Lilian Fernanda de Almeida Martelli

Oxitetraciclina como Antibiótico promotor de crescimento: Comportamento com substâncias húmicas e no solo empregando-se métodos espectroscópicos e LC-MS

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Wilson Tadeu Lopes da Silva

(Embrapa Instrumentação)

São Carlos

2016

A Deus, por conceder oportunidades, conquistas e dificuldades...

...e por não me abandonar em nenhuma delas

DEDICO

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e à Maria, por interceder por mim e caminhar lado a lado comigo.

Ao Dr. Wilson Tadeu Lopes da Silva, pela orientação, confiança na realização deste trabalho e aprendizado ao longo de todos esses anos;

À minha família...meu irmão, meus avós e meus pais; meus grandes exemplos, por todo o incentivo;

Ao Fabricio, por ser meu companheiro de todas as horas, por dividir comigo seus dias, suas conquistas e anseios, e seus sonhos e planos;

À minha Helena, tão pequenina e tão grandiosa, pela sua chegada em minha vida; por ter me dividido entre o acadêmico e a maternidade...você é razão de alegria e minha inspiração para apreciar mais os pequenos detalhes do caminho, para ser forte, para sonhar, para acreditar em ser melhor a cada dia que passa. Agradeço por muitas vezes, mais nos ensinar que aprender;

Aos amigos e colegas que fiz na Embrapa nestes anos, o meu “muito obrigada” pelo convívio e pelos aprendizados, eu seria até injusta ao tentar listá-los, em meio a tantos nomes

Aos funcionários da Embrapa Instrumentação, pela prontidão e boa vontade em ajudar, por todo o suporte e auxílio prestado, em especial àqueles que levarei principalmente como exemplos, entre os quais: Joana, Silviane, Alice, Viviane, Adriana, Marisa, Claudia, Liliane, Terezinha, Valentim, Jaqueline, Milene

Aos amigos da jornada acadêmica e da vida: Milena, Daniela, Camila Carvalho, Cléber, Aline, Lívia, Fernanda e muitos outros

À prof. Dra. Eny e sua aluna Lia Gracy, por todo o auxílio e sugestões e por toda boa vontade

Aos funcionários da secretaria de pós graduação do IQSC, por serem tão prestativos e por toda a atenção sempre

Ao CCI – USP, por ser um lugar mágico, pelo exemplar atendimento em educação infantil, e pelo zelo com a minha pequena, ao longo de sua permanência por lá.

À CAPES, pela bolsa concedida através do Edital Capes-Embrapa.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho

Resumo

A atividade de antimicrobianos, entre os quais os usados como Antibióticos Promotores de Crescimento (APC's), quando liberados no solo podem influenciar diretamente na sua biota. Muitas das bactérias presentes em solos cultiváveis e florestais têm papel fundamental na imobilização de minerais e processos de decomposição. Sendo assim, extinguindo-se ou alterando-se as bactérias presentes neste meio, a degradação de compostos xenobióticos, por exemplo, ficaria comprometida, havendo ainda a preocupação do desenvolvimento de bactérias resistentes. Além disso, também são praticamente inexistentes os estudos que tratam a respeito da interação entre antibióticos tetraciclínicos, com constituintes da matéria orgânica do solo no Brasil. Dentro deste contexto, procedeu-se a caracterização de amostras de latossolos oriundas de mata nativa e pastagem, ambas de texturas argilosa e arenosa, bem como os ácidos húmicos (AH) extraídos dos mesmos. Foram conduzidos ensaios de sorção dessas amostras com o antibiótico oxitetraciclina (OTC), desenvolvendo metodologia de determinação deste composto por LC-MS. Também foram realizadas análises espectroscópicas, empregando-se Espectroscopia na região do UV-Vis, Espectroscopia de Fluorescência na região do UV-Vis, Espectroscopia na região do infravermelho médio e Fluorescência induzida por laser. Constatou-se que a concentração hidrogeniônica é o fator que mais tem influência no processo de sorção solo-OTC e AH-OTC; com destaque para a condição de pH 5,0, situação da qual mais se aproximam os valores de pH reais dos solos brasileiros. Tal condição apresentou as alterações mais expressivas no que diz respeito às possíveis interações ocorridas entre o antibiótico e os ácidos húmicos. A variável textura do solo também se mostrou importante, seguida pelo teor de matéria orgânica e manejo.

Abstract

The antimicrobials activity, among then the ones used as growth promoter, when released in soil, could influence directly its biota. Many organisms present in cultivable soils have an important function in metals retaining and decomposition processes. Modifying or excluding these bacterias, the xenobiotic compounds degradation, for example, would be at risk, with the worring of resistant bactérias development. Besides this, the studies involving tetracyclenic antibiotics interaction with the organic matter in Brazil are scarce. In this context, the soil samples characterization from forest and pasture, both with clay and sandy textures, was carried out, and also done with the extracted humic acids from them. Sorption experiments were carried out with the soil and the humic acids, and the oxytetracycline. It was developed a method for OTC determination using LC-MS. Spectroscopic techniques were used, among then the UV-Vis spectroscopy, Fluorescence UV-Vis spectroscopy, Fourier transformed Infrared spectroscopy and Laser induced Fluorescence.

It was also found that the pH was the most important variable which influence in the sorption process soil-OTC and HA-OTC, especially at pH 5.0. The most significant modifications concerning the samples interactions with OTC occurred at this condition. The texture also showed important results, followed by the organic matter concentration and soil manure.

Lista de Figuras

Figura 1: Faturamento do mercado veterinário nacional (SINDAN, 2015)	18
Figura 2 Características ácido-base das tetraciclinas e as espécies predominantes conforme os diferentes valores de pH	23
Figura 3: Prováveis vias de entrada dos APC's no ambiente (ANDREU et al, 2010 apud DORETTO, 2012)	25
Figura 4: Triângulo textural de um solo de acordo com a porcentagem de silte, areia e argila (IBGE, 2007)	28
Figura 5: Esquema da análise por espectrometria de massas, onde M são moléculas de um composto puro. Fonte: (RODRIGUEZ, 2003)	39
Figura 6: Componentes básicos de um espectrômetro de massas. (Fonte: SKOOG, 2002).	40
Figura 7: Diagrama esquemático do funcionamento do ESI-MS. Fonte: (ALVES, 2006)	43
Figura 8: Esquema de um analisador quadrupolo. rf: radiofrequência e dc: corrente contínua. Fonte: (MORAES e LAGO, 2003).	43
Figura 9: Níveis energéticos das transições eletrônicas observadas na região do UV-Visível a partir dos orbitais moleculares. Fonte: adaptado de Pavia, Lampman e Kriz (2001).	49
Figura 10: Níveis de energia eletrônicos e vibracionais em uma molécula poliatômica e os caminhos das transições eletrônicas radioativas (absorção, fluorescência e fosforescência) e não-radioativas (conversão interna de energia e intersystem crossing).	53
Figura 11: Distribuição granulométrica acumulada para as amostras de estudo (MN: mata nativa e PAST: pastagem)	69
Figura 12: Difractogramas das amostras de solo evidenciando, em caráter preliminar, o perfil mineralógico das mesmas onde Ca= caulinita; Gb= gibbsita; Hm= hematita; Qz= quartzo. .	71
Figura 13: Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras de solo, onde A e B correspondem a MN arg e MN aren; C e D correspondem a P arg e P aren.	72
Figura 14: Estimativas da distribuição da abundância de ferro, alumínio e silício provenientes da análise de EDS e imagem de MEV para a amostra MN arg (Mata Nativa – Argilosa).	73
Figura 15: Índices de Humificação (H_{FIL}) para as amostras de solo bruto MN_{aren} , MN_{arg} , P_{aren} e P_{arg}	75
Figura 16: Espectros de Infravermelho Médio provenientes dos ácidos húmicos extraídos	76

Figura 17: (A) Cromatograma proveniente de extrato aquoso de solo e (B) Cromatograma de extrato aquoso de solo fortificado com uma solução padrão de oxitetraciclina	79
Figura 18: Curva Analítica construída para a oxitetraciclina e seu respectivo gráfico de resíduos.....	81
Figura 19: Isotermas de sorção da OTC para os solos MNaren, MNarg, Paren e Parg em pH 2,5 ajustadas à forma logarítmica da equação de Freundlich	83
Figura 20: Isotermas de sorção da OTC para os solos MNaren, MNarg, Paren e Parg em pH 5,0 ajustadas à forma logarítmica da equação de Freundlich	84
Figura 21: Gráfico de análise de componentes principais para os diferentes valores de pH estudados dos espectros das amostras de ácidos húmicos e soluções liofilizadas de AH-OTC.....	89
Figura 22: Espectros de absorção para as amostras dos ácidos húmicos do solo MN aren em pH 2,5; 5,0 e 8,5 após o ensaio de sorção. Em cada pH, são apresentados os espectros de interação (AH-OTC), do AH, da OTC e a subtração (AH-OTC) - AH.....	90
Figura 23: Espectros de absorção para as amostras dos ácidos húmicos do solo MN arg em pH 2,5; 5,0 e 8,5 após o ensaio de sorção. Em cada pH, são apresentados os espectros de interação (AH-OTC), do AH, da OTC e a subtração (AH-OTC) - AH.....	90
Figura 24: Espectros de absorção para as amostras dos ácidos húmicos do solo P aren em pH 2,5; 5,0 e 8,5 após o ensaio de sorção. Em cada pH, são apresentados os espectros de interação (AH-OTC), do AH, da OTC e a subtração (AH-OTC) - AH.....	91
Figura 25: Espectros de absorção para as amostras dos ácidos húmicos do solo P arg em pH 2,5; 5,0 e 8,5 após o ensaio de sorção. Em cada pH, são apresentados os espectros de interação (AH-OTC), do AH, da OTC e a subtração (AH-OTC) - AH.....	91
Figura 26: Espectros de Fluorescência nos três valores de pH, nos modos de emissão e varredura sincronizada utilizando $\Delta\lambda = 20$ e 55, para amostras de ácidos húmicos do solo MN aren, OTC e interação AH-OTC	94
Figura 27: Espectros de Fluorescência nos três valores de pH, nos modos de emissão e varredura sincronizada utilizando $\Delta\lambda = 20$ e 55, para amostras de ácidos húmicos do solo MN arg, OTC e interação AH-OTC	95
Figura 28: Espectros de Fluorescência nos três valores de pH, nos modos de emissão e varredura sincronizada utilizando $\Delta\lambda = 20$ e 55, para amostras de ácidos húmicos do solo P aren, OTC e interação AH-OTC.....	96
Figura 29: Espectros de Fluorescência nos três valores de pH, nos modos de emissão e varredura sincronizada utilizando $\Delta\lambda = 20$ e 55, para amostras de ácidos húmicos do solo P arg, OTC e interação AH-OTC.....	97
Figura 30: Gráficos da Razão das áreas A2/A1 dos espectros de fluorescência obtidos para os ácidos húmicos de MN aren em solução tampão e pós sorção (interação OTC-AH), nos	

diferentes valores de pH e nos modos de (A) emissão; (B) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 20$ e (C) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 55$ 100

Figura 31: Gráficos da Razão das áreas A2/A1 dos espectros de fluorescência obtidos para os ácidos húmicos de MN arg em solução tampão e pós sorção (interação OTC-AH), nos diferentes valores de pH e nos modos de (A) emissão; (B) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 20$ e (C) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 55$ 101

Figura 32: Gráficos da Razão das áreas A2/A1 dos espectros de fluorescência obtidos para os ácidos húmicos de P aren em solução tampão e pós sorção (interação OTC-AH), nos diferentes valores de pH e nos modos de (A) emissão; (B) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 20$ e (C) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 55$ 102

Figura 33: Gráficos da Razão das áreas A2/A1 dos espectros de fluorescência obtidos para os ácidos húmicos de P arg em solução tampão e pós sorção (interação OTC-AH), nos diferentes valores de pH e nos modos de (A) emissão; (B) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 20$ e (C) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 55$ 103

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estrutura molecular e algumas propriedades físico-químicas da oxitetraciclina ...	22
Tabela 2: Formas de isothermas de sorção propostos por Giles, Smith e Huitson (1974). Fonte: traduzido de Hinz (2001). S é a concentração sorvida, Ce é a concentração no equilíbrio e KD é a constante de partição ou se sorção.	32
Tabela 3: Transições eletrônicas e os comprimentos de onda máximos de bandas de grupamentos químicos cromóforos na região do Ultravioleta.	49
Tabela 4: Atribuição de bandas características de deformações e estiramentos vibracionais dos AH.	55
Tabela 5: Características físico-químicas e teor de micronutrientes dos solos estudados ...	61
Tabela 6: Percentagens de argila, silte e areia para as amostras	70
Tabela 7: Relações de sinal dos elementos constituintes das amostras de solo investigadas	72
Tabela 8: Teores de Carbono e Nitrogênio obtidos para as amostras coletadas, caracterizadas por ambientes de pastagem (P) e mata nativa (MN), predominantemente arenosas (aren) ou argilosas (arg)	74
Tabela 9: Percentagens estimadas dos grupamentos alifáticos e aromáticos e índice de aromaticidade das amostras de ácidos húmicos extraídos das amostras dos solos de estudo	78
Tabela 10: Parâmetros de sorção para a oxitetraciclina em pH 2,5 e 5,0.....	85
Tabela 11: Estimativa da percentagem da concentração de OTC sorvida pelas amostras de ácidos húmicos extraídas, em pH 2,5; 5,0 e 8,5.....	87
Tabela 12: Resultados da compilação das médias do conjunto de dados analisado utilizando ANOVA- teste de Duncan, para as análises de fluorescência no modo emissão abordando as amostras dos solos MN aren, Mn arg e P aren.	105
Tabela 13: Resultados da compilação das médias do conjunto de dados analisado utilizando ANOVA- teste de Duncan, para as análises de fluorescência no modo de varredura sincronizada abordando as amostras dos solos MN aren, Mn arg e P aren.	106

Lista de Abreviações e Siglas

AH – Ácido Húmico

ANOVA – Analise of Variance

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

Ce – Concentração do poluente no equilíbrio com o solo

CTC – Capacidade de Troca Catiônica

DPR – Desvio Padrão Relativo

FTIR – Fourier Transformed Infrared

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IHSS – *International Humic Substances Society*

Kd – Coeficiente de distribuição

Kf – Coeficiente de Freundlich

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MOS – Matéria Orgânica do Solo

MO – Matéria Orgânica

OECD – Organização Europeia de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

NMR – Nuclear Magnetic Resonance

SH – Substâncias Húmicas

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

OTC – oxitetraciclina

TFSA- terra fina seca ao ar

QuEChERS- Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Os fármacos de uso veterinário.....	20
3.1.1 A Oxitetraciclina (OTC)	21
3.2 A introdução de fármacos veterinários no ambiente	24
3.3 Impactos ocasionados pela presença de fármacos de uso veterinário no solo.....	25
3.4 Aspectos gerais do compartimento solo.....	26
3.5 O estudo dos antibióticos em solo.....	28
3.5.1 Isotermas de sorção.....	29
3.6 Matéria Orgânica do Solo (MOS) e as substâncias húmicas: Dinâmica e interação com os fármacos de uso veterinário	34
3.7 Cromatografia Líquida de alta eficiência	38
3.7.1 Espectrometria de massas.....	39
3.7.1.1 Ionização por Eletronebulização (ESI)	41
3.7.1.2. Analisador de massa do tipo quadrupolo	43
3.7.2 Análise de fármacos em matrizes ambientais	44
3.8 O emprego de técnicas espectroscópicas para o estudo de antibióticos em solo.....	46
3.8.1 Espectroscopia na Região do Ultravioleta- Visível	46
3.8.2 Espectroscopia de Fluorescência na Região do Ultravioleta-Visível	51
3.8.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio com transformada de Fourier.....	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1 SOLO BRUTO: DA COLETA À CARACTERIZAÇÃO	57
4.1.1 Amostras de solo.....	57
4.1.2 Fracionamento Químico	58
4.1.3 Análise Elementar	59
4.1.4 Análise Granulométrica	60
4.1.5 Difração de Raios - X	60

4.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia- Dispersiva (EDS)	60
4.1.7 Determinação do teor de macro e micronutrientes.....	61
4.1.8 Fluorescência Induzida por Laser (FIL).....	61
4.2 Caracterização dos ácidos húmicos extraídos	63
4.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio (FTIR).....	63
4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	63
4.3 Desenvolvimento de Método para determinação de oxitetraciclina por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas e Validação do método	64
4.3.1 Aplicação do método: Ensaios de Sorção (Solo Bruto).....	66
4.3.2 Ensaio de sorção com os ácidos húmicos extraídos.....	66
4.4 Utilização de técnicas espectroscópicas na avaliação das interações oxitetraciclina – ácidos húmicos	67
4.4.1 Espectroscopia da região do infravermelho médio.....	67
4.4.2 Espectroscopia na região do UV-Vis.....	68
4.4.3 Espectroscopia de fluorescência na região do UV-Vis.....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 Amostras de Solo	69
5.1.1 Análise Granulométrica	69
5.1.2 Difração de Raios – X	70
5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia- Dispersiva (EDS)	71
5.1.4 Análise Elementar	73
5.1.5 Fluorescência Induzida por Laser (FIL).....	74
5.2 Caracterização dos ácidos húmicos extraídos	76
5.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio (FTIR).....	76
5.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	77
5.3 Desenvolvimento de método para determinação de OTC por LC-MS e Validação do método.....	79
5.3.1 Ensaios de sorção com solo bruto	82
5.3.2 Estimando um ensaio de sorção com os ácidos húmicos extraídos	87
5.4 Utilização de técnicas espectroscópicas na avaliação das interações oxitetraciclina – ácidos húmicos	88

5.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio (FTIR).....	88
5.4.2 Espectroscopia na região do UV/Vis.....	90
5.4.3 Espectroscopia de Fluorescência na região do UV/Vís.....	92
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

1. INTRODUÇÃO

O desempenho satisfatório das atividades referentes à pecuária, especialmente no que diz respeito à produção animal está diretamente relacionado ao emprego de uma prática bastante comum, que consiste na utilização de fármacos visando finalidades terapêuticas e de profilaxia.

