

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS

RENATA DE CARVALHO TEIXEIRA

**RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE: LIMITE DE DETECÇÃO
POR ESPECTROSCOPIA ÓPTICA**

JUIZ DE FORA-MG
2019

RENATA DE CARVALHO TEIXEIRA

**RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE: LIMITE DE DETECÇÃO
POR ESPECTROSCOPIA ÓPTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos

Co-orientador: Dra. Geórgia Maria Amaral Junqueira

JUIZ DE FORA-MG

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Carvalho Teixeira, Renata.

Resíduos de Antibiótico em leite: Limite de detecção por espectroscopia óptica / Renata de Carvalho Teixeira - 2019.

85 p.: il

Orientador: Virgílio de Carvalho dos Anjos

Coorientadora: Geórgia Maria Amaral Junqueira

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2017.

1. Leite. 2. Raman. 3. Antibiótico. 4. Infravermelho. 5. Análise de Componentes Principais. 6. Qualidade dos alimentos I. de Carvalho dos Anjos, Virgílio, orient. II. Maria Amaral Junqueira, Geórgia, coorient. III. Título

**RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE: LIMITE DE DETECÇÃO
POR ESPECTROSCOPIA ÓPTICA**

Renata de Carvalho Teixeira

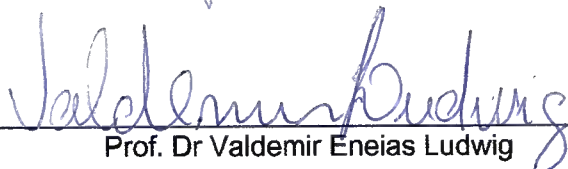
Prof. Dr Virgílio de Carvalho dos Anjos

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 23/08/2019.



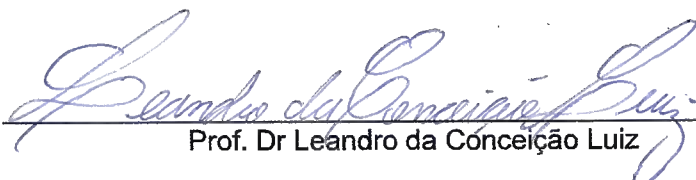
Prof. Dr. Cristina Guimarães Pereira



Prof. Dr Valdemir Eneias Ludwig



Prof. Dra. Geórgia Maria Amaral Junqueira



Prof. Dr Leandro da Conceição Luiz



Prof. Dr Virgílio de Carvalho dos Anjos

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família
e ao Paulo, por todo o apoio durante
este período de estudos.

AGRADECIMENTOS

- A toda minha família, em especial aos meus pais e minhas irmãs por sempre terem acreditado em mim;
- A Deus, Àquele que sempre me fortalece;
- A minha mãe por ser um exemplo de busca incansável pelo conhecimento;
- Ao Paulo por sempre fazer parte dos meus sonhos;
- A todos os professores que tive por me ajudarem na construção do saber;
- Ao professor Virgílio dos Anjos e a professora Geórgia Junqueira por terem me orientado durante os últimos anos, minha eterna gratidão pela oportunidade, apoio, confiança e por possibilitar este trabalho, além de toda experiência adquirida, mesmo diante de tanta dificuldade;
- Aos amigos que sempre me apoiaram durante todo o curso, em especial as amigas Luana, Carla, Fernanda, Mariana, Edyenis e Kymberly por oferecerem um ombro amigo durante a caminhada;
- Ao grupo do Laboratório de Espectroscopia de Materiais, com destaque aos colegas Cassiano, Leandro, Radha e Ilza, por todo apoio, orientações, críticas e ajuda. Este trabalho não teria a mesma qualidade sem vocês;
- Ao Sítio da Pérola e seus administradores pela doação do leite cru fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.
- À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, pela oportunidade de realização do curso;
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) a quem os autores muito agradecem.
- A todos que de alguma forma contribuíram à minha formação, o meu sincero agradecimento!

RESUMO

O leite, rico em vários nutrientes, desempenha um papel importante na nutrição humana. Sua qualidade está intimamente ligada a eficácia do processo de manipulação. A presença de resíduos de antibióticos no leite bovino causa sérios prejuízos na produção de queijos, iogurtes e coalhos. A ingestão desses resíduos ameaça a saúde do consumidor favorecendo a resistência microbiana e a hipersensibilidade. Assim, o objetivo deste estudo é testar a aplicação de técnicas de espectroscopia Raman e Infravermelho, que se destacam como ferramentas analíticas de grande potencial, uma vez que proporcionam resultados rápidos, quantitativos, qualitativos e confiáveis, exigindo pouco ou nenhum pré-tratamento das amostras. Investigou-se por meio de análise computacional a conformação e o espectro vibracional das moléculas dos antibióticos Penicilina e Ampicilina, com auxílio de um funcional híbrido B3LYP no nível de teoria DFT. A partir da Resolução 53 de outubro da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Brasil segue os Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pelo Mercosul. O leite analisado foi separado em duas porções, o genuíno e o controle sendo que nesta última foi simulada a contaminação por antibiótico seguindo os LMR. Não foi necessária a realização de pré ou pós-tratamento das amostras para as análises. Os resultados obtidos indicam que esta metodologia possa ser utilizada futuramente na identificação do tipo e na quantificação do antibiótico que possa estar presente no leite bovino.

Palavra-chave: Leite. Raman. Antibiótico. Infravermelho. Análise de Componentes Principais. Qualidade dos alimentos

ABSTRACT

Milk, rich in various nutrients, plays an important role in human nutrition. Quality is closely linked to the effectiveness of the handling process. The presence of antibiotic residues in bovine milk causes serious losses in the production of cheeses, yogurts and curds. The ingestion of these residues threatens the health of the consumer favoring microbial resistance and hypersensitivity. Thus, the objective of this study is to test the application of Raman and Infrared spectroscopy techniques, which stand out as analytical tools of great potential, since they provide fast, quantitative, qualitative and reliable results, requiring little or no pretreatment of the samples. The conformation and vibrational spectrum of the antibiotic molecules Penicillin and Ampicillin were investigated by means of a computational analysis with the aid of a B3LYP hybrid functional at the DFT theory level. As of Resolution 53 of October of the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA), Brazil follows the Maximum Residue Limits (MRLs) established by Mercosur. The analyzed milk was separated into two portions, the genuine and the control being that the latter was simulated the antibiotic contamination following the MRLs. Pre- or post-treatment of the samples was not required for the analyzes. The results indicate that this methodology can be used in the future to identify the type and quantification of the antibiotic that may be present in bovine milk.

Keyword: Milk. Raman. Antibiotic. Infra-red. Principal component analysis. Food quality

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modos de vibração de moléculas diatômicas e triatômicas	211
Figura 2 Representação esquemática da ATR.....	233
Figura 3 Níveis de energia para o espalhamento Raman. A) Espalhamento elástico. B) Espalhamento Stokes. C) Espalhamento Anti-Stokes.	289
Figura 4 Diagrama esquemático da diluição de 1 µL de substância (antibiótico) em 10 mL de água para alcançar uma concentração de 1 ppm (LUIZ et al., 2018).	366
Figura 5 Espectrômetro BRUKER®, modelo Vertex 70 com acessório ATR	37
Figura 6: Modelo teórico computacional dos antibióticos Benzilpenicilina e Ampicilina	433
Figura 7 O espectro em linha contínua representa o espectro experimental de leite cru. Em linha tracejada está representado o espectro de leite cru diluído em água.....	455
Figura 8 Espectros experimentais FT-MIR Benzilpenicilina A2 (uso humano) pura, Benzilpenicilina diluída em leite (simulação de contaminação), Benzilpenicilina diluída em água (adulterada) e leite puro.	487
Figura 9 Espectros FT MIR de Ampicilina Pura, ampicilina diluída em leite, ampicilina diluída em água e leite puro.....	48
Figura 10 Espectros experimentais FT-MIR de oxitetraciclina pura, diluída em leite e diluída em água. Para comparação também foi adicionado um espectro de leite puro.	54
Figura 11 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para valores médios das amostras via espectroscopia Raman: Leite puro (3), Penicilina veterinária pura (6), Penicilina humana pura (5), Ampicilina pura (1), Penicilina veterinária diluída em água (10) Penicilina humana diluída em água (2), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Ampicilina diluída em leite (9), Leite diluída em água (4), Penicilina humana diluída em leite (7).....	51
Figura 12 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia Raman: Leite Puro (3), Penicilina veterinária pura (6), Penicilina humana pura (5), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Penicilina humana diluída em leite (7), Ampicilina (1), Ampicilina diluída em leite (9).	53
Figura 13 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia Raman: Leite Puro (3), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Penicilina humana diluída em leite (7), Ampicilina diluída em leite (9).	54
Figura 14 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia de Infravermelho: Leite puro (3), Penicilina veterinária pura (6), Penicilina humana pura (5), Ampicilina pura (1), Penicilina veterinária diluída em água (10) Penicilina humana diluída em água (2), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Ampicilina diluída em leite (9), Leite diluída em água (4), Penicilina humana diluída em leite (7), Ampicilina diluída em água (11).	56
Figura 15 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia de Infravermelho: Leite Puro (3), Penicilina veterinária pura (6), Penicilina humana pura (5), Ampicilina Pura (1), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Penicilina humana diluída em Leite (7), Ampicilina diluída em Leite (9).	57
Figura 16 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia de Infravermelho: Leite Puro (3), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Penicilina humana diluída em leite (7), Ampicilina diluída em leite (9).	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Princípios ativos e limites do grupo beta-lactâmico	11
Tabela 2 Princípios ativos e limites do grupo tetraciclina.....	122
Tabela 3 Princípios ativos e limites do grupo sulfonamida.....	122
Tabela 4 Princípios ativos e limites do grupo quinolona	133
Tabela 5 Fármacos utilizados como contaminantes	355
Tabela 6 Resultado da caracterização físico-química da amostra de leite.	411
Tabela 7 Dados estruturais dos compostos de penicilina e ampicilina. Os cálculos teóricos foram obtidos no nível de teoria B3LYP / 6 - 31 + G (d, p).....	444

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS.....	8
2.1 GERAL.....	8
2.2 ESPECÍFICOS.....	8
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3.1 LEITE.....	9
3.2 ANTIBIÓTICOS.....	10
3.2.1 Antibióticos comuns no tratamento do gado leiteiro	11
3.3 LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS.....	13
3.4 MASTITE.....	14
3.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA	155
3.6 EFEITOS CARCINOGÊNICO, MUTAGÊNICO E TERATOGENICOS.....	166
3.7 PERTURBAÇÃO DA FLORA INTESTINAL.....	16
3.8 PREJUÍZOS NO BENEFICIAMENTO INDUSTRIAL.....	177
3.9 FERRAMENTAS DE DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS.....	17
3.10 ESPECTROSCOPIA ÓPTICA	188
3.10.1 Técnica de espectroscopia infravermelho	199
3.10.2 Espectroscopia Raman.....	244
3.10.3 Métodos Computacionais	288
3.10.4 Aproximação de Born-Oppenheimer	29
3.10.5 A Teoria do Funcional da Densidade	30
3.11 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 AMOSTRAS DE LEITE.....	33

4.2 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICA.....	33
4.2.1 Acidez	33
4.2.2 Alizarol	34
4.2.3 pH.....	34
4.2.4 Crioscopia	34
4.2.5 Densidade	35
4.3 AMOSTRAS DE ANTIBIÓTICOS	35
4.3.1. Simulando a contaminação.....	35
4.5 ANÁLISE POR FT-MIR DO LEITE CONTAMINADO.....	37
4.6 ANÁLISE DO LEITE CONTAMINADO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	38
4.7 SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	40
5.2 OTIMIZAÇÃO DA ESTRUTURA DE BENZILPENICILINA	42
5.3 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO FT-MIR	455
5.4 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA RAMAN	55
5.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	666
5.4.1 Estatística Multivariada resultados da espectroscopia Raman.....	66
5.4.1 Estatística Multivariada resultados da espectroscopia FT-MIR	70
6 CONCLUSÕES	733

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento rico em nutrientes, constituído de, aproximadamente, 87% de água e 13% de elementos sólidos, como gordura, proteínas, vitaminas e sais minerais (principalmente o cálcio) essenciais à dieta humana. O fator que mais interfere na qualidade desse alimento é a adição de alguma substância estranha de forma casual ou fraudulenta. (MAREZE et. al, 2015). Desta forma o leite consumido tanto no Brasil como em qualquer lugar do mundo é uma fonte de constante preocupação de técnicos e autoridades ligadas à área de saúde e laticínios.

A presença de resíduos de antibióticos no leite e seus derivados é um problema de saúde pública, que deve ser evitada, pois pode provocar graves problemas de saúde ao consumidor, dentre os quais: hipersensibilidade, choque anafilático em indivíduos alérgicos, teratogenia, resistência microbiana e desequilíbrio da microbiota intestinal, e ainda, desencadeando prejuízos financeiros na indústria, por interferirem na inibição de microrganismos benéficos na produção de derivados do leite (BASTOS, 2012). Órgãos fiscalizadores como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), visam fiscalizar e garantir a qualidade do leite, segundo a Resolução nº 52, que preconiza Limites Máximos de Resíduos (LMR) destes compostos.

A fiscalização da qualidade do leite em laticínios com certificação federal é realizada por laboratórios credenciados ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). As técnicas laboratoriais comumente utilizadas são as de Cromatografia Líquida (HPLC) e Cromatografia Gasosa (GC), ambas empregadas na confirmação e quantificação dos resíduos contaminantes. Devido a complexa preparação de amostras, necessidade de pessoal especializado e longo tempo de análise estas metodologias não são empregadas durante a fase de triagem do leite.

A detecção da presença de resíduos na triagem é realizada principalmente por kits de testes qualitativos, de inibição de crescimento ou reações enzimáticas. Esta metodologia apresenta a incidência de falsos positivos, limitação de detecção por relação sinal ruído alta ou pela capacidade de identificação de apenas um ou dois grupos de antibióticos. A discordância entre os resultados obtidos pelos testes de triagem e os testes de confirmação pode acarretar prejuízos financeiros e jurídicos para os laticínios.

As técnicas de espectroscopia óptica aliadas a análises estatísticas multivariadas podem fornecer resultados rápidos e precisos, capazes de detectar as baixas concentrações de resíduos

no leite. Muitos trabalhos já foram e vem sendo desenvolvidos nesta área. Por exemplo, estudos em fotoluminescência estacionária ou resolvida no tempo, espectroscopia de infravermelho ou em espectroscopia Raman. Nesta dissertação obtivemos as propriedades ópticas dos materiais de forma tanto experimental quanto teórica a fim de identificar os possíveis modos vibracionais.

O leite por ser um sistema complexo deve ser estudado por uma estatística multiparâmetros ou multivariada. Uma das maneiras de se garantir a qualidade do leite é realizar uma avaliação das metodologias/técnicas empregadas para detecção de contaminantes. Dentre as várias possibilidades de análises estatísticas podemos destacar a Análise de Componente Principal (PCA) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). A PCA faz uma transformação de variáveis possivelmente correlacionadas para variáveis não correlacionadas com finalidade de garantir a maior variância possível para os componentes principais. Enquanto a PLS encontra um conjunto de vetores de base para os dados espectrais e outro conjunto para os dados de concentração buscando estabelecer uma relação linear entre eles.

A técnica de Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR) vem sendo utilizada como uma alternativa rápida e eficiente em análises e controle de qualidade de leite e alimentos (MENDES et al., 2016). Por tratar-se de uma técnica que permite a obtenção das informações espectrais através de amostragem direta, não destrutível e utilizando volume reduzido de amostra.

Como a assinatura vibracional de cada molécula é única, pode-se em princípio usar a espectroscopia de infravermelho médio para a detecção de antibióticos em leite. O conjunto de dados permitirá a composição de um banco de dados para o desenvolvimento de futuras ferramentas de controle de qualidade do leite e seus derivados.

Para simular os espectros experimentais infravermelhos ou Raman de antibióticos é necessário utilizar ferramentas da mecânica quântica para obter os modos vibracionais possíveis de cada molécula e suas energias correspondentes.

No que tange a um tratamento quântico de um sistema, destacam-se os métodos de Hartree-Fock (HF) e a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), os quais são abordagens que descrevem as propriedades de moléculas ou de materiais cristalinos. O método HF é baseado na solução das energias possíveis e os respectivos estados (amplitudes de probabilidade) de um sistema quântico. Os estados possíveis são descritos em termos de funções de onda (amplitudes de probabilidade) cujo módulo ao quadrado fornecem a informação de qual é a probabilidade do sistema (molécula) se encontrar naquele estado. No método Hartree-Fock deve-se levar em

conta nos cálculos um momento angular intrínseco denominado spin. Tal imposição leva ao aparecimento de uma energia adicional no hamiltoniano do sistema (energia total do sistema), denominado termo de troca, e as equações a serem resolvidas são chamadas de equações de Hartree-Fock-Slater. Este método é considerado um método bom para estudar sistemas moleculares pequenos, não sendo muito adequado para descrever sistemas grandes, como, por exemplo, sólidos. Já a abordagem DFT é moderna e poderosa, usada para calcular a estrutura eletrônica de sistemas grandes que contém muitos átomos, como moléculas ou cristais. Esta teoria é baseada na densidade eletrônica do sistema. Além disso, leva em conta correções no cálculo da energia os termos devidos aos spins e mais um termo que leva em conta que as partículas do sistema são correlacionadas. Em resumo, na abordagem DFT são levados em conta efeitos de troca e de correlação. O método DFT foi utilizado neste trabalho e será apresentado nas seções seguintes.

Baseado nos conceitos expostos acima, o presente estudo pretende avaliar a aplicação experimental das técnicas de absorção no Infravermelho (ATR) e espectroscopia Raman a fim de detectar resíduos de antibióticos de uso veterinário em leite. Correspondentemente os espectros serão simulados via Teoria do Funcional da Densidade visando identificar a origem das intensidades espectrais. Este trabalho visa agregar conhecimento em limites de detecção das técnicas e compreensão dos espectros para futuro controle automático de qualidade de leite.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Aplicação da Espectroscopia vibracional Raman e Infravermelha aliadas aos cálculos de estrutura eletrônica, a fim de detectar moléculas de resíduos de antibióticos de uso veterinário, e posteriormente caracterização dos aspectos estruturais e vibracionais das moléculas, em estudo, na água e no leite, visando a obtenção dos limites de detecção dessas técnicas para um futuro controle de qualidade.

2.2 ESPECÍFICOS

- Compor um banco de dados de assinaturas espectroscópicas dos seguintes princípios ativos presentes em antibióticos: Benzilpenicilina-G; Ampicilina; Oxitetraciclina;
- Testar limites de detecção de resíduos de antibióticos veterinários em leite cru por Espectroscopia de Infravermelho ATR;
- Medir limites de detecção de resíduos de antibióticos veterinários em leite cru por Espectroscopia Raman;
- Apresentar a técnica de espectroscopia vibracional juntamente com cálculos de estrutura eletrônica, como uma alternativa, rápida e eficiente para a detecção de resíduos de antibiótico em leite;
- Analisar os espectros obtidos e relacionar os principais picos com os componentes majoritários presentes em cada medicamento.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LEITE

O leite é uma aglutinação de inúmeros componentes sólidos como lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas diluídos em água. A parte sólida representa aproximadamente 12% ou 13% do total, ou seja, o leite é composto em média por 87% de água, 4% a 5% de lactose, 3% de proteína, 3% a 4% de gordura, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas (CORREA, et al 2017). Explicitamente, a água é o componente mais abundante no qual se encontram em solução demais compostos e sólidos totais (ST) ou extrato seco total (EST) englobando todos os componentes do leite (CASTRO MONTOYA et al, 2018). À vista disso, na Instrução Normativa 62 de 2011, está estabelecido que o leite cru refrigerado deve apresentar teores mínimos de gordura, proteína e sólidos totais de 3,0%, 2,9% e 11,4%, respectivamente.

Dados os inúmeros componentes primordiais para o desenvolvimento da vida humana, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) recomenda um consumo per capita de leite de 200 litros/ano, ou seja, 0,548 litros/dia (FAO, 2015). Para atender essa demanda é necessário que o Brasil produza 42 bilhões de litros, considerando que a população brasileira é constituída de 207,7 milhões de habitantes (IBGE, 2017).

O leite de vaca ocupa um papel de grande importância na alimentação humana, principalmente na de crianças e idosos. O leite e seus derivados fornecem energia, proteínas, vitaminas e minerais essenciais (SANTOS, et al. 2017). Leite considerado de qualidade é, portanto, aquele obtido de maneira higiênica, de vacas sadias, sem microrganismos nocivos à saúde, sem excesso de resíduos de drogas veterinárias, resfriado imediatamente após a ordenha e recebido na indústria em até 48 horas após o final da ordenha inicial (BRASIL, 2011). Por conseguinte, é importante destacar que a qualidade desse alimento depende de uma investigação eficaz durante todo o processo de manipulação do mesmo.

A qualidade da composição do leite é um assunto que exige atenção de todos visto, que os altos índices de cálcio presentes no leite são de fundamental importância na fase de desenvolvimento dos indivíduos, para o fortalecimento dos ossos em crianças e para a prevenção de doenças como a osteoporose em pessoas de idade avançada. Além disso, o cálcio é um agente redutor da absorção de colesterol e atua no controle da pressão sanguínea e da massa corporal (CARRARA et al, 2017). Logo, a ampliação da indústria leiteira deve vir

acompanhada de métodos mais eficazes de controle de qualidade desse alimento, ponto crucial também defendido pela FAO.

3.2 ANTIBIÓTICOS

A palavra “antibiótico” deriva do termo *antibiosis*, que no sentido literal da palavra significa contra a vida. Como a etimologia dessa palavra, torna fácil entender a função deste composto como um medicamento com finalidade de combater alguma forma de vida. Sua função é atacar e eliminar bactérias. Os antimicrobianos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, com capacidade de inibir a proliferação de bactérias ou de as dizimar. A classe de antimicrobianos inclui compostos de origem natural, seus derivados e também os compostos químicos de origem sintética (WALSH, 2016) todos com essa função específica.

À priori, os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas espécies de bactérias, fungos e actinomicetoses. Sendo assim, os antimicrobianos são capazes de inibir o crescimento de fungos ou bactérias podendo causar a morte destes, sendo classificados em bacteriostáticos, quando causam a inibição em bactérias, ou bactericidas, quando promovem o perecimento, da bactéria. Os antimicrobianos são usados para combater os micro-organismos inespecíficos ou específicos associados a infecções e contaminações. Os antissépticos e os desinfetantes são classificados em inespecíficos, visto que atuam sobre micro-organismos patogênicos ou não. (WALSH, 2016).

É essencial uma ampla vigilância quanto à ocorrência de resíduos de antibióticos no leite devido aos efeitos indesejados que estes podem provocar na industrialização de alguns produtos lácteos e na saúde do consumidor. A adição de antibióticos no leite pode ocorrer acidentalmente ou propositalmente com função de adulterante. Os resíduos dessas drogas no leite apresentam riscos à saúde humana, causando um efeito adverso na flora intestinal, podendo prejudicar sua ação protetora local, além de fenômenos de resistência de estirpes bacterianas e ação cancerígena (LIU et al, 2017).

Saliente-se que a refrigeração e os processamentos realizados nos laticínios não são capazes de eliminar os possíveis resíduos de antibióticos existentes no leite, adquiridos pela injeção de medicamentos veterinários em tratamentos do gado leiteiro, como já mencionado, com enorme risco à saúde pública (GROOT et al, 2016).

Esses prejuízos devem ser evitados ou amenizados, uma vez que os riscos de saúde associados a ingestão de resíduos de antibiótico acima dos limites máximos estão relacionados

a diversos problemas de saúde, como por exemplo hipersensibilidades, choque anafilático, anemia, genotoxicidade, desequilíbrio de microbiota intestinal e efeitos colaterais secundários de acordo com cada tipo específico de antibiótico (BEYENE, 2016). Isso representa enorme preocupação aos órgãos agentes de saúde devido ao fato de que o leite é um alimento consumido por crianças e idosos que compõem uma faixa etária mais suscetível aos efeitos nocivos dos resíduos dos mesmos. (JAYALAKSHMI et al, 2017)

3.2.1 Antibióticos comuns no tratamento do gado leiteiro

Os antibioticos são muito utilizados para o tratamento de doenças infecciosas que acometem o gado leiteiro. Suas principais classes utilizadas em bovinos em período de lactação são os Aminoglicosídeos, Beta-lactâmicos, Tetraciclinas, Macrolídeos, Sulfonamidas e Quinolonas.

3.2.1.1 Beta-lactâmicos

Nos antibióticos da classe dos beta-lactâmicos, o anel beta-lactâmico atua como bactericida. Seu princípio baseia-se na inibição da síntese da parede celular bacteriana. Os beta-lactâmicos são divididos em quatro subclasses: as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenens e os monobactâmicos. A tabela 1 mostra os princípios ativos mais comuns ao grupo e seus limites máximos.

