas para validar o modelo de cada classe. Dessa forma pode-se ter uma idéia do grau de acerto para cada uma das 6 classes definidas.

Para todas as classes, escolheu-se um modelo baseado em 6 componentes principais, que explica, em média, 99,5% da variância dos dados. A Figura 17 mostra a separação entre cada uma das classes em relação às demais classes, visualizada em termos de Q (erros do modelo) e T^2 (Leverage). Nota-se, em todos os casos, uma excelente separação entre a classe referida e as demais.

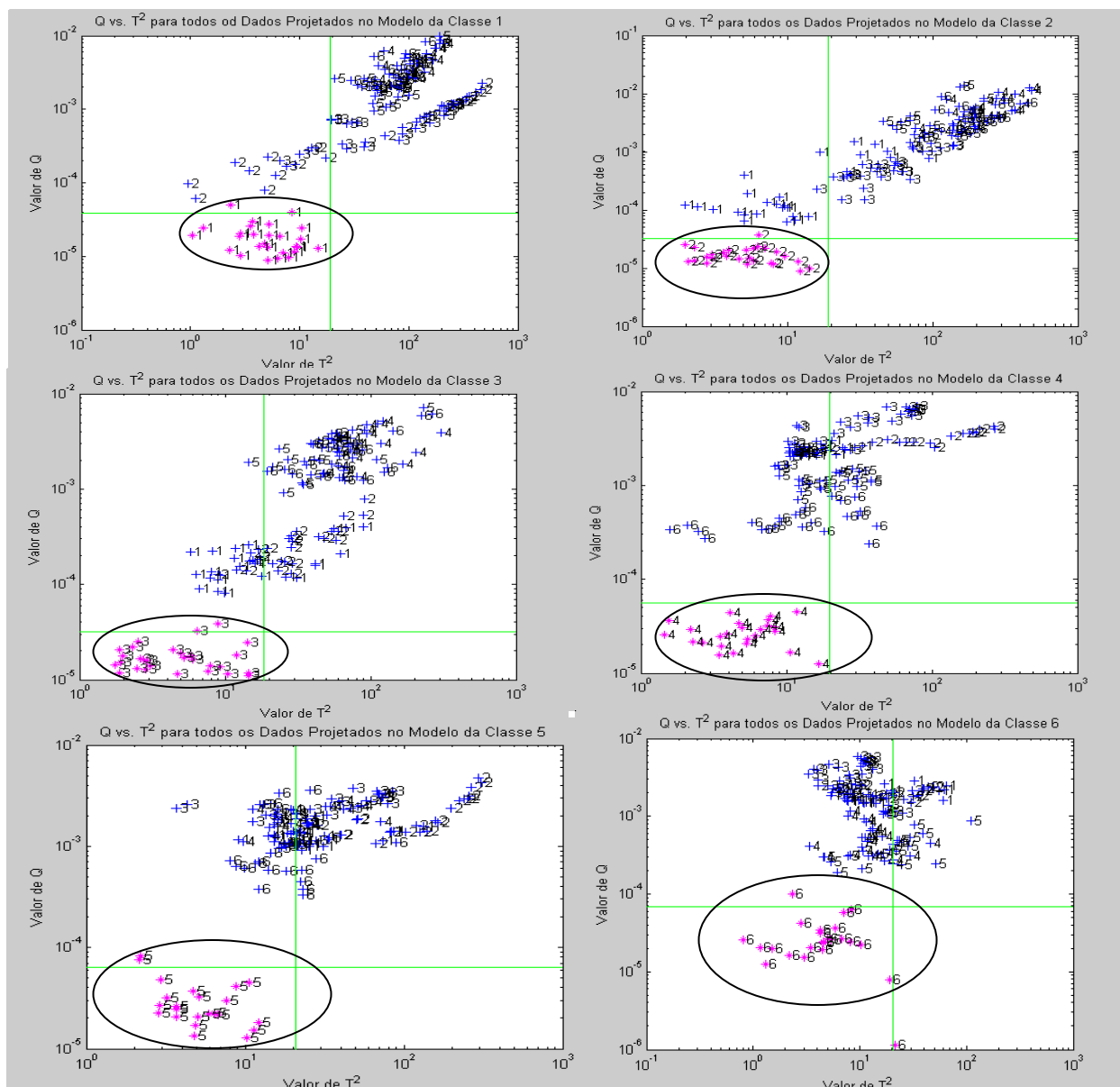


Figura 17 – Modelo SIMCA para cada uma das classes em estudo. Separação visualizada em termos de Q e T^2 .