Os agentes antibióticos figuram como uma das classes mais prescritas (THIELE-BRUHN, 2003). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme cita Palermo-Neto & Almeida (2006), estabelece a autorização para a utilização de cerca de 15 compostos antimicrobianos sob a forma de aditivos na alimentação animal e lista outros 50 compostos com finalidades terapêuticas. Muitos desses compostos apresentam uso comum entre as diversas atividades pecuárias como a bovinocultura, suinocultura, avicultura, entre outras.

Algumas das substâncias em uso, como os antibióticos, apresentam a característica de atuarem como promotores do crescimento. Tal aplicação foi descoberta por volta de 1940. Os efeitos observados na melhoria do desempenho zootécnico ocorrem através da ação dessas substâncias no sistema digestório sobre a microbiota intestinal, diminuindo a competição por nutrientes e reduzindo a produção de metabólitos que restringem o crescimento de animais. O trato digestório também tem seu tamanho reduzido de certo modo, em virtude da redução de ácidos graxos de cadeia curta e poliaminas produzidos pela fermentação microbiana, mantendo-se o tipo e número adequados de bactérias benéficas. Dessa forma, há uma proteção adequada da mucosa do intestino, acarretando uma melhor digestibilidade dos alimentos (DORETTO, 2012).

O emprego de tetraciclina como Antibiótico Promotor de Crescimento (APC) e para o tratamento de bactérias do gênero *Salmonella* em aves foi bastante difundido no Brasil durante as últimas décadas, por se tratar, certamente, de uma das principais classes de antibióticos comercializados e aplicados na pecuária brasileira (RUTZ et al, 2001).

Em estudos conduzidos por PEDERSEN & EDQVIST (2001), após a utilização de resíduos provenientes da produção de tetraciclina, posteriormente

fermentados como ração para aves, observou-se que as mesmas apresentavam uma taxa de crescimento maior que o grupo controle. Além do crescimento, observou-se também o aumento na produção das aves de postura, aumento do número de filhotes por parto em suínos, e aumento da produção em vacas leiteiras. A prática foi rapidamente adotada e logo se tornou parte integrante nos modernos sistemas de produção animal, especialmente de aves e suínos (WHO, 1999).

Em doses subterapêuticas, os antibióticos, entre os quais as tetraciclinas, sulfonamidas e tilosina, por exemplo, são utilizados como promotores do crescimento, aumentando o peso dos animais, a taxa de reprodução e a eficiência de aproveitamento dos alimentos, e diminuindo os índices de morbidez e mortalidade (DENOBILE e NASCIMENTO, 2004; JONES, 2009; NERO et al., 2007; SILVA et al., 2008; WANG et al., 2006). Assim, a utilização dos antibióticos na produção animal resulta em rebanhos mais saudáveis, ganhos econômicos para os produtores, maior disponibilidade de alimentos de origem animal para o consumo humano e menor risco de transferência de infecções dos animais para os seres humanos (HAYS, 1986).

Entretanto, através da utilização inadequada dos antibióticos (aplicação de medicamentos ilegais e/ou em doses superiores às recomendadas), podem ocorrer graves riscos à saúde humana e às atividades econômicas (AGARWAL, 1992; BRITO e LANGE, 2005; SILVA, et al., 2008; WANG et al., 2006). Consequentemente, o uso desses antibióticos vem sofrendo restrições nos últimos anos, devido à possibilidade de seleção de microorganismos resistentes, desenvolvimento de resistência bacteriana cruzada em humanos e devido à exigência de produtos livres de resíduos de antibióticos pelo mercado consumidor (BUTAYE et al., 2003; SALEHA et al., 2009; TRAESEL et al., 2011). Além disso, os prejuízos do ponto de vista ambiental também podem ser inúmeros, em se tratando da contaminação da água e solo, por exemplo.

Experimentos de campo conduzidos por pesquisadores da Universidade de Minnesota evidenciaram que as culturas de milho, cebola, repolho, batata e alface, adubadas com esterco animal, foram analisadas após seis meses do plantio e apresentaram absorção de alguns fármacos como a tetraciclina e sulfametazina (CIMITILE, 2009).

Além disso, vale ressaltar que a matéria orgânica do solo (MOS) tem grande afinidade pelos elementos tóxicos presentes em tal matriz. Em virtude de suas características e da existência de grupos fenólicos e carboxílicos, essa afinidade é evidenciada pela exposição de sítios de adsorção, sejam estes específicos ou não. Dessa maneira, a MO atua de modo similar à adsorção de argilas silicatadas e óxidos, bem como pela ação como agente complexante do elemento na solução do solo. Os complexos formados mostram-se importantes, pois podem manter o elemento (xenobióticos) em solução a um valor de pH em que este se encontraria insolúvel, além de atuarem fortemente no transporte de metais e outros elementos, tornando-os disponíveis ou não no solo (STEVENSON, 1977). Os ácidos fúlvicos e húmicos (substâncias húmicas –SH) presentes no solo possuem a capacidade de formação de complexos com cátions polivalentes. Pelo fato dos ácidos fúlvicos apresentarem menor massa molar aparente em relação aos ácidos húmicos e maior ocorrência de grupos ácidos em sua estrutura, seus complexos tendem a apresentar maior mobilidade nos compartimentos de solo e água (SANTOS, 2014).

As SH interagem com diversos compostos, incluindo os contaminantes orgânicos, como pesticidas e fármacos, e inorgânicos (incluindo elementos metálicos tóxicos) mais precisamente devido à sua estrutura molecular bastante variada, favorecendo tanto interações de caráter não-polar, ou polar temporário, para compostos orgânicos, e a formação de ligações coordenadas, no que diz respeito aos metais. (JENKINSON et al, 1991; CLAPP et al, 2001).

As substâncias húmicas desempenham um papel relevante com relação às propriedades do solo, por estarem diretamente envolvidas nos processos de liberação ou retenção de nutrientes e outros compostos (xenobióticos) no solo, capacidade de troca iônica e tamponante e pH (AMIR et al, 2006).

Há outras formas de interação envolvendo ligações de hidrogênio, interação hidrofóbica entre grupamentos alifáticos, transferência de carga e sobreposição de sistemas π aromáticos, as quais são também observadas entre os ácidos húmicos (AH) e compostos orgânicos (WERSHAW, 1999; HAYES et al, 2007).

As estatísticas relacionadas à quantidade de fármacos veterinários que é empregada nas criações de animais não costumam ser abrangentes, e estima-

se que em torno de 70% desses medicamentos sejam antibióticos (DÍAZ-CRUZ & BARCELÓ, 2007). Nos Estados Unidos, cerca de 11 milhões de quilogramas de agentes microbianos são comercializados, e destes, praticamente metade são destinados à avicultura. No ano de 1999, neste país, dos 9,3 milhões de kg de antibióticos comercializados, 87% deste montante destinaram-se a finalidades terapêuticas e o restante, empregado para promover maior crescimento animal e eficiência alimentar (SARMAH, 2006).

De acordo com estimativas de 2004, na Europa, houve um consumo da ordem de 4,6 milhões de quilogramas de antibióticos de uso veterinário, e as tetraciclinas figuram entre os produtos de maior consumo. Na Coreia do Sul, o consumo esteve na faixa de 1,4 milhões de quilogramas (KOOLS et al, 2008; KIM et al, 2008). No Reino Unido, em 2000, as tetraciclinas e sulfonamidas foram os medicamentos de maior consumo (REGITANO et al, 2010).

Desde o ano de 2004, o Brasil é considerado o maior exportador de carne bovina, o que caracteriza, dentre outros fatores, a extensa atividade pecuária exercida. Estima-se que a exportação de carne bovina e de frango seja intensificada nos próximos anos. Durante o ano de 2010, a produção de carnes bovina, suína e de frango foi da ordem de 24,5 milhões de toneladas, e o consumo interno atingiu os 75% dessa produção (DORETTO, 2012).

De acordo com o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil), a expectativa é de que até 2020, a produção nacional de carnes possa suprir 44,5% do mercado mundial, seguida pela carne de frango e suína, que corresponderão a 48,1% e 14,2%, respectivamente, das exportações mundiais (MAPA, 2011).

O mercado de medicamentos veterinários no Brasil vem aumentando e quase atingiu a marca de 5 bilhões de reais no ano de 2015, conforme mostra a Figura 1 (SINDAN, 2015). Dentre esses fármacos, destacam-se os antimicrobianos, cuja comercialização atinge no Brasil cerca de 1/3 do total.

Figura 1: Faturamento do mercado veterinário nacional (SINDAN, 2015)

Atualmente, não existem legislações específicas que possam reger os limites para a presença de antibióticos de uso veterinário no solo, embora existam algumas recomendações para a concentração desses compostos em alimentos. Determinou-se no ano de 2001, um limite genérico de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fármacos veterinários em solo, pela Agência Europeia através da Avaliação de Produtos Medicinais, baseado em estudos toxicológicos realizados nos Estados Unidos e encontra-se abaixo dos níveis prejudiciais observados em minhocas, alguns microorganismos e plantas (VICH, 2014)

Trabalhos realizados quase que em totalidade no exterior, têm evidenciado a detecção de compostos farmacêuticos de uso veterinário, em baixas concentrações (ng kg^{-1} a $\mu\text{g kg}^{-1}$), em diferentes matrizes ambientais, como dejetos de animais, lagoas de tratamento de resíduos de origem animal, solos e águas superficiais e subterrâneas (HIRSCH et al., 1999; THIELE-BRUHN, 2003; BOXALL et al., 2006; MARTÍNEZ-CABALLO et al., 2007). A ocorrência desses compostos no ambiente pode impactar negativamente organismos aquáticos e terrestres (KEMPER, 2008). Isso se deve especialmente ao fato de que muitos dos antibióticos administrados não são plenamente metabolizados no organismo animal, sendo excretados na urina e nas fezes, tanto na forma do composto original ou já parcialmente metabolizados (HALLING-SØRENSEN et al., 1998; SARMAH et al., 2006; KEMPER, 2008).

A realização de pesquisas que pretendem elucidar e melhor compreender aspectos relacionados à dinâmica e adsorção dos antibióticos promotores do crescimento no ambiente solo mostra-se atraente e relevante, uma vez que a maioria dos estudos neste contexto abordam análises envolvendo solos de clima temperado, bem como há na literatura material de maior enfoque voltado a análises desses compostos em água, sedimento e esgoto sanitário (VANZOLINI, 2009).

Diferentemente para o caso de pesticidas e outros poluentes, há uma certa carência nos estudos cujo enfoque seja o comportamento de fármacos no meio ambiente, principalmente no solo, inclusive quanto à mobilidade destes compostos em tal matriz. Ainda são escassos os estudos nacionais acerca da sorção entre fármacos de uso veterinário com a matéria orgânica do solo, bem como os mecanismos de interação envolvidos (PEREIRA et al, 2012).

Deste modo, observa-se uma necessidade da avaliação do comportamento de compostos dessa natureza em solos brasileiros, propiciando a disponibilização de métodos analíticos viáveis para monitoramento e compreensão de seu transporte no solo. Também são praticamente inexistentes os estudos que tratam a respeito da interação entre antibióticos tetraciclínicos, por exemplo, com constituintes da matéria orgânica do solo no Brasil (TORRES et al, 2012).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Desenvolver método analítico para detecção da Oxitetraciclina em solos
- Estudar o comportamento do antibiótico oxitetraciclina, utilizando-se ensaios de sorção por meio de *batch tests*
- Investigar a interação da OTC com a matéria orgânica do solo empregando métodos espectroscópicos (Espectroscopia na região do ultravioleta/visível, Fluorescência na região do UV-Vis e Espectroscopia na região do infravermelho médio).
- Traçar suposições quanto ao grau de risco da OTC do ponto de vista ambiental, com vistas a condições tropicais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Os fármacos de uso veterinário

O mercado de medicamentos veterinários no Brasil apresenta-se como um dos maiores do mundo e tende a continuar em expansão. A regulamentação deste mercado, desde os aspectos de registro e licença para produção até a análise fiscal, é exercida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio do Departamento de Fiscalização de Insumos e Produtos Agropecuários (DFIP) e de sua Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV) (DORETTO, 2012).

O MAPA autoriza o uso de aproximadamente 15 compostos antimicrobianos com a finalidade de aditivos na alimentação e outros 50 com finalidades terapêuticas, sendo muitos desses medicamentos de uso comum entre bovinos, suínos e a avicultura (PALERMO-NETO & ALMEIDA, 2006).

Os antibióticos compreendem uma gama de compostos que são destinados a diversos usos (antimicóticos, anti-helmínticos, antimicrobianos, entre outros), dispostos em diferentes classes (macrolídeos e tetraciclina) e apresentam diferentes estruturas moleculares e propriedades físicas. A maioria

dos antibióticos tendem a ionizar dependendo do pH do meio e seus valores de pK_a estão associados com os diversos grupos funcionais presentes nos compostos (THIELE-BRUHN, 2003).

3.1.1 A Oxitetraciclina (OTC)

Dentre o grupo destes fármacos, podemos destacar as tetraciclinas. Essas substâncias apresentam, em geral, ação bacteriostática através de inibição da síntese proteica. Classificam-se de acordo com a duração de sua atividade, podendo ser de curta, média ou longa ação, sendo amplamente distribuídas nos tecidos corporais. Os representantes deste grupo incluem a clorotetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina e a tetraciclina, com o mesmo nome do grupo a que pertence. Apresentam propriedades antimicrobianas similares, mas com diferenças em relação à farmacocinética, que engloba os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (SILVA, 1994). Dentre os antibióticos de uso comum no Brasil como medicamento veterinário, dos quais a oxitetraciclina, por exemplo, é o princípio ativo, destaca-se a Terramicina L.A.® comercializada pelo laboratório PFIZER e para uso em diferentes animais de criação, sendo tal substância certamente o principal antibiótico tetraciclínico em uso atualmente no país (PEREIRA et al, 2012).

As tetraciclinas são compostos anfóteros caracterizados pela presença de 3 valores de pK_a . São relativamente estáveis em meio ácido, mas não em meio alcalino e formam sais em ambos os meios. As tetraciclinas formam complexos quelatos com íons metálicos divalentes e β -dicetonas e formam fortes ligações com proteínas e grupos silanóis. A maioria das tetraciclinas são moderadamente solúveis em meio aquoso (em uma faixa de 230 a 52000 mg L⁻¹), diferentemente da solubilidade de seus hidrocloreto, que é bem maior (LEAL, 2012). Esses compostos absorvem luz e portanto, são bem susceptíveis à fotodegradação (THIELE-BRUHN, 2003).

A Tabela 1 apresentada a seguir, ilustra resumidamente a estrutura molecular e algumas características físico-químicas da oxitetraciclina, composto de estudo deste trabalho.

Tabela 1: Estrutura molecular e algumas propriedades físico-químicas da oxitetraciclina

Composto	Estrutura	Propriedades físico-químicas
Oxitetraciclina		Massa molecular: 496,89 g mol ⁻¹ pK _{a1} : 3,57 pK _{a2} : 7,49 pK _{a3} : 9,88

Considerada como um antibiótico de largo espectro de uso animal e humano, a oxitetraciclina (OTC), é produzida por microorganismos do gênero *Streptomyces* sp. via imersão ou fermentação no estado sólido e seu rendimento depende da levedura fermentadora utilizada, como também das condições do meio (pH e temperatura) e do meio de cultura. Esse composto atua via inibição de síntese protéica (YANG et al, 2001; WALKER, 2002).

A utilização de tetraciclina tanto como Antibiótico Promotor de Crescimento (APC) quanto para o tratamento de bactérias do gênero *Salmonella* em aves é amplamente comum no Brasil, especialmente por se tratar de uma das principais classes de antibióticos comercializados e aplicados na pecuária brasileira (RUTZ et al, 2001).

Preocupantemente, estima-se que uma grande fração de antibióticos tetraciclínicos veterinários, entre 20 e 90 %, não é absorvida pelo organismo animal, sendo excretada de forma inalterada na urina e nas fezes, podendo ocasionar o aparecimento de resistência a estes antibióticos, além do fato de que seu transporte no solo, também podem alcançar a água subterrânea, conferindo resistência por parte dos microorganismos da água (PEREIRA et al, 2012).

No Brasil, a OTC é usada como bactericida para aplicação em diversos cultivos, conforme permitido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), compreendendo a aplicação nas lavouras de tomate, batata, feijão, pepino, café, pêssego, ameixa e pimenta, com um Limite Máximo de Resíduo de 0,25 mg kg⁻¹. (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2005).

É relevante também destacar o *tempo de residência*, que trata-se de uma propriedade cinética de um composto em um ambiente

químico/físico/biológico em que este se encontra. Estudos conduzidos por WANG & YATES (2008) relatam que no caso da OTC, o tempo de meia-vida determinado em esterco bovino foi em torno de 8,1 dias (a 25 °C), 33 dias em solo após aplicação do esterco e 56 dias em solo sem a aplicação do esterco, o que a torna ambientalmente persistente principalmente em esterco saturado com água.

A OTC é um composto que possui características ácido-base, e a distribuição dessas espécies predominantes são apresentadas na Figura 2.

Figura 2 Características ácido-base das tetraciclinas e as espécies predominantes conforme os diferentes valores de pH

Os três valores de pKa da molécula de OTC são atribuídos às ionizações dos seguintes grupamentos: hidroxila e amida (pKa₁ = 3,57), hidroxilas carbonila (pKa₂ = 7,49) e amina secundária (pKa₃ = 9,88). Tal comportamento do pKa reflete a característica dos sítios de ligação da molécula, bem como a labilidade de cada um deles.

Além dos 3 valores de pKa existentes, há a presença de um *zwitteríon* em pH em torno de 5, onde a molécula possui uma carga positiva e uma negativa distribuídas em sua estrutura decorrente da transferência de prótons em caráter intramolecular. Tais características podem ser determinantes para as propriedades de interação intramoleculares e intermoleculares, de acordo com as influências do pH e da força iônica do meio (TAPIA & BERTRÁN, 2005).

3.2 A introdução de fármacos veterinários no ambiente

Os antibióticos de uso veterinário, utilizados como promotores de crescimento (APC's) são administrados aos animais através da alimentação, dessedentação, injeção ou via tópica. Há uma quantidade considerável desses compostos que não é completamente absorvida pelo metabolismo animal, resultando em uma taxa de excreção, seja do composto original ou metabólitos, da ordem que varia 30 e 90%. (HALLING-SØRENSEN, 2001).