Tabela 1 Princípios ativos e limites do grupo beta-lactâmico

Grupo de antimicrobiano	Princípio Ativo	LMR (µg/L)	Padrão
Beta-Lactâmico	Benzilpenicilina	4	Mercosul
	Ampicilina	4	Mercosul
	Amoxiciclina	4	Mercosul
	Cloxacilina	30	UE
	Oxacilina	30	UE
	Dicloxaciclina	30	UE

Fonte: FAO 2015.

3.2.1.2 Tetraciclina

As tetraciclina possuem amplo espectro de ação e baixa toxicidade, características que favorecem o uso indiscriminado desses fármacos fomentando a resistência bacteriana a esse antibiótico. A tabela 2 mostra os princípios ativos mais comuns ao grupo e seus limites máximos.

Tabela 2 Princípios ativos e limites do grupo tetraciclina

Grupo de antimicrobiano	Princípio Ativo	LMR ($\mu\text{g/L}$)	Padrão
Tetraciclina	Oxitetraciclina	100	Mercosul
	Tetraciclina	100	Mercosul
	Clortetraciclina	100	Mercosul

Fonte: FAO 2015.

3.2.1.3 Sulfonamida

A sulfanilamida inibe as reações enzimáticas necessárias para a produção do ácido dihidrofólico, que é usado para produzir às bases purinas necessárias para construir o DNA bacteriano. Na ausência dessas bases bactéria não consegue se multiplicar. A tabela 3 mostra os princípios ativos mais comuns ao grupo e seus limites máximos.

Tabela 3 Princípios ativos e limites do grupo sulfonamida

Grupo de antimicrobiano	Princípio Ativo	LMR ($\mu\text{g/L}$)	Padrão
Macrolídeo	Eritromicina	40	Mercosul

Fonte: FAO 2015.

3.2.1.4 Quinolonas

As quinolonas e fluoroquinolonas são derivadas do ácido nalidixico e seu mecanismo de ação é através da inibição da replicação do DNA bacteriano, destacando-se as fluoroquinolonas pois apresentam amplo espectro de ação contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A tabela 4 mostra os princípios ativos mais comuns ao grupo e seus limites máximos.

Tabela 4 Princípios ativos e limites do grupo quinolona

Grupo de antimicrobiano	Princípio Ativo	LMR ($\mu\text{g/L}$)	Padrão
Sulfonamidas	Sulfametazina	100	Mercosul
	Sulfametoxina	100	Mercosul
	Sulfatiazol	100	Mercosul

Fonte: FAO 2015.

3.3 LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

No Brasil o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) é uma ferramenta de gerenciamento e controle de risco adotada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) que tem o objetivo de promover segurança química dos alimentos de origem animal consumidos pela população. A fundamentação legal do programa é a Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999.

Anualmente são elaborados planos de amostragem de leite e demais produtos de origem animal nos estabelecimentos sob Inspeção Federal. Os testes incluem drogas veterinárias autorizadas e proibidas, agrotóxicos, contaminantes inorgânicos, micotoxinas e dioxinas. As análises são realizadas em laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, composta por laboratórios oficiais do MAPA e outros laboratórios credenciados.

Com o objetivo de assegurar a saúde pública e proteger o consumidor dos efeitos nocivos associados à contaminação por resíduo nos produtos de origem animal, foram definidos os Limites Máximos de Resíduos (LMR). Nesse sentido, os LMR são uma ferramenta de controle da qualidade e segurança do leite. (FAO, 2015).

No Brasil, os LMR permitidos para medicamentos veterinários são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Saúde por meio da Resolução RDC nº 53 de 02 de outubro de 2012. (BRASIL, 2012). As normas reguladoras deste definem o limite estabelecido para o leite. Os LMR são definidos, portanto, para prevenir que os resíduos entrem na cadeia produtiva do leite. Logo, compete à indústria que o recebe realizar o controle quanto a contaminação por resíduos de antibióticos, seguindo as indicações previstas na legislação.

3.4 MASTITE

A mastite é uma infecção no canal dos tetos, principal doença do gado, na maioria das vezes, requer a aplicação de antimicrobianos, potencializando a incidência de resíduos destes no leite. Isso se deve ao fato que o leite é produzido pela glândula mamária no processo de fluxo sanguíneo, podendo incorporar resíduos de medicamentos submetidos à vaca leiteira, o que exige um processo de tratamento veterinário criterioso (PEREIRA, 2017).

O leite da vaca em tratamento com medicamento veterinário não pode ser utilizado para fins comerciais ou para consumo durante um período de no mínimo sete dias, em razão da quantidade residual de antibióticos ser alta neste interregno (PEREIRA, 2017). Portanto, a prevenção da contaminação por resíduo de antimicrobiano apresenta-se como a alternativa mais simples e econômica e está ligada diretamente a um rígido controle leiteiro. As principais causas da presença de tais resíduos incluem: não seguir diretrizes recomendadas ou a dosagem recomendada; não observância do tempo de carência recomendado; administração de grandes doses em um único local de injeção; uso de equipamentos contaminados com drogas, ou falta de limpeza adequada do equipamento usado para misturar ou administrar drogas; erros de dosagem, medição ou mistura; permitir que os animais tenham acesso a produtos químicos derramados ou alimentos contaminados por medicamento; efeitos do próprio animal, idade, gravidez, doenças congênitas, doenças, alergias; interações químicas entre drogas; variações na temperatura; contaminação no ambiente e uso indevido de produtos químicos agrícolas, como pesticidas (LOPES et al., 2016).

Não seguir, portanto, essas diretrizes recomendadas, ocasiona inúmeros problemas. Adiciona-se também o fato dos medicamentos veterinários poderem ser facilmente obtidos em

estabelecimentos especializados. Isto torna o controle de resíduos ainda mais necessário. (BEYENE et al., 2016).

3.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Dentre os efeitos nocivos indiretos de antibióticos, destaca-se a resistência bacteriana que dificulta os tratamentos farmacoterápicos comuns (BLONDIAUX et al., 2017). Há, portanto, o favorecimento da seleção de microorganismos resistentes. Estes podem prejudicar os seres humanos através do contato direto ou indireto por meio do consumo de produtos de origem animal como o leite.

Como as bactérias de origem animal são capazes também de colonizar a flora endógena sobrecarregando os mecanismos de defesa presentes no corpo humano, uma potencial transferência de resistência bacteriana não pode ser desconsiderada. Sendo assim, o uso de antimicrobiano nos produtos de origem animal está diretamente relacionado ao desenvolvimento dessa resistência bacteriana em humanos (LANDERS, 2012).

Mesmo a alimentação como por exemplo creme de leite, queijo e leite com baixos níveis profiláticos de antibióticos pode favorecer o desenvolvimento da resistência bacteriana a estes antibióticos, uma vez que, durante a preparação ou consumo de alimentos de origem animal, resíduos podem ser encontrados nesses alimentos. Dessa forma, existem relatos do desenvolvimento de resistência bacteriana tais como à *Salmonella* *Campylobacter* e a *Staphylococcus* em alimentos de origem animal (CHANG et al., 2014).

Outro fator a ser considerado são as reações imunológicas às drogas. Devido a hipersensibilidade aos antibióticos definida como uma resposta imunológica mediada por células no paciente sensível, os indivíduos podem chegar a óbito (APARECIDA et al., 2004). Os mastócitos (nos tecidos) e os basófilos (no sangue) ligam-se à Imunoglobulina-E um anticorpo presente no soro sanguíneo em baixas concentrações, fazendo com que haja liberação de histamina. Esta provoca sintomas como a vasodilatação, a inflamação e dificuldades respiratórias. Logo, se uma reação alérgica não for tratada com um anti-histamínico, poderá até mesmo provocar a morte nas manifestações alérgicas mais severas. Assim, a alergia a antibióticos é restrita a uma reação física a determinadas substâncias. Numa pessoa alérgica, o sistema imunológico identifica erroneamente uma substância inofensiva como nociva, reagindo contra ela. Estima-se que cerca de 10% da população mundial seja considerada hipersensível a

antibióticos que incluem penicilina. Já, em animais, a extensão da hipersensibilidade não é tão conhecida (JASON et al., 2017).

3.6 EFEITOS CARCINOGENICO, MUTAGENICO E TERATOGENICOS

O termo carcinogênico refere-se a um efeito produzido por uma substância com atividade cancerígena. O prejuízo potencial desses resíduos carcinogênicos está relacionado a sua interação com diversos componentes intracelulares como as proteínas, ácidos desoxirribonucleicos (DNA), ácidos ribonucleicos (RNA), glicogênios, fosfolípidios e glutamina. Por conseguinte, há um alerta crescente sobre a presença desses resíduos carcinogênicos no leite (DIK, 2016).

A expressão mutagênica, por sua vez, é utilizada para descrever agentes químicos ou físicos que causam uma mutação na molécula de DNA ou danos aos componentes genéticos das células de um organismo. Produtos químicos, incluindo agentes alcalinizantes e análogos das bases de DNA demonstraram provocar atividade considerada mutagênica (ANDERSSON, 2014). Por isso, existe uma crescente preocupação acerca dos medicamentos que possam representar risco potencial à população devido a produção de mutação genética ou quebra cromossômica, uma vez que podem ocorrer efeitos adversos para a fertilidade (FOSTER, 2014).

O vocábulo teratogênico aplica-se a uma droga ou agente químico que produz um efeito tóxico no embrião ou no feto durante alguma fase crítica da gestação, resultando em uma má formação congênita que afeta a estrutura e funcionalidade do organismo. O composto orgânico benzimidazol produz esse efeito teratogênico, pois este é tóxico ao embrião quando administrado durante estágio inicial da gravidez devido à atividade anti-helmíntica desta droga. Além da toxicidade embrionária, incluindo a teratogenicidade, a droga de benzimidazol de oxfendazol, também apresentou efeito mutagênico (BOOKSTAVER, 2015).

3.7 PERTURBAÇÃO DA FLORA INTESTINAL

As bactérias que vivem no intestino saudável atuam como uma barreira que o protege de patógenos externos evitando seu estabelecimento e a proliferação de doenças. Os antibióticos apresentam a propriedade de reduzir o número total de bactérias da flora intestinal ou matar seletivamente algumas espécies importantes. Uma ampla exposição a antimicrobianos pode

afetar uma gama de bactérias da flora intestinal e conseqüentemente causar perturbações gastrointestinais (BECATTINI, 2016).

3.8 PREJUÍZOS NO BENEFICIAMENTO INDUSTRIAL

Os danos causados por resíduos de antibióticos nas indústrias poderão vir a ocasionar falhas no caráter tecnológico à produção de determinados tipos de alimentos, causando transtornos na fermentação de bebidas lácteas, iogurtes, queijos, entre outros problemas (PIECH et al., 2016). Considera-se, portanto, indesejável a presença de resíduos de antimicrobianos quanto aos aspectos de produção em razão de sua interferência no crescimento dos cultivos iniciadores durante a elaboração de queijos e leites fermentados e outros (FOX et al., 2017).

A pasteurização e a esterilização não inativam os antimicrobianos, supostamente presentes no leite (SILVA et al., 2013). O ponto de fusão da maioria dos antimicrobianos utilizados é superior à temperatura de 210 °C. A penicilina no leite cru mantém-se ativa mesmo frente a temperatura de 4 °C, não ocorrendo perda da concentração inicial de 20 partes por bilhão (ppb) de ampicilina colocada no leite (SILVA et al., 2013). Pode-se concluir que as baixas temperaturas não são suficientes para desativar os resíduos de antimicrobianos.

Diante disso, é declarado inaceitável a presença de resíduos de antimicrobianos em relação aos aspectos de produção, em decorrência da sua interferência no crescimento dos cultivos iniciadores durante a elaboração de queijos e leites fermentados, podendo resultar em coagulação inadequada do leite e maturação inapropriada de queijos durante sua produção. Podendo ocorrer uma má dessoragem da coalhada, fermentação indesejada com produção de gás indesejado e maturação de baixa qualidade, alteração de sabor e textura incompatível com o esperado (FOX et al., 2017).

3.9 FERRAMENTAS DE DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

O monitoramento da qualidade do leite feito pelas agências reguladoras baseia-se em métodos analíticos para a detecção de resíduos de antibióticos. Entre os métodos analíticos destacam-se a Cromatografia Líquida de Alta Performance – High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Cromatografia Gasosa combinada com espectroscopia de massa –

Gas Chromatography Mass Spectroscopy (CG-MS). Entretanto, existem desvantagens no uso de cada um destes, tais como: preparação complexa ou demorada de amostras, mão-de-obra altamente qualificada. Isto inviabiliza sua utilização pela indústria leiteira na fase de recepção e triagem do leite (Acar-Soykut et al., 2018).

Diversos tipos de testes qualitativos, semi-quantitativos ou quantitativos podem ser utilizados para a detecção de resíduos de antibióticos no leite. Os testes qualitativos, principalmente os imunoenzimáticos ligados a enzimas - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), são considerados testes de triagem, cuja resposta é positiva ou negativa para um determinado grupo de antibióticos. (WANG et al., 2012). Estes testes são amplamente utilizados na triagem das empresas que recebem o leite cru das fazendas (TRONCO, 2010).

Normalmente, os testes de antibióticos são específicos para uma ou duas classes de antibióticos. A incidência de falsos positivos, sinais de fundo frequentemente altos, grande número de etapas de incubação, lavagem necessárias e a dificuldade de ser automatizada, tornam estes testes inconclusivos sobre a presença de resíduos de antibióticos. Sendo assim, é desejável que técnicas complementares supram as lacunas deixadas pelas atuais. Técnicas de controle de qualidade de produtos alimentícios devem fornecer, portanto, resultados rápidos e confiáveis (Maluf 2012).

Outras metodologias disponíveis incluem detecção de fotoluminescência, espectrofotometria, eletroforese capilar e até titulometria. Pelo fato de serem demoradas e requisitarem pessoal especializado e preparação de amostras, não são úteis para análise de campo.

3.10 ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

A espectroscopia óptica, a qual investiga a interação entre a matéria e a radiação, é usada para analisar compostos químicos, identificando quais elementos diferentes compõem a matéria. Sua finalidade primordial consiste na determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares. As transições entre os estados energéticos dependem do valor da energia da radiação eletromagnética, originando assim diversos métodos espectroscópicos. A espectroscopia vibracional divide-se em duas grandes classes de técnicas: a espectroscopia de absorção no infravermelho e a espectroscopia Raman (SATHYANARAYANA, 2015).

3.10.1 Técnica de espectroscopia infravermelho

A princípio, as restrições tecnológicas impossibilitavam uma utilização mais profunda da técnica de espectroscopia no infravermelho. Diante disso, os primeiros trabalhos limitavam-se ao estudo de poucas espécies químicas. Assim, o infravermelho médio era utilizado inicialmente na caracterização de bandas de absorção de grupos orgânicos. O estudo quantitativo utilizando a região do infravermelho se desenvolveu a partir da década de 70 com o surgimento de equipamentos ópticos e mecânicos mais precisos e a evolução da informática, abrindo espaço para novas aplicações (BURNS et al., 2001).

3.10.1.1 Aplicações da espectroscopia no infravermelho

A região espectral do infravermelho está limitada pelas micro-ondas e pelo visível, é subdividida em Infravermelho próximo na faixa de $12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, médio na faixa de $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ e distante $200 - 10 \text{ cm}^{-1}$. A larga utilização da espectroscopia de infravermelho como ferramenta analítica deve-se também ao fato de que as análises não geram subprodutos tóxicos, a preparação de amostras não é complexa e estas não são destruídas no processo atendendo à demanda de métodos analíticos rápidos e limpos (LARKIN, 2017).

As amostras a serem analisadas podem encontrar-se em todos os estados e formas, seja gasoso, líquido, sólidos, semi-sólido, pasta ou gel. A principal desvantagem técnica do uso do Infravermelho próximo – Near Infra Red (NIR) deve-se a baixa sensibilidade a constituintes em baixas concentrações, apesar de fornecer resultados rápidos (LARKIN, 2017).

Grande parte das aplicações do Mid Infra Red (MIR) concentra-se na identificação de compostos orgânicos. Na faixa espectral conhecida como impressão digital da molécula 1200 a 700 cm^{-1} , pequenas alterações na estrutura de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição dos picos de absorção do espectro. Desta maneira a identificação de compostos pode ser realizada pela comparação do espectro MIR com bancos de dados existentes (LARKIN, 2017).

Inicialmente, a utilização do infravermelho distante – Far Infra Red (FIR) foi restrita devido a poucas fontes de emissão disponível para este tipo de radiação. 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 por 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 (EMIL, 2014).

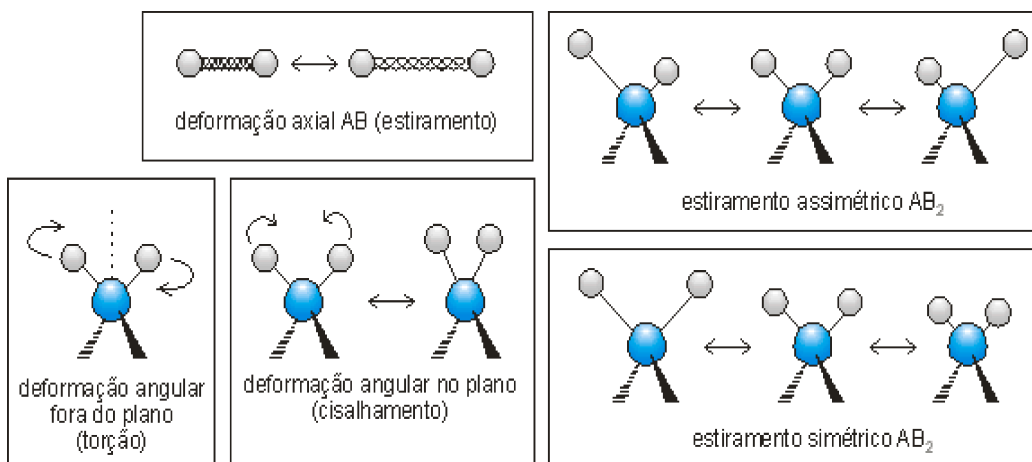
3.10.1.2 Princípios da espectroscopia no infravermelho

A energia da radiação Infravermelho em geral é insuficiente para gerar transições eletrônicas, já que tal faixa de comprimento de onda não possui energia suficiente para tanto (SKOOG, 2017).

Para que uma molécula possa absorver radiação Infravermelho, esta precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. O momento de dipolo pode ser definido pelo valor da diferença de carga e da distância entre dois centros de carga. Uma molécula ao vibrar sofre uma variação regular do momento dipolar, produzindo um campo interativo 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. Nessas circunstâncias, o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de seus movimentos (SKOOG, 2017).

É necessária apenas uma pequena quantidade de energia para causar uma mudança de nível rotacional molecular, da ordem de 100 cm^{-1} . Um gás fornece espectro no infravermelho normalmente como uma série de linhas igualmente espaçadas, isso porque há vários estados rotacionais de energia para cada estado vibracional. Em líquidos e sólidos devido rotação de cada molécula estar bastante restrita, as linhas discretas vibracionais/rotacionais originam bandas vibracionais alargadas (SKOOG, 2017).

Figura 1: Modos de vibração de moléculas diatômicas e triatômicas



Fonte: Recocities, 2018

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais (ou de estiramento) e deformações angulares (ou dobramento) e podem ser simétricas e assimétricas. As vibrações de estiramento são oscilações na direção radial aos núcleos, e as deformações angulares envolvem mudanças dos ângulos entre o plano que contém a ligação e um plano adotado como referência (LARKIN, 2017).

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, são de quatro tipos: tesoura (do inglês scissoring), extensão (do inglês rocking), cisalhamento (do inglês wagging) e torção (do inglês twisting). Além dos tipos de vibrações citados, interações ou acoplamentos de vibrações são permitidos (LARKIN, 2017).

As vibrações acontecem de forma isolada em uma molécula, e podem ser representadas por um modelo mecânico simples, capaz de fornecer interpretação fenomenológica, conhecido como oscilador harmônico. Esta aproximação se constitui da vibração de duas massas ligadas entre si por uma mola. As frequências fundamentais de quaisquer dois átomos ligados então podem ser calculadas assumindo que a energia segue à Lei de Hooke (SKOOG, 2017).

Em uma molécula as massas representam os átomos e a ligação química entre eles representam a mola. Uma perturbação de uma das massas ao longo do eixo da mola resulta em uma vibração conhecida como movimento harmônico simples e a força restauradora é proporcional ao deslocamento das massas. Sua tendência é restaurar as massas para sua posição original. A frequência (ν) de oscilação é dada pela equação (1):

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

onde v é a frequência da vibração (Hz); k é a constante de força da ligação (N.m^2); μ é a massa reduzida dos dois átomos definida pela equação (Kg):

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

O cálculo das frequências fundamentais de moléculas diatômicas simples, pode ser estimado com resultados próximos aos valores médios encontrados para o estiramento de uma ligação entre dois átomos que constituem uma molécula poliatômica.

As limitações deste modelo apresentam-se ao tratar moléculas constituídas de muitos átomos, possuindo um grande número de centros de vibração, ou moléculas apresentando interações entre vários centros. A variedade de vibrações possíveis dá origem a espectros na região do infravermelho cuja interpretação torna-se difícil (SKOOG, 2017).

Para partículas de dimensões atômicas o modelo do oscilador harmônico falha. Deve-se então lançar mão da mecânica quântica que por sua vez o considerou com adaptações para desenvolvimento teórico próprio. Os osciladores mecânico-quânticos possuem energias discretas apenas, cuja regra de seleção é uma mudança de número quântico de dimensão da unidade. Como consequência os níveis vibracionais são igualmente espaçados, uma única banda de absorção deveria ser observada para determinada vibração molecular. (LARKIN, 2017).

A descrição fornecida pelo modelo representa com êxito considerável o comportamento das moléculas reais. Descreve a presença de sobretons, isto é, transições observadas no NIR e bandas de combinação (LATMIRAL et al., 2016).

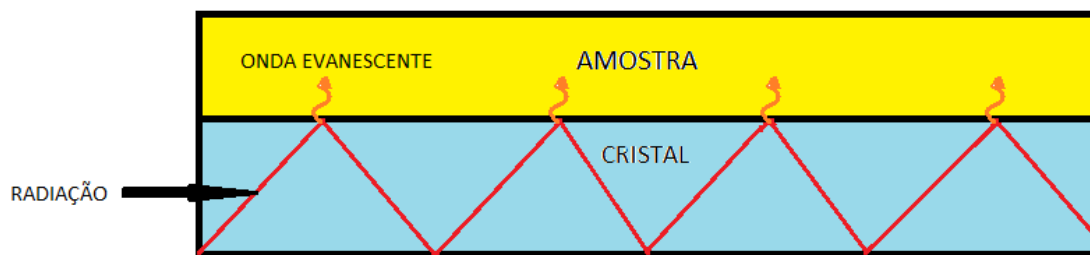
Os sinais do tipo sobreton concentram-se principalmente na região do infravermelho próximo e a intensidade dessas transições é cerca de 10 a 1.000 vezes menor que as observadas para transições fundamentais. A teoria quântica, por sua vez, prevê que tais transições seriam proibidas (SKOOG, 2017).

3.10.1.3 Espectroscopia de absorção por reflexão total atenuada (ATR)

Uma amostra é capaz de refletir uma radiação incidente das maneiras: especular, difusa, interna e total atenuada - Attenuated total reflection (ATR). A reflexão do tipo ATR é uma técnica não destrutiva que permite obter espectros no infravermelho de amostras nos estados líquidos, sólidos insolúveis, filmes, adesivos, pós, pastas, entre outros (SKOOG, 2017).

Esta técnica tem por princípio o fato de que quando um feixe de radiação passa do cristal de ATR para a amostra, onde há diferença de índices de refração, ocorre uma reflexão. No entanto esta reflexão é parcial. Parte dela penetra na amostra e é conhecida como onda evanescente, conforme esquematizado na Figura 2. 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 (SILVERSTEIN, 2012).

Figura 2 Representação esquemática da ATR



Fonte: O autor 2018

No processo de reflexão ocorre a atenuação do feixe em comprimentos de onda correspondentes as bandas de absorção. Pode-se calcular a profundidade de penetração da onda evanescente como segue através da equação (3).

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

Onde: λ , comprimento de onda medido em metro; θ , ângulo de incidência; n_1 , índice de refração do cristal; n_2 índice de refração da amostra.

A profundidade de penetração da radiação incidente pode variar de uma fração até vários comprimentos de onda. Este fator é dependente do comprimento de onda da radiação incidente, dos índices de refração dos dois materiais e do ângulo do feixe incidente em relação à interface (LARKIN, 2017).