Um grau de acerto de 100% foi obtido para as amostras de validação das 6 classes distintas. Dessa forma, podemos diferenciar amostras de leite contaminadas com um dos tipos de tetraciclinas estudados ou a mistura binária delas baseado em seu espectro de Infravermelho médio.

5.4 - Determinação do Teor de Tetraciclina (TC)

Visando refinar o espectro, selecionando apenas a região espectral com maior relação com a quantidade de tetraciclinas presente na amostra, implementou-se o procedimento de seleção de variáveis por intervalos (ou iPLS – PLS por intervalos). Por este procedimento, subdivide-se o espectro em várias partes e um modelo de regressão baseado no PLS é desenvolvido para cada intervalo. Feito isso, se compara o RMSECV (raiz quadrada do erro médio da validação cruzada) obtido para o modelo de cada intervalo com o obtido utilizando todo o espectro. O intervalo que apresentar o menor erro em relação ao modelo global (utilizando todo o espectro) é escolhido para a previsão.

Foram selecionadas 32 amostras para o desenvolvimento do modelo de calibração e 9 amostras para validação, que são utilizadas para verificar se o modelo desenvolvido apresenta boa habilidade para previsão da concentração do contaminante (TC neste caso) em novas amostras.

No modelo de iPLS desenvolvido para a Tetraciclina (TC), o espectro foi dividido em 15 partes iguais. Na figura 18 abaixo, verifica-se os intervalos obtidos e o valor de RMSECV para cada um deles em gráfico de barras, de acordo com o modelo de PLS desenvolvido para cada região. Para este caso em particular, o segundo intervalo é o que apresentou o modelo mais adequado à quantidade de tetraciclina nas amostras consideradas. Dentro de cada barra de erro é mostrado o número de componentes principais utilizado, e abaixo do eixo das abscissas, tem-se o número de intervalos no qual foi dividido o espectro.

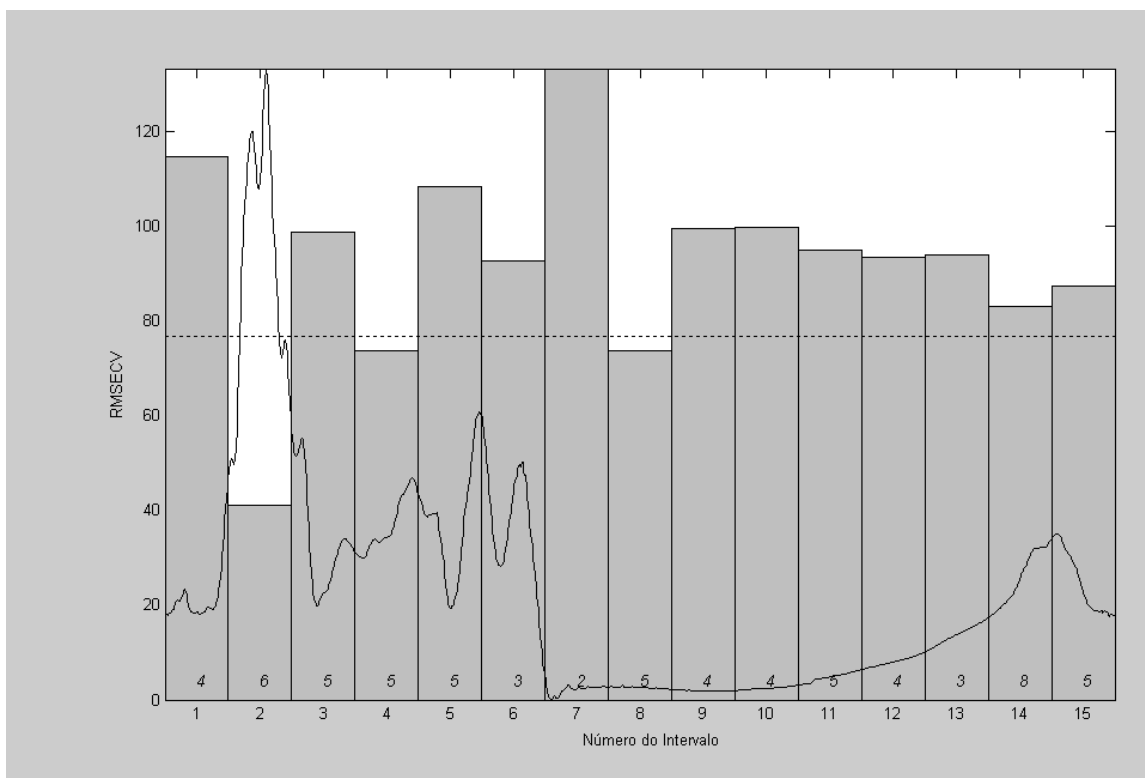


Figura 18 - Gráfico de barras do RMSECV para cada intervalo.