A taxa de excreção das substâncias envolve, dentre muitos aspectos, das propriedades físico-químicas das mesmas, a forma de aplicação, a dosagem e a duração do tratamento. A dispersão desses compostos no meio ambiente é influenciada, dentre outros fatores, pela solubilidade, pelo comportamento de sorção e pela persistência do antimicrobiano; bem como pelas características do meio, como estrutura física, pH, conteúdo de carbono orgânico, capacidade de troca catiônica da matriz solo; além das condições climáticas, tais como temperatura, volume e intensidade de chuva (KEMPER, 2008 apud DORETTO, 2012). Compostos fortemente adsorvidos tendem a se acumular mais preferencialmente no solo, enquanto que os de maior mobilidade são mais facilmente lixiviados para águas superficiais ou subterrâneas.

A dispersão dos fármacos é abrangente, atingindo águas superficiais e subterrâneas, ar, solo, plantas e outros organismos terrestres e aquáticos, além de ocasionar a propagação de bactérias resistentes. As vias de entrada dos APC's no ambiente são inúmeras, como mostra resumidamente a Figura 3.

Os compostos podem ser liberados durante a sua manufatura, através das águas residuárias; já os administrados aos animais, como já mencionado, atinge o solo por meio da disposição de fezes e urina contaminadas (BOXALL, 2010).

decomposição. Sendo assim, extinguindo-se ou alterando-se as bactérias presentes neste meio, a degradação de compostos xenobióticos, por exemplo, ficaria comprometida (SARMAH et al., 20006).

Além disso, ainda há a preocupação do desenvolvimento de bactérias resistentes. Muitos estudos publicados reportam o isolamento desse tipo de microorganismos após aplicação no solo de esterco de suínos, bovinos e aves que foram tratados com APC's (PEREIRA et al, 2012).

O consumo de APC's pelos animais, ainda que em doses sub-terapêuticas, favorece a seleção de bactérias resistentes no trato intestinal, as quais propiciam a disseminação de seus genes para a microbiota do solo.

A prevenção da seleção de estirpes de organismos resistentes aos APC's é de suma importância, tanto para a medicina humana quanto a veterinária. É primordial o uso controlado e prudente de antibióticos, visando reduzir ou impedir riscos ao homem e ao ambiente.

Diversos estudos procuraram avaliar o impacto dos antibióticos em comunidades microbianas terrestres e aquáticas, tanto na estrutura quanto em processos ecológicos importantes mediados por microrganismos, como a ciclagem de N (taxas de desnitrificação no solo), metanogênese, redução microbiana de ferro e sulfato, atividade enzimática e taxa de respiração do solo (DING; HE, 2010). Tais efeitos dependerão de vários fatores, entre os quais se destacam as propriedades específicas da matriz, os grupos microbianos presentes e as concentrações de antibióticos envolvidas (DING; HE, 2010). No entanto, o conhecimento acumulado sobre o assunto é insuficiente para que conclusões gerais possam ser tiradas. Outro aspecto ainda pouco conhecido consiste no efeito de misturas e da coexistência de antibióticos com outros poluentes, como os metais pesados (LEAL, 2012).

3.4 Aspectos gerais do compartimento solo

Entende-se o solo como um compartimento não é estático. O pH, sais solúveis, quantidade de matéria orgânica e razão carbono-nitrogênio, microorganismos, fauna do solo, temperatura e umidade mudam com as estações climáticas e ao longo dos anos. Além disso, o solo é fortemente afetado pela

atividade antropogênica, entre essas as atividades de indústrias, esgotos domésticos e atividades agrícolas as quais muitas vezes resultam na degradação e perda ou redução das funções do solo (USDA, 2010).

A matéria orgânica do solo se refere a todo material orgânico de origem vegetal ou animal decomposto, parcialmente decomposto e não decomposto. É geralmente sinônimo de húmus embora este último seja mais comumente usado para se referir à matéria orgânica decomposta, chamada de substâncias húmicas (SH), as quais contribuem de forma fundamental para as propriedades do solo, como na capacidade de complexação, mobilização e efeito redox de moléculas orgânicas ao meio (xenobióticos) (PIGATIN, 2011).

O intemperismo físico e químico de rochas e minerais resulta numa ampla faixa de tamanho de partículas de pedras, cascalho, areia, silte e partículas muito pequenas de argila. Especificamente, a textura é a proporção relativa de areia, silte e argila no solo. Assim sendo, a fração mineral do solo pode ser classificada de acordo com o tamanho das partículas: areia corresponde à fração de 2,0 a 0,05 mm de diâmetro, o silte à fração entre 0,05 a 0,002 mm e argila, à fração com diâmetro de partícula menor que 0,002 mm (CHESWORTH, 2008; FOTH, 1990).

A argila apresenta uma grande área superficial e normalmente possui uma carga líquida negativa e, conseqüentemente, funciona como sítio ativo para reações químicas que ocorrem no solo. Os principais componentes da argila são os filossilicatos e óxidos de ferro, manganês, alumínio e de silício. Os óxidos de ferro e alumínio, característicos de regiões muito intemperizadas como as tropicais, influenciam significativamente nas propriedades dos solos, entre elas a adsorção de íons e moléculas, agregação e comportamento redox. A adsorção de compostos na superfície destes óxidos se dá por meio de grupos M-OH com propriedades dependentes ácido-base que influenciam a ionização, conforme as equações 1 e 2:

Assim sendo, em valores de pH mais elevados, a forma aniônica prevalece. Por outro lado, com a diminuição do pH, a forma catiônica predomina e, em determinado valor de pH (ponto isoeletrico ou ponto de carga

A adsorção corresponde ao contato entre o contaminante e a superfície do solo, tratando-se de uma interação bidimensional na interface solo-contaminante; pode ser considerada um tipo de partição, pois envolve a distribuição do contaminante entre a água dos poros e a matriz do solo. A Absorção envolve uma penetração tridimensional da molécula na matriz. A partição, por sua vez, é a distribuição da molécula entre duas fases (por exemplo: gasosa e sólida, ou líquida e sólida), por meio de um equilíbrio. Já a difusão consiste em um processo de transporte do contaminante para o interior da matriz solo, permitindo o contato com o maior número de sítios de modo que ele seja sorvido. Tal processo pode ocorrer para o interior da MOS e poros do solo, para o interior de partículas minerais ou laminar, sobre a superfície da matriz do solo (EHLERS & LOIBNER, 2006).

No caso de contaminantes, o termo partição compreende vários processos que resultam na distribuição entre contaminantes orgânicos hidrofóbicos, a solução do solo e a fase não polar da matriz do solo.

3.5.1 Isotermas de sorção

Os processos relacionados à sorção, ou às interações de superfícies, são decorrentes da *fisiosorção* e *quimisorção*. Na primeira, observam-se a existência de interações fracas de van der Waals (ex.: interação por dispersão e dipolar) e de ligação de hidrogênio entre o sorbato e a superfície do sorbente, ou substrato (ATKINS, 2006).

No fenômeno de quimisorção, as moléculas do sorbato são sorvidas na superfície do substrato pela formação de ligações químicas, geralmente ligação covalente, tendendo a encontrar sítios que maximizam seu número de coordenação com o substrato, além da entalpia da quimisorção ser maior do que a da fisiosorção, apresentando valores em torno de 200 kJ mol^{-1} , e da distância entre sorbato e sorbente ser freqüentemente menor para a quimisorção (ATKINS, 2006).

As isotermas de Sorção são curvas que representam a concentração de espécie química sorvida pela sua concentração não sorvida, usualmente em meio aquoso, a uma temperatura constante e podendo ser atribuído um modelo

matemático às mesmas, com tais isotermas sendo utilizadas para quantificar a capacidade de sorção de um sorbente frente a variáveis experimentais. De acordo com Giles, Smith e Huitson (1974), as atribuições que podem ser feitas sobre os tipos de Isotermas de Sorção mais comuns são:

- Isoterma do tipo “S”: resultado de cooperação de cada molécula sucessivamente adsorvida à adsorção de outras, com a disponibilidade de espaço intermolecular limitando a sorção;
- Isoterma do tipo “C”, ou de Partição: resultado de acréscimo de disponibilidade de superfície de interação, levando à partição.

A Isoterma de Sorção Linear, ou de Partição, define-se por:

$$K_D = C_s / C_e \quad \text{Eq. 3}$$

onde C_s é a concentração do soluto sorvido em mmol g^{-1} e C_e é a concentração do soluto na fase aquosa no equilíbrio em mmol L^{-1} , com K_D em L g^{-1} , (constante de partição), fornecendo a tendência do soluto em se manter sorvido ou em fase aquosa após alcançado o equilíbrio químico entre as espécies (GILES et al, 1974).

A Isoterma de Freundlich, aplicada a superfícies heterogêneas, é definida por:

$$S = kf C_e^N \quad \text{Eq. 4}$$

onde S é a concentração do soluto sorvido em mg g^{-1} , kf é o coeficiente de sorção em $\text{mg}^{1-n} \text{L g}^n$, C_e é a concentração do soluto em equilíbrio em solução aquosa em mg L^{-1} e N é o parâmetro de linearidade. Em um caso simples, quanto mais o valor de N for igual a 1, o valor de kf se aproxima mais ao de K_D para isotermas lineares. Utiliza-se a forma logarítmica da equação para o ajuste linear do modelo:

$$\text{Log}S = \text{log}Kf + N\text{log}C_e \quad \text{Eq. 5}$$

Já a Isoterma de Langmuir, a qual se restringe às superfícies homogêneas, é representada por:

$$S = C_m C_e / K_L + C_e \quad \text{Eq. 6}$$

Onde S é a concentração do soluto sorvido em mg g^{-1} , C_m é a quantidade máxima do soluto sorvido em mg g^{-1} , C_e é a concentração do soluto em equilíbrio em solução aquosa em mg L^{-1} e K_L é o coeficiente de sorção de Langmuir em mg L^{-1} .

Giles, Smith e Huitson (1974) realizaram a classificação das isotermas de Sorção baseando-se em suas formas e curvaturas. Ao levar em conta platôs, pontos de inflexão e de máximo, também foram distinguidos subgrupos de isotermas. No entanto, esta classificação operacional é puramente empírica e não revela os processos que levaram às diferentes formas das isotermas (HINZ, 2001).

A Tabela 2 apresenta estas classes de isotermas e suas características de acordo com o tratamento matemático aplicado. Em referência às características da interação sorbente–sorbato, estas curvas podem ser assim interpretadas:

- *Curva “L”*: representa um sorbato com uma alta afinidade pelo sorbente a uma baixa concentração, mas a uma alta concentração esta afinidade decresce, juntamente com o número de sítios de sorção;
- *Curva “H”*: representa um sorbato com uma alta afinidade pelo sorbente;
- *Curva “S”*: sugere que existe uma barreira à sorção do sorbato, mas uma vez que esta limitação é sobreposta, a sorção é similar àquela de L, ou seja, a sorção aumenta com o aumento da concentração do sorbato na fase aquosa;
- *Curva “C” ou linear*: característica de partição envolvendo compostos orgânicos e a MOS do solo (ex.: AH), sugere que a retenção do sorbato depende do recobrimento da superfície do sorbente, ou seja, o sorbato tem maior afinidade pela superfície do sorbente do que pela fase aquosa.

Tabela 2: Formas de isotermas de sorção propostos por Giles, Smith e Huitson (1974). Fonte: traduzido de Hinz (2001). S é a concentração sorvida, C_e é a concentração no equilíbrio e K_d é a constante de partição ou se sorção.

Classe	Subgrupo	Formas da Isoterma ($S \times C_e$)	Formas da Isoterma ($K_d \times S$)	Formas da Isoterma ($\log K_d \times \log S$)
S	1	Côncavo	Inclinação positiva	Inclinação positiva
L	1	Convexo	Inclinação negativa, linha	Inclinação negativa
H	1	Convexo	Inclinação negativa, curva	Inclinação negativa
C	1	Linha reta	Inclinação zero	Inclinação zero
S, L, H	2	Platô	Inclinação negativa, linha ou curva	$S_T = S$ a baixos valores de K_d
S, L, H	3	Platô, inflexão	Mínimo	Mínimo
S, L, H	4	Platô, inflexão, platô	Mínimo	Mínimo

A maioria dos estudos de sorção (adsorção e dessorção) é realizada por meio de medidas de isotermas de sorção em experimentos com frascos sob agitação (*batch tests*). Este tipo de experimento geralmente é realizado com a adição de uma determinada quantidade do solo ou sedimento em soluções contendo o analito de interesse ao longo de um intervalo de concentrações. A mistura é em seguida agitada a uma temperatura fixa e a concentração do analito na fase aquosa ou associada à matriz (solo ou sedimento) é medida uma vez que é assumido que o tempo de equilíbrio foi

alcançado. Para cada concentração inicial estudada, a concentração do analito na fase sólida (C_s , analito associado ao solo ou sedimento) é traçada em função da concentração do analito na fase aquosa (C_{aq}). O gráfico gerado é conhecido como isoterma de adsorção ou dessorção e sua forma reflete na extensão e, conseqüentemente, a favorabilidade da associação do analito com o solo ou sedimento (WARREN et al., 2003).

Vários conceitos de sorção estão disponíveis para descrever a interação de substâncias dissolvidas com o solo. Estes conceitos de sorção diferem em relação à isoterma de sorção envolvida (linear ou não linear), os pressupostos feitos em relação à dependência com o tempo (instantânea ou um tempo limitado) e reversibilidade do processo de sorção (reversível ou irreversível). Múltiplas regiões de sorção são consideradas nos modelos de sorção para representar a heterogeneidade do solo com relação às suas propriedades de sorção bem como diferenças na acessibilidade de superfícies potencialmente adsorptivas. No entanto, essas regiões de sorção são apenas conceituais e não reflete frações bem definidas do solo (WEHRHAN et al., 2007). Assim sendo, o processo de sorção de contaminantes em solos e sedimentos é caracterizado como um fenômeno de reações múltiplas envolvendo diferentes mecanismos de reação.

No que diz respeito ao termo “sorção”, às vezes, é utilizado no lugar do termo “adsorção” para descrever a perda física do analito da solução de solo (fase aquosa) por meio do contato com o solo sólido (DORETTO, 2012).

O modelo de distribuição linear é baseado na hipótese de que a matéria orgânica do solo é como um gel amorfo ou como uma fase líquida que não tem limitação de sítios ou espaços para acomodar moléculas de contaminantes orgânicos com o aumento da concentração do mesmo. A relativa rigidez da matéria orgânica do solo reduz a flexibilidade para acomodar moléculas com o aumento da concentração do soluto na fase aquosa, manifestando, assim, capacidade de adsorção limitada (HUANG et al., 2003).

Desta maneira, o modelo mais simples que descreve a adsorção de um composto sobre uma superfície com número finito de sítios sem difusão superficial é o modelo de Langmuir (Equação 6) (YANG et al., 2011).

Por outro lado, o modelo mais comumente utilizado para quantificar o equilíbrio de adsorção de contaminantes orgânicos em solos e/ou sedimentos é o modelo de Freundlich (Equações 4 e 5) (HUANG et al., 2003).

Há um número considerável de trabalhos que abordam o comportamento de fármacos em solos provenientes de países de clima temperado, mas as condições climáticas e tipos de solos nas regiões tropicais certamente favorecem um comportamento distinto. Ainda pouco se conhece sobre a ocorrência e a dinâmica destes compostos, particularmente nos ambientes tropicais. Assim sendo, os estudos de adsorção e dessorção são fundamentais para fornecer informações sobre a mobilidade e a distribuição dos antimicrobianos no meio ambiente (HUANG et al., 2003).

3.6 Matéria Orgânica do Solo (MOS) e as substâncias húmicas: Dinâmica e interação com os fármacos de uso veterinário

A MOS é constituída basicamente de substâncias húmicas (SH) e substâncias não húmicas. As substâncias não húmicas (carboidratos, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos de baixa massa molecular, entre outras) pertencem a grupos bem conhecidos e possuem características físicas e químicas bem definidas. Geralmente correspondem aos compostos mais facilmente degradados por microrganismos, tendo normalmente tempo mais curto de vida no ambiente (SANTOS, 2008).

As SH, por sua vez, são macromoléculas ou estruturas supramoleculares, com massa molecular e estruturas variáveis. Possuem características físicas e químicas não bem definidas e que podem ser divididos em ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e huminas, com base nas suas características de solubilidade em meio aquoso ácido ou alcalino (STEVENSON, 1994).

Do ponto de vista estrutural, a definição de uma estrutura química dos AH é um tema polêmico, por existirem duas propostas em discussão: macromolecular e supramolecular, onde a macromolecular estabelece que as variações estruturais dos AH são similares àsquelas observadas em macromoléculas biológicas, como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos

e ligninas, cujas configurações dependem do pH e da força iônica do meio. Já uma estrutura supramolecular estabelece que os AH em solução formam agregados moleculares que são estabilizados por interações fracas, como ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas (van der Waals). Estudos mais recentes apontam que a associação supramolecular de componentes húmicos de baixa massa molecular é o modelo estrutural mais consistente, baseando-se em informações cromatográficas dos elementos constituintes de tais componentes húmicos, como o nitrogênio, e das interações sofridas em função do ambiente químico (VAZ-JUNIOR, 2010).

A sorção de compostos químicos orgânicos hidrofóbicos em solos e sedimentos é impulsionada por interações hidrofóbicas, incluindo efeitos entrópicos da fase aquosa e interações não específicas dos compostos químicos orgânicos hidrofóbicos com a matéria orgânica de solo e/ou sedimentos (HUANG et al., 2003). Entretanto, troca iônica, ligação com cátions e ligações de hidrogênio tem sido propostas como principais mecanismos de interação dos ácidos húmicos com xenobióticos (TOLLS, 2001).