Os espectros de absorção de ATR não são iguais aos espectros de absorção por transmissão de radiação através da amostra, pois as intensidades relativas das bandas não são iguais. Em geral as mesmas bandas são encontradas nos dois tipos de espectros, já que o número de onda de absorção de uma molécula não está relacionado ao quanto a radiação no infravermelho penetra nesta (SKOOG, 2017).

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 de maneira rápida, uma vez que a radiação penetra apenas alguns micrômetros na amostra (SKOOG, 2017).

3.10.2 Espectroscopia Raman

O efeito Raman acontece devido ao espalhamento inelástico da luz que incide sobre um material. O fenômeno recebeu este nome em homenagem ao físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman que o descobriu experimentalmente em 1928 (GUOZHEN, 2016). A grande observação experimental que C. V. Raman fez foi observar uma mudança da frequência da luz incidente em uma fração da luz espalhada pela amostra. A mudança de cor de uma pequena parte da luz (na faixa do visível) dependia principalmente da estrutura química do material responsável pelo espalhamento e independia da frequência da luz incidente.

A partir de 1960, com a descoberta e disponibilidade do uso de laser como fonte de excitação, em substituição a lâmpadas de gases nobres, o espalhamento Raman tornou-se uma técnica amplamente empregada para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Diversos tipos de espectroscopia Raman foram desenvolvidas e aplicadas em diversas áreas da ciência (GUOZHEN, 2016).

3.10.2.1 Conceitos fundamentais

O fenômeno de espalhamento em nível atômico e molecular deve ser tratado de um ponto de vista mais formal pela mecânica quântica. Entretanto, é possível que o espalhamento

Raman seja compreendido a partir de uma abordagem macroscópica. O campo elétrico que interage com os elétrons ao incidir sobre uma molécula provoca alterações na sua distribuição eletrônica. Essas alterações são devidas à polarização da densidade eletrônica, e pode ser mensurada através de um momento de dipolo induzido (\vec{P}) medido em coulomb, que pode ser descrito em função do campo elétrico (\vec{E}) da radiação incidente visto pela equação (4).

$$\vec{P} = \vec{\alpha} \cdot \vec{E}, \quad (4)$$

onde $\vec{\alpha}$ corresponde ao tensor de polarizabilidade molecular e demonstra a tendência de distorção espacial da nuvem eletrônica devido ao campo elétrico da radiação incidente. Como exemplo, a componente x do vetor momento de dipolo da equação anterior é escrita como dado pela equação (5).

$$P_x = \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \quad (5)$$

O momento de dipolo induzido na molécula reproduz o mesmo comportamento oscilatório no tempo e no espaço do campo elétrico da radiação eletromagnética. Expresso na equação 6:

$$\vec{P}(t) = \text{Re}[\vec{P} \cdot e^{-i\omega t}] \quad (6)$$

Onde ω é a frequência do movimento oscilatório, cujo valor é o mesmo da radiação incidente.

Ao assumir uma descrição harmônica para o momento de dipolo induzido observamos que a amplitude do momento de dipolo induzido pode ser escrita como abaixo pela equação (7):

$$\vec{P} = e \cdot q \cdot \left[\frac{\vec{r} \cdot \vec{r}}{|\vec{r}|} \right], \quad (7)$$

onde e é a carga elementar do elétron e q descreve a quantidade de carga da nuvem eletrônica oscilando.

Cargas elétricas oscilantes, mesmo na configuração de dipolos são fontes de emissão de radiação eletromagnética, cuja intensidade de radiação emitida é proporcional a amplitude e podemos escrever:

$$I \propto \omega^4 |\vec{P}|^2 \quad (8)$$

$$I = \omega^4 |\vec{E}_0|^2 \sum_{\rho, \sigma} (\vec{\alpha})_{\rho\sigma}^2, \quad (9)$$

onde $\vec{\alpha}$ corresponde aos elementos do tensor de polarizabilidade.

Pode-se observar que a intensidade da radiação espalhada é proporcional à quarta potência da frequência de radiação espalhada, ao quadrado do campo elétrico da radiação incidente e por fim ao quadrado das componentes do tensor de polarizabilidade.

Se as frequências da radiação espalhada e incidentes são iguais o espalhamento descrito é elástico. Porém, há ainda a possibilidade do espalhamento ser inelástico devido a absorções de parte da energia da luz do laser incidente pelo sistema medido resultar em luz espalhada com energia menor do que a do laser incidente. Pode acontecer também o caso do sistema medido estar em um estado excitado e ao interagir com a luz fornecer luz espalhada com energia maior do que a luz incidente. (GUOZHEN, 2016).

A frequência (ou energia) da radiação espalhada maior em relação à frequência da luz incidente é característica do espalhamento Raman Anti-Stokes. Radiação espalhada com frequência (ou energia) menor em relação à frequência da luz incidente é característica do espalhamento Raman Stokes. As frequências das radiações espalhadas anti-Stokes e Stokes são simétricas em torno da frequência da radiação incidente (espalhamento elástico), apresentando a mesma informação em termos de frequência vibracional.

As alterações na polarizabilidade causadas pelo movimento vibracional são descritas pelas coordenadas normais de vibração, Q .

A polarizabilidade depende do deslocamento atômico Q_j e pode ser expandida em série de Taylor e aproximada para termos de primeira ordem devido à pequena variação de Q em torno da posição de equilíbrio, descrita abaixo pela equação (10).

$$\vec{\alpha}(Q_j) = \vec{\alpha} + \left(\frac{\partial \vec{\alpha}}{\partial Q_j} \right)_0 Q_j(t) + \dots \quad (10)$$

Podemos ainda reescrever a expressão para o momento de dipolo induzido incorporando-se a dependência no tempo e no espaço de maneira harmônica.

$$Q_j(t) = \text{Re}\left[Q_j^0 e^{-i\omega_j t}\right] = \frac{1}{2}Q_j^0 \left[e^{-i\omega_j t} + e^{i\omega_j t}\right] \quad (11)$$

Onde Q_j corresponde à amplitude da coordenada normal e ω_j é a frequência vibracional do modo j . Para o momento de dipolo podemos então escrever:

$$\vec{P}(t) = \vec{\alpha}(Q_j)\vec{E}(t) \quad (12)$$

$$\vec{P}(t) = \vec{\alpha}\vec{E}_0 \text{Re}\left[e^{-i\omega t}\right] + \frac{1}{2}R_j Q_j^0 \vec{E}_0 \left[\text{Re}\left(e^{-i(\omega+\omega_j)t}\right) + \text{Re}\left(e^{-i(\omega-\omega_j)t}\right)\right] \quad (13)$$

O primeiro termo descreve o espalhamento Rayleigh (elástico), enquanto o segundo e terceiro termos descrevem o espalhamento anti-Stokes (radiação espalhada com frequência $\omega+\omega_j$) e Stokes (radiação espalhada com frequência $\omega-\omega_j$). As expressões para as intensidades Raman nos regimes Stokes e anti-Stokes, podem então ser escritas pela equação (14).

$$I \propto (\omega \pm \omega_j)^4 |\vec{E}_0|^2 \sum_{\rho,\sigma} (\vec{\alpha})_{\rho\sigma}^2 \quad (14)$$

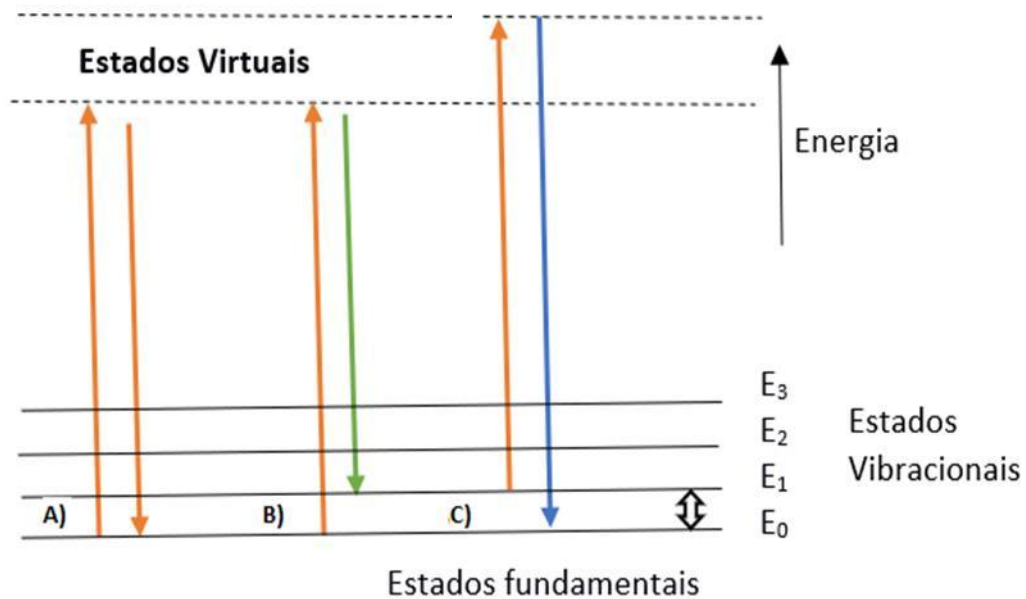
A expressão acima descreve a dependência do espalhamento Raman com o tensor polarizabilidade Raman, com a intensidade da radiação incidente (relacionada a \vec{E}_0) e com a frequência da radiação espalhada ω_j onde o símbolo + se aplica para o espalhamento anti-Stokes e o – para o Stokes.

O cálculo das intensidades Raman exige uma modelagem adequada através de modelos quânticos. Podemos ainda utilizar o modelo clássico para a polarizabilidade da molécula para antecipar algumas propriedades do espalhamento Raman. O modelo de Lorentz para a polarizabilidade molecular, como é conhecido, considera uma força de restauração entre o par elétron-buraco. Apresentando uma dependência conforme a equação (15).

$$\vec{\alpha}(\omega) = \frac{e^2}{m} \frac{1}{(\omega_0 - \omega^2 - i\Gamma\omega)}, \quad (15)$$

onde m , Γ e ω_0 são a massa do elétron, a constante de amortecimento do movimento oscilatório e a frequência natural do oscilador. Observa-se uma forte dependência com a frequência da radiação incidente, sendo que quando este valor se aproxima da frequência natural do oscilador, $\vec{\alpha}$ atinge seu valor máximo. Este modelo simples descreve uma condição de ressonância que pode ser, por exemplo, uma ressonância com uma transição eletrônica da molécula (SKOOG, 2017, como demonstra a Figura 3).

Figura 3 Níveis de energia para o espalhamento Raman. A) Espalhamento elástico. B) Espalhamento Stokes. C) Espalhamento Anti-Stokes.



Fonte: O autor 2018 eq 17

3.10.3 Métodos Computacionais

A simulação computacional é uma poderosa ferramenta na caracterização dos espectros de moléculas de antibiótico devido a grande capacidade de produzir espectros e informações sobre o

sistema de interesse. A partir de uma representação das coordenadas dos átomos que compõem a molécula são calculadas grandezas físicas e algumas propriedades do sistema podem ser estimadas.

3.10.3.1 *Otimização de Geometria*

A otimização da geometria de uma molécula consiste na localização do ponto mínimo de uma superfície de energia potencial, isto é a variação da energia potencial em relação a suas coordenadas. São utilizados métodos numéricos que deslocam gradualmente as coordenadas espaciais com intuito de diminuir a energia, este processo se repete até que um critério de otimização pré-determinado seja alcançado. Em simulação computacional a estrutura otimizada pretende representar as propriedades e características do sistema estudado, neste trabalho as moléculas de antibiótico. O cálculo computacional está baseado no gradiente da energia do sistema ($\frac{\partial E}{\partial \xi_i}$) para cada coordenada espacial dos átomos na molécula (ξ_i).

O processo de otimização pode ser de natureza clássica ou quântica. A diferença principal entre os dois tipos de processo de otimização é de ordem técnica, relativa ao custo computacional e de ordem teórica devido ao tipo de sistema que se pretende estudar com impacto direto na precisão dos cálculos. Uma vez que a força resultante sobre os átomos é nula a molécula encontra-se em seu ponto mínimo de energia na superfície de energia potencial, sendo este o critério de otimização adotado.

3.10.4 **Aproximação de Born-Oppenheimer**

Para realizar o cálculo diretamente pela equação de Schrödinger para sistemas com muitos elétrons seria necessário tempo e recursos computacionais imensos. Isto poderia implicar em problemas impossíveis de ser resolvidos. Para tornar possível o cálculo quântico para sistemas com dimensões gigantescas foram desenvolvidas diversas aproximações que objetivam resolver problemas específicos em mecânica quântica. Uma das primeiras aproximações considera o fato de núcleos possuírem uma massa da ordem de 10^3 vezes maior que a massa dos elétrons ocasionando que os elétrons se movam muito mais rápido quando comparados a estes núcleos.

Se considerarmos, sem prejuízo, que os núcleos estão em repouso o termo de energia cinética pode ser desprezado, restando apenas um termo de energia potencial de interação constante. Os valores obtidos com este cálculo quântico serão aproximados, porém altamente confiáveis, esta é a chamada aproximação de Born-Oppenheimer. Com a aproximação de Born-Oppenheimer o hamiltoniano do sistema de interesse pode ser escrito.

A aproximação de Born-Oppenheimer faz com que cálculos sejam simplificados no estudo quântico de sistemas, tais como moléculas, cristais, entre outros. O sistema eletrônico é definido completamente pelo número total de elétrons, N , e pelo potencial externo V^{\wedge} , no qual os elétrons estão se deslocam.

A densidade eletrônica do sistema que é recalculada em cada iteração passa a ser definida pela equação (18):

$$\rho(r) = \dots \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) \cdot \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_1 dr_2 \dots dr_N, \quad (18)$$

onde $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$ é a solução do estado fundamental do hamiltoniano.

3.10.5 A Teoria do Funcional da Densidade

As bases da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) foram desenvolvida por Hohenberg e Kohn, seu mérito está em provar que a energia eletrônica do estado fundamental é determinada pela densidade eletrônica do estado. A DFT usa principalmente a densidade eletrônica $\rho(r)$ afim de obter a solução da equação de Schrödinger, obter, portanto, a solução o do estado fundamental $\psi(r_N)$. A densidade eletrônica é definida como o quadrado da função de onda podendo ser escrita com apenas três coordenadas espaciais, independentemente do número de elétrons. A densidade eletrônica tem o mesmo número de variáveis, independentemente do tamanho do sistema, enquanto que a complexidade da função de onda aumenta juntamente com o número de elétrons.

A partir da densidade eletrônica pode-se determinar propriedades físicas de interesse, como por exemplo o bandgap da estrutura. A cada iteração uma nova densidade eletrônica é calculada e esta será tão precisa quanto o critério de convergência adotada para o sistema. A

precisão de cada aproximação dependerá do tipo de sistema quântico de interesse, da sua regularidade e do tamanho do sistema.

3.10.5.1 Aproximação Híbrida

O nível de teoria DFT está fundamentado na obtenção de um funcional capaz de descrever o sistema quânticos de interesse, na tentativa de obter uma aproximação precisa o suficiente os funcionais de troca-correlação do tipo híbridos são comumente usados. Nestes funcionais faz-se uso de funcionais GGA de troca e correlação que inclui uma contribuição advinda do método de Hartree-Fock. Como exemplo de funcional híbrido temos o B3LYP, funcional híbrido mais citado no formalismo DFT e utilizado neste trabalho.

3.11 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A análise estatística multivariada, ou de múltiplos parâmetros, emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos. O crescimento e desenvolvimento desta estatística estão intimamente relacionados com o da informática à partir de 1970. A velocidade e capacidade de armazenamento dos computadores e novos softwares permitiram a aquisição e processamento de uma grande quantidade de informação de sistemas amostrais em pouquíssimo tempo, como, por exemplo, na aquisição de espectros de Ultra-Violeta/Visível, de NIR e MIR (VARMUZA, 2016).

A calibração multivariada que se sobrepôs a calibração univariada, construiu uma ponte interdisciplinar entre métodos derivados da matemática, estatística e ciência da computação. A utilização da calibração multivariada conduziu ao uso analítico com aplicação industrial direta. Atualmente a análise estatística multivariada está estabelecida como área independente. Dentro desta estatística destacamos a análise de componentes principais (PCA) que tem a função de reduzir a dimensionalidade do espaço de parâmetros, revelando as variáveis ou combinações de variáveis com características inerentes aos dados originais, permitindo a interpretação em termos químicos ou físico-químicos (VARMUZA, 2016).

A aplicação do método PCA deveu-se à baixa concentração dos fármacos em estudo e à grande quantidade de variáveis fornecidas pelos espectros medidos. Os espectros obtidos

foram submetidos à análise estatística multivariada através do software Unscrambler® versão 9.2 que pode ser realizada em ambiente Windows (JOLLIFFE & CADIMA 2016).

Desta forma, uma rotação no espaço de parâmetros foi realizada até que um eixo de variáveis seja obtido de modo que esta componente seja a mais representativa do sistema, ou seja, é uma direção que engloba o maior número de parâmetros possível (variabilidade). A segunda componente principal (ortogonal à primeira) tem o segundo grau de variabilidade, e assim por diante. Assim, com a rotação, projeta-se o sistema em um novo espaço de parâmetros (sistema de coordenadas) em que seus eixos principais têm as mesmas direções de variabilidade máxima.

O PCA foi projetado a fim de reduzir o número de variáveis que descrevem o sistema. Assim, a primeira componente principal (PC1) engloba um conjunto de variáveis que consegue caracterizar o sistema estudado. Ela descreve a maior parte da variância compreendida na informação, a segunda (PC2) a segunda maior variância (LUIZ et al., 2018), (USP 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises físicas foram realizadas no Laboratório de Produtos e Processos (LPP) e no Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM) do Grupo de Engenharia e Espectroscopia de Materiais (GE2M) do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora. As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos e Águas (LAAA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.1 AMOSTRAS DE LEITE

As amostras de leite cru utilizadas neste trabalho foram coletadas de uma vaca não-medicada, Girolanda, de uma fazenda na cidade de Juiz de Fora, MG, Brasil. Após a ordenha, o leite cru (2L) foi imediatamente armazenado em um ambiente refrigerado a 5 °C por cerca de 1 hora. Uma parte do leite foi utilizada como amostra de leite genuíno enquanto a outra parte foi utilizada para simular a contaminação por resíduos de antibióticos. Em seguida, o leite foi submetido as análises físico-químicas no LAAA.

4.2 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS

Para determinar o ponto de fusão das amostras de leite utilizou-se o crioscópico eletrônico digital MK 540 Flex da ITR. A densidade foi obtida por meio de um lactodensímetro Q 15 °C.

As medidas de gordura, proteína, lactose e sólidos foram realizadas no equipamento Lactoscope da Delta Instruments. Todas as soluções e indicadores utilizados foram da empresa O Macalé Ltda produtos para Laticínios.

4.2.1 Acidez

A medida de acidez foi realizada através da coleta de 10 mL de leite, com pipeta graduada, em um tubo de ensaio e adição de 3 a 5 gotas de fenolftaleína a 1%. Em seguida

foi realizada a titulação com auxílio do acidímetro, contendo a solução de Dornic, até ponto de viragem. Cada 0,1 mL da solução de Dornic equivale a 1 grau Dornic (°D) (BRASIL, 2011). O ponto de viragem foi verificado através do indicador de fenolftaleína, onde se obtinha uma coloração levemente rósea. Conforme o padrão determinado pela empresa, com base na Instrução Normativa 62 e na Portaria nº 53, o resultado podia ser expresso em graus Dornic (°D) e devia estar entre 14 a 18 °D para o leite.

4.2.2 Alizarol

A análise consistia em misturar partes iguais de leite e solução alizarina a 0,1%, com objetivo de estimar o pH da amostra. Na rotina do laboratório adicionou-se 2 mL de amostra em tubo de ensaio, com auxílio de pipeta graduada, adicionados 2 mL de alizarol 72°GL, com auxílio de bico de papagaio, e em seguida foi realizada agitação e leitura.

4.2.3 pH

A leitura do pH foi realizada com auxílio do pHmetro digital. Retirava-se o eletrodo do pHmetro de dentro de sua solução de descanso (KCl 3M®) e realizava-se a lavagem com água destilada. Em seguida o eletrodo era secado com auxílio de papel, e após limpo foi mergulhado na amostra. Aguardava-se então a estabilização do pHmetro e realizava-se a leitura.

4.2.4 Crioscopia

O fundamento da crioscopia é determinar, com exatidão, se houve ou não fraude por adição de água ou sólidos, através do ponto de congelamento do leite, que se situa normalmente entre -0,530 °H e -0,550 °H, conforme a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL 2011).

A técnica constituía-se em pipetar 2,5 mL de amostra em um tubo de ensaio, próprio para crioscopia, aquecer levemente por cerca de 3 segundos em banhomaria e colocar o tubo com a amostra no aparelho para realização da leitura.

4.2.5 Densidade

A densidade, o teor de proteína e o teor de gordura foram analisados por testes individuais. Porém, as análises feitas nos leites provenientes da recepção, foram realizadas com auxílio de um equipamento chamado Ekomilk (Total- CapLab®), a fim de otimizar o tempo gasto. Esse aparelho determinava os valores de forma muito mais rápida e também eficaz e havia dois equipamentos no local.

4.3 AMOSTRAS DE ANTIBIÓTICOS

Os antimicrobianos utilizados neste estudo foram obtidos do comércio local da cidade de Juiz de Fora- MG, de lojas especializadas em tratamento de animais. Todas as análises seguiram padrão analítico em triplicado e estão dispostas na tabela 5 **abaixo** de acordo com a classe, nome comercial, período de carência e dosagem por litro.

Tabela 5 Fármacos utilizados como contaminantes

<i>Princípio ativo</i>	CLASSE	NOME COMERCIAL	PERÍODO DE CARÊNCIA	LMR
Benzilpenicilina L (veterinária)	β -lactâmicos	Fortbiótico Além disso Superforte®	5 dias	4 $\mu\text{g} / \text{L}$
Benzilpenicilina benzatina (humano)	β -lactâmicos	Benzetacil®	Não possui	4 $\mu\text{g} / \text{L}$
Ampicilina (humano)	β -lactâmicos	Ampicillin®	Não possui	4 $\mu\text{g} / \text{L}$
Oxitetraciclina (veterinária)	Tetraciclina	Oxytetracycline®	12 dias	100 $\mu\text{g} / \text{L}$

Fonte: O autor

*Para as preparações experimentais foi necessário utilizar água destilada e água deionizada.

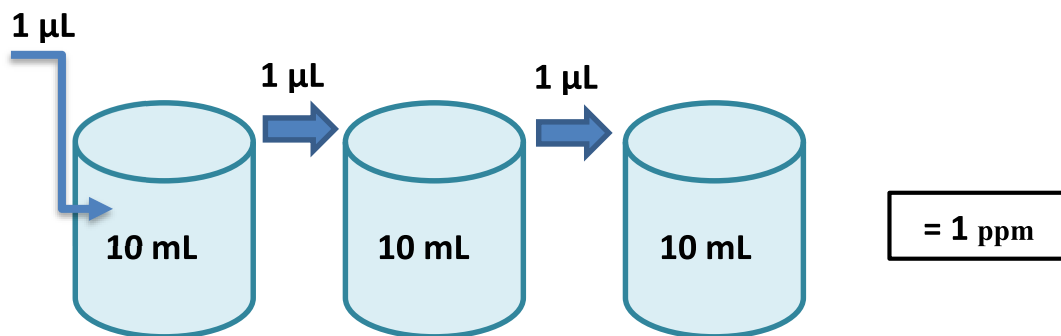
4.3.1. Simulando a contaminação

A maioria dos medicamentos são constituídos de princípio ativo excipiente, portanto, na análise de dados com PCA, a discriminação do leite contaminado ($\mu\text{g}/\text{L}$) é dada por meio do princípio ativo, e não através do medicamento (princípio ativo e excipientes) (LUIZ et al.,

2018).

Para o simular a contaminação de cada amostra foram utilizados os seguintes parâmetros: Ampicilina em pó (250 mg/5ml); Benzilpenicilina (1.200.000 UI), Estreptomina (8,4 g/2.500 mg) de mistura por ampola; Oxitetraciclina (20 g/100 mL). Após as diluições, foram adicionadas alíquotas individuais das amostras citadas acima no leite reservado para a contaminação (LUIZ et al., 2018). Cada medicamento utilizado (penicilina G, oxitetraciclina e enrofloxacin) foi primeiramente diluído em água destilada, parte desta diluição foi adicionada no leite genuíno, a fim de alcançar a concentração do princípio ativo no leite. A Fig. 4 é um diagrama esquemático de como foram feitas as diluições dos medicamentos usados neste trabalho. Nela se exemplifica como obter uma concentração de 1 mg/L (1 ppm) a partir 1 mL de medicamento em 100 mL água destilada.

Figura 4 Diagrama esquemático da diluição de 1 µL de substância (antibiótico) em 10 mL de água para alcançar uma concentração de 1 ppm (LUIZ et al., 2018).