A Figura 19 mostra a região escolhida em detalhe, onde se pode verificar a ocorrência de picos na região de 1045, 1075 e 1120 cm^{-1} . Tal região é dominada pela característica vibracional das ligações C-O de ligações C-O-C da Tetraciclina⁷.

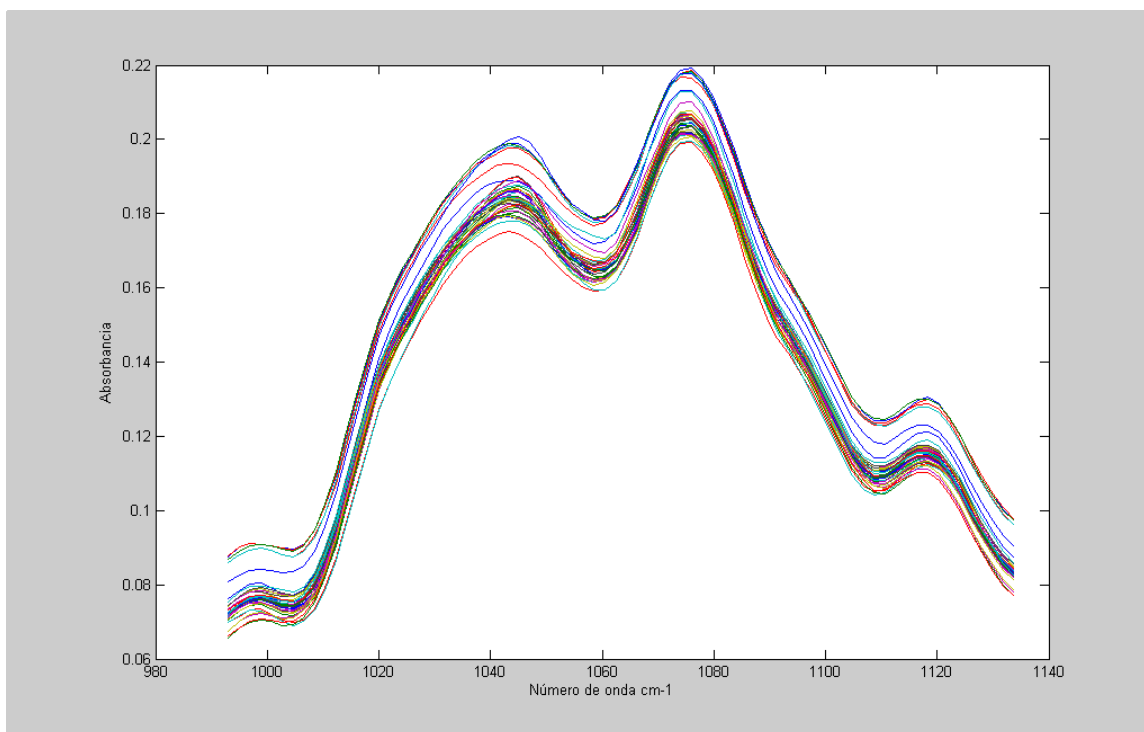


Figura 19 - Região espectral selecionada pelo iPLS.

Os resultados obtidos para previsão das nove amostras de validação utilizando a região espectral selecionada são apresentados na Tabela 5.

Na tabela 5 são apresentados também os valores previstos pelo PLS utilizando-se todo o espectro para a construção do modelo de calibração, e os erros relativos de previsão. Nota-se grande melhora na previsão de novas amostras com a utilização do iPLS.

Tabela 5 - Erros de previsão para a determinação de TC.