Oleszczuk *et al.* (2009) investigaram os processos de sorção e dessorção do antimicrobiano oxitetraciclina às superfícies nanométricas não polares de carbono, similares a grupamentos alquila e arila dos ácidos húmicos, utilizando isotermas de sorção e modelos cinéticos, observando, assim, uma rápida cinética de sorção e uma dessorção dependente do pH do meio e da quantidade inicial sorvida bem como da agregação intermolecular. Em outro estudo com oxitetraciclina, Kulshrestha *et al.* (2004), utilizando isotermas de Freundlich, Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Médio e Difração de Raio X, observaram que a sorção de oxitetraciclina à argila do tipo montmorilonita diminui com o aumento do pH do meio devido à presença de interação por troca catiônica, a qual é mais efetiva em meio ácido; enquanto que a interação hidrofóbica em pH 5 se dá devido ao zwitteríon com uma grande quantidade de matéria orgânica dissolvida inibindo a sorção.

Gu *et al.* (2005) demonstraram que a sorção de tetraciclina em ácido húmico de solo foi fortemente dependente do pH com um máximo em pH próximo de 4,3 e da competição com íons hidrônio (H_3O^+) e eletrólito catiônico (Na^+). Além disso, a dependência do pH foi consistente com a complexação

entre as espécies catiônica/zwitteriônicas da tetraciclina e sítios desprotonados em ácidos húmicos (principalmente dos grupos funcionais carboxílicos). Ainda, modificações no ácido húmico do solo pela adição de Ca^{2+} aumentou a sorção de tetraciclina sugerindo que a formação do complexo ternário (ácido húmico-metal-tetraciclina) pode ser importante em concentrações mais elevadas do cátion.

Hayes et al. (2007) simulando terminações húmicas suportadas em sílica fundida com utilização de medidas de ângulo de contato e Geração de Segundo Harmônico (SHG, *Second Harmonic Generation*) por polarização não-linear, obtiveram indicativos de que em pH 8 a OTC interage com SH através de ligação de hidrogênio entre grupos metil-amida e metil-éster, interações hidrofóbicas entre grupamentos alquila e arila e dipolo-induzido de sistemas π aromáticos, com a presença de ligação via grupamento amida acoplado a ácido benzoico podendo perturbar os valores de pKa interfacial, alterando o pH ótimo de ligação da OTC, e sugeriram, ainda, que o sistema amida-ácido carboxílico possui alta constante de ligação ($6,0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$), o que também deve facilitar uma possível transferência de carga entre as duas espécies;

Mifflin, Konek e Geiger (2006) examinando a sorção da OTC às interfaces óxidos minerais/água, na presença e ausência de grupos funcionais de SH, com o uso de SHG por polarização não-linear e Isotermas de Sorção, observaram que a sorção se dá de forma reversível via grupamentos metil-éster, ácido carboxílico e alquila, com uma intensidade apreciável ocorrendo somente em pH 8, definindo que a mobilidade da OTC no ambiente depende fortemente do pH e da constituição do solo;

Kulshrestha, Giese e Aga (2004) utilizando Isotermas de Freundlich, Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Médio e Difração de Raios X, observaram que a sorção de OTC à argila do tipo montmorilonita diminui com o aumento do pH do meio devido à presença de interação por troca catiônica, a qual é mais efetiva em meio ácido, enquanto que a interação hidrofóbica em pH 5 se dá devido ao zwitterion, com uma grande quantidade de MO dissolvida inibindo a sorção (KULSHRESTHA, 2004);

Whershaw (1999) apontou os sistemas π sobrepostos como possível mecanismo de agregação de compostos orgânicos, os quais contenham anéis aromáticos em sua estrutura, com o carbono orgânico dissolvido;

Masel (1996) e Somorjay (1994) definiram que a fisiosorção (ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica) seria favorecida termodinamicamente sobre a quimisorção (ligação covamente) por conta da diminuição da densidade interfacial da Energia Livre de Gibbs, com uma tendência de formação de interações fracas em meios com a presença de grupamentos não-polares.

Ressalta-se que ainda não escassos no Brasil estudos a respeito da sorção entre antimicrobianos veterinários com a matéria orgânica do solo. E, mesmo obtendo informações na literatura da sorção de antimicrobianos com substâncias húmicas, ainda não se tem definido quais os mecanismos de interação envolvidos ou muito menos o pH ótimo de interação para ácidos húmicos em solos brasileiros dadas as características estruturais destes que dependem da matéria-prima de formação e das características físico-químicas e biológicas do meio, bem como quais as implicações destas interações em solos brasileiros (LEAL, 2012).

Os solos que apresentam elevados teores de argila e matéria orgânica apresentam uma maior Capacidade de Troca de Cátions (CTC) que favorece a adsorção de contaminantes aos colóides orgânicos e minerais, os quais estarão por consequência em menor quantidade na solução do solo diminuindo a quantidade da substância sujeita a lixiviação e contaminação das águas subterrâneas. O processo inverso é definido como dessorção que pode ocorrer devido ao aumento da umidade do solo e da temperatura. (DORETTO, 2012).

No ambiente, coexistem as moléculas originais e seus metabólitos, sendo estes, geralmente, menos tóxicos que a molécula original. No entanto, em alguns casos, como para a tetraciclina, os produtos de degradação podem ser tão ou até mais tóxicos que o composto original (HALLING-SØRENSEN et al., 2002; BOXALL, 2004), o que ilustra a importância de compreender detalhadamente o comportamento e a dinâmica dos agentes antimicrobianos e de seus resíduos no ambiente (REGITANO et al., 2010).

Algumas moléculas de antibióticos apresentam características mais hidrofóbicas (como é o caso de alguns macrolídeos aminoglicosídeos e β -lactâmicos), enquanto outras são bastante solúveis e/ou se dissociam a valores de pH encontrados no ambiente, apresentando com isso diferentes potenciais de sorção (K_d – coeficiente de sorção e K_{oc} - coeficiente de sorção

normalizado em relação ao teor de carbono orgânico do solo) e de mobilidade no solo (THIELE-BRUHN, 2003).

O valor de K_d para os antibióticos também varia com o tipo de solo. No entanto, as variações nas quantidades sorvidas não estão necessariamente correlacionadas com o teor de carbono orgânico dos solos, como é observado para a maioria das substâncias orgânicas hidrofóbicas, como os pesticidas e outros poluentes aromáticos (TOLLS, 2001; BOXWALL et al., 2003). Esse fato se justifica em razão dos agentes antibióticos serem, em geral, relativamente complexas e com grupos multifuncionais ionizáveis em valores de pH ambientalmente relevantes (CUNNINGHAM, 2004), o que restringe a importância do papel da partição hidrofóbica no processo de sorção. A literatura enfatiza a importância dos processos de troca catiônica, da adsorção às superfícies dos minerais de argila, das reações de complexação com íons metálicos e das ligações de hidrogênio para a sorção dos antibióticos (TOLLS, 2001).

3.7 Cromatografia Líquida de alta eficiência

Os métodos de separação cromatográfica baseiam-se em diferentes fatores, tais como o tipo de fase móvel e fase estacionária que são empregados. A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*) apresenta-se como uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis. A HPLC aliada a diferentes detectores possibilita a análise qualitativa e quantitativa de grande quantidade de compostos.

Os métodos cromatográficos acoplados ao espectrômetro de massas destacam-se dentre os vários detectores existentes. A espectrometria de massas é uma poderosa técnica analítica, de ampla aplicabilidade. O acoplamento entre as duas técnicas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (FREITAS, 2011).

3.7.1 Espectrometria de massas

Dentre as diversas ferramentas analíticas disponíveis para os pesquisadores, a espectrometria de massas é a de mais ampla aplicabilidade, visto que a técnica é capaz de fornecer informações sobre: a composição elementar de amostras; estruturas de moléculas inorgânicas e orgânicas; a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; a estrutura e a composição de superfícies sólidas; e as razões isotópicas de átomos nas amostras (SKOOG, 2002).

Um espectrômetro de massas é um instrumento que produz íons a partir de átomos ou moléculas e os separa, de forma positiva ou negativa de acordo com suas razões massa/carga, m/z (SKOOG, 2002). Na espectrometria de massas, o requisito básico para uma análise é a formação de íons livres na fase gasosa, onde, alguma forma de energia é transferida para a amostra causando a sua ionização. A Figura 5 ilustra, resumidamente, o processo da análise por espectrometria de massas, onde M representa as moléculas de um composto puro.

Figura 5: Esquema da análise por espectrometria de massas, onde M são moléculas de um composto puro. (SKOOG, 2002)

Após o processo de ionização, M^+ se decompõe, formando íons de massas menores que, ao serem detectados, geram o espectro de massa. Para que o processo integral possa acontecer, é necessário que o instrumento contenha os componentes adequados.

A Figura 6 mostra os principais componentes dos espectrômetros de massas.

Figura 6: Componentes básicos de um espectrômetro de massas. (Fonte: SKOOG, 2002).

Pode-se observar, portanto, que são três os componentes principais: a fonte de íons, o analisador de massas e o detector. Na fonte, os constituintes de uma amostra são convertidos em íons gasosos pelo bombardeamento com elétrons, fótons, íons ou moléculas. Os íons positivos (o mais comum) ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massas. O analisador de massas tem a função de separar tais íons de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). Sua função é semelhante à do monocromador na espectrometria óptica, entretanto há dispersão da razão m/z em vez da radiação em diferentes comprimentos de onda (FREITAS, 2011).

O detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados e armazenados na memória de um computador (SKOOG, 2002). Os espectrômetros de massas exigem um elaborado sistema de vácuo para manter uma baixa pressão em todos os componentes, exceto no processamento de sinal e de leitura. A baixa pressão assegura número muito pequeno de colisões no interior do espectrômetro de massas de forma a poder produzir e manter íons e elétrons livres (SKOOG, 2002).

A ionização à pressão atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Ionization* - API) têm muitas vantagens com relação às demais técnicas. Na espectrometria de massas com ionização à pressão atmosférica a fonte de íons é localizada fora do espectrômetro, os íons são formados à pressão atmosférica e então introduzidos dentro do espectrômetro de massas. Esta é

uma técnica de ionização branda, onde apenas o íon protonado é formado, porém a aplicação de um potencial elétrico na entrada do espectrômetro de massas pode criar condições para a produção de fragmentos iônicos.

Atualmente as duas interfaces API mais utilizadas são: a de ionização química à pressão atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* - APCI) e a de ionização por eletronebulização (do inglês, *Electrospray Ionization* - ESI).

3.7.1.1 Ionização por *Eletrospray* (Eletrospray Ionization - ESI)

A ionização por eletrospray (ESI) é atualmente uma das mais importantes técnicas de ionização para acoplamento da cromatografia líquida com espectrometria de massas. É um método simples, que opera a pressão atmosférica e em temperatura moderada, sendo a técnica de ionização mais branda disponível na espectrometria de massas.

Embora seja normalmente considerada como uma fonte de ionização, o “electrospray” é, na realidade, um processo de transferência de íons preexistentes em solução para a fase gasosa. Pode-se dizer que a efetiva ionização (transformação de uma espécie neutra em um íon) é um efeito secundário. De qualquer forma, é fácil entender porque uma técnica que permite a transferência de íons de uma solução para a fase gasosa e posterior análise por espectrometria de massas, em tão pouco tempo, teve um impulso tão grande: isto se deve ao fato da maioria dos processos químicos e bioquímicos ocorrerem em fase líquida, envolvendo muitas vezes espécies pouco voláteis (MORAES e LAGO, 2003).

O funcionamento do sistema ESI-MS, espectrometria de massas com ionização por eletronebulização, se baseia inicialmente na formação de um “spray” eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons; em seguida, estes íons são transportados da região da fonte de ionização a pressão atmosférica para dentro de uma região de vácuo, onde se localiza o analisador de massas (ENKE et al, 2001)

A interface ESI produz íons pela dessorção ou emissão de íons na forma de pequenas gotículas carregadas. As pequenas gotículas são carregadas através do aumento na força do campo aplicado e, posteriormente, os íons

podem ser diretamente dessorvidos e o solvente evaporado (ENKE et al, 2001).

Na interface ESI a solução da amostra é bombeada através de uma agulha capilar de aço inoxidável com vazão de alguns microlitros por minuto, onde é aplicada uma diferença de potencial intensa, geralmente entre 2 - 5 kV (MORAES e LAGO, 2003).

A Figura 7 a seguir, mostra uma representação esquemática da fonte de “electrospray” de um espectrômetro de massas. Toda a região da fonte está a pressão atmosférica. A diferença de potencial aplicada pode ser positiva ou negativa, de acordo com as características do composto analisado. Quando, por exemplo, um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos sofrem uma repulsão eletrostática, tendendo a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletrodo. Assim a gota que se forma na ponta do capilar estará enriquecida em íons positivos. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra-eletrodo aumenta provocando a deformação da gota. A gota ganha a forma de um cone que é denominado de cone de Taylor (MORAES e LAGO, 2003).

Esta gota permanece “presa” ao capilar. Somente quando a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vencem a tensão superficial do líquido ocorre a liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução (MORAES e LAGO, 2003).

Figura 7: Diagrama esquemático do funcionamento do ESI-MS. Fonte: (ALVES, 2006).

3.7.1.2. Analisador de massa do tipo quadrupolo

O quadrupolo consiste em 4 barras cilíndricas e paralelas que atuam como eletrodos, conforme mostra a Figura 8, conectadas eletricamente e uma voltagem com potenciais de radiofrequência variável, que estão a 180° fora de fase, é aplicada a cada par de barras (SKOOG, 2002).

Figura 8: Esquema de um analisador quadrupolo. rf: radiofrequência e dc: corrente contínua. Fonte: (MORAES e LAGO, 2003).

3.7.2 Análise de fármacos em matrizes ambientais

A análise de fármacos veterinários de diferentes classes terapêuticas abrange certa variedade de técnicas. Na determinação de fármacos veterinários em amostras ambientais sólidas é de suma importância considerar a heterogeneidade da matriz, bem como seus possíveis interferentes, lembrando que o analito, muitas vezes, está presente em baixas concentrações. Dessa forma, é essencial realizar um efetivo tratamento da amostra atendendo os passos de extração e purificação (ou ambos) precedente a análise por cromatografia gasosa ou, mais frequentemente, cromatografia líquida.

De modo geral, a extração de fármacos veterinários de matrizes ambientais sólidas tem sido conduzida empregando-se sonicação ou agitação da amostra com solventes orgânicos polares ou misturas destes com soluções aquosas adequadas (LIGUORO et al., 2003; DÍAZ-CRUZ et al., 2003).

Existem outras técnicas de extração mais avançadas, entre as quais, citam-se a extração assistida por microondas (MAE, *microwave assisted extraction*), extração com fluído supercrítico (SFE, *supercritical fluid extraction*), extração com líquido pressurizado (PLE, *pressurized liquid extraction*) para a remoção de fármacos veterinários em matrizes ambientais sólidas (RAICH-MONTIU et al., 2010). O clean-up da amostra é geralmente realizado através de extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) e extração líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*). Em seguida, as fases obtidas são centrifugadas e concentradas por evaporação. A SPE se destaca pela rapidez e requerer menor volume de solvente orgânico (THIELE-BRUHN, 2003).

Com relação à determinação de antibióticos em solo, após extraídos das amostras, têm sido empregadas a cromatografia líquida preferencialmente à gasosa, já que muitos fármacos são polares e termolábeis. A separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é conduzida geralmente empregando-se colunas C₁₈ e diferentes fases móveis (DÍAZ-CRUZ et al., 2003).

Deteção por arranjo de diodos (DAD), UV, fluorescência e espectrometria de massas (MS) ou espectrometria de massas em tandem (MS/MS) tem sido utilizadas como técnicas de detecção acopladas à cromatografia líquida para análise de fármacos veterinários em matrizes

ambientais sólidas. Devido ao fato da espectrometria de massas em tandem (MS/MS) possuir baixo limite de detecção, alta seletividade e informar a respeito da estrutura dos compostos, o acoplamento desta técnica com a cromatografia à líquido na análise de amostras ambientais têm sido crescente. Contudo, por conta do alto custo da instrumentação, a detecção por arranjo de diodos e fluorescência ainda é comum. Alguns antibióticos em particular, como tetraciclinas, sulfonamidas e fluoroquinolonas são investigados em matrizes ambientais utilizando-se LC-MS preferencialmente (DÍAZ-CRUZ et al., 2003; DORETTO, 2012).

O'Connor et. al (2007) evidenciam que análises de tetraciclinas, por exemplo, utilizando-se MS oferecem muitas vantagens sobre os outros sistemas de detecção, como alta seletividade e habilidade na obtenção de informações estruturais. O sistema TANDEM possibilita maior confiabilidade na identificação dos analitos em amostras complexas com base nos íons-filhos gerados.

O uso de triplo quadrupolo-MS para tetraciclinas tem sido aplicado para análises em solo com qualidade superior ao uso de *ion-trap*-MS. Entretanto, ambos os tipos de MS demonstram-se superiores à detecção por ultravioleta-visível (O'CONNOR et. al, 2007).

Entretanto, quando a detecção por Espectrometria de Massas é empregada para análises em solo, a matéria orgânica presente é responsável por intensificar os efeitos de matriz, em virtude de suas características surfactantes que podem afetar o sinal de electrospray promovendo ou suprimindo a ionização na fonte operando no modo de ionização positiva. Algumas estratégias podem ser adotadas de modo a minimizar esses efeitos, e a mais simples delas, que é eficiente em muitos casos, é a diluição da amostra (DÍAZ-CRUZ et al, 2008).

Com relação à validação dos métodos desenvolvidos para determinação dos antibióticos, os parâmetros estudados acabam diferindo entre as diversas organizações nacionais e internacionais. Na área de Química Ambiental, os métodos padrões para análise de contaminantes publicados pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA, 2007) contêm orientações a respeito da validação destes métodos. Os parâmetros analíticos de validação podem variar de acordo com a técnica analítica empregada ou com o protocolo de validação

a ser seguido. No Brasil, dois órgãos são responsáveis por regulamentar a validação de metodologias analíticas para a determinação de medicamentos, os quais são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Recentemente, contudo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) publicou o Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica, relacionado à análise de fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários.

3.8 O emprego de técnicas espectroscópicas para o estudo de antibióticos em solo

As técnicas espectroscópicas se mostram como ferramentas interessantes para auxiliar na investigação da composição estrutural das substâncias húmicas e xenobióticos e seus comportamentos mediante as diversas interações que podem ocorrer. Dentre essas técnicas, podem ser citadas a espectroscopia na região do infravermelho médio e próximo, espectroscopia de fluorescência na região do UV/Vís, Fluorescência induzida por Laser e Ressonância Magnética Nuclear.