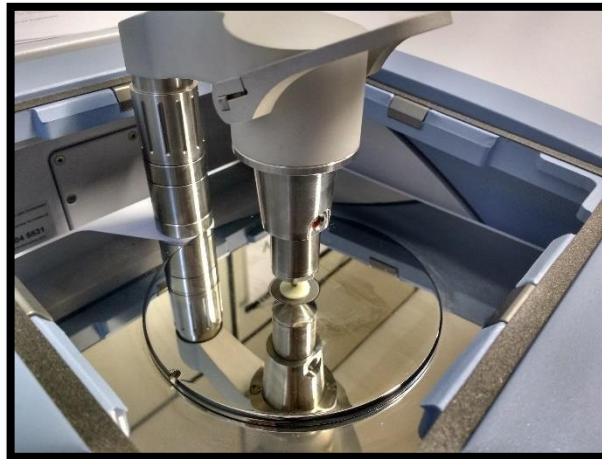
Fonte: (Adptado)

Os valores equivalentes seguidos pela Legislação Brasileira para os antimicrobianos e seus metabólitos são os seguintes: 100 µg/L para Oxitetraciclina e 4 µg/L para penicilina G (MOHARANA, 2015) (PACHECO-SILVA, 2014) (MANGERONA, 2013). As concentrações finais da simulação seguem as normas LMR do Codex Alimentarius, a qual determina que, a concentração máxima permitida é de 4 µg/L para Ampicilina e Benzilpenicilina e 100 µg/L para Oxitetraciclina.

4.5 ANÁLISE POR FT-MIR DO LEITE CONTAMINADO

As amostras (antimicrobiano puro, leite genuíno e leite contaminado) foram analisadas em espectrômetro BRUKER®, modelo Vertex 70 com acessório ATR pertencente ao LEM (Laboratório de Espectroscopia de Materiais) do Departamento de Física da UFJF. As especificações utilizadas foram: resolução de 4 cm^{-1} , janela espectral cobrindo a faixa 4000 a 350 cm^{-1} números de onda, 32 varreduras em volume fixo de antimicrobiano com ATR de diamante. Os dados coletados foram analisados no software OriginPro® 8 SR2 v.8.0891 (B891) e Unscrambler® 9.2 versão 10.3. As medições foram realizadas em triplicatas. A Fig. 5 mostra o acessório ATR com janela de diamante, utilizado neste trabalho.

Figura 5 Espectrômetro BRUKER®, modelo Vertex 70 com acessório ATR



Fonte: (O autor)

O alto índice de refração do elemento ATR é adequado para obtenção de espectros de excelente qualidade para a maior parte das substâncias, com grau de penetração da radiação na amostra em torno de $1\text{-}2\ \mu\text{m}$. A dureza e a estabilidade química do diamante permite a obtenção direta de espectros de materiais também em fase líquida, com bom contato entre a amostra e o cristal.

4.6 ANÁLISE DO LEITE CONTAMINADO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

As medições foram realizadas no equipamento Espectrômetro T64000 da Horiba-Jobin Yvon, equipado com um detector CCD – *Charge Coupled Device*, dispositivo de carga acoplada, que recebe líquido criogênico, nitrogênio, para efetuar a detecção de fótons a temperatura de -130 °C. Para excitação das amostras, foi utilizado um laser de argônio (Melles-Griot), com comprimento de onda de 488 nm. As amostras foram colocadas em lâminas e visualizadas por um microscópio Olympus modelo BX41, com uma objetiva da Olympus Mplan 50x de aumento com distância de trabalho de 0,35 mm e N.A. (abertura numérica) de 0,50. Os dados coletados foram analisados no software OriginPro® 8 SR2 v.8.0891 (B891) e Unscrambler® 9.2 versão 10.3.

As amostras de leite genuíno e leite contaminado com antibiótico foram pipetadas cuidadosamente em uma lâmina para evitar a formação de bolhas e obter uma superfície homogênea sobre o plano das lâminas (porta-amostras). A distância entre a sonda Raman emissora da luz azul e a superfície da amostra de leite no porta-amostras foi mantida em 10 mm, em todos os experimentos. A sala onde o equipamento se encontra era climatizada à temperatura de 20 °C.

4.7 SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

As estruturas do estado fundamental de penicilina e ampicilina foram calculadas em fase gasosa com base na Teoria Funcional de Densidade (DFT) (PARR R & YANG, 1989) utilizando o funcional híbrido B3LYP (Becke AD, 1988) (Lee C et al., 1988) e utilizando-se como funções base, o conjunto 6-31 + G (d, p) (Ditchfield R et al., 1971). As geometrias de sistemas em solução foram obtidas usando o Modelo Contínuo Polarizável (PCM) (TOMASI J et al., 2005).

Os espectros vibracionais (infravermelho e Raman) foram obtidos com base na Teoria do Funcional da Densidade e usando o pacote computacional GAUSSIAN (FRISCH et al., 2003). A fim de melhorar os valores de frequência, foi utilizado um fator de correção de escala como preconizado por Alecu et al., 0,9614 (ALECU et al., 2010).

As intensidades Raman foram encontradas através da equação proposta por V.A. Rassolov et al. (Rassolov et al., 2001). Para cada modo normal, ν_0 , a frequência de excitação do laser foi configurada para $9398,5 \text{ cm}^{-1}$. A constante C foi considerada 10-13. Bi, considerada um fator de temperatura unitário, responsável pela contribuição dos estados vibracionais excitados (WYSOKINSKI R et al., 2007).

Em resumo, os cálculos computacionais foram obtidos através da utilização de dois pacotes computacionais ORCA (NEESE F, 2012) e Gaussian 03 (FRISCH et al., 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão abordados os resultados encontrados a partir das análises realizadas, desde a coleta do leite até as medidas de espectroscopia óptica. A vantagem do FT-MIR é que apresenta maior velocidade e sensibilidade em relação a um instrumento dispersivo. O sucesso no emprego da técnica tem sido fortemente impulsionado pelo desenvolvimento de métodos de análise de dados específicos, que permitem obter informações importantes dos espectros vibracionais de amostras complexas como de resíduos de antibióticos. A espectroscopia Raman associada a ferramentas quimiométricas e análise estatística de dados fornece resultados rápidos sem que haja a necessidade de tratamento das amostras, consolidando-se na literatura científica como uma poderosa ferramenta de controle de qualidade dos alimentos.

Os espectros MIR e os dados de referência das amostras foram tratados pelo programa BRUKER®: OPUS versão 6.5.97 – Programa que permite a aquisição dos espectros e a sua visualização, aplicando os pré-tratamentos espectrais mais habituais. Os espectros Raman e os dados de referência das amostras foram tratados pelo programa LabSpec® versão 5.93.20 da HORIBA Scientific® - O LabSpec® é uma ferramenta poderosa para o experimento completo, desde a configuração do instrumento e aquisição de dados, até rotinas sofisticadas para processamento e exibição de espectro e imagem.

Os espectros FT-MIR e Raman foram analisadas no software OriginPro® 8 SR2 versão 8.08914 (B891) e por estatística multivariada no software Unscrambler® versão 9.2 com PLSPLUS/IQ – Programa que permite desenvolver calibrações de modo a obter os resultados pretendidos. Permite trabalhar com conjuntos de dados multivariáveis e incorpora os algoritmos quimiométricos mais comuns. Foi utilizado para aplicar os pré-tratamentos espectrais, realizar análises de componentes principais (PCA) e calcular regressões por mínimos quadrados parciais (PLS).

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A Tabela 6 apresenta as médias e desvios padrão referente às análises físico-químicas do leite cru e os padrões preconizados utilizados como referência.

Praticamente todas as amostras obtidas quando comparadas aos valores de referência adotados apresentaram-se dentro dos padrões oficiais da legislação vigente, exceto gordura e proteína, que apresentou um valor inferior. A coleta do leite foi feita em vaca de primeira ordenha. Assim é possível que no momento da coleta o tanque onde o leite estava armazenado não tinha sido homogeneizado corretamente, levando a leite com baixo teor de gordura e proteína.

Tabela 6 Resultado da caracterização físico-química da amostra de leite.

Análises	Valores	Referência
Acidez	(17,33± 0.6) °Dornic	(14 to 18) °Dornic
Crioscopia	(-0,541± 0.001) °H	(-0.550 to -0.530) °H
Ph a 25 °C	(6,71± 0.01)	(6.60 to 6.80)
Densidade	(1,0306 ± 0.001) g/mL	(1.029 to 1.040) g/mL
Proteína	(2,67 ± 0.01) %	≥4.30
Gordura	(2,2 ± 0.01) %	≥3.00
Lactose	(4,78 ± 0.01) %	≥2.90
Sólidos	(9,48 ± 0.01) %	≥8.40

^a IN 62; ^bFAO/TCP/KEN/6611.

Fonte:O Autor

Na determinação do índice crioscópico, não indicou água acrescentada ao leite, como observado na tabela 6, indicando que os valores ainda estavam dentro do ponto de congelamento máximo do leite aceito pela legislação brasileira que é de 0,550 °H(graus Hortvet) (BRITO et al., 2009).

Não foi observado nenhum tipo de alteração nas amostras em relação ao teste de alizarol 75%, possivelmente devido à quantidade de bactérias presentes não serem suficientes para elevarem a acidez do leite, indicando que as amostras estavam dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2002) com relação à acidez titulável, densidade e sólidos.

Apesar do valor de gordura de 2,2 g/g (Tabela 6), encontrar-se abaixo do valor mínimo de 3,0 g/g estabelecido pela legislação (BRASIL, 2011). Em seus experimentos, SALVADOR

(2008) encontraram valores de 2,6 a 3,0% para os teores de gordura, resultados próximos ao deste estudo.

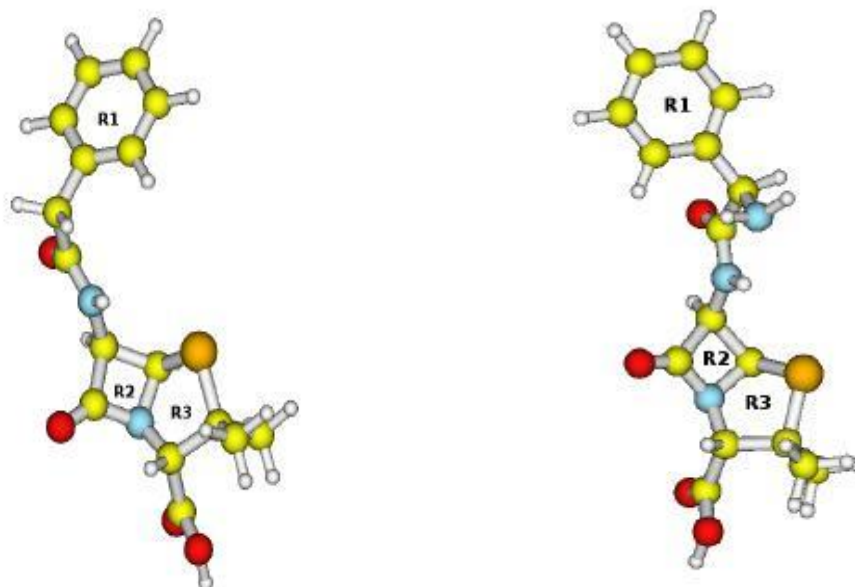
Os resultados obtidos para os valores de proteína do estudo (2,96% a 3,32%), demonstrados na Tabela 6, apresentaram-se de acordo com a IN 62 (BRASIL, 2011) que estabelece concentração mínima de 2,9 % desse componente no leite bovino. Evidências têm constatado que fatores sazonais (RIBAS et al., 2004), raciais (VERNEQUE et al., 2005), nutricionais (BOTARO et al., 2008) e a ocorrência de mastite (MAZAL et al., 2007) influenciam os teores de proteína bruta do leite.

Contudo, observa-se que as amostras se encontram dentro do aceitável no quesito, leite de boa qualidade, possíveis alterações, como a de coleta, transporte e armazenamento não impactaram negativamente nas medidas para antibióticos.

5.2 OTIMIZAÇÃO DA ESTRUTURA DE BENZILPENICILINA

A estrutura das moléculas de Benzilpenicilina e Ampicilina fornecem informações sobre o modo de ação desses antibióticos, o espectro de vibração dessas moléculas fornece a impressão digital das mesmas permitindo a identificação dessas substâncias em uma matriz complexa como o leite. As geometrias das moléculas de penicilina e ampicilina estão representadas da Figura 6.

Figura 6: Modelo teórico computacional dos antibióticos Benzilpenicilina e Ampicilina



(a) Modelo computacional da molécula de Penicilina (b) Modelo computacional da molécula de Ampicilina

Fonte: O Autor

As moléculas de penicilina e ampicilina foram calculadas na fase gasosa e diluída em água, as diferenças na geometria das moléculas nessas duas situações estão descritas na Tabela 7.

Como pode ser visto, ambas as estruturas são muito semelhantes. Além disso, os valores calculados em solução não apresentaram alterações significativas em relação aos valores da fase gasosa. A principal alteração estrutural entre penicilina e ampicilina é o ângulo diedral do anel fenílico em relação à molécula inteira, varia de 64° a 52° , respectivamente. O anel β -Lactâmico característico dos antibióticos desse grupo apresentou geometria muito semelhante nas duas moléculas.

Tabela 7 Dados estruturais dos compostos de penicilina e ampicilina. Os cálculos teóricos foram obtidos no nível de teoria B3LYP / 6 - 31 + G (d, p).

		Penicilina - gás	Ampicilina - gás	Penicilina - água	Ampicillin - água
R1 anel	C-C	1.396	1.396	1.398	1.399
	C-H	1.086	1.086	1.096	1.086
	C - CH ₂	1.521	1.522	1.519	1.524
Grupo amida	C-H	1.094	1.097	1.094	1.096
	C-C	1.528	1.546	1.529	1.545
	C-O	1.226	1.226	1.233	1.234
	C-N	1.375	1.367	1.368	1.358
	N-H	1.010	1.016	1.012	1.017
	C - N(NH ₂)	-	1.478	-	1.475
	N - H(NH ₂)	-	1.016	-	1.016
R2 anel	HC-NH	1.427	1.425	1.430	1.427
	C-H	1.093	1.094	1.092	1.092
	OC-CH	1.552	1.552	1.552	1.553
	C-N	1.399	1.398	1.388	1.388
	C - S	1.838	1.837	1.834	1.835
	HC - CH	1.568	1.588	1.566	1.566
	N-CH	1.471	1.472	1.476	1.475
R3 anel	C-C	1.587	1.588	1.588	1.588
	C-C(COOH)	1.528	1.528	1.529	1.529
	C - C((CH ₃) ₂)	1.539	1.538	1.538	1.538
	C-H	1.093	1.093	1.093	1.090
	C-S	1.880	1.879	1.883	1.882
	C-O	1.208	1.208	1.213	1.213
	C-OH	1.358	1.358	1.346	1.346
	O-H	0.973	0.973	0.974	0.974

Fonte: O Autor

5.3 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO FT-MIR

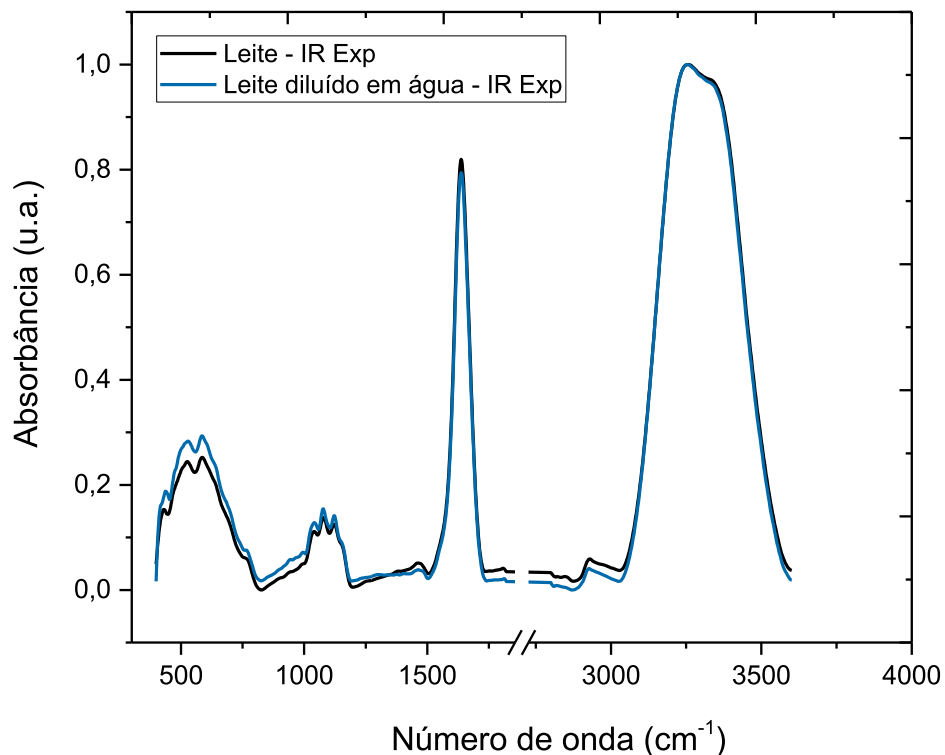
Nesta seção serão abordados os resultados referentes às análises realizadas pela espectroscopia de infravermelho médio. Foram analisados os espectros experimentais para benzilpenicilina veterinária, benzilpenicilina humana, ampicilina e oxitetraciclina; os espectros computacionais para benzilpenicilina e ampicilina.

Adicionalmente analisamos uma alíquota de leite puro (sem contaminação), e amostras de leite puro adicionadas com água. Essas amostras compõem o grupo de controle antes da contaminação por antibiótico realizada no laboratório.

5.2.1 Espectro FT-MIR leite e leite diluído em água

A Figura 7 apresenta os espectros experimentais FT-MIR referentes ao leite cru (sem contaminação) e leite cru adicionado de 1 μL água pura em 250 mL de leite.

Figura 7 O espectro em linha contínua representa o espectro experimental de leite cru. Em linha tracejada está representado o espectro de leite cru diluído em água.



Os espectros do leite diluído em água apresentaram intensidade ligeiramente superior em algumas faixas ao leite puro, na faixa em torno de 500 cm^{-1} a diferença observada é muito maior do que nos outros números de onda. desvio médio das intensidades é inferior a 5%, nenhuma banda de absorção nova foi observada no leite diluído em água em relação ao leite puro. A adulteração de $1\ \mu\text{L}$ de água em 250 mL de leite não provocou mudança significativa no espectro do leite. A análise desses dois espectros é importante, pois, a simulação de contaminação ocorreu acrescentando $1\ \mu\text{L}$ de mistura antibiótico + água em 250 mL de leite puro.

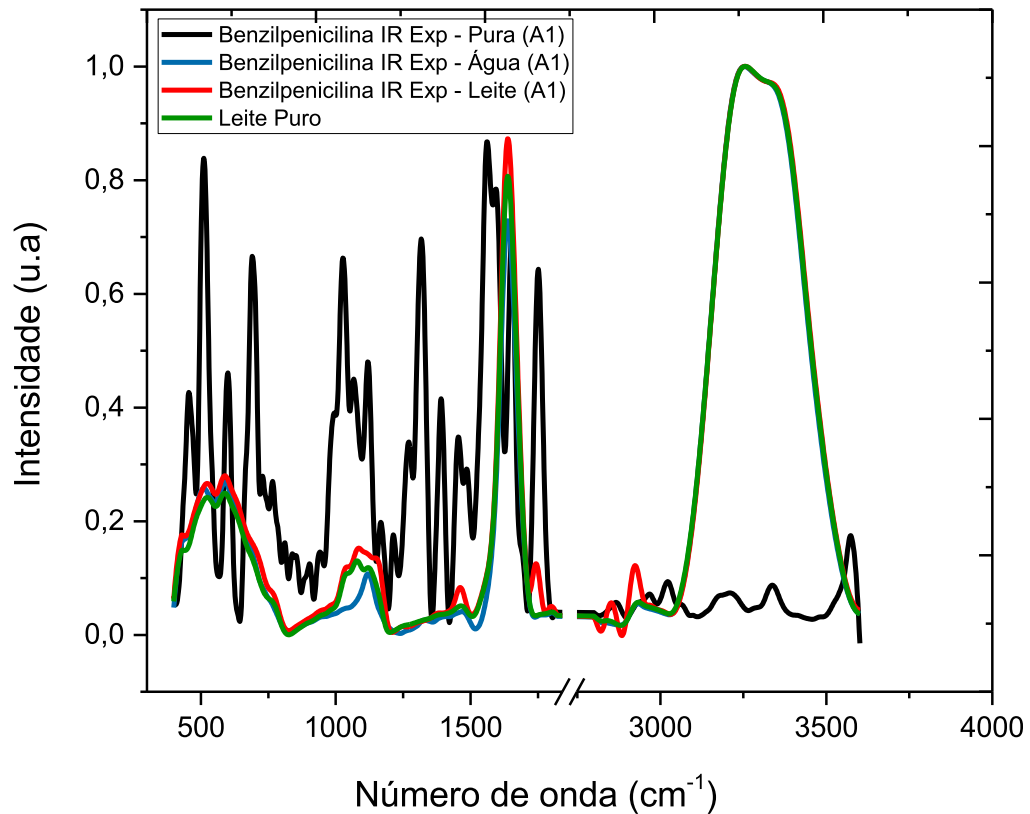
Estudos anteriores recomendam que algumas regiões do MIR sejam suprimidas durante a análise, pois apresentam ruídos e sinal fraco (PILLONEL et al., 2003), para leite e derivados observa-se apenas uma banda relativa a molécula de CO_2 . Neste estudo analisamos duas regiões do MIR, a primeira de 400 a 1.820 cm^{-1} e a segunda de 2.600 a 3.600 cm^{-1} .

As contribuições dos lipídios ocorrem na região de 2.800 a 3.000 cm^{-1} (LEFÈVRE e SUBIRADE, 2000), em nosso estudo a atribuição para uma banda de absorção de lipídios se deu com pico em 2.929 cm^{-1} e banda de absorção entre 2.871 e 3.000 cm^{-1} . A segunda banda de absorção de lipídios conhecida pela frequência de vibração do grupo carboxílico de ácidos graxos situa-se entre 1.736 e 1.805 cm^{-1} (COATES, 2000). Os picos entre as regiões da impressão digital da molécula de 640 a 1.500 cm^{-1} são devido ao dobramento C-H (1.493 cm^{-1}) e ao estiramento C-O (1.157 a 1.080 cm^{-1}). A tentativa de atribuição para o dobramento C-H ocorreu em 1.463 cm^{-1} e para o estiramento C-O ocorreu em 1.055 a 1.123 cm^{-1} .

5.2.2 Espectro experimental FT-MIR benzilpenicilina

O espectro infravermelho da benzilpenicilina foi coletado para duas versões do antibiótico, a primeira é a versão veterinária e a segunda é a versão disponível para consumo humano. A Figura 8 apresenta os espectros experimentais FT-MIR Benzilpenicilina A1 (veterinária) pura, Benzilpenicilina diluída em leite (simulação de contaminação), Benzilpenicilina diluída em água (adulterada) e leite puro (sem antibiótico).

Figura 8 Espectros experimentais FT-MIR de Benzilpenicilina A1 (veterinária) pura, Benzilpenicilina diluída em leite (simulação de contaminação), Benzilpenicilina diluída em água (adulterada) e leite puro.