Valor esperado (ppb _v)	Valor previsto PLS (espectro completo) (ppb _v)	Valor previsto iPLS (ppb _v)	Erro Relativo- PLS espectro completo (%)	Erro Relativo iPLS (%)
42,5	7,2	45,9	83,1	-8,0
67,5	128,1	75,1	-89,8	-11,3
142,5	202,5	161,7	-42,1	-13,5
217,5	279,3	227,5	-28,4	-4,6
242,5	319,8	255,0	-31,9	-5,2
292,5	298,8	273,2	-2,2	6,7
342,5	417,9	323,4	-22,0	5,6
392,5	436,8	400,0	-11,3	-1,9
500,0	588,6	482,9	-17,7	3,4

5.5 - Determinação do Teor de clorotetraciclina (CTC)

Para a determinação do teor de clorotetraciclina nas amostras de leite, o mesmo procedimento aplicado à Tetraciclina TC foi adotado, porém neste caso, o número ideal encontrado para a divisão do espectro foi de 17 partes. Como pode ser verificado na Figura 20a, o intervalo no. 9 apresentou o menor valor de RMSECV, que corresponde à região de 1412 a 1488 cm^{-1} , característica de vibração de grupos OH terciários e grupos C-H presentes nas clorotetraciclinas⁷, conforme representado na figura 20b. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

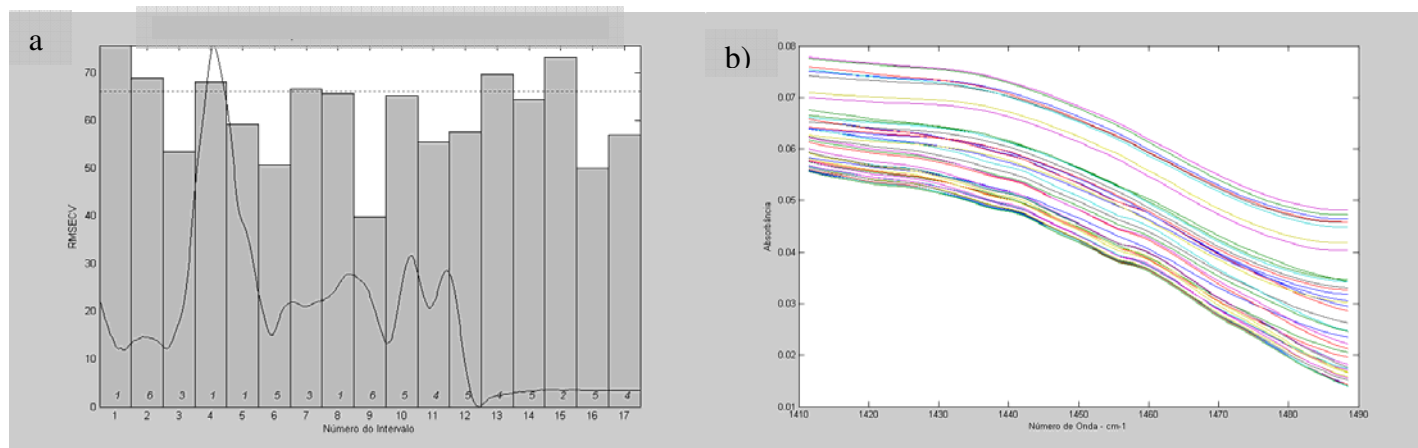


Figura 20 - a) Seleção da região espectral; b) região espectral escolhida para os cálculos.

Tabela 6 - Erros de previsão para a determinação de CTC.

Valor esperado (ppb _v)	Valor previsto PLS (espectro completo) (ppb _v)	Valor previsto iPLS (ppb _v)	Erro Relativo - PLS espectro completo (%)	Erro Relativo- iPLS (%)
42,5	12,3	52,2	71,1	-22,8
67,5	115,2	79,0	-70,7	-17,0
142,5	231,3	131,5	-62,3	7,7
217,5	235,6	213,4	-8,3	1,9
242,5	311,2	248,4	-28,3	-2,5
292,5	331,0	289,8	-13,2	0,9
342,5	387,9	347,7	-13,3	-1,5
392,5	318,3	390,1	18,9	0,6
500,0	529,0	481,1	-5,8	3,8

5.6 - Determinação do teor de oxitetraciclina (OTC)

Novamente o método iPLS foi aplicado ao desenvolvimento do modelo de calibração multivariada. Nesse caso, obteve-se um melhor resultado tomando-se apenas uma parte do espectro total ($1150 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) e dividindo-o em 4 partes iguais. A Figura 21a mostra a seleção da região espectral, que nesse caso apresenta o intervalo no. 1 com menor RMSECV, que corresponde à faixa de 1060 a 1204 cm^{-1} (figura 21b), que é uma região dominada por vibrações do anel de ciclohexano e do grupo C-N de amina terciária presentes na OTC.