A caracterização da MOS (Matéria orgânica do solo) é importante para auxiliar na compreensão das alterações da mesma em diferentes situações, tais como manejo do solo ou mesmo com relação à presença de xenobióticos. O uso das técnicas espectroscópicas propicia informações úteis sobre a composição química da matéria orgânica e suas interações (STEVENSON, 1994; OLK et al., 2000; GONZÁLES-PÉREZ et al., 2004; CARVALHO et al., 2004; SENESI, et al., 2009; MILORI et al., 2002; MILORI et al, 2011).

3.8.1 Espectroscopia na Região do Ultravioleta- Visível

De modo a compreender os princípios físicos e químicos que governam a técnica, cabe considerar que a região do Ultravioleta (UV) do espectro da radiação eletromagnética está compreendida entre 200 a 400 nm, e a região do Visível está compreendida entre 400 a 800 nm, com as energias

correspondentes para estas regiões compreendidas entre 150 a 72 kcal mol⁻¹ e entre 72 a 36 kcal mol⁻¹, respectivamente. Energias desta magnitude freqüentemente correspondem às diferenças energéticas entre estados eletrônicos moleculares (PAVIA et al, 2001)

A energia associada com a radiação eletromagnética é definida pela seguinte equação:

$$E = h\nu \quad \text{Eq. 7}$$

onde E é a energia (J), h é a constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ J s) e ν é a freqüência (s).

A radiação eletromagnética pode ser considerada como uma combinação de campos elétricos e magnéticos alternados que são transportados através de um espaço por um movimento de onda. Como a radiação atua como uma onda, ela pode ser classificada em termos de seu comprimento de onda ou de sua freqüência, de acordo com a seguinte equação:

$$\nu = c / \lambda \quad \text{Eq. 8}$$

onde ν é novamente a freqüência, c é a velocidade da luz ($3,0 \times 10^8$ m s⁻¹) e λ é o comprimento de onda (nm). De acordo com a Equação 8, radiação com comprimento de onda curto possui uma alta energia e vice-versa.

Quando a radiação eletromagnética interage com a matéria, um número de processos físico-químicos pode ocorrer, como: reflexão, espalhamento, absorbância, fluorescência/fosforescência (absorção e emissão) e reações fotoquímicas (absorbância seguida de quebra de ligações). Geralmente, o espectro obtido no UV-Visível é somente o de absorção; no entanto, é importante ter em conta os possíveis fenômenos correlatos a estes dois comprimentos de onda para a obtenção de uma correta medida espectrofotométrica.

A absorção da radiação eletromagnética na região do UV-Visível pela matéria causa aumento no conteúdo energético da molécula, com a energia potencial da molécula sendo definida como:

$$E_p(\text{total}) = E_{\text{eletrônica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}} \quad \text{Eq. 9}$$

A quantidade de energia de uma molécula é determinada por uma série de níveis discretos ou estados energéticos, com as diferenças de energia entre os diferentes estados seguindo a seguinte ordem decrescente: $E_{\text{eletrônica}} > E_{\text{vibracional}} > E_{\text{rotacional}}$.

Em algumas moléculas e átomos, fótons de radiação UV-Visível têm suficiente energia para causar transições entre os diferentes níveis eletrônicos; o comprimento de onda desta radiação absorvida é aquele cuja energia é requerida para mover um elétron de um nível energético baixo para um nível energético alto.

Sistemas de ligação simples tendem a exibir transição eletrônica de orbitais ligantes δ para orbitais antiligante δ^* ($\delta \rightarrow \delta^*$) e ocasionalmente transições de elétrons do orbital não-ligante n para δ^* ($n \rightarrow \delta^*$), quando elétrons de n possam estar envolvidos, com as bandas atribuídas a estas transições sendo observadas abaixo de 200 nm. Bandas de absorção atribuídas às transições eletrônicas envolvendo dupla ligação (sistemas π) e elétrons de orbitais n ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$) são mais facilmente observadas acima de 200 nm (PAVIA et al, 2001).

Bandas de absorção também podem surgir de certas moléculas onde a energia requerida para remover um elétron de um átomo e transferi-lo para outro está dentro da região do UV-Visível, sendo de grande importância na determinação de mecanismos intermoleculares de interação. Este processo é conhecido como *excitação por transferência de carga*.

Na Figura 9 é apresentada a distribuição energética das transições eletrônicas.

Figura 9: Níveis energéticos das transições eletrônicas observadas na região do UV-Visível a partir dos orbitais moleculares. Fonte: adaptado de Pavia, Lanpman e Kriz (2001).

Deslocamentos no comprimento de onda e variação na intensidade de absorção devido à interação do analito com o meio (ex.: solvente) são classificados como: *efeito batocrômico* (deslocamento para maiores comprimentos de onda), *efeito hipsocrômico* (deslocamento para menores comprimentos de onda), *efeito hiperacrômico* (aumento na intensidade de absorção) e *efeito hipocrômico* (diminuição na intensidade de absorção) (PAVIA et al, 2001).

A Tabela 3 apresenta as transições energéticas de alguns grupamentos cromóforos.

Tabela 3: Transições eletrônicas e os comprimentos de onda máximos de bandas de grupamentos químicos cromóforos na região do Ultravioleta.

Grupamento Cromóforo	Fórmula Estrutural	Transição Eletrônica	λ_{max} (nm)
Carbonila (cetona)	RR'C=O	$n \rightarrow \pi^*$	271
		$\pi \rightarrow \pi^*$	180
Carbonila (aldeído)	RHC=O	$n \rightarrow \pi^*$	293
		$\pi \rightarrow \pi^*$	190
Carboxila	RCOOH	$n \rightarrow \pi^*$	204
Amida	RC=ONH ₂	$\pi \rightarrow \pi^*$	208
		$n \rightarrow \pi^*$	210
Etileno	RCH=CHR	$\pi \rightarrow \pi^*$	193
Acetileno	RC≡CR	$\pi \rightarrow \pi^*$	173
Nitro	RNO ₂	$n \rightarrow \pi^*$	271

Fonte: adaptado de Settle (1997)^[65] e de Pavia, Lanpman e Kriz (2001)^[79].

Quando a radiação eletromagnética na região do UV-Visível passa através de uma amostra sua quantidade absorvida é a diferença entre a radiação incidente (I_0) e a radiação transmitida (I), sendo expressa como *transmitância* ou como *absorbância* (o termo correto é *absorvância*). A transmitância usualmente é dada em termos de fração da unidade (1) ou como uma porcentagem, e é definida como:

$$T = I / I_0 \quad \text{Eq. 10}$$

Ou

$$\% T = I / I_0 \times 100 \quad \text{Eq. 11}$$

Correlaciona-se logaritmicamente a absorção molecular à transmitância para a operacionalidade analítica do fenômeno:

$$A = -\log T \quad \text{Eq. 12}$$

Para a maioria das aplicações analíticas são utilizados os valores de absorbância, desde que haja uma relação linear entre a absorbância e a concentração molar, conforme estabelecido pela *Equação de Lambert-Beer*.

$$A = \epsilon bc \quad \text{Eq. 13}$$

onde A é a absorbância (adimensional), ϵ é a constante de absorvidade molar ($\text{cm}^{-1} \text{ L mol}^{-1}$), b é o caminho óptico percorrido pela radiação incidida (cm) e c é a concentração molar da espécie absorvedora ou cromófora (mol L^{-1}).

A utilização da Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Visível para os estudos dos AH se dá, dentre outros, para a determinação da razão E4/E6, que é a razão dos valores de absorção a 465 nm e a 665 nm, e no estudo de interação com xenobióticos solúveis em meio aquoso com a absorção da radiação na região do UV se devendo a elétrons de grupamentos aromáticos e carboxílicos, enquanto que a absorção na região do Visível se deve principalmente a grupamentos quinona e ceto-enol. Um exemplo do uso

desta técnica aliada à Polarografia para o estudo da influência das SH na degradação de pesticidas é o caso do *p*-nitrofenol, que é o principal produto da hidrólise do pesticida organoclorado metilparation, de grande uso na agricultura mundial (STEVENSON, 1994; UYGUNER & BEKBOLET, 2005).

O estudo da interação entre o pesticida atrazina e as SH também é um importante exemplo de aplicação aliada às outras técnicas espectroscópicas, como Absorção no Infravermelho Médio e RMN (MARIANA-LUCIO, 2006)

3.8.2 Espectroscopia de Fluorescência na Região do Ultravioleta-Visível

Compostos fluorescentes apresentam espectros eletrônicos que são caracterizados pela energia de transição entre o estado não excitado (fundamental) e o estado excitado da molécula. A transição entre o estado fundamental para o estado excitado corresponde ao espectro de absorção (anteriormente discutido para a Absorção no UV-Visível) e a transição na direção oposta corresponde ao espectro de emissão ou de *luminescência* (CAMPBELL, 1984).

Quando ocorre a absorção de energia e, caso não seja suficiente para ionizar ou dissociar a molécula, esta permanecerá no estado excitado e para retornar o estado fundamental a energia absorvida deve ser dissipada. Isto normalmente ocorre por decaimentos não radioativos em que o excesso de energia é transferido na forma de vibrações, rotações e translações (ATKINS, 2006).

Porém, quando a dissipação de energia pela molécula se dá pela emissão de fótons tem-se um decaimento radioativo que é a *fotoluminescência*. No estado fundamental os elétrons ocupam o mesmo orbital molecular, porém com spins antiparalelos, com o spin resultante (*S*) sendo zero, enquanto que o nível de multiplicidade, definido em módulo como $|2S+1|$, é igual à unidade, com este estado de energia sendo conhecido como estado singleto (*S*). Se a transição para o estado excitado é acompanhada pelo inverso do spin de um dos elétrons, o spin total será unitário e a multiplicidade será três (estado tripleto, *T*). Se a absorção da radiação não trouxer nenhuma mudança na multiplicidade de estados, o estado excitado correspondente será o estado

singleto $S1$. No caso do primeiro estado eletrônico excitado possuir a mesma multiplicidade de spin do estado eletrônico fundamental, a emissão será denominada Fluorescência, e no caso de diferentes multiplicidades a emissão será denominada Fosforescência.

A transição singleto-singleto ($S0 \rightarrow S1$) associada com a absorção da radiação pode resultar em uma transferência de valência de elétrons π da molécula para o orbital π^* ($S0 \rightarrow S\pi-\pi^*$) ou da transferência de elétrons do orbital n de um heteroátomo para um orbital π^* ($S0 \rightarrow Sn-\pi^*$), como para o caso de moléculas contendo $C=C$, $N=N$, $C=N$ e NO_2 .

Em uma molécula pode haver tanto uma transição de um estado excitado $S1$ para o estado fundamental $S0$, com a emissão de radiação, quanto de um estado excitado $T1$ para o mesmo estado fundamental $S0$, por meio de cruzamento intersistema ou *intersystem crossing* (transição entre estados de diferentes multiplicidades). Desde que o tempo de vida de uma molécula excitada no estado $T1$ seja muito maior que no estado $S1$, a probabilidade de perda de energia não-radioativa (conversão energética interna) é muito maior no estado $T1$. O tempo de vida da emissão fluorescente ($S1 \rightarrow S0$) é de 10^{-9} s enquanto que da emissão fosforescente ($T1 \rightarrow S0$) é de 10^{-7} a 10^{-5} s.

A Figura 10 mostra que a energia de emissão é, via-de-regra, menor que a de absorção, processo este conhecido como Deslocamento de Stokes (KRASOVITSKII & BOLOTIN, 1987).

Figura 10: Níveis de energia eletrônicos e vibracionais em uma molécula poliatômica e os caminhos das transições eletrônicas radioativas (absorção, fluorescência e fosforescência) e não-radioativas (conversão interna de energia e intersystem crossing).

A Espectroscopia de Fluorescência na Região do UV-Visível é uma técnica largamente utilizada no estudo das SH (substâncias húmicas), e em particular dos AH (ácidos húmicos), já que estes apresentam uma forte característica de emissão da radiação UV-Visível em função da ocorrência de grande número de sistemas aromáticos conjugados em sua estrutura molecular (McDONALD et al, 2004; PROVENZANO et al, 2004).

Essa técnica já foi empregada para a determinação de tetraciclinas em águas superficiais (LIANG et al, 1999), pois a ligação π dos anéis conjugados da estrutura molecular funciona como doadora de elétrons o que favorece o fenômeno de emissão de radiação (NIJEGORODOV & MABLS, 2000), similar ao caso dos AH.

3.8.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio com transformada de Fourier

A radiação infravermelha corresponde aproximadamente ao comprimento de onda do espectro eletromagnético situado entre as regiões do Visível e das microondas. A região do Infravermelho Médio está compreendida entre os valores de frequência de 4.000 a 400 cm^{-1} .

A radiação infravermelha média converte-se, quando absorvida, em energia de vibração molecular, com o processo sendo quantizado, gerando um espectro vibracional que é composto por uma série de bandas, já que cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a várias mudanças de níveis de energia rotacional (linhas), com estas últimas sendo sobrepostas; são estas bandas de vibração-rotação características de observação desta técnica. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos (SILVERSTEIN, 2000).

As intensidades das bandas de absorção são expressas como transmitância ou absorção. Convencionou-se utilizar os seguintes termos semiquantitativos para a interpretação dos espectros de acordo com a intensidade das bandas: forte (*F*), médio(*m*) e fraco (*f*).

As vibrações moleculares podem ser classificadas em *deformações axiais* (ν) e *deformações angulares* (δ). Uma deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação que faz com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente, enquanto que a deformação angular corresponde a variações ritmadas de ligações que têm um átomo em comum ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao restante da molécula sem que as posições relativas dos átomos se alterem.

A Tabela 4 apresenta regiões de absorção características para os tipos de ligação mais comuns em AH.

Tabela 4: Atribuição de bandas características de deformações e estiramentos vibracionais dos AH.

Posição da Banda (cm^{-1})	Atribuição
3.500 – 3.000	Estiramento intramolecular de O-H e N-H
2.940 – 2.900	Estiramento assimétrico de C-H alifático
1.725 – 1.720	Estiramento de C=O em COOH e cetonas
1.660 – 1.630	Estiramento de grupos amida (banda I da amida) e quinona Estiramento C=O de cetonas conjugadas com ligação de hidrogênio Estiramento de COO^-
1.620 – 1.600	Estiramento de C=C aromático Estiramento de COO^-
1.590 – 1.517	Estiramento simétrico de COO^- e deformação de N-H + estiramento de C=N (banda II da amida)
1.460 – 1.450	Estiramento de C-H alifático
1.400 – 1.390	Deformação de O-H e estiramento C-O de OH fenólico, deformação de C-H em CH_2 e CH_3 e estiramento assimétrico de COO^-
1.280 – 1.200	Estiramento de C-O e deformação de O-H em COOH, estiramento de C-O em éteres de arila
1.170 - 950	Estiramento de C-O em polissacarídeos ou substâncias polissacarídicas

Fonte: adaptado de Stevenson (1994) ^[1].

Fenômenos intermoleculares e intramoleculares que podem influenciar a absorção se dão devido às interações por acoplamento e ligações de hidrogênio. No primeiro caso, que é um acoplamento mecânico intramolecular de osciladores, tem-se a formação de duas vibrações fundamentais de deformação: o modo simétrico e o modo assimétrico, onde o modo simétrico não produz alteração no momento dipolo da molécula (μ) sendo inativo, enquanto que o modo assimétrico produz alteração em μ , sendo observado no Infravermelho Médio; as bandas características de grupamentos químicos úteis para a identificação da estrutura molecular envolvem, freqüentemente, as vibrações acopladas, tanto as deformações angulares quanto as axiais.

Já para o caso das ligações de hidrogênio, é necessário ressaltar que este tipo de ligação ocorre em qualquer sistema que contenha um grupo doador de prótons (A-H) e um grupo aceptor de prótons (B), desde que ocorra interação efetiva entre o orbital *s* do hidrogênio e orbitais *p* ou π do grupo aceptor. Os átomos A e B devem ser eletronegativos e B deve possuir pelo menos um par de elétrons livres. Exemplos de doadores: COOH, OH, R-NH₂ e CONH₂; exemplos de aceptores: O, N e X; em grupos insaturados C=C pode atuar como aceptor de prótons. A ligação é mais forte quando o grupo doador de prótons e o eixo do par de elétrons livre estão em uma mesma linha, com a força de ligação sendo inversamente proporcional à distância entre A e B. Do ponto de vista molecular, a ligação de hidrogênio altera a constante de força de ambos os grupos nela envolvidos, e assim, alteram-se as frequências de deformação axial e angular.

As bandas de deformação axial de A-H deslocam-se para menores frequências (maiores comprimentos de onda), seguido de aumento de intensidade e alargamento de banda; a frequência da deformação axial do aceptor também diminui, porém o deslocamento é menos pronunciado. A vibração de deformação angular de A-H usualmente desloca-se para menores frequências, porém, o deslocamento é menor do que o das deformações axiais. As ligações de hidrogênio intermoleculares envolvem a associação de duas ou mais moléculas do mesmo composto ou de compostos diferentes, com a formação da ligação podendo produzir dímeros (ex.: ácidos carboxílicos) ou polímeros, como em soluções puras ou concentradas de alcoóis monohidroxílicos (SILVERSTEIN, 2000).

Por outro lado, formam-se ligações intramoleculares toda vez que o doador e o aceptor estão na mesma molécula e em uma relação espacial tal que permita a superposição de orbitais, como no caso de anéis de cinco ou seis átomos, com a formação da ligação dependendo da temperatura; bandas intramoleculares tendem a desaparecer com a diminuição da concentração molecular abaixo de 0,01 mol L⁻¹.

Um aspecto importante da ligação de hidrogênio envolve a interação entre grupos funcionais do solvente e do soluto, fazendo-se necessário especificar o soluto utilizado.