Fonte: O Autor

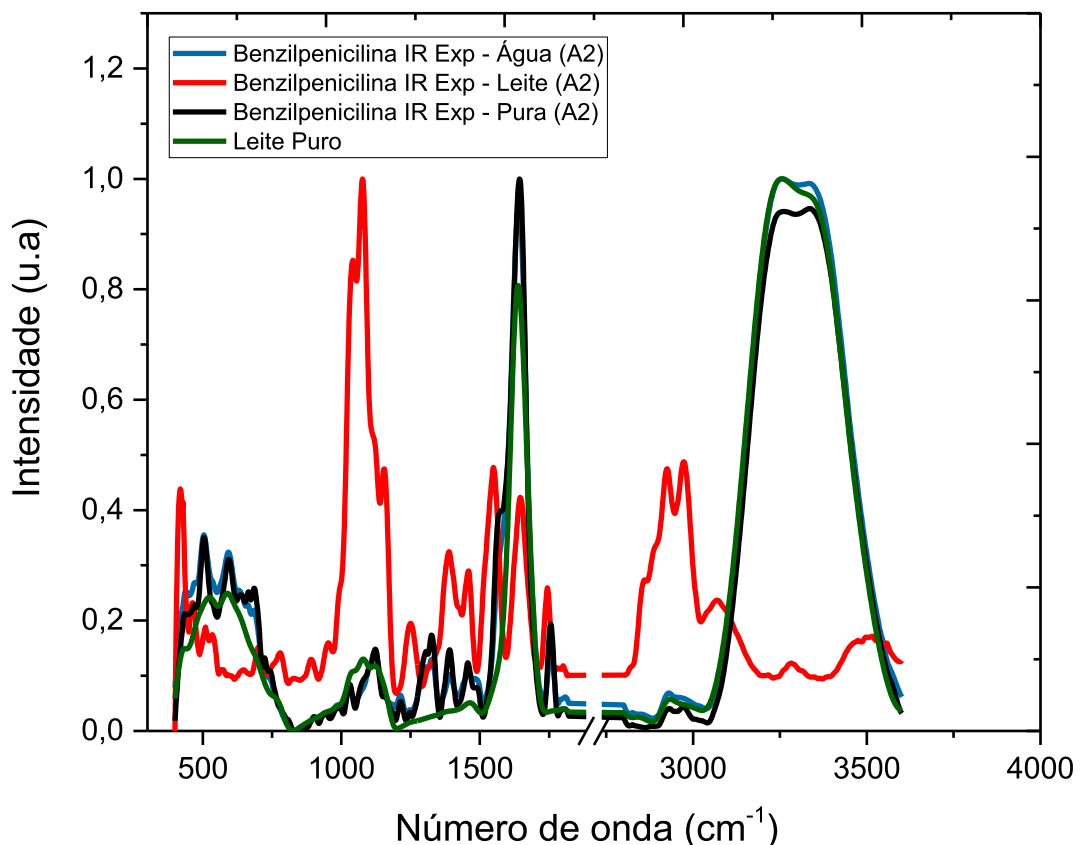
A mistura de Benzilpenicilina A1 (veterinária) e Leite foi realizada na concentração de $4\mu\text{g}$ de antibiótico por litro de leite seguindo os LMR adotados pela Legislação Brasileira. O espectro da Benzilpenicilina A1 apresenta uma banda de absorção com pico em 1751 cm^{-1} que corresponde ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ do anel betalactâmico que caracteriza o grupo dos antibióticos β -lactâmicos.

O anel aromático da Benzilpenicilina A1 possui bandas de absorção que correspondem ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ do anel que ocorrem aos pares em 1600 e 1475 cm^{-1} (DONALD, 2008) a atribuição desse par de estiramentos está em 1591 e 1485 cm^{-1} respectivamente. O estiramento $=\text{C}-\text{H } sp^2$ ocorre em valores maiores que 3.000 cm^{-1} a atribuição feita para esse estiramento está em 3.022 cm^{-1} e correspondendo também a um estiramento do anel aromático. A Benzilpenicilina A1 diluída em água apresentou espectro com menor ruído e estiramento $=\text{C}-\text{H } sp^2$ menos intenso.

A Benzilpenicilina A1 diluída em leite apresentou aumento de intensidade no estiramento C=O do Anel Betalactâmico. Esse efeito de ampliação pode ser resultante de um efeito de conjugação durante a mistura com o leite (DONALD, 2008). A banda de absorção devido ao estiramento =C-H sp^2 diminui de intensidade, mesma tendência observada com a diluição em água e uma nova banda de absorção apareceu na faixa espectral de 2829 a 2871 cm^{-1} .

A Figura 9 apresenta os espectros experimentais FT-MIR Benzilpenicilina A2 (uso humano) pura, Benzilpenicilina diluída em leite (simulação de contaminação), Benzilpenicilina diluída em água (adulterada) e Leite puro (sem antibiótico).

Figura 9 Espectros experimentais FT-MIR Benzilpenicilina A2 (uso humano) pura, Benzilpenicilina diluída em leite (simulação de contaminação), Benzilpenicilina diluída em água (adulterada) e leite puro.



Fonte: O Autor

A mistura de Benzilpenicilina A2 (uso humano) e Leite foi realizada na concentração

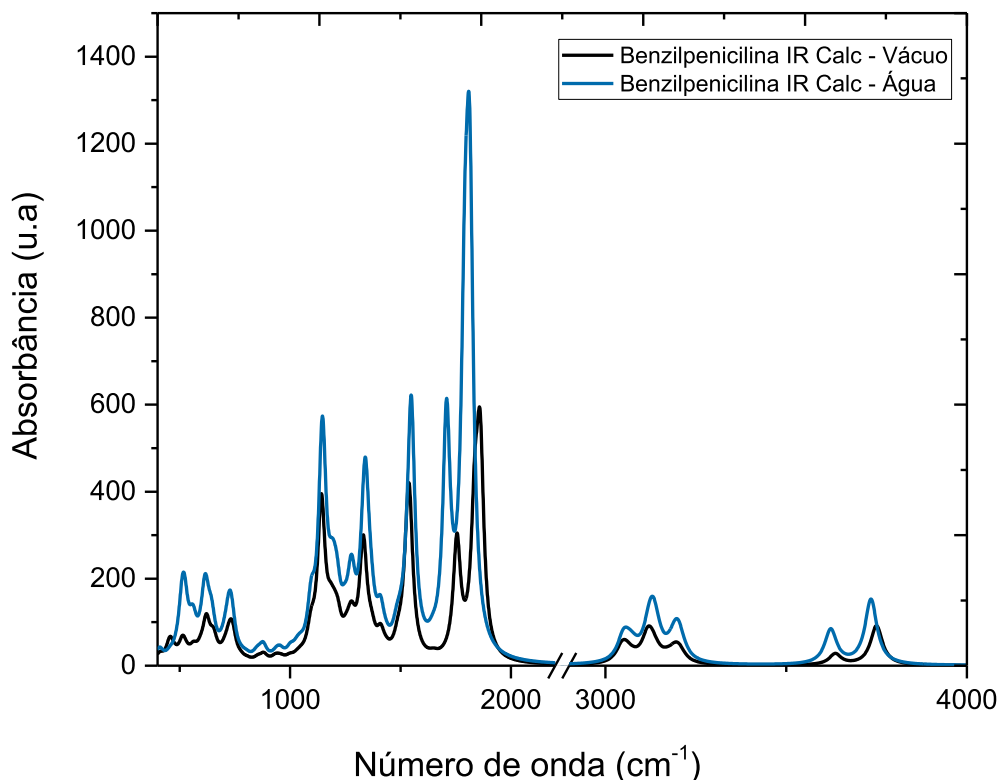
de 4 μ g de antibiótico por litro de leite seguindo os LMR adotados pela Legislação Brasileira. O espectro da Benzilpenicilina A2 pura apresenta uma banda de absorção com pico em 1.622 cm^{-1} que corresponde ao estiramento da ligação C=O do anel betalactâmico comum a todo o grupo dos antibióticos β -lactâmicos.

A Benzilpenicilina A2 diluída em leite apresentou aumento de intensidade na banda de absorção entre 989 e 1.238 cm^{-1} , parte do aumento das intensidades é atribuída aos excipientes presentes na Benzilpenicilina A2.

5.2.3 Espectro teórico FT-MIR benzilpenicilina

O espectro infravermelho da benzilpenicilina calculado por simulação computacional foi obtido para a Benzilpenicilina no vácuo (fase gasosa) e para a Benzilpenicilina diluída em água. A Figura 10 apresenta os espectros teóricos FT-MIR para a Benzilpenicilina na fase gasosa e para a Benzilpenicilina diluída em água.

Figura 10 Espectros teóricos FT-MIR para a Benzilpenicilina na fase gasosa e para a Benzilpenicilina diluída em água.



Fonte: O Autor

O espectro da Benzilpenicilina simulada com meio aquoso apresentou aumento da intensidade de sinal IR devido a interação com a água, o que provoca ligeiro alargamento das bandas de absorção, entretanto a localização e largura das bandas de absorção manteve-se nos mesmo números de onda em relação a fase gasosa. O estiramento =C-H ocorreu em valores maiores que 3000 cm^{-1} , a atribuição feita para esse estiramento está em 3201 cm^{-1} e corresponde a um estiramento do anel aromático. O estiramento do grupo amida foi atribuído em 3112 cm^{-1} . Para o grupo carboxílico CO observou-se um estiramento centrado no pico de 1836 cm^{-1} . O anel aromático da Benzilpenicilina apresentou estiramento C-C centrado no pico de 1530 cm^{-1} . Outros estiramentos, torções e deformações assimétricas estão listadas no Anexo I deste trabalho.

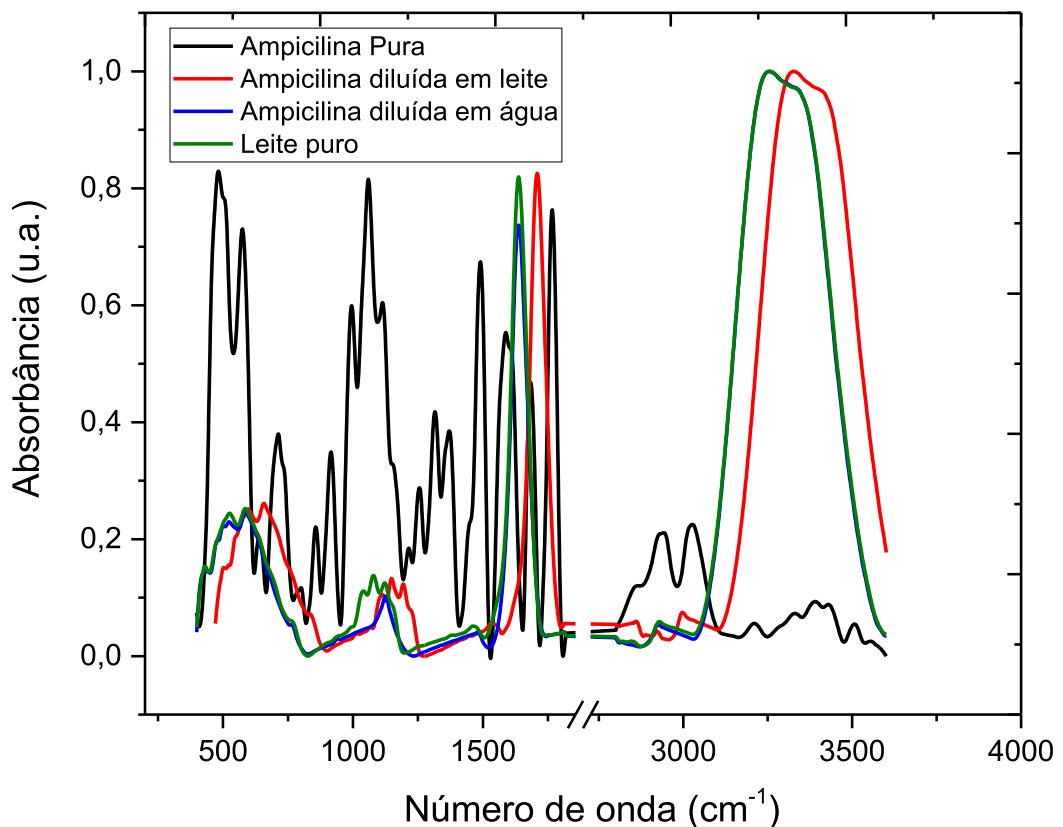
Quando comparado ao espectro experimental a benilpenicilina teórica obtida via simulação computacional apresentou em linhas gerais o mesmo formato do espectro, bandas de absorção próximas e com larguras semelhantes. A banda de maior discrepância ocorreu entre 3200 e 3600 cm^{-1} , onde uma banda de absorção não foi observada no espectro teórico. Atribui-se essa diferença a alguma limitação do modelo computacional escolhido, visto que

em outros espectros experimentais da benzilpenicilina identificamos a presença dessa mesma banda de absorção.

5.2.4 Espectro experimental FT-MIR ampilina

O espectro infravermelho da Ampicilina foi coletado para a Ampicilina pura, Ampicilina diluída em água e Ampicilina diluída em leite (simulação de contaminação). A Figura 11 mostra os espectros experimentais obtidos para a Ampicilina.

Figura 11 Espectros FT MIR de Ampicilina Pura, ampilina diluída em leite, ampilina diluída em água e leite puro.



Fonte: O Autor

No espectro experimental da Ampicilina Pura observamos o estiramento atribuído ao grupo amida na região centrada no pico em 3505 cm^{-1} , o estiramento C-C do anel aromático ocorreu em 1408 cm^{-1} , o estiramento NH(NH₂) ocorreu com pico centrado em 1566 cm^{-1} . O

estiramento C-O carboxílico ocorreu na região centrada no pico em 1678 cm^{-1} e o estiramento C-O do grupo amida na região centrada no pico em 1597 cm^{-1} .

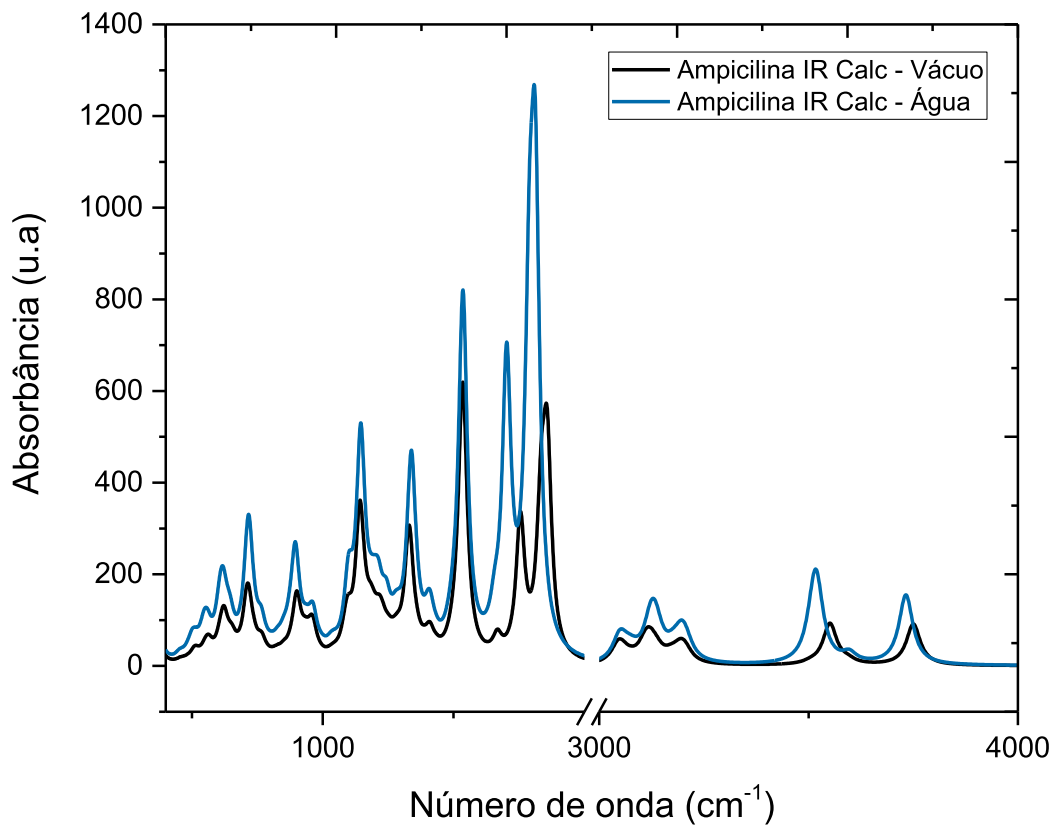
O espectro experimental da Ampicilina pura apresentou diferença significativa da Ampicilina diluída em água. Tal diferença é atribuída ao tamanho dos grãos da Ampicilina na fase sólida (sem diluição) e após a mistura e homogeneização da primeira alíquota de antibiótico com água e na segunda alíquota em leite. O espectro experimental obtido para a Ampicilina pura também apresentou diferença do espectro experimental para a mistura de Ampicilina e Leite, uma diversidade de bandas de absorção entre 500 e 1.250 cm^{-1} ; bandas em 1600 e 1780 cm^{-1} foram atenuadas.

Os espectros experimentais para a Ampicilina diluída em água e para a Ampicilina diluída em leite apresentaram grande semelhança, havendo apenas o deslocamento de algumas bandas de absorção. A banda de absorção centrada no pico em 1008 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-N do anel β -Lactâmico, essa banda de absorção mostra-se como a mais provável para a detecção de Ampicilina no leite. A grande semelhança entre os dois espectros pode indicar uma limitação da espectroscopia FT-MIR ou ainda uma baixa difusão das moléculas de Ampicilina no meio aquoso e no leite devido a sua granulação.

5.2.5 Espectro teórico FT-MIR ampicilina

O espectro infravermelho da Ampicilina calculado por simulação computacional foi obtido para duas situações Ampicilina no vácuo (fase gasosa) e para Ampicilina diluída em água. A Figura 12 apresenta os espectros teóricos FT-MIR para a Ampicilina na fase gasosa e para a Ampicilina diluída em água.

Figura 12 Espectros teóricos FT-MIR para a Ampicilina na fase gasosa e para a Ampicilina diluída em água.



Fonte: O Autor

O espectro da Ampicilina simulada com meio aquoso apresentou aumento da intensidade de sinal IR devido a interação com a água, o que provoca ligeiro alargamento das bandas de absorção, entretanto a localização e largura das bandas de absorção manteve-se praticamente nos mesmos números de onda em relação a fase gasosa. A maior discordância ocorreu para números de onda maiores. O estiramento do grupo amina NH_2 ocorreu na região centrada no pico em 901 cm^{-1} , o grupo NH_2 é uma forte característica que diferencia a Ampicilina de outros antibióticos do grupo dos β -Lactâmicos.

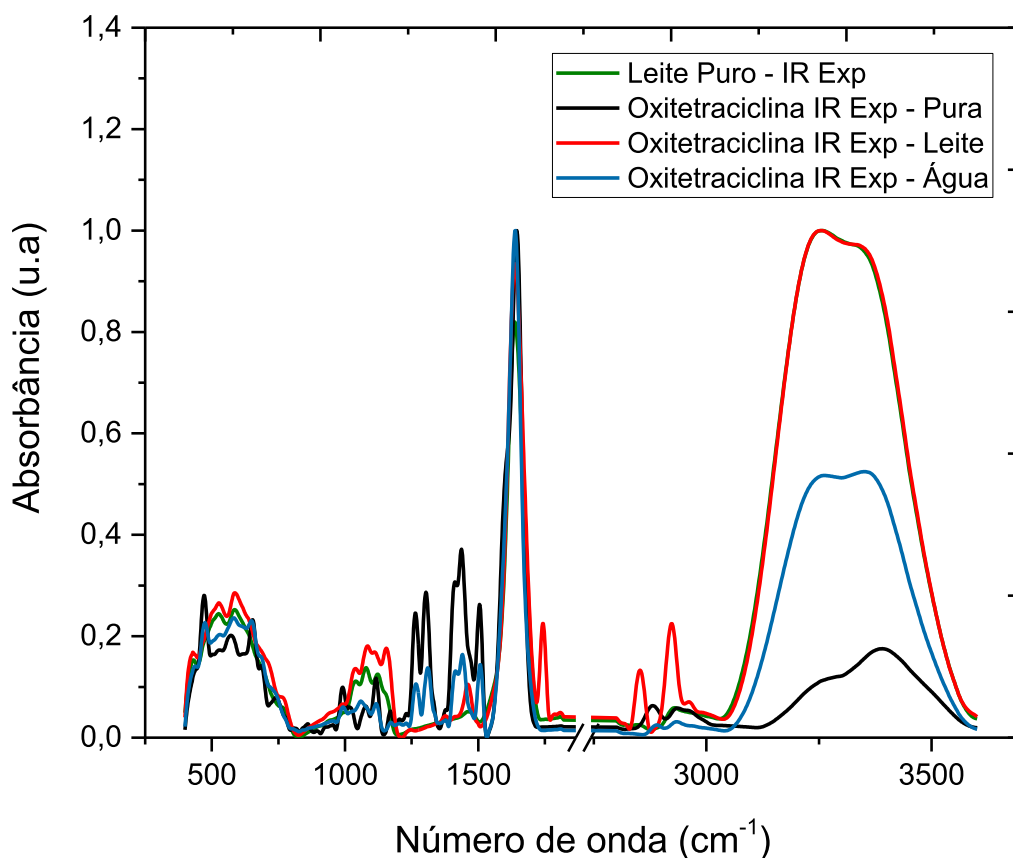
O estiramento C-H simétrico do grupo amida foi atribuído em 2985 cm^{-1} , o estiramento C-C do anel aromático foi atribuído na banda de absorção centrada no pico de 1491 cm^{-1} . Para o grupo carboxílico CO observou-se um estiramento centrado no pico de 1682 cm^{-1} . O anel aromático da Benzilpenicilina apresentou estiramento C-C centrado no pico de 1530 cm^{-1} . Outros estiramentos, torções e deformações assimétricas estão listadas na Tabela Anexa 1 deste trabalho.

Quando comparado ao espectro experimental a ampicilina teórica obtida via simulação computacional apresentou-se semelhante em linhas gerais. Na região entre 500 e 1000 cm^{-1} algumas bandas de absorção obtidas no espectro experimental foram maiores em intensidade em comparação ao espectro obtido via simulação computacional. Na região acima de 3000 cm^{-1} do espectro teórico foi observado o deslocamento de uma banda de absorção observada na região entre 2800 e 3000 cm^{-1} no espectro experimental.

5.2.6 Espectro experimental FT-MIR oxitetraciclina

O espectro infravermelho da Oxitetraciclina foi coletado para a Oxitetraciclina pura, Oxitetraciclina diluída em água e Oxitetraciclina. A Figura 13 mostra os espectros experimentais obtidos para a Oxitetraciclina.

Figura 13 Espectros experimentais FT-MIR de oxitetraciclina pura, diluída em leite e diluída em água. Para comparação também foi adicionado um espectro de leite puro.



Fonte: O Autor

O espectro da oxitetraciclina pura apresenta uma banda muito intensa do grupo C=O na faixa de 1640 a 1700 cm^{-1} (DONALD, 2008). Neste trabalho a atribuição dessa banda de absorção foi identificada na faixa de 1579 a 1732 cm^{-1} . Uma banda de absorção centrada na região do pico em 746 cm^{-1} foi observada e corresponde aos anéis aromáticos ortodissubstituídos da oxitetraciclina.

O espectro da oxitetraciclina e do leite puro são similares, diferem apenas em intensidade do sinal, na região entre 2880 cm^{-1} e 2990 cm^{-1} onde existem duas bandas de absorção não observadas no espectro do leite puro.

5.4 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA RAMAN

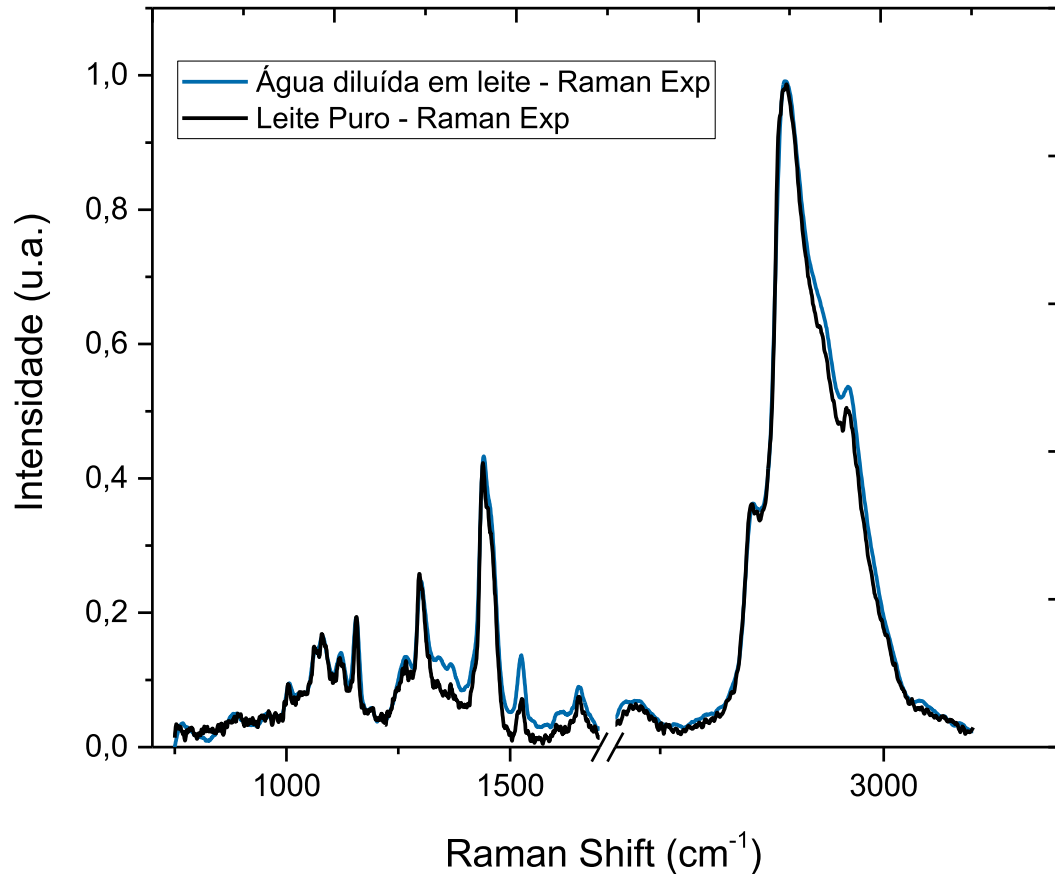
Nesta seção serão abordados os resultados referentes às análises realizadas por Espectroscopia Raman. Foram analisados os espectros experimentais para benzilpenicilina veterinária, benzilpenicilina humana, ampicilina e oxitetraciclina; e os espectros computacionais para benzilpenicilina e ampicilina.