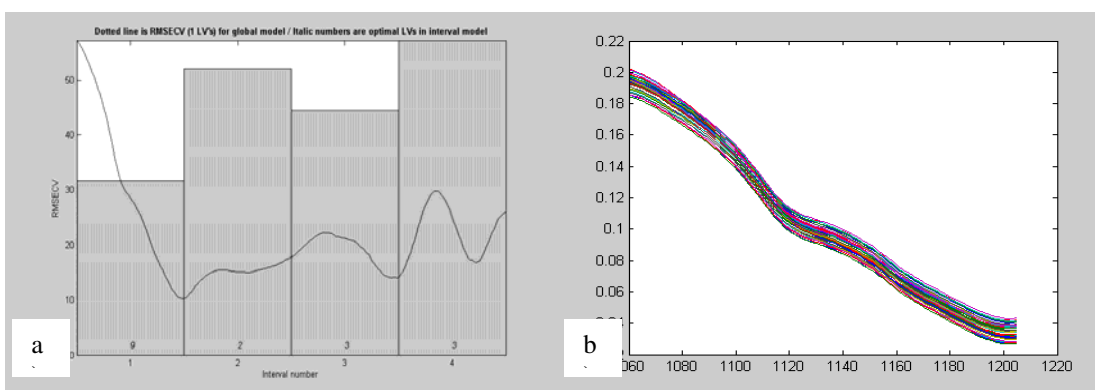


Figura 21 - a) Seleção da região espectral; b) região espectral escolhida para os cálculos.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Erros de previsão para a determinação de OTC.

Valor esperado (ppb _v)	Valor previsto pelo modelo PLS do espectro completo	Valor previsto iPLS (ppb _v)	Erro Relativo - PLS espectro completo (%)	Erro Relativo- iPLS (%)
42,5	11,2	55,5	73,6	-30,7
67,5	95,6	79,6	-41,6	-17,9
142,5	189,6	162,3	-33,1	-13,9
217,5	264,3	217,0	-21,5	0,2
242,5	287,7	274,0	-18,6	-13,0
292,5	315,4	288,1	-7,8	1,5
342,5	414,4	328,8	-21,0	4,0
392,5	378,1	409,2	3,7	-4,3
500,0	569,7	493,7	-13,9	1,3

5.7 - Determinação da soma de TC e CTC

Para a determinação do teor dos antibióticos testados em misturas binárias dos mesmos, a utilização do iPLS para selecionar uma região do espectro que melhor descrevesse a correlação com o teor de contaminante no leite não teve sucesso, já que não foi possível obter regiões com erros de previsão (RMSECV) menores que os apresentados para todo o espectro (modelo global).

A Tabela 8 mostra os resultados para a previsão das amostras de validação da soma de TC e CTC. Como pode ser verificado na Tabela 8, os erros são bastante baixos, sempre abaixo de 8%.

Tabela 8 - Erros de previsão para a determinação da soma de TC e CTC.

Valor esperado (ppb _v)	Valor previsto (ppb _v)	Erro Relativo (%)
320,0	345,9	-8,0
500,0	473,0	5,4
580,0	568,7	1,9
680,0	674,2	0,9
400,0	422,2	-5,5
780,0	804,0	-3,1
700,0	709,6	-1,4
580,0	589,0	-1,6

5.8 - Determinação da soma de TC e OTC

As mesmas considerações feitas para a determinação da soma da mistura binária de TC e CTC, são válidas para a soma de todas as outras misturas binárias testadas, ou seja, para tais determinações o uso de todo o espectro (dentro da região de trabalho citada na parte experimental) foi mais adequado. Os resultados para a previsão da soma de TC e CTC são apresentados na Tabela 9. Novamente, nesse caso podem-se verificar erros sempre abaixo de 11%.

Tabela 9 - Erros de previsão para a determinação da soma de TC e OTC.

Valor esperado (ppb_v)	Valor previsto (ppb_v)	Erro Relativo (%)
320,0	341,3	-6,7
500,0	497,7	0,5
580,0	559,7	3,5
680,0	682,1	-0,3
400,0	443,5	-10,9
780,0	757,3	2,9
700,0	674,6	3,6
580,0	586,4	-1,1

5.9 - Determinação da soma de CTC e OTC

Os resultados para a previsão da soma de CTC e OTC são apresentados na Tabela 10. Também como para a soma das outras tetraciclinas, observam-se erros baixos, sempre abaixo de 8%.