Esta técnica espectroscópica tem sido comumente utilizada no estudo da interação da MO do solo com xenobióticos como agrotóxicos e antibióticos, fornecendo resultados confiáveis a respeito dos mecanismos de interação envolvidos (KULSHRESTHA, 2004; BASSET et al, 1994; BAUER et al, 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SOLO BRUTO: DA COLETA À CARACTERIZAÇÃO

4.1.1 Amostras de solo

A coleta de amostras de solo foi realizada na Fazenda Canchim, onde se encontra instalada a sede da Embrapa Pecuária Sudeste, na cidade de São Carlos-SP, entre as coordenadas geográficas 21°55' e 22°00' Sul, 47°48' e 47°52' Oeste. O clima ocorrente é considerado como tropical de altitude, Cwa, segundo a classificação de Köppen-Geiger: quente com inverno seco. Há predominância de solos classificados como Latossolos Vermelho-Amarelo. A amostragem realizada foi a composta, pertencente aos horizontes O/A do solo, em uma profundidade de até 10 cm.

Tais amostras caracterizam-se por apresentarem texturas predominantemente argilosas ou arenosas, e serem oriundas de áreas de pastagem e área nativa de mata Atlântica ou cerrado. Pretendeu-se estabelecer um comparativo entre o comportamento dos compostos de estudo (APC's) com a matéria orgânica do solo mediante dois tipos distintos de manejo do solo, caracterizados por área de pastagem e mata nativa, levando-se em consideração, portanto, a atividade antrópica que se dá de modo mais intenso para o primeiro cenário.

Após a coleta, realizada entre a profundidade de 0 e 10 cm, as amostras foram secas à temperatura ambiente, moídas com auxílio de almofariz e pistilo e passadas em peneira de abertura de 2 mm para a obtenção da fração de terra fina seca ao ar (TFSA). Em seguida, parte dessas amostras de solo foi moída e passada em peneira de 100 mesh para análises espectroscópicas e análise elementar.

Ao longo do trabalho, será adotada a seguinte nomenclatura para se referir às amostras:

P_{aren} e **P_{arg}**: Amostras coletadas sob área de pastagem, de caráter arenoso e argiloso, respectivamente,

MN_{aren} e **MN_{arg}**: Amostras coletadas sob área de mata nativa, de caráter arenoso e argiloso, respectivamente.

4.1.2 Fracionamento Químico

As substâncias húmicas (SH) do solo foram extraídas segundo SWIFT *et al.*, (1996), partindo-se de 200 g de TFSA de amostra, após ter sido passada em peneira de 0,5 mm.

O valor de pH de cada amostra foi ajustado para 1-2 com adição de HCl 1 mol L⁻¹. O volume da solução foi ajustado com HCl 0,1 mol L⁻¹ até atingir uma concentração final com uma relação de 10 mL de líquido por 1g de TFSA. A solução foi agitada manualmente durante uma hora e, após deixar a solução em repouso, separou-se o sobrenadante por sifonação. O sobrenadante separado que seria utilizado para extração de ácidos fúlvicos (AF), foi descartado após neutralização.

Ao solo residual foi adicionado NaOH 0,1 mol L⁻¹, resultando no final uma relação solo-solução 10:1. A solução foi agitada durante 4 horas. A seguir, a suspensão ficou em repouso por 16 horas e o sobrenadante foi isolado através de uma centrifugação (10000 rpm – 10 min) e reservado para posterior acidificação. O material insolúvel, composto da fração mineral e humina, também foi descartado.

O sobrenadante isolado foi acidificado com HCl 6,0 mol L⁻¹, com agitação simultânea até atingir pH 1,0 e mantido novamente em repouso por 16 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada (10000 rpm – 10 min) para separar o AH (precipitado) e as frações de AF, sendo que as frações de AF foram descartadas.

A fração de AH foi redissolvida através da adição de um pequeno volume conhecido de KOH 0,1 mol L⁻¹. Adicionou-se 1,5 g KCl sólido, atingindo uma concentração de K⁺ de 0,3 mol L⁻¹. Após, centrifugou-se a solução sob

alta velocidade (15000 rpm – 10 min) para que os sólidos suspensos fossem removidos.

O AH foi então reprecipitado, adicionando-se HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ com agitação simultânea até que fosse atingido pH 1,0-1,5, e após, a suspensão foi mantida em repouso por 16 horas. Centrifugou-se a solução (10000 rpm – 10 min) e o sobrenadante foi então descartado. O precipitado (AH) foi suspenso em solução HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + HF $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ num recipiente plástico e agitado durante 16 horas a temperatura ambiente.

A seguir a solução foi centrifugada (10000 rpm – 10 min) e o precipitado foi transferido para uma membrana de diálise (Spectra/Por 6000 – 8000Da), preparada utilizando água deionizada. Procedeu-se a diálise contra água deionizada até que a água de diálise apresentasse teste negativo de Cl^- com nitrato de prata. Para isso, tal procedimento foi mantido durante aproximadamente cinco dias, fazendo-se a troca da água deionizada duas vezes por dia.

Após a diálise, as amostras foram congeladas e liofilizadas e o sólido obtido (AH) foi reservado para posteriores análises.

4.1.3 Análise Elementar

A determinação de carbono do solo foi realizada em triplicata, utilizando-se 10 mg das amostras de solo inteiro, por combustão a 1000°C . O equipamento de análise elementar é um CHNS/O da marca Perkin Elmer modelo 2400, pertencente à Embrapa Instrumentação, operando em modo CHN. As amostras de solos foram moídas em partículas menores do que 0,15 mm (100 mesh) e, pesadas diretamente em cápsulas de estanho, utilizando uma microbalança (PerkinElmer AD-6 Auto Balance Controller), que é conectada ao equipamento para aquisição direta das massas. Em seguida, as cápsulas de estanho foram fechadas e inseridas no interior do forno. Todos os resultados para a análise elementar com base em um valor de um padrão conhecido, a acetanilida, um padrão orgânico de composição elementar conhecida (SANTOS, 2010).

4.1.4 Análise Granulométrica

A percentagem das frações areia, silte e argila das amostras foram determinadas em um analisador granulométrico automático de raios gama, segundo a metodologia desenvolvida por Vaz e colaboradores (1992). O equipamento opera baseando-se na atenuação de um feixe de raios gama pelas partículas dispersas em sedimentação. Após secagem, pesou-se 40 g de solo e o material foi deixado em contato com 10 mL de NaOH, 1 mol L⁻¹, por uma noite. Em seguida, permaneceu em agitação por 16 horas em agitação de rotação lenta (agitador tipo Wagner). As amostras em seguida foram colocadas em recipientes especiais de acrílico e introduzidas na plataforma do equipamento para análise. Os resultados foram armazenados em um arquivo de texto contendo dados de concentração e diâmetro de partícula (VARANDAS, 2010).

4.1.5 Difração de Raios - X

As amostras de solo em estudo foram peneiradas a 0,5 mm e analisadas para avaliação do perfil mineralógico, pelo método do pó, empregando-se um Difrator de Raios-X da marca Shimadzu XDR 6000 operado com radiação Cu- α $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, tensão de 30 kV, corrente de 30 mA, com velocidade contínua de 2°(2 θ)/min, com variação do ângulo na faixa de 10 a 80°(2 θ) (SOARES, 2009).

4.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia- Dispersiva (EDS)

De modo a complementar os resultados obtidos pela difração de raios-X, as amostras de solo bruto também foram submetidas à análise de Espectroscopia de Energia dispersiva (EDS), para caracterizar também os elementos presentes e suas quantidades estimadas. Para as imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura, utilizou-se um equipamento Zeiss FE-SEM Supra 35, operado com tensão de 15 kV e as imagens foram coletadas utilizando o detector de elétrons secundário.

4.1.7 Determinação do teor de macro e micronutrientes

As análises básicas das amostras de solo, além das análises com relação ao teor de macro e micronutrientes foram realizadas pelo laboratório de Solos da Embrapa Pecuária Sudeste, o qual atua com prestador de serviços e segue metodologias estabelecidas pela literatura, conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Características físico-químicas e teor de macro e micronutrientes dos solos estudados

Propriedade	Unidade	MN _{aren}	MN _{arg}	P _{aren}	P _{arg}
pH(CaCl ₂)	-	5,1	5,2	4,3	4,9
M.O.	g dm ⁻³	44	80	31	42
C.T.	g dm ⁻³	26	46	18	24
P	mg dm ⁻³	12	8	6	11
K	mmolc dm ⁻³	1,9	3,0	1,3	1,9
Ca	mmolc dm ⁻³	45	57	7	19
Mg	mmolc dm ⁻³	16	20	3	7
H + Al	mmolc dm ⁻³	25	42	42	35
Al	mmolc dm ⁻³	1	1	3	3
S.SO ₄	mg dm ⁻³	11	18	5	7
SB	mmolc dm ⁻³	63	80	11	28
CTC	mmolc dm ⁻³	88	122	53	63
V	%	71	66	21	44
B	mg dm ⁻³	0,37	1,06	0,23	0,31
Cu	mg dm ⁻³	0,7	7,2	1,0	2,9
Fe	mg dm ⁻³	42	31	61	17
Mn	mg dm ⁻³	29,4	33,8	7,2	14,7
Zn	mg dm ⁻³	2,9	1,3	0,5	0,9

4.1.8 Fluorescência Induzida por Laser (FIL) – Laser Induced Fluorescence (LIF)

Tal técnica foi empregada de modo a realizar a avaliação do grau de humificação da matéria orgânica do solo. Os espectros de emissão de LIF

foram obtidos a partir de amostras de solo secas à temperatura ambiente, posteriormente moídas e peneiradas com abertura de malha de 100 mesh (TFSA). Em seguida, pesou-se em torno de 0,5 g de cada amostra, as quais foram prensadas a 10 ton de pressão por 2 minutos para formar pastilhas. Para cada amostra de solo foram preparadas duas pastilhas. A utilização de pastilhas de solo se dá por conta de sua fácil manipulação, além da superfície plana das suas faces (MILORI et al., 2002, 2004, 2006).

As medidas foram realizadas em triplicata para as amostras pastilhadas de solo inteiro, utilizando-se o espectrômetro LIF portátil. Os parâmetros adotados nas análises foram:

- Intervalo de varredura entre 475 e 800 nm;
- Tempo de integração: 30 ms;
- Boxcar: 4;
- Average: 5.

O cálculo para obtenção do índice de humificação pela metodologia de LIF se dá pela razão entre o valor da área sobre a curva de fluorescência (ACF), com excitação em 458 nm, e o valor de carbono orgânico total (COT) presente na amostra de solo inteiro (Milori et al., 2004, 2006; SANTOS, 2014), ou seja:

$$H_{FIL} = \frac{ACF}{COT} \quad \text{Eq. 14}$$

A adoção da área sobre a curva de fluorescência (ACF) como parâmetro para estimativa da humificação se baseia na metodologia para análise de fluorescência de AH em solução proposta por Milori et al. (2002), ou seja, o índice de humificação A_{465} .

4.2 Caracterização dos ácidos húmicos extraídos

4.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio (FTIR)

Para as medidas por FTIR, as amostras de ácido húmico (AH) foram analisadas em pastilhas (STEVENSON, 1994), utilizando espectrômetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum 1000. As pastilhas foram preparadas na proporção de 1 mg de amostra de AH para 100 mg de KBr, maceradas e prensadas em pastilhador, por 2 minutos em prensa hidráulica com carga equivalente a 6 toneladas. Os espectros foram obtidos a partir de 64 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ^{13}C RMN em estado sólido foram obtidos utilizando a seqüência de ^{13}C RMN, CP com amplitude variável (VA) e MAS, empregando uma sonda de sólido da Doty. A frequência de ressonância foi 100,58 MHz (^{13}C), a banda espectral utilizada para a CP foi de 50 kHz, tempo de contato de 1 ms, tempo de relaxação de espera de 500 ms, tempo de aquisição de 0,0128 ms. A varredura foi de 0-230 ppm. As amostras de ácidos húmicos foram medidas em rotores cilíndricos de zircônia com diâmetro de 5 mm carregados com aproximadamente 100 mg da amostra, com MAS de 6,4 KHz. A rampa no canal de ^1H foi de 110 a 60% (em KHz) da condição de Hartman-Hahn (NOVOTNY, 2002). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao tetrametilsilano e foi utilizado hexametilbenzeno (HMB) como referência externa. Os espectros foram divididos em 7 regiões: 0 – 45 ppm (alifáticos não substituídos), 45 – 60 ppm (metoxil e N-alifáticos), 60 – 110 ppm (O-alifáticos), 110 – 140 ppm (aromáticos), 140 – 160 ppm (fenólicos), 160 – 185 ppm (carboxílicos) e 185 – 230 ppm (carbonílicos), integrando-se as áreas e calculando-se a intensidade de cada região em relação à área total do espectro. As porcentagens de aromaticidade e alifaticidade foram calculadas a partir das áreas dos espectros, segundo Stevenson (1994). Os espectros de ^{13}C RMN de estado sólido foram obtidos em um espectrômetro Varian (Unity 400), que opera em 400 MHz para o ^1H (SANTOS, 2014).

4.3 Desenvolvimento de Método para determinação de oxitetraciclina por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas e Validação do método

Para a determinação do antibiótico de estudo, utilizou-se um cromatógrafo Líquido acoplado a um Espectrômetro de Massas, marca Varian 310 - MS, com fonte de nebulização por eletrospray e detecção por triplo quadrupolo, operando em modo positivo, tendo 1035 V e 60 V como energia do detector e capilar, respectivamente, e temperatura do *drying gas* igual a 400°C. Usou-se uma coluna cromatográfica Pursuit C₁₈ – RP, de dimensões 100 x 2,0 mm, e partículas de 5,0 µm.

Foram realizados testes preliminares envolvendo equipamentos de diferentes sistemas de detecção e colunas, fases móveis e outros parâmetros, de modo a considerar as peculiaridades do composto em estudo. Por fim, adaptou-se a metodologia sugerida por Alfredsson e colaboradores (2005).

Uma vez estabelecido o método para determinação e quantificação do analito, foram conduzidos ensaios preconizando a extração do mesmo, partindo-se de amostras de solo bruto, para avaliação da recuperação.

Inicialmente, como não se conhecia propriamente metodologias específicas para extração de OTC em solos, trabalhou-se com uma metodologia adaptando-se o método QuEChERS (MACEDO, 2012), onde, resumidamente, uma massa de solo foi fortificada com o composto, em meio de metanol e solução tampão de McIlvaine, seguido de sonicação e adição de sais (sulfato de magnésio e cloreto de sódio), com posterior adição de acetonitrila e centrifugação (MACEDO, 2012). Testou-se também a metodologia adaptada de Zhao et. al (2010), que compreende etapas sucessivas de sonicação, vórtex e centrifugação das amostras de solo fortificadas. Posteriormente, seguiu-se a adaptação dos métodos de Freitas (2011) e Macedo (2012), que analisaram oxitetraciclina e sulfas em leite. O método contemplava etapas já realizadas anteriormente, acrescentando-se o emprego da amina primária-secundária (PSA). Contudo, os testes realizados não demonstraram boa performance, atingindo taxas de recuperação inferiores a 30%, o que sugere a necessidade de que novos estudos sejam desenvolvidos nesse contexto.

O método adaptado de Alfredsson et al (2005) consiste na utilização de metanol e solução aquosa de ácido oxálico 0,1 mM e ácido fórmico 0,2% como fase móvel. O gradiente iniciou-se com a fase aquosa na proporção de 90% por 2,5 minutos, decrescendo para 25% por 4,5 minutos e retornando a 90% por mais 3 minutos, a um fluxo de $300 \mu\text{L min}^{-1}$ totalizando 10 minutos de corrida. O tempo de retenção da oxitetraciclina foi de 6,2 minutos.

O reagente oxitetraciclina (OTC.HCl), de pureza igual a 85%, foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). As soluções do antibiótico eram preparadas em metanol grau MS, estocadas em freezer por até dois meses e protegidas da luz.

Primeiramente, construiu-se uma curva analítica para avaliar a linearidade do equipamento, e para tal empregou-se soluções de oxitetraciclina em meio aquoso nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 200 e $400 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a construção das curvas envolvendo o extrato aquoso de solos, os mesmos foram previamente peneirados, e agitados durante 24 horas com tampão BR em pH 5,0 sendo a razão solo/solução de 1:10 (m/v). Os extratos aquosos foram obtidos por centrifugação, filtrados e fortificados em triplicata, partindo-se da solução estoque de oxitetraciclina e preparando-se as concentrações finais de 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e $100,0 \text{ mg L}^{-1}$. Posteriormente, os valores de LD e LQ foram determinados. A precisão do método intra-dias, considerada como sendo a estimativa do desvio padrão relativo (DPR), foi realizada fortificando-se amostras de extrato aquoso de solo após 24 horas de equilíbrio de mistura solo/solução e avaliando-se a concentração do antibiótico a 10 mg L^{-1} . As medidas foram realizadas com amostras independentes em quintuplicata, utilizando-se o mesmo equipamento e executadas pelo mesmo analista. Já a precisão inter-dias foi conduzida com amostras independentes, na mesma concentração e em triplicata, ao longo de três dias diferentes, também executadas pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. As amostras, após centrifugação, eram filtradas e a concentração posteriormente determinada através das condições cromatográficas descritas anteriormente.

4.3.1 Aplicação do método: Ensaios de Sorção (Solo Bruto)

A solução empregada durante os ensaios realizados foi o tampão Britton-Robinson (BR) 40 mmol L⁻¹. Tal solução foi escolhida por se tratar de um tampão universal e cuja capacidade tamponante encontra-se entre pH 2 e 12, atendendo aos valores de pH de interesse no estudo conduzido e uniformizando as soluções utilizadas em cada condição, evitando que espécies químicas diferentes fossem adicionadas ao meio e pudessem influenciar de alguma forma. Seu preparo consistiu na mistura dos ácidos bórico, acético e fosfórico e azida sódica a 1,5 mmol L⁻¹ (PEREIRA, 2012). O ajuste para o valor de pH de interesse se deu por meio da adição de solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. Optou-se nos ensaios de sorção pelos valores de pH iguais a 2,5 e 5,0 no intuito de trabalhar com o antibiótico em suas formas moleculares aniônicas ou catiônicas predominantes.

Seguindo as diretrizes estabelecidas pela OECD 106 (2000) para ensaios de sorção, pesou-se 2,5 g das amostras dos solos de estudo em triplicata, em tubos tipo Falcon. A cada tubo foram adicionados 20 mL de tampão BR, para cada valor de pH estabelecido. Os tubos, protegidos de luz, foram mantidos sob agitação, em agitador horizontal a 25°C por 24 horas, para equilíbrio da solução. Posteriormente, fortificou-se cada tubo com 5 mL de solução de OTC, preparada na mesma solução tampão, de modo que as concentrações finais nos tubos fossem iguais a 5, 10, 20, 25 e 50 mg L⁻¹. A fortificação final dos solos ficou entre 0,125 e 1,25 mg g⁻¹.