Adicionalmente analisamos uma alíquota de leite puro (sem contaminação), e amostras de leite puro adicionadas de água, essas amostras compõem o grupo de controle antes da contaminação por antibiótico realizada no laboratório.

5.4.1 Espectro Raman leite e leite diluído em água

A Figura 14 apresenta os espectros experimentais Raman referentes ao leite cru (sem contaminação) e leite cru adicionado de 1 μL água pura em 250 mL de leite.

Figura 14 Espectro Raman de amostras de leite puro e leite diluído com água



Fonte: O Autor

No espectro Raman para o leite cru sem adulteração as bandas de absorção que correspondem ao estiramento simétrico C-H, estiramento do grupo carbonila C=O, o dobramento CH₂ e CH₃, CH₂ em fase de torção e o estiramento C-C são bastante conhecidos e ocorrem respectivamente entre 2.900-2.880, 1.747-1.740, 1.470-1.340, 1.305-1.295 e 1.132-885 cm⁻¹ (STEFANOV, 2010). A Atribuição para essas bandas de absorção são as seguintes: o dobramento CH₂ e CH₃ ocorre em 1.345-1.482 cm⁻¹, CH₂ em fase de torção 1.291-1.308 cm⁻¹ e o estiramento entre C-C 980-1.025 cm⁻¹.

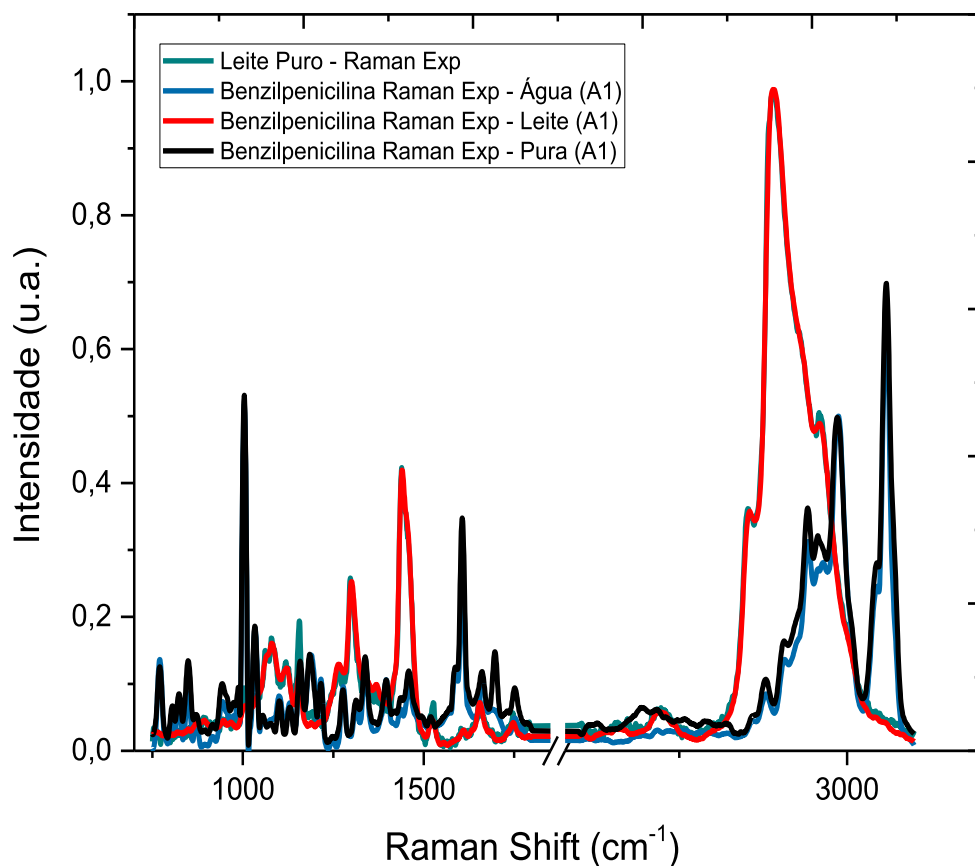
Na região abaixo de 900 cm⁻¹ existe pouca informação na literatura e atribuição para esses picos corresponde a uma vibração da cadeia C-C-C. Na região entre 2.650-2800 cm⁻¹ é atribuída em compostos orgânicos a vibração da ramificação metila (LAWSON, 1995).

O espectro do leite adulterado com água apresentou ligeiro aumento de intensidade nas bandas de absorção. A localização e formato dos picos permaneceu inalterada em comparação ao espectro experimental do leite sem adição de água.

5.4.2 Espectro experimental RAMAN benzilpenicilina

O espectro Raman da Benzilpenicilina foi coletado para duas versões do antibiótico, a primeira é a versão veterinária e a segunda é a versão disponível para consumo humano. A Figura 15 apresenta os espectros experimentais Raman da Benzilpenicilina A1 (veterinária) pura, Benzilpenicilina diluída em leite (simulação de contaminação), Benzilpenicilina diluída em água (adulterada) e Leite puro (sem antibiótico).

Figura 15 Espectro Raman de amostras de leite puro, Benzilpenicilina pura, Benzilpenicilina com água e Benzilpenicilina com leite.



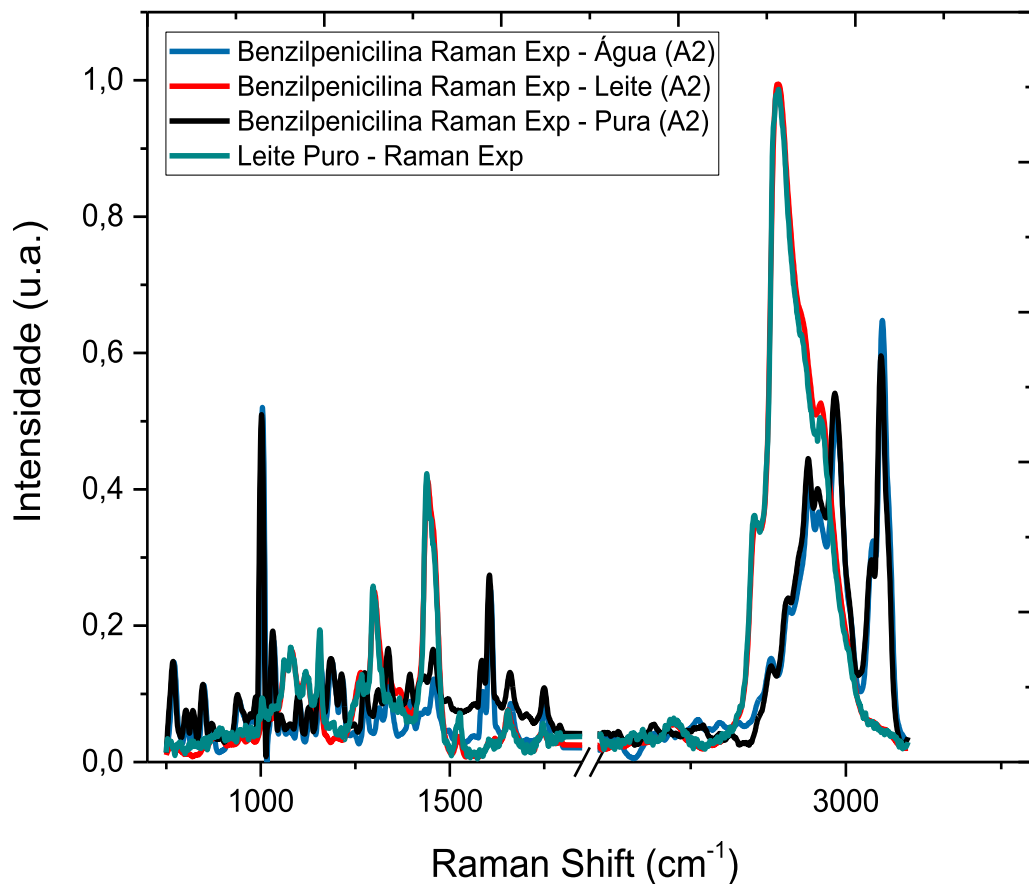
Fonte: O Autor

A mistura de Benzilpenicilina A1 (veterinária) e leite foi realizada na concentração de 4 μ g de antibiótico por litro de leite seguindo os LMR adotados pela Legislação Brasileira. O espectro Raman da Benzilpenicilina A1 apresentou intensidades semelhantes em comparação ao espectro da Benzilpenicilina A1 diluída em água. Observa-se o estiramento NH do grupo amida em 3.576 cm^{-1} , o estiramento C-C do anel aromático ocorreu na banda de absorção centrada no pico em 1.444 e 1.557 cm^{-1} o estiramento C-O do anel β -Lactâmico ocorreu na banda de absorção centrada em 1.762 cm^{-1} . O estiramento C-O do grupo carboxila ocorreu em 1.649 cm^{-1} . O estiramento CH₃ ocorreu com uma banda de absorção centrada em 2.920 cm^{-1} .

O espectro Raman da Benzilpenicilina diluída em leite apresentou grande semelhança em relação ao espectro da benzilpenicilina diluída em água, algumas bandas de absorção entre 750 e 1.250 cm^{-1} foram atenuadas. Durante a análise estatística pretende-se determinar se as vibrações do anel β -Lactâmico podem ser identificadas no espectro experimental da Benzilpenicilina, pois essas bandas de absorção podem ser indicativo da presença de antibióticos da classe dos β -Lactâmicos.

A Figura 16 apresenta os espectros experimentais Raman para a Benzilpenicilina A2 (uso humano) pura, Benzilpenicilina diluída em leite (simulação de contaminação), Benzilpenicilina diluída em água (adulterada) e Leite puro (sem antibiótico).

Figura 16 Espectros experimentais Raman para a Benzilpenicilina A2 (uso humano) pura, Benzilpenicilina diluída em leite (simulação de contaminação), Benzilpenicilina diluída em água (adulterada) e Leite puro (sem antibiótico).



Fonte: O Autor

A mistura de Benzilpenicilina A2 (uso humano) e Leite foi realizada na concentração de 4 μ g de antibiótico por litro de leite seguindo os LMR adotados pela Legislação Brasileira. O espectro da Benzilpenicilina A2 pura apresenta uma banda de absorção com pico em 1762 cm^{-1} que corresponde ao estiramento da ligação C=O do anel betalactâmico comum a todo o grupo dos antibióticos β -lactâmicos. Os espectros da Benzilpenicilina pura apresentaram intensidades de sinal Raman semelhantes quando comparados com o espectro da Benzilpenicilina diluída em água.

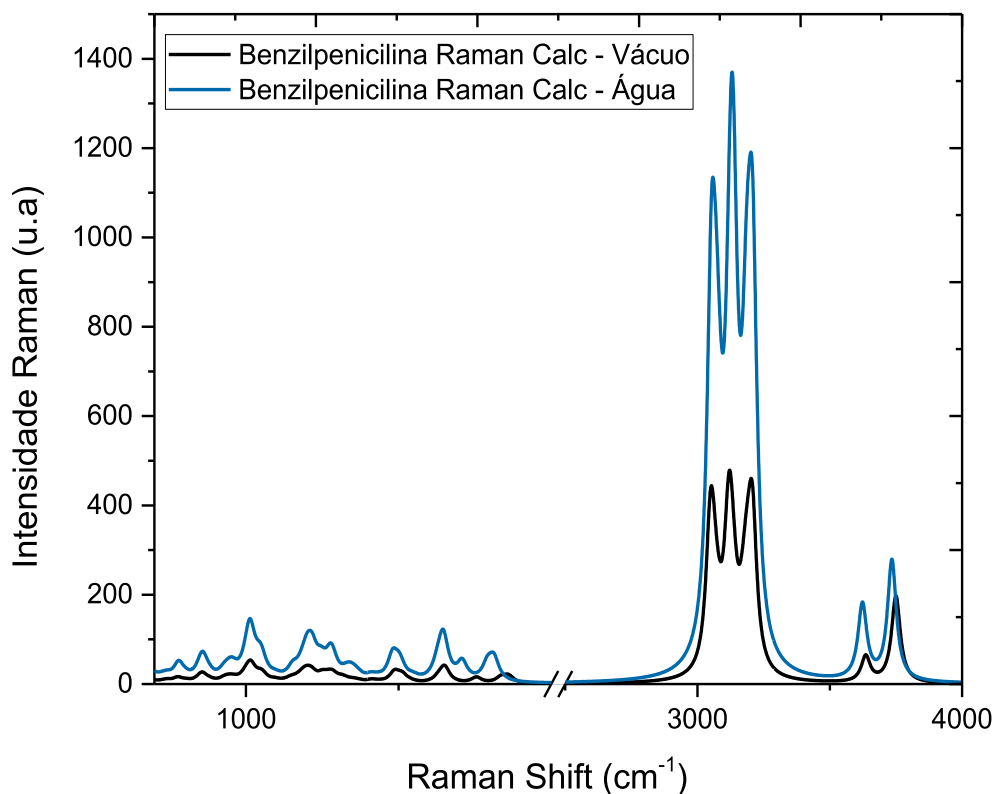
A Benzilpenicilina A2 diluída em leite apresentou aumento de intensidade na banda de

absorção entre 2.823 e 3.146 cm^{-1} . Esse aumento de intensidade é atribuído a presença do leite que possui uma forte banda de absorção nesta região.

5.4.3 Espectro teórico Raman benzilpenicilina

O espectro Raman da benzilpenicilina calculado por simulação computacional foi obtido para a Benzilpenicilina no vácuo (fase gasosa) e para a Benzilpenicilina diluída em água. A Figura 17 apresenta os espectros teóricos Raman para a Benzilpenicilina na fase gasosa e para a Benzilpenicilina diluída em água.

Figura 17 Espectro Raman calculado da benzilpenicilina na fase gasosa e na água.



Fonte: O Autor

No espectro teórico da Benzilpenicilina simulada com meio aquoso observa-se o aumento da intensidade do sinal Raman devido a interação com a água, o que provoca ligeiro alargamento das bandas de absorção, entretanto a localização e largura das bandas de absorção manteve-se nos mesmo números de onda em relação a fase gasosa.

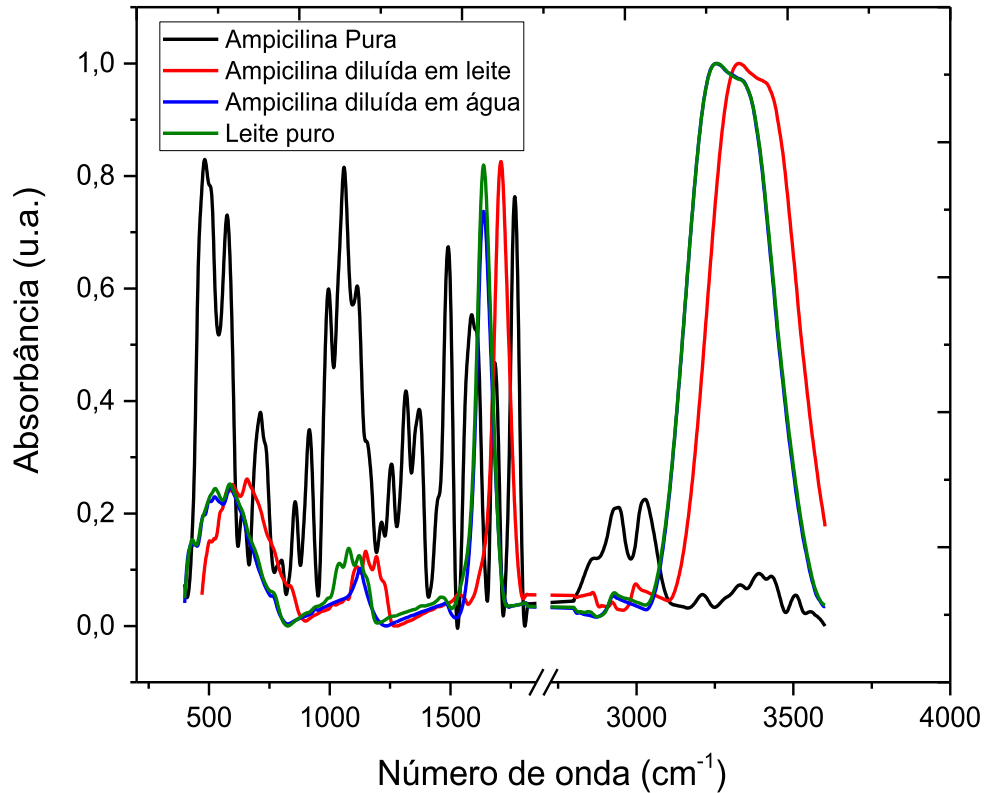
O estiramento N-H do grupo amida ocorreu em 3.636 cm^{-1} , o estiramento C-H do anel β -Lactâmico foi calculado em 3.117 cm^{-1} , o estiramento C=O do anel β -Lactâmico 1.860 cm^{-1} , o estiramento C-N do anel β -Lactâmico foi calculado em 1.094 cm^{-1} . O anel aromático da Benzilpenicilina apresentou vibrações características em 856 cm^{-1} correspondente ao estiramento C-H; 1030 cm^{-1} correspondente a deformação C-H₂, 1.530 e 1.651 cm^{-1} correspondente ao estiramento C-C, 3191 cm^{-1} correspondente ao estiramento simétrico C-H. Outros estiramentos, torções e deformações assimétricas estão listadas na Tabela Anexa 1 deste trabalho.

Quando comparado ao espectro experimental a benzilpenicilina teórica obtida via simulação computacional apresentou-se de maneira geral com o mesmo formato do espectro, bandas de absorção próximas e com larguras semelhantes.

5.4.4 Espectro experimental RAMAN ampicilina

O espectro Raman da Ampicilina foi coletado para a Ampicilina pura, Ampicilina diluída em água e Ampicilina diluída em leite (simulação de contaminação). A Figura 18 mostra espectros experimentais obtidos para a Ampicilina.

Figura 18 Espectros Raman experimentais de ampicilina pura, de ampicilina diluída em leite, de ampicilina diluída em água e de leite puro.



Fonte: O Autor

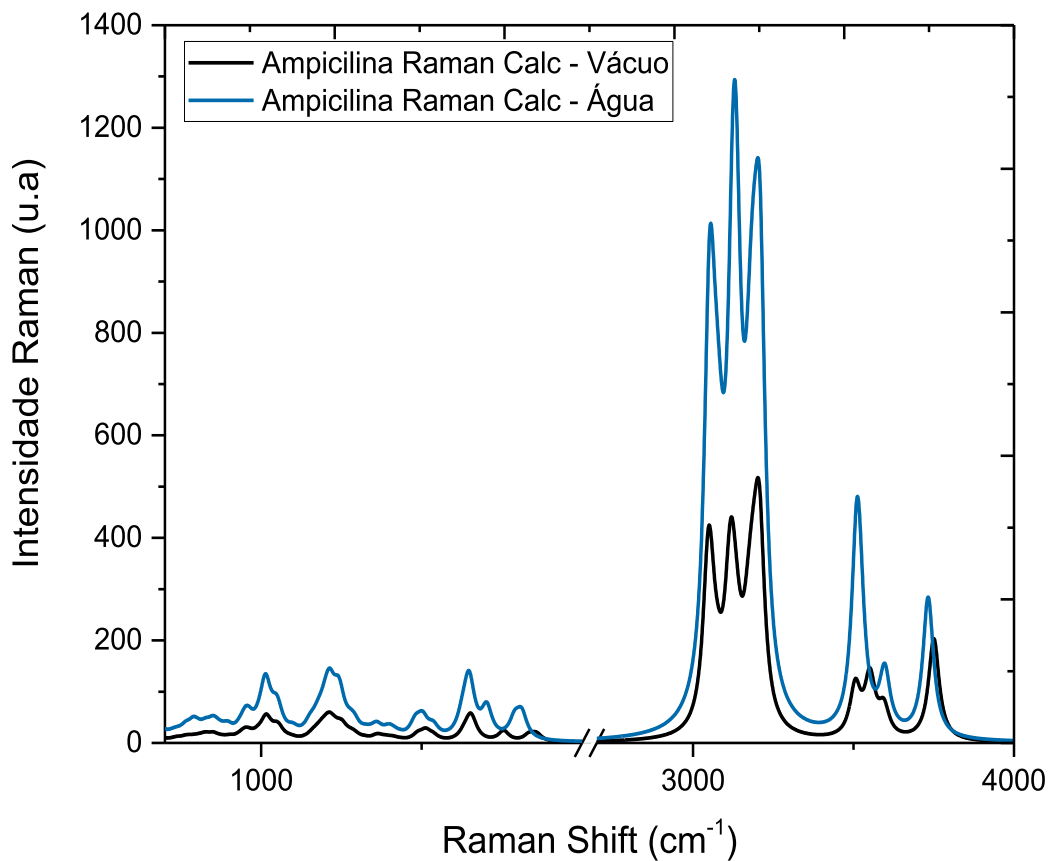
No espectro experimental da Ampicilina Pura observamos uma banda de absorção relativa ao estiramento NH do grupo amida centrada no pico de 3505 cm^{-1} . O estiramento C=O do anel β -Lactâmico foi observado ocorreu em 1.768 cm^{-1} . O estiramento C-C do anel aromático da Ampicilina foi observado em 1.491 e 1.404 cm^{-1} . O banda de absorção relativa ao estiramento NH_2 característico da Ampicilina foi observado centrado no pico em 1.571 cm^{-1} .

O espectro da Ampicilina diluída em leite apresentou picos e intensidades semelhantes quando comparado ao espectro do Leite Puro. Observa-se que na região entre 500 e 1.500 cm^{-1} houve a atenuação de uma série de bandas de absorção quando comparamos os espectros da Ampicilina Pura e da Ampicilina diluída em Leite.

5.4.5 Espectro teórico Raman ampilina

O espectro Raman da Ampicilina calculado por simulação computacional foi obtido para duas situações Ampicilina no vácuo (fase gasosa) e para Ampicilina diluída em água. A Figura 19 apresenta os espectros teóricos Raman para a Ampicilina na fase gasosa e para a Ampicilina diluída em água.

Figura 19 Espectro Raman calculado de ampilina em fase gasosa e em vácuo.



Fonte: **O Autor**

O espectro da Ampicilina simulada com meio aquoso apresentou aumento da intensidade de sinal Raman devido a interação com a água entretanto a localização e largura das bandas de absorção manteve-se nos mesmo números de onda em relação a fase gasosa. O anel aromático apresentou vibrações características em 3.2017 cm^{-1} correspondente ao

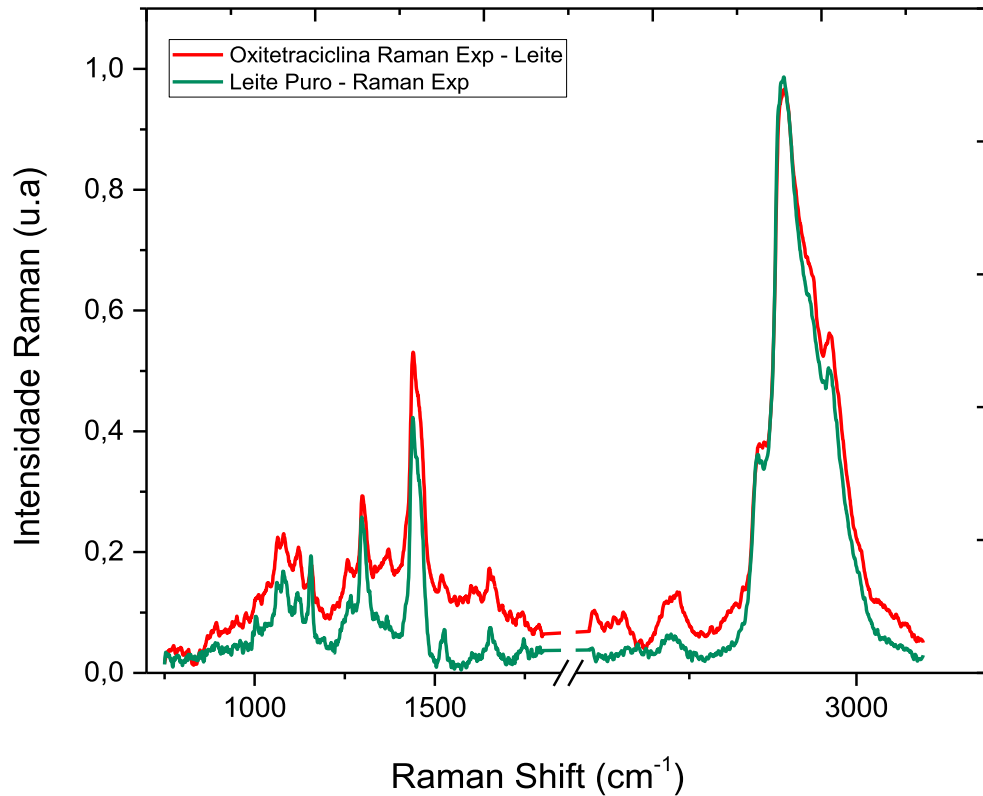
estiramento C-H, 3.195 cm^{-1} correspondente ao estiramento simétrico C-H, 1.653 , 1.532 e 1.183 cm^{-1} correspondente ao estiramento C-C, 767 e 715 cm^{-1} correspondente a deformação C-H. O anel β -Lactâmico apresentou vibrações características em 905 cm^{-1} correspondente a deformação NH_2 , 1.010 cm^{-1} correspondente ao estiramento C-N, 1.271 cm^{-1} correspondete a uma deformação C-H, 1858 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O. Outros estiramentos, torções e deformações assimétricas estão listadas na Tabela Anexa 1 no Anexo I deste trabalho.