Tabela 10 - Erros de previsão para a determinação da soma de CTC e OTC.

Valor esperado (ppb_v)	Valor previsto (ppb_v)	Erro Relativo (%)
320,0	308,9	3,5
500,0	464,0	7,2
580,0	597,8	-3,1
680,0	683,2	-0,5
400,0	403,8	-0,9
780,0	768,9	1,4
700,0	740,1	-5,7
580,0	556,9	4,0

CONCLUSÕES

CONCLUSÃO

Foi possível verificar em todos os modelos desenvolvidos, que a previsão de amostras com concentrações inferiores a 100 ppb apresenta erros mais elevados (em média 18%). Dessa forma, a metodologia desenvolvida não é adequada para concentrações de tetraciclinas em leite inferiores a 100 ppb.

Para valores superiores a 100 ppb, os modelos de previsão criados apresentam-se razoáveis (erros menores que 13%), adequados para uma metodologia de detecção semi-quantitativa de tetraciclinas em leite desnatado.

Em misturas com dois tipos de tetraciclinas presentes na amostra de leite, somente foi possível quantificar a soma das mesmas, porém, tal limitação não deve ser considerada demasiadamente prejudicial, já que na maioria das vezes pretende-se saber apenas a quantidade total de tetraciclinas presentes na amostra.

Agregando valor à metodologia de quantificação desenvolvida, foi possível classificar o tipo de tetraciclina presente na amostra de leite, tanto para amostras com somente uma das tetraciclinas como contaminante, quanto para amostras com dois tipos das tetraciclinas testadas presentes.

Sendo assim, pode-se identificar qual o contaminante presente na amostra de leite e, feito isso, submeter o espectro de tal amostra ao modelo de quantificação adequado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OLIVEIRA, C.AF.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, v.13, 62 (1999), 10-16.
2. EMBRAPA. CNPGL. Produção, importação, exportação e consumo de leite no Brasil, 1980 – 2003. Tabela 07.06. Disponível em <<http://www.Cnpgl.embrapa.br/produção/07consumo/tabela07.06.php>>, acesso em 12/08/2006.
3. PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiology: Concepts and Application. New York: McGraw-Hill, v. 2, 1993, 22-40.
4. MINIUSSI, J.T. Resíduos de Medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. Doenças dos bovinos de leite adultos. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992, p. 169-174.
5. GUSTAFSON, R.H. & BOWEN, R.E. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 5 (1997), 531-541.
6. BISHOP, J. R.; WHITE, C.H. Antibiotic residue detection in milk: A review. *Journal of Food Protection*, 47, 8 (1984), 647-652.
7. GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene do leite: Aspectos legais das mastites. *Higiene Alimentar*, 9, 36 (1995), 12-16.
8. MARTH, E.H.; ELLICKSON, B.E. Antibiotics residues in milk products – A review. *Journal of Milk Food Technology*, 22, 7 (1959), 241-249.

9. KATZ, S.E.; BRADY, M.S. In: Antibiotic residues in food and their significance. DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. *Antimicrobials in Foods*. 2. ed. Revised and expanded. New York, 1993.
10. BARBANO, D.M.; RASMUSSEN, R.R.; LYNCH, J.M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *Journal of Dairy Science*, 74, 8 (1984), 647-652.
11. MURPHY, S.C.; CRANKER, K.; SENYK, G.F.; BARBANO, D.M.; SAEMAN, A.J.; GALTON, D.M. Influence of Bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 72, 3 (1989), 620-626.
12. RENEAU, J. K.; PACKARD, V.S. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 11, 5 (1991), 4-11.
13. CORCIA, A.D.; NAZZARI, M. An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 974 (2002), 53-89.
14. TAVARES, W. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. *Agentes infecciosos*. 2. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996.
15. BOOTH, N.H.; MCDONALD, L. M.; Farmacologia e terapêutica em veterinária. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
16. MIDIO, A.F. & MARTINS, D.I. In: *Toxicologia de Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 2000, p. 295.