Após 24 horas de agitação, as amostras foram centrifugadas e filtradas, e as alíquotas foram analisadas, para que as isotermas de sorção pudessem ser construídas.

4.3.2 Ensaio de sorção com os ácidos húmicos extraídos

Seguindo-se o mesmo meio reacional utilizado para os ensaios envolvendo o solo bruto, preparou-se soluções do tampão BR (Britton-Robson) 40 mmol L⁻¹, com valores de pH iguais a 2,5; 5,0 e 8,5.

Pesou-se 1,2 mg de cada amostra de ácido húmico em tubos Falcon, adicionando-se em seguida 15 mL da solução tampão ajustada para cada valor de pH de interesse e em triplicata. Os tubos foram protegidos da luz, e

permaneceram por 24 horas em agitador horizontal. Após este período, adicionou-se a cada tubo 5 mL de uma solução de oxitetraciclina de concentração igual a 8 mg L^{-1} , de modo que a concentração final de cada tubo atingisse 2 mg L^{-1} . Os tubos contendo o antibiótico e os AH's foram agitados por mais 24 horas. Foram mantidos em agitação também tubos com ácidos húmicos em solução, em triplicata, sem o antibiótico ("brancos"), de forma que pudessem ser realizadas as análises de comparação.

Após o tempo de agitação mencionado, os tubos foram mantidos refrigerados e as soluções foram analisadas por Espectroscopia na região do ultravioleta-visível e Fluorescência na região do ultravioleta-visível, além da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Em seguida, as mesmas foram congeladas e liofilizadas, para serem analisadas por Espectroscopia na região do infravermelho médio (FTIR).

Diferentemente dos ensaios de sorção empregando-se solo bruto, estabeleceu-se para o ensaio com os ácidos húmicos a razão AH-OTC como sendo a mesma empregada em outros estudos envolvendo tais compostos e xenobióticos (VAZ-JUNIOR, 2010).

4.4 Utilização de técnicas espectroscópicas na avaliação das interações oxitetraciclina – ácidos húmicos

4.4.1 Espectroscopia da região do infravermelho médio

Utilizou-se um espectrômetro modelo SPECTRUM 1000, marca PERKIN ELMER, para a caracterização dos grupos funcionais. Os espectros foram obtidos a uma resolução de 4 cm^{-1} , 64 varreduras e em intervalo de número de onda de 4.000 a 400 cm^{-1} .

As pastilhas foram preparadas utilizando os ácidos húmicos em tampão, na presença ou não da OTC e liofilizados, na proporção de 1mg de amostra e 99 mg de brometo de potássio (SANTOS, 2014).

4.4.2 Espectroscopia na região do UV-Vís

As análises das soluções após sorção foram conduzidas em espectrofotômetro modelo UV-1601- C marca SHIMADZU, em um intervalo de comprimento de onda de 190 a 800 nm. No momento das leituras, quando necessárias, eram realizadas diluições para que os espectros não ultrapassassem a absorbância igual a 1 (VAZ-JUNIOR, 2010; SANTOS, 2014).

4.4.3 Espectroscopia de fluorescência na região do UV-Vis

As soluções contendo AH em tampão na presença ou não de OTC, após o período de agitação, foram analisadas de modo a investigar as diferenças proporcionadas pelas interações AH-OTC nas amostras estudadas. Para tal, utilizou-se um espectrômetro modelo LS50B PERKIN ELMER, com largura de fenda para todos os monocromadores de 10 nm e velocidade de varredura de 120 nm min^{-1} (SWIFT, 1996; SANTOS, 2014).

De modo a descartar a influência do “*inner effect*”, o qual se trata de possíveis sinais cujos efeitos seriam proporcionados pelos filtros internos, avaliou-se para os ácidos húmicos estudados a concentração adequada para a continuidade das medidas, a qual foi correspondente a 10 mg L^{-1} . Para se atingir tal concentração, as amostras correspondentes ao ensaio de sorção dos ácidos húmicos e OTC foram diluídas.

Para a aquisição dos espectros, os modos bidimensionais empregados foram:

- **Emissão:** excitação em 240 nm, com filtro de 290nm *cut-off* e intervalo de emissão entre 300-650 nm, tendo o comprimento de onda da emissão sendo varrido;
- **Varredura Sincronizada:** variação do comprimento de onda ($\Delta\lambda$) igual a 55 nm e também a 20 nm, com intervalo de varredura entre 240 - 500 nm, com os monocromadores de excitação e emissão sendo varridos simultaneamente a uma diferença de comprimento de onda fixa (SANTOS, 2014; MILORI et al, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostras de Solo

5.1.1 Análise Granulométrica

A avaliação textural das amostras também possibilita um melhor conhecimento acerca de suas propriedades e pode auxiliar na compreensão do comportamento dessas matrizes com xenobióticos, como os medicamentos veterinários, os quais são o interesse deste trabalho. A Figura 11 ilustra a distribuição granulométrica acumulada para as amostras.

Figura 11: Distribuição granulométrica acumulada para as amostras de estudo (MN: mata nativa e P: pastagem)

Na Tabela 6, podem ser observadas as percentagens obtidas para as amostras, com relação aos teores de areia, silte e argila. Segundo a Pirâmide textural, as amostras atendem às classificações: argilosa, para as áreas de mata nativa e pastagem (MN arg e P arg) e franco-arenosa, para as amostras MN e P aren.

Tabela 6: Percentagens de argila, silte e areia para as amostras

Solo	Argila (%)	Silte (%)	Areia (%)
MN arg	45,3	14,5	40,2
MN aren	28,2	2,9	68,9
P arg	49,2	8,8	42,0
P aren	34,8	2,3	62,9

5.1.2 Difração de Raios – X

A técnica de Difração de Raios-X (DRX) possibilita igualmente o conhecimento do perfil da amostra, no que diz respeito à mineralogia. A Figura 12 apresenta os difratogramas das amostras, constando a predominância e tendência da presença de determinados minerais.

Todas as amostras caracterizam-se pela presença de material silicatado (quartzo - Qz). Os minerais identificados nos difratogramas correspondem basicamente à gibbsita (Gb), Hematita (Hm), goethita (Gt) e caulinita (Ca), característicos de Latossolos (caso das amostras analisadas).

Tal classe de solo caracteriza-se por ocupar mais de 50% do território brasileiro, constituindo, nesse aspecto, a ordem mais importante do país. São solos que apresentam elevado estágio de intemperismo. De modo geral, são solos relativamente ácidos, com elevados teores de quartzo, alumínio e ferro (CALDERANO-FILHO et al, 1998; VARANDAS, 2010).

Os sinais da caulinita e da hematita são mais pronunciados nos difratogramas relativos aos solos argilosos, que possuem a característica de maior capacidade de troca de cátions (CTC) (PEDRON, 2007; SOARES, 2009).

Figura 12: Difratogramas das amostras de solo evidenciando, em caráter preliminar, o perfil mineralógico das mesmas onde Ca= caulinita; Gb= gibbsita; Hm= hematita; Qz= quartzo.

5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia- Dispersiva (Energy Dispersive Spectroscopy - EDS)

De forma a complementar os resultados obtidos por meio da difração de raio X, encontram-se na figura 13, as imagens obtidas por MEV.

Embora seja de caráter predominantemente qualitativo, os resultados obtidos por EDS, quando da varredura das imagens provenientes do MEV, são capazes de estimar a presença e abundância de alguns elementos nas amostras de estudo, conforme mostra a Tabela 7.

Os elevados teores de ferro, alumínio e silício também corroboram com os resultados obtidos por difração de raios-X, evidenciando características típicas de latossolos.

Figura 13: Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras de solo, onde A e B correspondem a MN arg e MN aren; C e D correspondem a P arg e P aren.

Tabela 7: Relações de sinal dos elementos constituintes das amostras de solo investigadas

Elemento	<i>MN arg (%)</i>	<i>MN aren (%)</i>	<i>P arg (%)</i>	<i>P aren (%)</i>
C	5,74	20,62	26,24	23,92
O	48,73	50,04	48,21	50,29
Mg	0,10	0,09	--	0,09
Al	16,77	10,53	9,89	10,58
Si	5,15	11,51	5,20	8,61
P	0,15	0,10	0,09	0,09
Ca	0,41	0,23	0,09	--
Ti	2,95	1,13	1,27	1,11
Fe	19,39	4,71	7,48	4,71
S	--	0,07	--	--
K	--	0,08	--	--
Cu	--	0,88	0,85	0,60
Zn	--	--	0,67	--

A Figura 14 ilustra a abundância estimada para esses elementos (ferro, alumínio e silício, respectivamente) na varredura feita nas imagens obtidas, para a amostra de Mata Nativa- Argilosa, por exemplo.

Figura 14: Estimativas da distribuição da abundância de ferro, alumínio e silício provenientes da análise de EDS e imagem de MEV para a amostra MN arg (Mata Nativa – Argilosa).

5.1.4 Análise Elementar

As amostras coletadas foram analisadas empregando-se um Analisador Elementar, operando no modo CHN. Para a área de Mata Nativa, em decorrência do maior aporte de cobertura vegetal e praticamente sem influência antrópica, foram observados os teores de carbono ligeiramente mais elevados, independente da característica textural, tratando-se de um comportamento típico desse ambiente. Com relação aos teores de nitrogênio, os quais correspondem fundamentalmente à fração da matéria orgânica, são ligeiramente maiores para as amostras de solo provenientes de mata nativa, mas encontram-se, ainda, próximos ao limite de detecção do equipamento. A Tabela 8 apresenta os teores de carbono e nitrogênio para as amostras iniciais.

Tabela 8: Teores de Carbono e Nitrogênio obtidos para as amostras coletadas, caracterizadas por ambientes de pastagem (P) e mata nativa (MN), predominantemente arenosas (aren) ou argilosas (arg)

Amostra	Teor de carbono (%C)	Teor de nitrogênio (%N)
P aren	2,34 ±0,08	0,23 ±0,03
P arg	2,26 ±0,03	0,20 --
MN aren	3,73 ±0,02	0,56 ±0,01
MN arg	4,84 ±0,07	0,32 ±0,15

5.1.5 Fluorescência Induzida por Laser (FIL) – Laser Induced Fluorescence (LIF)

Esta técnica aplicada a solos tem se mostrado como uma grande aliada na análise da MO de solos inteiros, através de resultados obtidos de forma rápida, limpa e em condições muito próximas às condições naturais (MILORI et al. 2006). Neste estudo, a FIL foi aplicada às amostras de solos inteiros de modo a se obter informações acerca do grau de humificação da matéria orgânica do solo. Obteve-se o índice de humificação (H_{FIL}) como na equação do item 4.1.8, e cujos resultados estão apresentados na figura 15.

Figura 15: Índices de Humificação (H_{FIL}) para as amostras de solo bruto MN_{aren} , MN_{arg} , P_{aren} e P_{arg}

O grau de humificação se torna um indicador da estabilidade da MO decorrente do seu processo de decomposição, o qual está relacionado, mais especificamente, à oxidação dos polissacarídeos das plantas, preservação de compostos orgânicos mais recalcitrantes como a lignina, estruturas fenólicas e compostos de origem microbiana (MILORI et al., 2002).

As amostras de pastagem e mata, ambas de caráter predominantemente arenosas apresentaram os maiores índices de humificação. O aumento da aromaticidade da matéria orgânica nas frações de maior caráter arenoso, de partículas entre 2-20 μm e 20-53 μm , principalmente com a intensificação do revolvimento do solo e aporte constante de matéria orgânica fresca, o “turnover”, sugere a decomposição preferencial de frações alifáticas da matéria orgânica pela biota do solo, resultando assim em um incremento relativo de estruturas recalcitrantes (SANTOS, 2014). Em frações do solo com partículas < 2 μm , seria provavelmente a fração mineral por meio de proteção física, o fator determinante de sua estabilidade.

5.2 Caracterização dos ácidos húmicos extraídos

5.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio (FTIR)

Os espectros de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) das amostras em estudo, ilustrados na figura 16, apresentam muitas semelhanças entre si. Os mesmos podem ter suas bandas atribuídas do ponto de vista orgânico e inorgânico, através dos grupamentos funcionais observados.

Figura 16: Espectros de Infravermelho Médio provenientes dos ácidos húmicos extraídos

Do ponto de vista das absorções inorgânicas, mais intensas nos espectros, podem ser observadas e identificadas as seguintes regiões: entre 1900 e 1700 cm^{-1} tem-se os sinais que podem estar relacionados a quartzo e os minerais caulinita, silicatos, hematita e illita apresentam absorções peculiares na região entre 1100 e 400 cm^{-1} . Como a FTIR é uma técnica qualitativa, os resultados estão de acordo com o observado por DRX, do ponto de vista mineralógico. Do ponto de vista de estruturas orgânicas, os sinais observados entre a região de 3000 cm^{-1} e 3300 cm^{-1} , correspondem a estiramentos O-H provenientes de álcoois e fenóis e N-H de compostos lactâmicos. A região de 2900 e 2000 cm^{-1} corresponde aos estiramentos assimétricos de ligações C-H presentes em CH_2 e CH_3 . As absorções na região entre 1600 e 1400 cm^{-1} estão associadas a grupamentos carbonílicos e deformações angulares de amidas. Observam-se também os estiramentos correspondentes a OH fenólico entre 1.400 a 1.390 cm^{-1} de OH em COOH entre 1280 a 1200 cm^{-1} . Em torno de 1200 cm^{-1} encontram-se absorções correspondentes a grupos metílicos e O-H e entre 1100 a 1250 cm^{-1} , encontram-se os estiramentos provenientes de C-O de polissacarídeos. Na região aproximada de 1000 cm^{-1} , observam-se as deformações angulares assimétricas no plano de grupos *t*-butila e para a região em torno de 700 cm^{-1} , estão associadas às deformações angulares assimétricas fora do plano de ligações C-H. De maneira geral, os espectros são similares, diferindo principalmente nas bandas de frações inorgânicas, caracterizadas por possuírem formato do tipo “sharp”.

5.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Um dos parâmetros importantes obtidos por ^{13}C RMN é o índice (ou grau) de aromaticidade (I.A.), o qual estabelece a relação de sinal obtido para os grupos aromáticos (110-160 ppm) em relação aos alifáticos (0-110 ppm) (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004). Valores de IA elevados correspondem a maiores graus de humificação da matéria orgânica do solo. O aumento da aromaticidade é uma das principais transformações químicas decorrentes do aumento do processo de humificação e estabilização dos MOS, e pode estar associado a efeitos deletérios de aceleração da taxa de mineralização da MO

lável, com acúmulo relativo de estruturas mais recalcitrantes (STEVENSON, 1994; MILLORI et al., 2002). De acordo com esta técnica, valores de I.A. mais elevados correspondem a maiores graus de humificação da matéria orgânica do solo. Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que o solo oriundo de mata, de caráter predominantemente argiloso, apresenta o maior índice de aromaticidade dentre as demais amostras, seguido da amostra de pastagem, também de caráter argiloso. Ambas amostras apresentaram um teor maior de aromaticidade, provavelmente em decorrência da composição do material orgânico adicionado e da estabilização do mesmo. Tal fator depende a composição da MOS, pois pode conter compostos de fácil oxidação, bem como aqueles pouco susceptíveis à decomposição (PEREIRA, 2012).

Já as amostras de caráter arenoso, independente de serem oriundas de pastagem ou mata, apresentaram IA inferiores, inferindo que em sua constituição provavelmente houve a predominância da incorporação de material derivado de compostos alifáticos e polissacarídeos, provenientes das fibras vegetais presentes.

Cabe ressaltar que além do fator manejo do solo, a magnitude do mecanismo de proteção física por oclusão dos agregados também é dependente da textura do solo. Em solos argilosos, a capacidade de proteger fisicamente a matéria orgânica particulada é maior que em solos arenosos (SANTOS, 2014).

Tabela 9: Percentagens estimadas dos grupamentos alifáticos e aromáticos e índice de aromaticidade das amostras de ácidos húmicos extraídos das amostras dos solos de estudo

AH	Regiões Alifáticos				Regiões Aromáticos					
¹³ C por regiões do espectro (%)										
	Alquilas		O-alkilas		Aromáticos		Carbonilas			
	0-45	45-60	60-110		110-140	140-16	160-185	185-230		
	ppm	ppm	ppm	Total	ppm	0ppm	ppm	ppm	Total	I.A. (%)
MN										
aren	34	10	21	65	13	6	12	1	32	29
MN arg	24	5	16	45	18	12	14	7	51	67
P aren	30	11	25	66	14	5	10	2	31	29
P arg	26	8	20	54	18	9	12	3	42	50

5.3 Desenvolvimento de método para determinação de OTC por LC-MS e Validação do método

A metodologia utilizada apresentou seletividade, como observou-se através da investigação dos cromatogramas dos extratos brancos dos solos e dos extratos brancos fortificados com o composto. Na Figura 17A é possível observar a ausência de interferentes eluídos juntamente com o sinal correspondente à OTC, cujo tempo de retenção foi de 6,24 minutos. Tal sinal pode ser visualizado na Figura 17B, indicando se tratar de um pico cromatográfico bem resolvido.