Quando comparado ao espectro experimental a ampicilina teórica obtida via simulação computacional apresentou-se semelhante em linhas gerais. Na região entre 500 e 1000 cm^{-1} algumas bandas de absorção obtidas no espectro experimental foram maiores em intensidade em comparação ao espectro obtido via simulação computacional, essa mesma atenuação foi observada nos espectros de Ampicilina diluída em água e em leite.

5.4.6 Espectro experimental Raman oxitetraciclina

O espectro Raman da Oxitetraciclina foi coletado para a oxitetraciclina pura e oxitetraciclina diluída em água. A Figura 20 mostra os espectros experimentais obtidos para a Oxitetraciclina.

Figura 20 Espectros Raman experimentais de oxitetraciclina em leite e leite puro.



Fonte: O Autor

O espectro da Oxitetraciclina pura apresenta vibração característica dos anéis ligados ao radical CONH_2 na região com pico centrado em 1.317 cm^{-1} correspondente ao estiramento C-C dos anéis e estiramento C_6O , 1624 cm^{-1} correspondente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ amida e 1564 cm^{-1} e ao estiramento C_5O (FILGIEIRAS, 2013). A atribuição para essas vibrações está em 1329 cm^{-1} , 1.640 cm^{-1} e 1.541 cm^{-1} respectivamente. O espectro da Oxitetraciclina diluída em leite e do leite puro são similares, diferem apenas em intensidade do sinal e principalmente na região entre 2.120 e 2.200 cm^{-1} .

5.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

5.4.1 Estatística Multivariada resultados da espectroscopia Raman

Os resíduos de antibióticos presentes nas amostras de leite encontravam-se em baixas concentrações, 4 µg/L seguindo os LMR. Sendo o leite uma matriz complexa é numerosa a quantidade de variáveis fornecidas pelos espectros medidos. A atribuição de cada uma das bandas de absorção nos espectros experimentais onde ocorreu mistura de leite e antibiótico não poderiam ser feitas apenas visualmente. Para atribuir as bandas de vibração para o leite e para o antibiótico, diferenciando-as e permitindo a identificação do antibiótico na mistura foi necessário o tratamento estatístico dos dados através do uso da técnica PCA. Para interpretar os pontos, os dados obtidos foram separados em quadrantes em sentido horário, como apresentado na Figura 21.

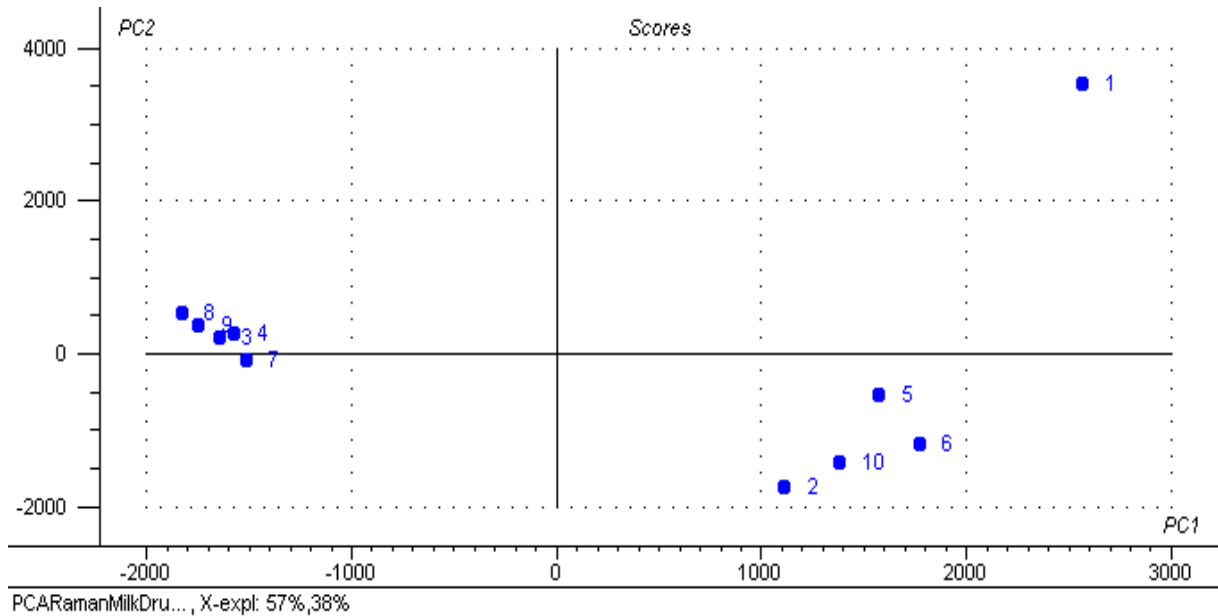
Figura 21 Divisão em quadrantes da técnica PCA.

4º Quadrante	1º Quadrante
3º Quadrante	2º Quadrante

Fonte: O Autor

Para identificar cada amostra no PCA, foram utilizados as seguintes legendas: Leite puro (3), Água diluída em leite (4), Penicilina veterinária pura – A1 (6), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Penicilina veterinária diluída em água (10), Penicilina humana pura – A2 (5), Penicilina humana diluída em leite (7), Penicilina humana diluída em água (2), Ampicilina Pura (1), Ampicilina diluída em leite (9), Ampicilina diluída em água (11). As Figuras 22 a 27 representam os gráficos dos scores das amostras de leite puro, medicamentos adicionados ao leite, estes diluídos em água e drogas puras, estes analisados no equipamento Raman e FT-MIR.

Figura 228 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para valores médios das amostras via espectroscopia Raman: Leite puro (3), Penicilina veterinária pura (6), Penicilina humana pura (5), Ampicilina pura (1), Penicilina veterinária diluída em água (10) Penicilina humana diluída em água (2), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Ampicilina diluída em leite (9), Leite diluída em água (4), Penicilina humana diluída em leite (7).

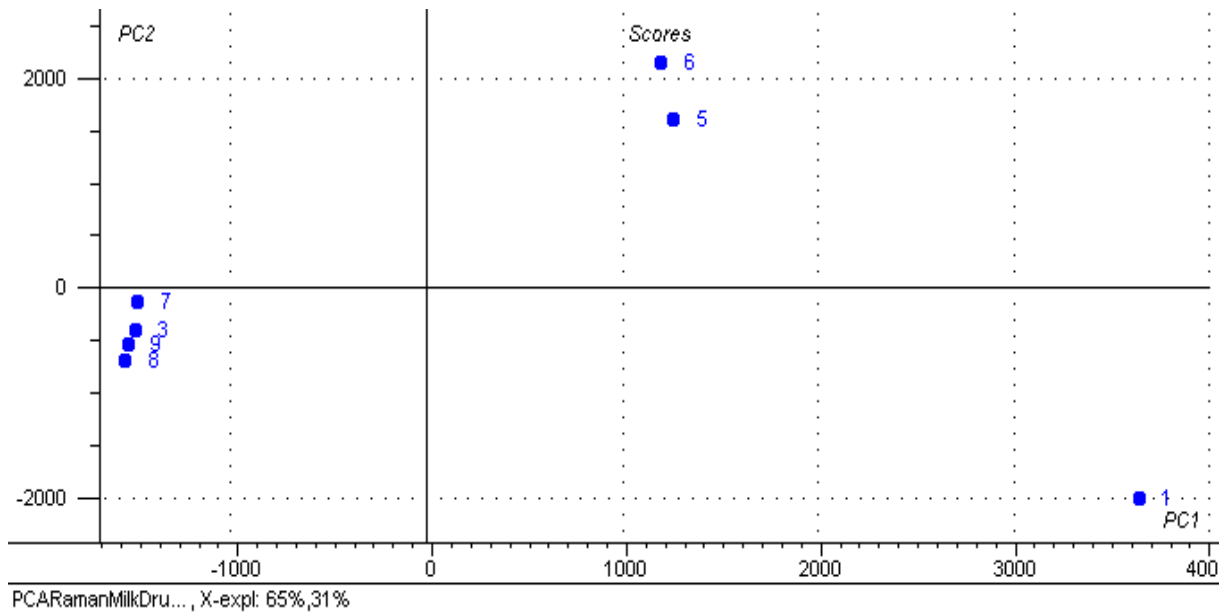


Fonte: O Autor

Verifica-se a presença de dois aglomerados, o primeiro está no quarto quadrante, PC1 próximo à variável -1500. As amostras foram separadas como drogas diluídas em leite, leite puro e leite diluído em água. Note que neste cluster encontram-se todas as amostras onde a matriz principal era o leite, enquanto o segundo cluster no segundo quadrante, PC1 próximo da variável 1750, são as amostras de drogas puras e diluídas em água. As amostras foram separadas em dois grupos independentemente de estarem em sua matriz sólida ou líquida. Perto da variável 2500 em PC1 que está no primeiro quadrante, identificamos Ampicilina pura, podendo ser um "outlier", pois é a única matriz em pó sem que estivesse previamente diluída.

O PC1 separou as matérias primas em maior concentração (leite e água), mas não conseguiu separar a presença ou não de antibiótico, pois nos dois grupos temos presença e ausência de antibiótico.

Figura 23 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia Raman: Leite Puro (3), Penicilina veterinária pura (6), Penicilina humana pura (5), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Penicilina humana diluída em leite (7), Ampicilina (1), Ampicilina diluída em leite (9).



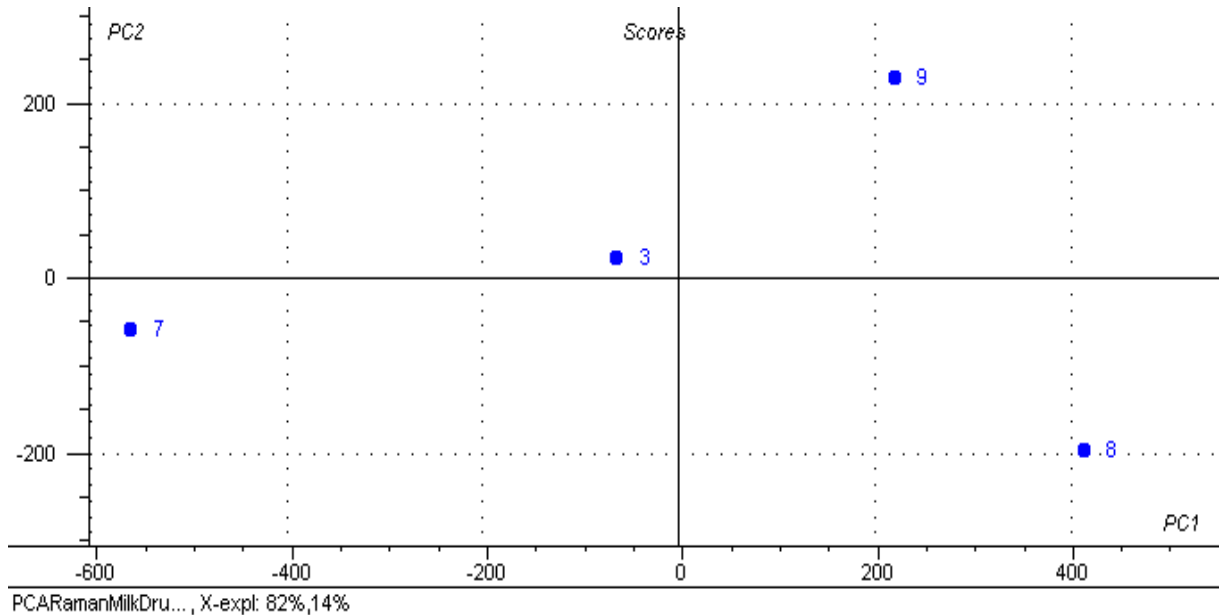
Fonte: O Autor

Na PC1, a penicilina humana pura e a penicilina veterinária pura estão localizadas no primeiro quadrante entre as variáveis 1.000 e 2.000 do PC1. Esse comportamento analisado nessa região demonstra a proximidade entre as duas drogas, indicando a similaridade na composição química. Leite genuíno (3) e leite com medicamentos formaram um cluster no terceiro quadrante, entre as variáveis -1.000 e -2.000 do PC1, isso mostra que eles têm similaridade.

A PC1 conseguiu separar os compostos puros (penicilina e ampicilina pura) no lado direito e leite puro no lado esquerdo, mas não conseguiu separar o leite puro dos contaminados.

Analisando PC2, encontramos no primeiro quadrante, perto de 2000, as penicilinas puras, continuando a análise no segundo quadrante, próximo a -2000, temos a ampicilina. Observamos que estes medicamentos veterinários apresentam semelhanças em sua composição, mas são opostos no gráfico, isso se deve ao fato de sua forma farmacêutica, onde a ampicilina possui o seu granulado mais espesso diferente da penicilina que tem em seu pó um granulado mais fino. Foi encontrado próximo ao eixo zero do PC2 as amostras de antibiótico de matriz líquida e distanciamento da origem encontramos os antibióticos da matriz em pó.

Figura 24 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia Raman: Leite Puro (3), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Penicilina humana diluída em leite (7), Ampicilina diluída em leite (9).



Fonte: O Autor

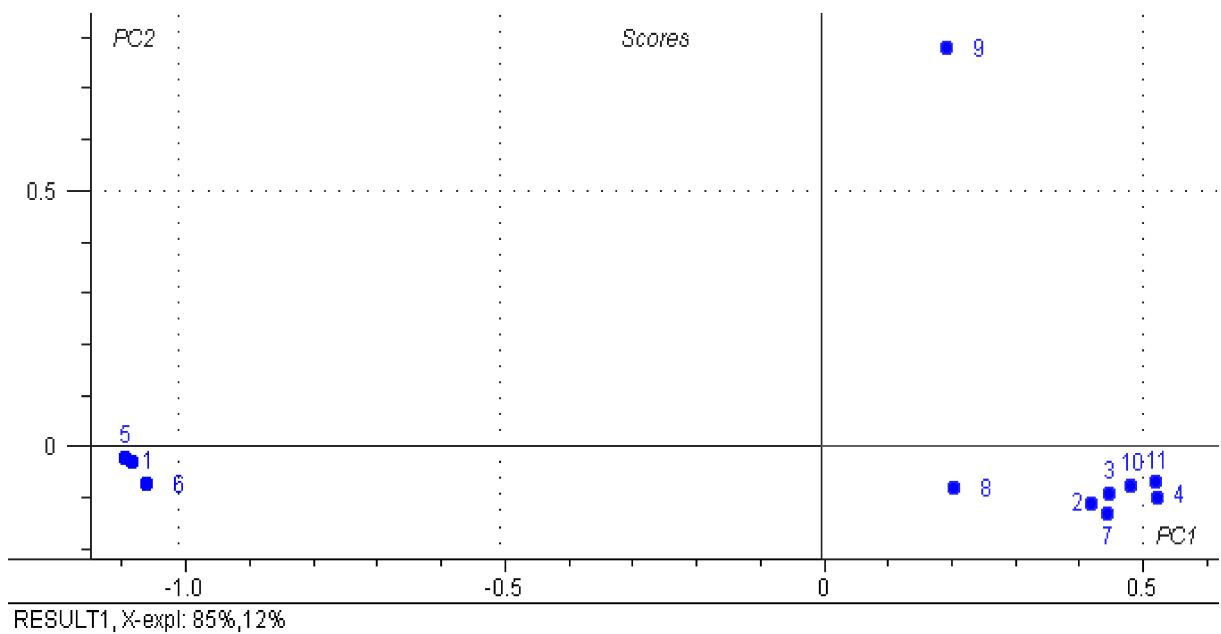
Na PC1 foi discriminada a contaminação das amostras de leite com medicamentos líquidos e em pó. Onde Penicilina veterinária diluída no leite (8) e a ampicilina diluída no leite (9) que foram contaminados com medicamentos em sua forma pó, estão distantes do leite genuíno (3) em sua forma líquida. Enquanto o leite puro (3) e Penicilina humana diluída em leite (7), que são amostras em sua forma líquida, estavam do lado oposto.

A PC2 conseguiu separar e diferenciar as penicilinas e o leite não apresentou grande influência no posicionamento das amostras.

A Figura 25 representa o gráfico dos scores das amostras de leite puro, medicamentos adicionados ao leite, estes diluídos em água e drogas puras, estes analisados no equipamento FT- MIR.

5.4.1 Estatística Multivariada resultados da espectroscopia FT-MIR

Figura 25 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia de Infravermelho: Leite puro (3), Penicilina veterinária pura (6), Penicilina humana pura (5), Ampicilina pura (1), Penicilina veterinária diluída em água (10) Penicilina humana diluída em água (2), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Ampicilina diluída em leite (9), Leite diluída em água (4), Penicilina humana diluída em leite (7), Ampicilina diluída em água (11).

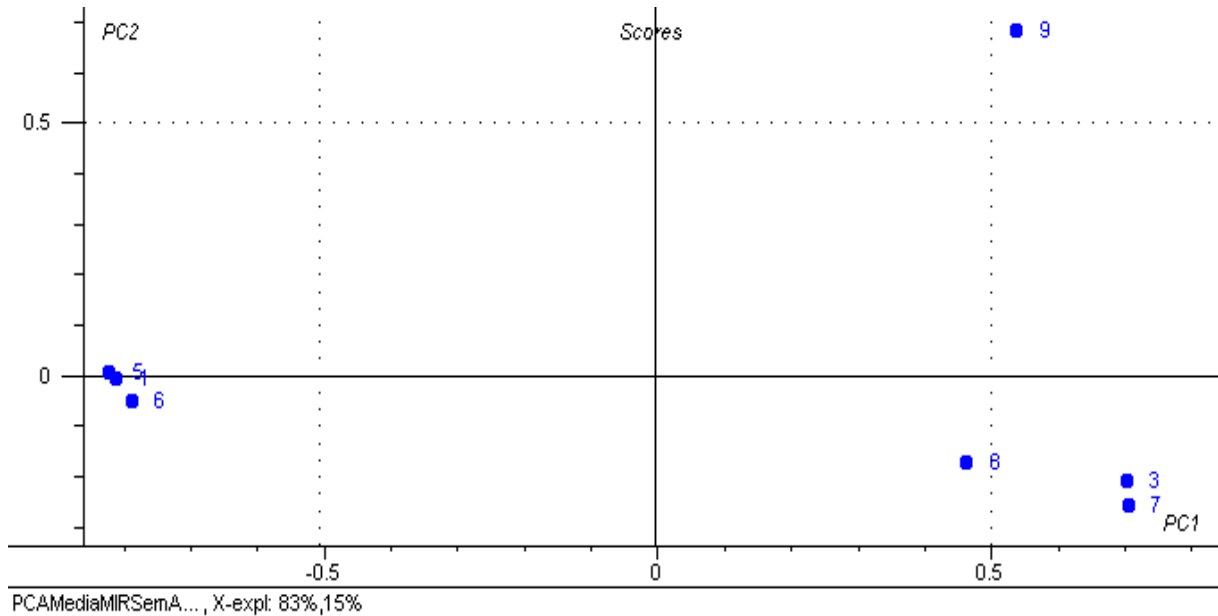


Fonte: O Autor

Na Figura 25 observa-se a formação de dois clusters, no segundo e terceiro quadrante. No segundo quadrante o cluster localizado referece às amostras de fármacos diluídos em leite e água, isto está relacionado ao fato de que o leite é composto por cerca de 90% de água. No primeiro quadrante na parte superior a amostra de leite contaminado com ampicilina afastou-se indicando possíveis outliers, mas esta amostra é ao longo do mesmo PC1 apresentando similaridade de acordo com este eixo. Acredita-se que isto ocorreu porque a ampicilina utilizada está na forma de pó tendo grânulos mais espessos. No segundo cluster localizado no terceiro quadrante são representadas as amostras de drogas veterinárias puras.

A Figura 26 representa o gráfico score das amostras de leite puro, medicamentos adicionados ao leite e drogas puras, com valores médios analisados no equipamento FT-MIR.

Figura 26 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia de Infravermelho: Leite Puro (3), Penicilina veterinária pura (6), Penicilina humana pura (5), Ampicilina Pura (1), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Penicilina humana diluída em Leite (7), Ampicilina diluída em Leite (9).

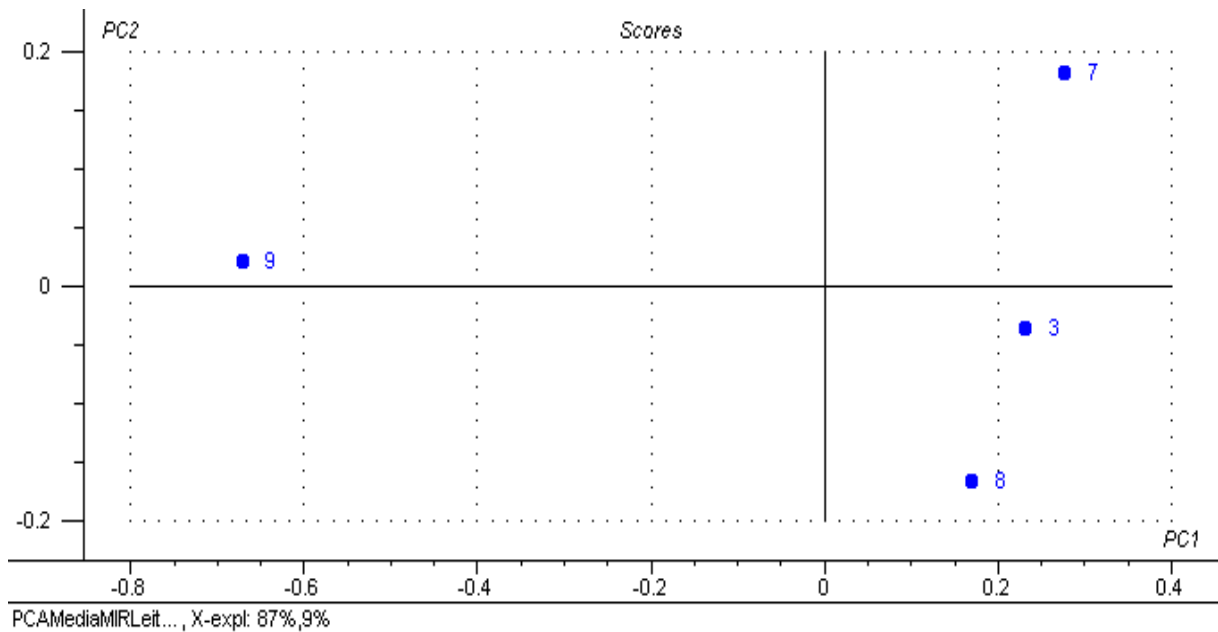


Fonte: O Autor

Observou-se na plotagem dos escores referentes a Figura 26, a formação de dois clusters, o PCA discriminou as amostras de leite contaminado por medicamentos das amostras de fármaco puro. No primeiro grupo localizado no segundo quadrante, o PCA discriminou amostras de leite puro (genuíno) de amostras de leite contaminadas com drogas dentro do LMR. Mesmo em baixas concentrações de drogas no leite, a discriminação neste cluster é clara. No segundo cluster no terceiro quadrante são amostras de droga pura. A amostra pura de ampicilina diluída no leite afastou-se das outras por apresentar seu granulado mais espesso.

A Figura 27 representa o gráfico score das amostras de leite genuíno e leite contaminado com os medicamentos, estes analisados no equipamento FT-MIR.

Figura 9 Gráfico de score da análise estatística (PCA), para os valores médios das amostras via espectroscopia de Infravermelho: Leite Puro (3), Penicilina veterinária diluída em leite (8), Penicilina humana diluída em leite (7), Ampicilina diluída em leite (9).