17. SPINOSA, H.S. Considerações gerais sobre antimicrobianos. In: GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*, 2 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999, p.333-336.
18. WEY, S.B. Bactérias multi-resistentes: podemos minimizar este problema? *Anais do 1º encontro de doenças infecciosas adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar*. Arquivo Brasileiro de Medicina, Rio de Janeiro, v.70, n.2, 1996, p.97-110.
19. COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implication for a post anti-microbial era. *Science*, 257, 5073 (1992), 1050 – 1055.
20. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet. Brasília, Novembro de 2003. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>>. Acesso em 27/09/2005.
21. COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. *Higiene Alimentar*, 10, 44 (1996), 15-17.
22. VASSIL, M. Resistance to antibiotics in Staphylococcus aureus isolated from dairy cow mastitis, milk, udder smears and milking installation. *Veterinary Medicine*, 44, 4 (1999), 115-120.
23. KATZUNG, B. G. In: *Farmacologia Básica e Clínica*, 6 ed., Guanabara, Copyright, 1998.
24. KOSIKOWSKI, F.V. The control of antibiotic in milk through a sound test program. *Journal of Milk and Food Technology*, 23, 7 (1960), 285-287.

25. FILHO, J.F. & DIAS, J.G. Antibióticos no leite: problemas e conseqüências. Artigo Técnico. Qualidade em Dia. *Hexis Científica*. v.16, 2001, p.6-7.
26. MOATS, W. A.; HARIKKAHN, R. Rapid HPLC Determination of Tetracycline antibiotics in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 4 (1995), 931-934.
27. SENYK, G. F.; DAVIDSON, J.H.; BROW, J.M.; HALLSTEAD, E.R.; SHERBON, J.W. Comparison of rapid tests used to detect antibiotic residues in milk. *Journal of Food Protection*, 53, 2 (1990), 158-164.
28. AURELI, P.; FERRINI, A.M.; MANNONI, V. Effect of some proteolytic enzymes on microbial detection levels for tetracyclines and sulfonamides in milk serum. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 50, 415 (1999), 115-118.
29. Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products. *International Dairy Federation Special Issue 9701*. IDF General Secretariat: 41, Square Vergote, B-1040 Brussels (Belgium), p. 189, 1991.
30. MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; McEWENS, S.A.; McNAB, W.B.; YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *Journal of Food Protection*, 61, 6 (1998), 742-756.
31. FDA. United States/Food and Drug Administration. Tolerances established for tetracycline in milk. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>. Acesso em: 12/03/2006.
32. Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº3 (22/01/1999). *Diário Oficial nº244 de 22/12/1999, seção 1*.

33. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 78, de 19 de dezembro de 2002. Anexo III. Publicado no Diário Oficial da União de 03 de janeiro de 2003, seção 1. Disponível em :<<http://extranet.agricultura.gov.br/agrolegis/do/ConsultaLei?op=viewTextual&codigo=1085>>. Acesso em: 11/04/2005.
34. SINDAN. Manual de Produtos Veterinários. Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para a Saúde Animal. CD-ROM. MPV 2001-2002.
35. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2002.
36. SCHRADER, B. Infrared and Raman Spectroscopy: methods and applications. Weinheim: VCH, 1995.
37. BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. *Handbook of Near-Infrared Analysis*. New York: Marcel Dekker, 2001.
38. WORKMAN JR, J. J. Interpretative spectroscopy for near infrared, *Applied Spectroscopy Review*, 31, 3 (1996), 251-320.
39. COATES, J. A review of current new technology: Used in instrumentation for Industrial vibrational spectroscopy, *Spectroscopy*, 14, 10 (1999), 21-34.
40. HARRICK, N.J. Multiple Reflection Cells for Internal Reflection Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 36 (1964), 188-191.
41. COLEMAN, P.B. Practical sampling techniques for infrared analysis. CRC Press, London, 1993.

42. COULTHUP, D. W. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Academic Press, 2^a ed., New York, 1975.
43. BOKOBZA, L. Near infrared spectroscopy, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6 (1998), 3-17.
44. FRANT, M. S.; LABUTTI, G. Process infrared measurements, *Analytical Chemistry*, 52, 12 (1980), A1331-A1344.
45. BORGES, W.N. Aplicação de métodos de Reconhecimento de Padrões para classificação de Óleos Vegetais. *Dissertação de Mestrado (2001)* – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás.
46. BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria, *Quim. Nova*, 8 (1995), 84-99.
47. OTTO, M. Chemometrics – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry, Weinheim: Wiley, 1999.
48. BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics: A practical guide*. New York: Wiley, 1998.
49. BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst*, 125 (2000), 2125-2154.
50. BARTHUS, R.C. Aplicação de Métodos Quimiométricos para Análise de Controle de Qualidade de Óleos Vegetais utilizando Espectroscopia no Infravermelho e Raman – *Dissertação de Mestrado* (1999)
51. JOHNSON, A. R.; WICHEM, W.D. Applied Multivariate Statistical Analysis, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 4th ed., 1998.