Fonte: O Autor

Observa-se no gráfico na parte referente a PC1, as amostras de penicilina diluídas ao leite (26 e 27) encontrando-se próximas a região de 0.2, estas amostras apresentam um grau de semelhanças. Devido ao fato destas estarem localizadas a distâncias bem próximas à amostra de leite puro na PC1, uma vez que possuem a mesma e menor concentração de antibióticos. A amostra de Ampicilina está a uma distância maior da amostra de leite puro neste mesmo componente principal (PC2), no entanto, esta amostra de ampicilina no leite não se parece com as outras amostras, de acordo com sua concentração, deve estar mais próximo da amostra de leite puro, esse comportamento pode indicar que o antibiótico não tenha sido diluído integralmente no leite, apesar de a homogeneização ter sido realizada no aparelho de ultrassom.

6 CONCLUSÕES

Através dos resultados encontrados nas análises dos espectros dos medicamentos veterinários: Penicilina, Ampicilina e Oxitetraciclina diluídas em água e acrescidas no leite nas mesmas concentrações definidas pelos LMR, foi possível verificar a presença de resíduos desses antibióticos. Para definir a presença desses antibióticos no leite foi necessário o tratamento estatístico dos espectros, uma vez que a análise visual não apresentou de forma clara as bandas de absorção das moléculas do antibiótico. Devemos salientar que o leite é uma matriz complexa e as concentrações utilizadas são da ordem de 1 ppm.

As técnicas de espectroscopia utilizadas demonstraram-se rápidas e precisas uma vez que a partir da coletânea de identidades espectroscópicas dessas moléculas, das ferramentas quimiométricas e da análise estatística foi possível a identificação de resíduos de antibióticos presentes no leite. A abordagem computacional utilizada demonstrou ser uma poderosa ferramenta para a caracterização das moléculas dos antibióticos estudados, destaca-se que a partir dos modos vibracionais teóricos foi possível destacar tons das bandas de absorção.

Verificamos através de simulações computacionais que podemos calcular espectros Raman e de infravermelho e comparar com espectros experimentais para identificar os grupamentos atômicos responsáveis pelas vibrações moleculares de uma dada molécula.

Verificamos também que através da utilização de espectros por espectroscopia Raman ou Infravermelho Médio por Transformada de Fourier (FT-MIR), podemos separar a contribuição dos diferentes tipos de antibióticos. Estes dados para serem interpretados devem ser acompanhados por uma estatística multivariada como, por exemplo, PCA. Nossos resultados forneceram fortes indicativos que esta metodologia possa ser utilizada futuramente na identificação do tipo e na quantificação do antibiótico que possa estar dissolvido em leite bovino.

Os resultados encontrados neste trabalho, nos encorajam a ampliar os bancos de dados sobre assinaturas espectroscópicas de antibióticos mais comuns na veterinária do gado leiteiro. A utilização de diferentes tipos de leite na simulação de contaminação pode ajudar o entendimento da influência desses na mistura. O estudo computacional, que considere os espectros vibracionais de derivados de penicilina, pode contribuir para o entendimento da ação

metabólica do animal leiteiro quando exposto ao antibiótico. Como desenvolvimento futuro pode-se utilizar as ferramentas computacionais para determinar os sobretons das bandas de absorção de misturas de mais de um tipo de antibiótico.

Espera-se que esta pesquisa contribua para a validação de um novo método de detecção, através dos resultados obtidos por espectroscopia Raman e Infravermelho Médio de Transformada de Fourier (FT-MIR) juntamente com Análise de Componentes Principais (PCA), os quais, através da pesquisa, demonstram que esta técnica é capaz de fornecer resultados rápidos e eficientes para a detecção de resíduos de antibióticos em leite.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALECU I. M.; ZHENG J.; ZHAO Y.; TRUHLAR D. G. **From electronic model chemistries**, *Journal of Chemical Theory and Computation* 6 (9) (2010) 2872–2887. doi:10.1021/ct100326h.1

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. **Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics**. *Nature Reviews Microbiology* volume 12, pages 465–478, 2014. doi:10.1038/nrmicro3270.

BASTOS, L. P. F.; **Avaliação da capacidade de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite por um método de inibição microbiana**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, na área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Escola Veterinária, UFMG.

BECKE A. D., **Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior**, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098.

BECATTINI, S.; TAUR, Y.; PAMER, E. G. **Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease**. Vol. 22, issue 6, pages 458-478 junho de 2016.

BEYENE, T. **Veterinary drug residues in food-animal products: its risks factors and potential effects on public health**. *Journal of Veterinary Science and Technology*, v. 7, n. 1, p. 1-7, e285, 2016. doi: 10.4172/2157-7579.1000285.

BLONDIAUX, N.; MOUNE, M.; DESROSES, M.; ROSANGELA FRITA, R.; FLIPO, M.; MATHYS, V.; SOETAERT, K.; et al. **Reversion of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by spiroisoxazoline SMART-420**. *Science* 17 Mar 2017: Vol. 355, Issue 6330, pp. 1206-1211 DOI: 10.1126/ science.aag1006

BOOKSTAVER, P. BRANDON AND BLAND, CHRISTOPHER M. AND GRIFFIN, BROOKE AND STOVER, KAYLA R. AND EILAND, LEA S. AND MCLAUGHLIN, MILENA. **A Review of Antibiotic Use in Pregnancy**. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. Vol, Novembro de 2015 Pages 1052–1062, issn 1875-9114.

BOURIN, M.; CLÉNET, F. **Regulation of the risk of exposure to antibiotics in milk.** Pharmaceutical Regulatory Affairs, v. 3, n. 2, p. 1-2, e128, 2014.

BRASIL. **Resolução RDC N° 53, de 2 de outubro De 2012.** Ministério Da Saúde, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. DOU de 03/10/2012 (n° 192, Seção 1, pág. 47), 2012.

_____. **Instrução Normativa n° 62, de 29 de dezembro de 2011.** O Ministro de Estado, Interino, Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DOU de 29/12/2011.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G.. **Composição do leite.** Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em 23 jul. 2018.

_____, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G.. **Índice crioscópico.** Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_185_21720039246.html>. Acesso em 23 jul. 2018.

_____, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G.: **Redutase.** Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_192_21720039246.html>. Acesso em 23 jul. 2018.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of Near-Infrared Analysis.** New York: Marcel Dekker, 2001.

CARRARA, E. ; GAYA, LEILA DE GENOVA ; MOURÃO, G. B. **Fatty acid profile in bovine milk: Its role in human health and modification by selection.** Archivos de zootecnia, Vol.66(253), pp.151-158, 2017.

CASTRO MONTOYA J.M., GARCÍA R.A., RAMOS R.A., FLORES J.M., ALAS E.A., CORREA E.E. **Dairy cows fed on tropical legume forages: effects on milk yield, nutrients use efficiency and profitability.** Tropical Animal Health and Production, p. 1-7, 2018.

CHANG Q, WANG W, REGEV-YOCHAY G, LIPSITCH M, HANAGE WP. **Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?** *Evolutionary Applications*, 8: 240-247, 2014

CHEN Y., LIA X., YANGA M., YANGA L., HANB X., JIANGA X.,*, ZHAOB B. **High sensitive detection of penicillin G residues in milk by surfaceenhanced Raman scattering.** *Talanta* 167, 2017, págs. 236–241.

COATES, J. 2000. **Interpretation of infrared spectra, a practical approach.** Pages 10815–10837 in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R. A. Meyers, ed. John Wiley & Sons, New York, NY.

CORREA E.E., AGUILAR J.M., ALAS N.P., ALAS E.A., FLORES J.M., BRODERICK G.A. **Effects of dietary cowpea (*Vigna sinensis*) hay and protein level on milk yield, milk composition, N efficiency and profitability of dairy cows.** *Animal Feed Science and Technology* v. 226, 2017.

DIK, V.K., VAN OIJEN, M.G.H., SMEETS, H.M. et al. **Frequent Use of Antibiotics Is Associated with Colorectal Cancer Risk: Results of a Nested Case–Control Study** *Dig Dis. Sci*, ISSN 163-2116, 2016.

DONALD L. PAVIA, GARY M. LAMPMAN, GEORGE S. KRIZ, JAMES A. VYVYAN. **Introduction to Spectroscopy.** Edição 4, ilustrada. Editora Cengage Learning, 2008., Isbn 0495114782, 9780495114789

EMIL W. C., BENOIT I. **Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy**, Second Edition. CRC Press, 2014, ISBN 1420084143, 9781420084146.

FAO - Food And Agriculture Organization of the United Nations, **Milk Talk – The role of milk and dairy products in human nutrition**, 2015. Disponível em:

< <http://www.fao.org/zhc/detail-events/en/c/288359/>>. Acesso em: jan. 2018.

FILGUEIRAS, A. L. **Estudo in vitro do potencial antibacteriano de nanopartículas de prata, associadas à quitosana e antibióticos e das interações com a superfície metálica por espectroscopia Raman intensificada por superfície.** 2013. 115p. Dissertação de mestrado. Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

FOSTER, W.; BEECROFT, M. L. **Chemical Exposures and Human Fertility**. Infertility Awareness Association of Canada, 2014.

FOX P.F., GUINEE T.P., COGAN T.M., MCSWEENEY P.L.H. **Overview of Cheese Manufacture. In: Fundamentals of Cheese Science**. Springer, 2017, Boston, MA

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, JR., J. A.; VREVEN, T.; N. KUDIN, K.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ C.; POPLE, J. A.; [i] **Gaussian 03W**; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003[i].

GALVANI, J. W. C.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. **Commonly screened antibiotics in raw milk from dairy plants under State Inspection in Rio Grande do Sul, Brazil**. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 147-153, 2017.

GROOT MJ AND VAN'T HOOFT KE. **The Hidden Effects of Dairy Farming on Public and Environmental Health in the Netherlands, India, Ethiopia, and Uganda, Considering the Use of antibiotics and Other Agro-chemicals**. *Front. Public Health* 4:12. doi: 10.3389, 2016.

GUOZHEN, W. **Raman Spectroscopy: An Intensity Approach**. World Scientific, 2016, ISBN 9813143517, 9789813143517.

IBGE. IBGE divulga as estimativas populacionais dos municípios para 2017. Agência IBGE Notícias, 30 de Agosto de 2017. Disponível em:

<<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/16131-ibge-divulga-as-estimativas-populacionais-dos-municipios-para-2017>> . Acesso em: 01 de março de 2018.

JASON A TRUBIANO, KARIN A THURSKY, ANDREW J STEWARDSON, KAREN URBANCIC, LEON J WORTH, CHERYL JACKSON, WENDY STEVENSON, MICHAEL SUTHERLAND, MONICA A SLAVIN, M LINDSAY GRAYSON, ELIZABETH J PHILLIPS. **Impact of an Integrated Antibiotic Allergy Testing Program on Antimicrobial Stewardship: A Multicenter Evaluation**, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 65, Issue 1, 1 July 2017, Pages 166–174.

JAYALAKSHMI, K.; PARAMASIVAM, M.; SASIKALA, T.; TAMILAM, V.; SUMITHRA, A. **Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health**. Journal of Entomology and Zoology Studies 2017.

JOHNSON B.; CHEN W.; WONG M. W.; GONZALEZ C.; POPLE J. A. **Gaussian 03** Revision B.05, gaussian Inc. Pittsburg PA 2003.

TOYOTA K.; FUKUDA R.; HASEGAWA J.; ISHIDA M.; NAKAJIMA T.; HONDA Y.; LANDERS TF.; COHEN B.; WITTUM TE.; LARSON EL. **A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential**. Public Health Rep 127: 4-22, 2012.

KITAO O.; NAKAI H.; KLENE M.; KNOX J. E.; HRATCHIAN H. P.; CROSS J. B.; ADAMO C.; JARAMILLO J.; GOMPERS R.; STRATMANN R. E.; YAZYEV O.; PISKORZ P.; KOMAROMI I.; MARTIN R. L.; FOX D. J.; KEITH T.; LAHAM M. A. AL.; PENG C. Y.; NANAYAKKARA A.; CHALLACOMBE M.; GILL P. M. W.; PATZE S.; HUEBNER U.; LIEBOLD F. W.; CIALLA D.; POPP J. **SERS as an analytical tool in environmental science: The detection of sulfamethoxazole in the nanomolar range by applying a microfluidic cartridge setup**. Analytica Chimica Acta Volume 949, 1 January 2017, Pages 1-7

LAWSON, A. E. **Science Teaching and the Development of Thinking**. Belmont, CA: Watsworth Publishing Company. Scientific Research, (1995).

LARKIN, P. **Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation.** Elsevier, 2017, ISBN 0128042095, 9780128042090

LATMIRAL, L.; ARMATA, F.; GENONI, M. G.; AND PIKOVSKI, I.; KIM, M. S. **Probing anharmonicity of a quantum oscillator in an optomechanical cavity.** Phys. Rev. A, vol. 93, may 2016.

LEE C.; YANG W.; PARR R. G. **Development of the colle-salvetti correlation- energy formula into a functional of the electron density,** Phys. Rev. B 37 (1988) 785.

LEFÈVRE, T., AND M. SUBIRADE. 2000. **Interaction of β -lactoglobulin with phospholipids bilayers:** A molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. Int. J. Biol. Macromol. 28:59–67.

LIU, X.; STEELE, J. C.; MENG, X. **Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture:** A review Environmental Pollution, Vol.223, pp.161-169 2017.

LOPES, M. A.; REIS, E. M. B.; DEMEY, F. A.; MESQUITA, A. A.; FERRAZ ROCHA, A. G. F.; BENEDICTO, G. C. **Uso de ferramentas de gestão na atividade leiteira: um estudo de caso n sul de Minas Gerais.** Revista Científica de Produção Animal, v. 18, nº 1, 2016.

LUIZ L.C.; BELL V.J.; ROCHA R.A.; LEAL N.L.; ANJOS V.C.; **Detection of Veterinary Antimicrobial Residues in Milk through Near-Infrared Absorption Spectroscopy.** Hindawi Journal of Spectroscopy, Volume 2018, Article ID 5152832, 6 pages, <https://doi.org/10.1155/2018/5152832>

MALUF, R. S.; RIBEIRO, A. B. **Resíduos de Antibióticos em Leite.** SaBios: Revista de Saúde e Biologia. 7(1), 2012 p 30-44.

MAREZE J. ; MARIOTO L. ; GONZAGA N.; DANIEL G ; TAMANINI R. ; BELOTI V. **Detection of pasteurized milk adulteration through official methods.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, 01 March 2015, Vol.36(1Supl), pp.283-290.

MARSHALL B. M., LEVY S. B. **Food animals and antimicrobials:** Impacts on human health, Clinical Microbiology Reviews 24 (4) (2011) 718–733. doi:10.1128/CMR.00002-11.

MAZAL, G.; VIANA, P. C. B.; SANTOS, M. V.; GIGANTE, M. L. **Effect of somatic cell count on prato cheese composition**, Journal of Dairy Science, v.90 p. 630-636, 2007. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71545-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71545-X)

MENDES O.T.; JUNQUEIRA M.G.A.; PORTO L. B. S PORTO.; BRITO D.C, SATO .F.; **Vibrational spectroscopy for milk fat quantification: line shape analysis of the Raman and infrared spectra**, Journal of Raman Spectroscopy 47, 2016.

NEESE, F. **The ORCA Program System**. WIREs Computational Molecular Science, 2, 73-78. 2012 <http://dx.doi.org/10.1002/wcms.81>

OLIVEIRA M. A. L.; ANJOS V.; BELL M. J. V.. **Vibrational spectroscopy for milk fat quantification: line shape analysis of the Raman and infrared spectra**, Journal of Raman Spectroscopy 47 (6) (2016) 692–698. doi:10.01002/jrs.4878.

PEREIRA, M. N.; SCUSSEL, V. M. **Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle**. Revista de Ciências Agroveterinárias. Vol. 16, nº 2, 2017.

PIECH, T.; MAJER-DZIEDZIC, B.; KOSTRUBA, A.; GRZELAK, E. M.; CHOMA, I. M. **Thin-layer chromatography—direct bioautography as an alternative method for screening of antibiotic residues in milk: A comparative study**. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies Vol. 39, Iss. 5-6, 2016

PILLONEL, L., W. LUGINBÜHL, D. PICQUE, E. SCHALLER, R. TABACCHI, AND J. O. BOSSET. 2003. **Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese: Mid- and near-infrared spectroscopy**. Eur. Food Res. Technol. 216:174–178.

PROCHAZKA, M. **Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Bioanalytical, Biomolecular and Medical Applications**. Springer, 2015, ISBN 3319239929, 9783319239927.

RIBAS, N. P.; HARTMANN, W.; MONARDES, H. G.; ANDRADE, U. V. C. **Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 33, n. 6, p. 2343 – 2350, 2004.

DITCHFIELD R.; HEHRE W. J.; POPLE J. A.; **Selfconsistent molecularorbital methods. ix. an extended gaussian type basis for molecularorbital studies of organic molecules**, J. Chem. Phys. 54 (2) (1971) 724–728.

PARR R.; YANG W., **Functional Theory of Atoms and Molecules**, Oxford University, Oxford, 1989.

WYSOKINSKI R.; HERNIK K.; SZOSTAK R.; MICHALSKA D., **Electronic structure and vibrational spectra of cis-diammine(orotato)platinum(ii), a potential cisplatin analogue: Dft and experimental study**, Chemical Physics 333 (1) (2007) 37 – 48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2007.01.002>.

DAPPRICH S.; DANIELS A. D.; STRAIN M. C.; FARKAS O.; MALICK D. K.; RABUCK A. D.; RAGHAVACHARI K.; FORESMAN J. B.; ORTIZ J. V.; BABOUL Q. CUI, A. G.; CLIFFORD S.; CIOSLOWSKI J .; STEFANOV B. B.; LIU G.; LIASHENKO A.; STERGIADIS S.; BERLITZ C. B.; HUNT B.; GARG S.; GIVENS D. I.; KLIEM K. E., **An update to the fatty acid profiles of bovine retail milk in the united kingdom: Implications for nutrition in different age and gender groups**, Food Chemistry 276 (2019) 218 – 230. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.165>.

SANTOS NW, YOSHIMURA EH, MAREZE-COSTA CE, MACHADO E, AGUSTINHO BC, PEREIRA LM, ET AL. (2017) **Supplementation of cow milk naturally enriched in polyunsaturated fatty acids and polyphenols to growing rats**. PLoS ONE 12(3): e0172909. doi:10.137

SATHYANARAYANA, D. N. **Vibrational Spectroscopy: Theory and Applications**. New Age International, 2015 ISBN 8122415172, 9788122415179.

SILVA A. M.; JUNQUEIRA G. M. A.; ANCONI C. P. A.; SANTOS H. F. **New insights on chemical oxidation of single-wall carbon nanotubes: A theoretical study**, J. Phys. Chem. C 113 (2009) 10079.

SILVA, D. P.; GELLEN, L. F. A.; SILVA, T. S.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. **Resíduos de antibiótico em leite: prevalência, danos à saúde e prejuízos na indústria de laticínios**. Evidência, Joaçaba v. 13 n. 2, p. 127-152, jul./dez. 2013

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7^a ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2012.

SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. Cengage Learning, 2017, ISBN 1305577213, 9781305577213.

VAN BOECKEL T. P.; BROWER C.; GILBERT M.; GRENFELL B. T.; LEVIN S. A.; P. ROBINSON T.; TEILLANT A.; LAXMINARAYAN R.. **Global trends in antimicrobial use in food animals**, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (18) (2015) 5649–5654. doi:10.1073/pnas.1503141112.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4. ed. Santa Maria: UFSM, 2010. 195 p. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301010407000055>

USP, Universidade de São Paulo. **Curso de Reconhecimento de Padrões – Dedução de Componentes Principais**, 2010.

RASSOLOV V. A.; RATNER M. A.; POPLER J. A.; REDFERN P. C.; CURTISS L. A.; 6–31G* basis set for third-row atoms, *J. Comput. Chem.* 22 (2001) 976.

VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. **Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics**. CRC Press, 2016.

VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R. L.; MARTINE, M. L.; PEIXOTO, M. G. C. D.; SILVA, M. V. G. B.; RESI FILHO, J.C. **Associação entre produção de leite, idade ao primeiro parto e intervalo de partos em rebanho Gir Leiteiro**. In 42 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Anais... Goiânia – GO, 2005.

WALSH, C.; WENCEWICZ, T. A. **Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities** ASM Press, 2^a ed, 2016.

WANG, J.; MACNEIL, J. D.; KAY, J. F. **Chemical analysis of antibiotic residues in food**. **Hoboken**: John Wiley & Sons, 2012.

WYSOKIŃSKI R.; HERNIK K.; MICHALSKA D. **Electronic structure and vibrational spectra of cis-diammine(oxalato)platinum(II), a potential cisplatin analogue: DFT and experimental study**. Semantic Scholar, Published 2007. doi:10.1016/j.chemphys.2007.01.002

ANEXO I

Tabela Anexa 1 Dados de espectros vibracionais de compostos de penicilina e ampicilina. Os cálculos teóricos foram obtidos no nível de teoria B3LYP / 6 - 31 + G (d, p). Frequências harmônicas em cm^{-1} , (Intensidades de infravermelho em KM / Mole) e [Raman scattering activities in $^{\circ}\text{A}^4/\text{AMU}$].

Pen. (Calc.)	Pen. (Exp.)	Amp. (Calc.)	Amp. (Exp.)	Modo. Vib
3750(91)[195]	–	3750(90)[199]	–	δOH
–	–	3594(8)[56]	3554	νNH (asym., NH_2)
3636(25)[57]	3576	3551(90)[115]	3505	νNH (amide)
–	–	3505(4)[98]	3428	νNH (sym., NH_2)
3201(16)[35]	3472	3207(19)[342]	3379	νCH (R1)
3191(19)[86]	3337	3195(28)[61]	3331	νCH (sym., R1)
3129(13)[46]	3265	3129(14)[49]	3198	νCH_3 (asym.)
3121(20)[104]	3209	3139(14)[53]	3273	νCH_3 (asym.)
3117(27)[37]	3175	3109(25)[50]	3161	νCH (R2)
3112(8)[68]	3085	–	–	νCH_2 (amide, asym.)
–	–	3120(18)[109]	3127	νCH_3 (asym.)
3077(5)[45]	3062	3076(6)[45]	3017	νCH (R3)
3061(16)[112]	3026	3058(9)[57]	2985	νCH (sym.,amide)
3049(21)[261]	2947	3048(24)[285]	2958	νCH_3 (sym.alt.)
3044(17)[36]	2920	3043(18)[36]	2930	νCH_3 (sym.sim.)
1860(459)[15]	1762	1858(422)[14]	1768	νCO (R2)
1836(284)[12]	1649	1835(287)[12]	1682	νCO (carboxyl)
1755(267)[13]	1592	1756(296)[20]	1602	νCO (amide)
–	–	1667(40)[5]	1571	$\delta\text{NH}(\text{NH}_2)$
1651(7)[35]	1557	1633(1)[12]	1491	νCC (R1)
1539(325)[2]	1493	1535(546)[8]	1454	δNH (amide)
1530(388)[1]	1444	1532(54)[0.5]	1404	νCC (R1)
1415(10)[2]	1324	1413(10)[2]	1367	$\delta_{\text{oop}}\text{CH}_3$ (sym.)

1409(38)[3]	1395	1408(36)[3]	1330	δ CH (R3)	
1331(252)[1]	1302	1330(268)[1]	1303	δ CH (R2) plus ν CN (R3)	
	-	1320(6)[3]	1256	δ CH (R3)	
	-	1289(6)[3]	1213	δ CH (R2)	
	-	1284(18)[3]	1191	δ CH (amide))	
1277(58)[13]	1261	-	-	δ NH	
	-	1271(15)[5]	1164	δ CH (R2)	
1250(23)[14]	1239	1250(27)[24]	1111	δ_{oop} CH (R2)	
1216(43)[3]	1112			ν CS (R3)	
1202(28)[6]	1063				ν HC -NH
	-	1183(6)[3]	1071		ν CC (R1)
1141(253)[3]	1000	1142(308)	1047	δ OH	
1103(12)[1]	1013			δ CH (R1)	
	-	1085(21)[2]	985	ν HC - NH2	
1094(51)[4]	1020	1095(69)[2]	1010	ν CN (R2)	
1030(5)[1]	978			δ CH ₂ (assym.,R1)	
	-	961(60)[6]	905	δ NH ₂	
880(16)[4]	716	900(131)[1]	843	δ R2	
856(5)[16]	893	875(7)[4]	797	δ_{oop} CH (R1)	
849(3)[4]	837	851(14)[10]	757	ν CC(R3)	
742(211)[4]	689	767(35)[7]	723	δ_{oop} CH (R1)	
735(48)[1]	674	715(98)[1]	689	δ_{oop} CH (R1)	
620(84)[9]	590	620(67)[5]	643	δ_{oop} OH	
563(24)[13]	498	564(29)[11]	578	ν C - S	
512(38)[2]	463	509(17)[4]	497	δ_{oop} NH + OH, δ CSC(R3)	