52. POPPI, R. J. Quantificação de Picos Cromatográficos Superpostos por Métodos de Calibração Multivariada - *Dissertação de Mestrado* (1989), UNICAMP.
53. MARTENS H. E TORMOD N., *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, New York, 1989.
54. The Unscrambler, CAMO ASA, versão 6.0, 1997.
55. THOMAS, E.V. A primer on multivariate calibration. *Analytical Chemistry*, 66, 15 (1994), A795-A804.
56. THOMAS, E.V.; HAALAND, D.M.; Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral-analysis. *Analytical Chemistry*, 62, 10 (1990), 1091 – 1099.
57. MALINOWSKI, E. R., *Factor Analysis in Chemistry*, 2th. Ed., John Wiley & Sons, Inc., 1991.
58. WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P., .Principal Component Analysis, *Chemometrics and Intelligent Systems*, 2 (1987), 37-52.
59. THOMAS, E. V., A Primer on Multivariate Calibration, *Analytical Chemistry*, 66, 15 (1994), 795A - 803A.
60. CENTNER, V.; MASSART, D. Elimination of uninformative variables for multivariate calibration, *Analytical Chemistry*, 68, 21 (1996), 3851-3858.
61. BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst*, 125 (2000), 2125-2154.

62. VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L.; BUYDENS, L. M. C.; JING, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*. Amsterdam: Elsevier, 1998.
63. FERREIRA, M. M. C; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O., .Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial., *Química Nova*, 22, 5 (1999), 724-731.
64. SEKULIC, S.; SEASHOLTZ, M. B.; WANG, Z.; KOWALSKI, B. R. Nonlinear multivariate calibration methods in analytical chemistry, *Analytical Chemistry*, 65, 19 (1993), A835-A845.
65. ROHRBACK, B. G., .Computer-assisted Rating of Gasoline Octane., *Trends in Analytical Chemistry*, 10, 9, 1991.
66. HELLAND, I. S. On the structure of partial least square regression, *Communications in statistics – simulation and computation*, 17, 2 (1998).
67. MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. London: Prentice Hall, 2000.
68. GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial Least Squares Regression: A Tutorial, *Analytical Chemistry. Acta*, 1986, 1-17.
69. LINDGREN, F; GELADI, P.; WOLD, S. Kernel-based PLS regression: Cross Validation and applications to spectral data. *Journal of Chemometrics*, 8 (1994), 377- 389.
70. NIEMEYER, J.; CHEN, Y.; BOLLAG, J.M. Characterization of humic acids, composts and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. *Soil Science Society of America Journal*, 56 (1992), 130-135.

71. LUINGE, H.J.; VAN DER MAAS, J.H.; VISSER, T. Partial least squares regression as a multivariate tool for the interpretation of infrared spectra, *Chemometric Intelligence Laboratory System.*, 28 (1995), 129-138.
72. OLIVEIRA, F. C.; SOUZA, A. T. P. C.; DIAS, J. A.; DIAS, S. C. L.; RUBIM, J. C. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos, *Quim. Nova*, 27, 2, 2004.
73. OSBORNE, S. D.; JORDAN, R. B.; KÜNNEMEYER, R. Method of wavelength selection for partial least square, *Analyst*, 122 (1997).
74. CENTNER, V.; MASSART, D. Elimination of uninformative variables for multivariate calibration, *Analytical Chemistry*, 68, 21 (1996), 3851-3858.
75. NORGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J. P.; MUNCK, L; ENGELSEN, B. Interval partial least-square regression (iPLS): A comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 54, 3 (2000), 413-419.
76. ABRAHAMSSON, C. ET AL. Comparison of different variable selection methods conducted on NIR transmission measurements on intact tablets, *Chemometric. Intelligence. Laboratory. System*, 69 (2003), 3-12.
77. SHARAF, M.A.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R.; *Chemometrics*, 1986, ed. John Wiley & Sons, Inc.
78. MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S.N.; MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L; *Chemometrics : A Textbook*, ed Elsevier, 1998.

79. MELLINGER, M. Multivariate Data Analysis: Its Methods, *Chemometric Intelligence Laboratory System*, 2 (1987), 29.
80. WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P.; Principal Component Analysis, *Chemometric Intelligence Laboratory System*, 2 (1987), 37.