Figura 17: (A) Cromatograma proveniente de extrato aquoso de solo e (B) Cromatograma de extrato aquoso de solo fortificado com uma solução padrão de oxitetraciclina

Aplicando-se a metodologia cromatográfica proposta, o espectrômetro de massas operou em modo positivo de aquisição de dados. A energia do capilar foi de 60V, e o íon pai tem a relação m/z igual a 461,00. As duas transições selecionadas para monitoramento foram: 426,00 m/z - a mais intensa, considerada como sendo a mais estável e a segunda transição (443,00

m/z) como confirmação. As demais transições encontram-se relacionadas na Tabela 9 B abaixo, junto dos dados referentes à energia de colisão

Tabela 9 B: Fragmentos e transições monitoradas no espectrômetro de massas:

Transição monitorada (m/z)	Energia de colisão (V)
461 - 201	38
461- 337	28
461- 426	12
461- 443	18

Realizou-se a construção das curvas de calibração fortificando-se extratos aquosos de solo em tampão BR em faixa compreendendo as concentrações entre 5 e 100 mg L⁻¹. Contudo, após os ensaios de sorção em solo bruto, verificou-se que tal faixa empregada não se mostrou adequada para as determinações das concentrações nos extratos. Deste modo, optou-se por conduzir os estudos utilizando-se a curva de calibração com os extratos aquosos, a qual foi construída empregando as concentrações entre 20 e 400 µg L⁻¹. A curva analítica mencionada bem como o respectivo gráfico de resíduos são mostrados na figura 18. Optou-se, ainda, por desmembrar a curva analítica gerada em duas outras (uma compreendendo a faixa entre 20 e 80 µg L⁻¹, e a outra na faixa entre 60 e 400 µg L⁻¹), para auxiliar nos cálculos e melhorar os resultados, de acordo com as faixas empregadas de concentração, e que podem ser observadas na figura 18 A.

Através do gráfico de resíduos, é possível observar a dispersão aleatória dos resultados, não refletindo em possíveis tendências.

Figura 18: Curva Analítica construída para a oxitetraciclina e seu respectivo gráfico de resíduos

Figura 18A : Curvas analíticas desmembradas a partir da curva original

Com relação aos parâmetros de validação, a linearidade do método obteve valor de $R > 0,99$, mostrando-se adequada para a faixa de trabalho empregada. O valor obtido de LD foi de $17,326 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ igual a $57,754 \mu\text{g L}^{-1}$. Expressa em DPR, a precisão do método, foi de 3,57% para a intra-dias e 4,21% para a inter-dias, e tais desvios encontram-se dentro dos encontrados na literatura (VAZ-JUNIOR, 2010).

5.3.1 Ensaios de sorção com solo bruto

Por meio do ajuste linear das curvas obtidas, tanto em pH 2,5 como em pH 5,0, determinou-se que a isoterma de Freundlich, em sua forma logarítmica foi o modelo que melhor se adequou para os ensaios realizados. Tal forma é bastante utilizada para representar empiricamente a sorção de compostos xenobióticos à superfícies heterogêneas (FERREIRA *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2010).

As Figuras 19 e 20 apresentam as isotermas obtidas para o ensaio de sorção com a oxitetraciclina, em pH 2,5 e 5,0, respectivamente.

Vale ressaltar que nas condições onde o pH está em torno de 2,5, a oxitetraciclina apresenta-se predominantemente na forma de um cátion, quando o sistema dimetil amônio é protonado; enquanto que em pH 5,0 ela encontra-se como um zwitterion, assumindo cargas positivas e negativas, quando o grupo fenólico dicetona é desprotonado (KULSHRESTHA *et al.*, 2004).

Figura 19: Isotermas de sorção da OTC para os solos MNaren, MNarg, Paren e Parg em pH 2,5 ajustadas à forma logarítmica da equação de Freundlich

Figura 20: Isotermas de sorção da OTC para os solos MNaren, MNarg, Paren e Parg em pH 5,0 ajustadas à forma logarítmica da equação de Freundlich

Os parâmetros de sorção da OTC, para os valores de pH iguais a 2,5 e 5,0 calculados a partir do ajuste das isotermas ao modelo de Freundlich, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros de sorção para a oxitetraciclina em pH 2,5 e 5,0

Solo	1/N	K_f $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{g}^{-1}$	R	K_d (mL g^{-1})	
Mn aren	0,9516	2,1787	0,95	2,13-3,39	pH 2,5
Mn arg	0,9147	4,0392	0,87	3,16-6,68	
P aren	0,9526	1,3611	0,96	1-19-1,81	
P arg	0,7061	1,3689	0,95	2,11-4,07	
Mn aren	0,7255	1,1114	0,88	0,96-2,36	pH 5,0
Mn arg	0,7311	1,8344	0,85	2,22-5,96	
P aren	0,2334	2,9335	0,7	0,38-4,57	
P arg	0,8538	2,947	0,96	3,42-4,71	

Avaliando-se o valor de N, é possível inferir sobre a forma da isoterma e estabelecer uma generalização para o mecanismo de sorção no meio. Valores de $N = 1$ representam uma isoterma C linear ou de partição, como pode ser observado para os resultados obtidos especialmente em pH 2,5. Para este tipo de isoterma, entende-se que o sorbato tem uma maior afinidade com a superfície do sorbente do que com a fase aquosa propriamente dita. Já quando valores de N são maiores que 1, pode-se dizer que se trata de uma isoterma do tipo S, e isso pode ser observado com maior ênfase nas amostras de solo cujo ensaio de sorção se deu em pH 5,0. Neste caso, esse tipo de isoterma sugere que há uma espécie de barreira para a sorção do sorbato; se tal barreira é sobreposta, a sorção se dá praticamente como nas isotermas do tipo L, e a sorção aumenta com a concentração crescente do sorbato em fase aquosa (VAZ-JUNIOR, 2010). Entende-se que quanto maior o valor de N, mais heterogêneo é caracterizado o processo de sorção (YU et al., 2010).

Em estudos reportados na literatura, há uma ampla faixa de K_f para a oxitetraciclina ($1,4 \leq K_f \leq \text{até } 3014 \mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{g}^{-1}$), o que implica que a sorção desse composto é fortemente dependente tanto das condições experimentais quanto das características físico-químicas dos solos estudados (PEREIRA, 2012). Neste contexto, os solos avaliados neste trabalho tiveram valores de K_f de acordo com os valores descritos em literatura.

Valores superiores de K_f e K_d foram encontrados para os solos de pastagem para o ensaio de sorção em pH 5,0; mas houve um destaque para as amostras argilosas, especialmente as que possuem teores de matéria orgânica mais

elevados, tanto para pH 2,5 quanto para pH 5,0. Esse resultado corrobora com os índices de aromaticidade encontrados para essas amostras, em especial a MNarg, nas análises por RMN, conforme apresentado no item 5.2.2.

Portanto, esse comportamento infere que maiores teores de argila e matéria orgânica aumentam a capacidade de sorção do composto.

Os valores obtidos para K_f e K_d foram inferiores aos obtidos em estudos envolvendo a sorção de OTC a solos temperados (JONES et al., 2009).

Jones et al. (2009) relataram que a textura do solo, junto da CTC são fatores de forte influência para a sorção de OTC a solos. Isso pode ser observado nos resultados obtidos, especialmente para as amostras de mata de caráter argiloso, as quais apresentam o maior potencial CTC dentre as demais. Outro fator importante no que diz respeito à sorção é a presença de cátions metálicos em teores diferenciados nas amostras. Sabe-se que a OTC é um forte agente quelante e a existência de metais proporciona uma maior interação entre o composto e a matéria orgânica do solo, por meio de pontes metálicas, especialmente em valores de pH próximos a 5,0. Tal fato justificaria os valores superiores de K_f e K_d para as amostras oriundas de pastagem, as quais apresentam teores elevados de cátions metálicos, em especial o ferro. Cabe ressaltar, ainda, que em pH 5,0, diferentemente do meio mais ácido em pH 2,5, é possível contar com mais sítios disponíveis no meio para interação.

Ling-Ling e colaboradores (2010) verificaram em dois tipos de solos que a retenção dos fármacos estudados foi superior no solo com maior teor de carbônico orgânico. Tal comportamento pode ser explicado por meio da grande capacidade de interação dessas moléculas com a matéria orgânica do solo, através de ligações com espécies divalentes, troca iônica e/ou através de ligações de hidrogênio entre os grupamentos ácidos das substâncias húmicas e os grupos polares da oxitetraciclina, por exemplo.

Contudo, Jones et al. (2009) em estudo com 30 solos, oriundos da costa leste americana e de pH em torno de 5,0, observaram uma correlação negativa entre o aumento do teor de carbono dos solos e capacidade de sorção da OTC. Pills e Laird observaram que a sorção da tetraciclina e da clortetraciclina foi maior nos componentes dos solos com menor teor de carbono (% CO = 3,2 %) do que nos componentes do solo com maior teor de carbono (% CO = 5,2%) (PILLS & LAIRD, 2007). Kulshrestha e colaboradores constataram que a

sorção da OTC em Na-montmorilonita decresceu na presença de ácido húmico dissolvido em concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e aumentou quando a concentração do ácido húmico foi diminuída para $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (KULSHRESTHA *et al.*, 2004). A OTC também apresentou maior sorção em solos arenosos, comparando-se ao esterco avaliado em seus estudos (LOKE *et al.*, 2002).

Por outro lado, Fernández-Calviño e colaboradores (2015) relatam, estudando-se solos predominantemente ácidos (pH em torno de 4,4), que a intensidade de sorção foi maior nos solos contendo os teores mais elevados de matéria orgânica, argila, alumínio e ferro.

5.3.2 Estimando um ensaio de sorção com os ácidos húmicos extraídos

Foi realizada a estimativa da percentagem de sorção OTC-AH (1,2 mg de AH) para uma determinada concentração inicial (2 mg L^{-1}), e a tabela 11 apresenta as percentagens da concentração sorvida de OTC para as amostras dos ácidos húmicos extraídos, em pH 2,5; 5,0 e 8,5.

Tabela 11: Estimativa da percentagem da concentração de OTC sorvida pelas amostras de ácidos húmicos extraídas, em pH 2,5; 5,0 e 8,5

Amostra de AH	pH	Concentração sorvida (%)
MN aren	2,5	17
MN arg		43
P aren		17
P arg		44
MN aren	5,0	96
MN arg		95
P aren		98
P arg		98
MN aren	8,5	71
MN arg		65
P aren		67
P arg		70

Os maiores percentuais de sorção AH-OTC se deram, de modo geral, nas amostras de origem argilosa, pelas mesmas razões discutidas para o solo bruto anteriormente, especialmente na condição do meio em pH 2,5 e para todas as amostras em pH 5,0.

Em linhas gerais, pode-se dizer que em pH 2,5 as moléculas de AH e OTC encontram-se predominantemente protonadas, levando à possibilidades de interação por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Em pH 5,0, sugere-se que há uma maior quantidade de sítios passíveis de interações para o processo de sorção o AH está parcialmente protonado, enquanto que a OTC encontra-se como zwitterion, apresentando uma carga positiva e outra negativa ao longo de sua estrutura. Tal fato justificaria uma maior percentagem de sorção AH-OTC nessa condição, para todas as amostras.

Já em pH 8,5, tanto o AH quanto a OTC encontram-se desprotonados, sugerindo-se a possibilidade de interações por pontes metálicas (VAZ-JUNIOR, 2010).

Como observado em estudos envolvendo xenobióticos e ácidos húmicos, Ferreira e colaboradores (2002) relataram que a sorção da OTC foi inferior em solos do que em AH, e isso se deve, provavelmente, ao fato de que os ácidos húmicos possuem maior capacidade de sorção, devido à redução da competitividade de interação, favorecendo e otimizando a sorção AH-OTC. Tal comportamento foi também observado neste trabalho, especialmente no que diz respeito às amostras argilosas, em pH 5,0.

5.4 Utilização de técnicas espectroscópicas na avaliação das interações oxitetraciclina – ácidos húmicos

5.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio (FTIR)

No intuito de avaliar as possíveis alterações estruturais e em grupamentos decorrentes da sorção do antibiótico aos ácidos húmicos nas diferentes condições de pH, utilizou-se a espectroscopia na região do infravermelho. Não foi possível observar mudanças significativas nos espectros das amostras liofilizadas das soluções contendo AH e OTC. Optou-se pela realização de uma análise multivariada para verificar se essas alterações

pudessem se mostrar de modo mais expressivo. Utilizando-se o software Pirouette®, conduziu-se uma análise de componentes principais, como mostra a Figura 21, empregando-se pré-processamento dos espectros, como SNV e correção de linha de base. No gráfico, as amostras estão identificadas como anteriormente (MNarg e MNaren, Paren e Parg), acrescidas da informação quanto à condição de pH do meio (2,5; 5,0 e 8,5), além da denominação “BCO” – branco, correspondendo às amostras sem fortificação com OTC, e as demais, referentes às amostras de interação OTC-AH. Não foi possível observar alterações e tendências de formações de grupamentos específicos de amostras por semelhanças entre os espectros dos ácidos húmicos, da OTC e dos espectros das soluções AH-OTC. Neste caso, portanto, a FTIR não se mostrou uma técnica eficiente para averiguar as diferenças proporcionadas pelas interações AH-OTC.

Figura 21: Gráfico de análise de componentes principais para os diferentes valores de pH estudados dos espectros das amostras de ácidos húmicos e soluções liofilizadas de AH-OTC

5.4.2 Espectroscopia na região do UV/Vis

Ainda no intuito de verificar as possíveis alterações proporcionadas pela interação com a OTC, espectros na região do UV/Vis foram obtidos, conforme mostram as figuras de 22 a 25. Para cada valor de pH, são mostrados os espectros da OTC e dos AH isoladamente, além dos espectros de interação AH-OTC (espectro pós sorção) e a subtração de espectros (pós sorção – AH).

Figura 22: Espectros de absorção para as amostras dos ácidos húmicos do solo MN aren em pH 2,5; 5,0 e 8,5 após o ensaio de sorção. Em cada pH, são apresentados os espectros de interação (AH-OTC), do AH, da OTC e a subtração (AH-OTC) - AH

Figura 23: Espectros de absorção para as amostras dos ácidos húmicos do solo MN arg em pH 2,5; 5,0 e 8,5 após o ensaio de sorção. Em cada pH, são apresentados os espectros de interação (AH-OTC), do AH, da OTC e a subtração (AH-OTC) - AH

Figura 24: Espectros de absorção para as amostras dos ácidos húmicos do solo P aren em pH 2,5; 5,0 e 8,5 após o ensaio de sorção. Em cada pH, são apresentados os espectros de interação (AH-OTC), do AH, da OTC e a subtração (AH-OTC) - AH

Figura 25: Espectros de absorção para as amostras dos ácidos húmicos do solo P arg em pH 2,5; 5,0 e 8,5 após o ensaio de sorção. Em cada pH, são apresentados os espectros de interação (AH-OTC), do AH, da OTC e a subtração (AH-OTC) - AH

Segundo mostram os espectros obtidos, não foram notadas diferenças representativas no perfil dos mesmos, especialmente no que diz respeito ao tipo do ácido húmico, conforme o solo do qual foi extraído.

Nota-se que o pH, contudo, é um fator que influencia o comportamento dos espectros. Esta variação ocorre fundamentalmente em virtude da protonação/desprotonação de grupamentos funcionais carboxílicos e fenólicos, com a diminuição ou aumento da densidade eletrônica, favorecendo (meio alcalino) ou desfavorecendo (meio ácido) a transição eletrônica entre os estados energéticos e eventuais mudanças conformacionais.

Ainda conforme os valores de pH, o perfil dos espectros, de modo geral, se mostrou bastante semelhante.

Sabe-se que em pH 2,5 e 5,0 são esperadas interações como as ligações de hidrogênio e hidrofóbicas para hidrocarbonetos alifáticos, e dipolo- induzido para sistemas π . Em contrapartida, em pH 8,5 esperam-se a ocorrência de interações do tipo dipolo-induzido para sistemas π . Para estes casos, é importante também que sejam consideradas as interações por transferência de elétrons entre o grupamento amina da OTC e os grupamentos carboxílicos dos AH (HAYES et al., 2007). Contudo, em decorrência de uma possível limitação da técnica, já que não foram observadas alterações expressivas nos espectros, pode-se sugerir a ocorrência de interações fracas, tais como interações hidrofóbicas e dipolo-induzido.

Entretanto, pode-se notar, para os ácidos húmicos estudados, que em pH 8,5 não foi mais observado o perfil espectral da OTC em contato com o AH, claramente notado no espectro AH-OTC, bem como na subtração de espectros. Provavelmente, conforme estudos realizados por VAZ-JUNIOR e colaboradores (2013), tal fato seria um indicativo de que o espectro AH-OTC não se trata unicamente da somatória dos espectros separados da OTC e do AH, mas sim de um espectro que representa um tipo de interação que certamente alterou profundamente as propriedades eletrônicas do conjunto, em comparação aos componentes separados (AH e OTC).

5.4.3 Espectroscopia de Fluorescência na região do UV/Vís

Esta técnica é capaz de fornecer informações que podem ser usadas tanto para diferenciar como para classificar a matéria orgânica, conforme sua origem e natureza, sendo um modo sensível à presença de metais tóxicos e contaminantes orgânicos (MILORI et al., 2002; NARIMOTO, 2006). Ao se utilizar dessa técnica para estudos envolvendo substâncias húmicas, assume-se que ela se baseia na presença estável de diversas estruturas fluorescentes intrínsecas à molécula húmica e aos seus precursores, em especial anéis aromáticos, grupos quinonas e semiquinonas e fenóis (SENESI et al., 1991).

Os espectros de fluorescência das substâncias húmicas são constituídos pela soma dos espectros dos diferentes tipos de fluoróforos, consequência da complexidade molecular e da heterogeneidade dessas substâncias (NARIMOTO, 2006). Assim, os espectros apresentam bandas que são

avaliadas de acordo com suas intensidades e deslocamento para maiores ou menores comprimentos de onda (SANTOS, 2014). A intensidade da fluorescência também é afetada pelo pH do meio, além da presença de eletrólitos e outras estruturas orgânicas (STEVENSON, 1994). Isso foi também observado tanto para o perfil dos espectros dos AH, assim como da OTC e os respectivos produtos de interação AH-OTC. As figuras 26, 27, 28 e 29 apresentam, para cada ácido húmico, os espectros obtidos nos diferentes valores de pH, nos modos de emissão e varredura sincronizada utilizando $\Delta\lambda = 20$ e 55.

Figura 26: Espectros de Fluorescência nos três valores de pH, nos modos de emissão e varredura sincronizada utilizando $\Delta\lambda = 20$ e 55, para amostras de ácidos húmicos do solo MN aren, OTC e interação AH-OTC

Figura 27: Espectros de Fluorescência nos três valores de pH, nos modos de emissão e varredura sincronizada utilizando $\Delta\lambda = 20$ e 55, para amostras de ácidos húmicos do solo MN arg, OTC e interação AH-OTC

Figura 28: Espectros de Fluorescência nos três valores de pH, nos modos de emissão e varredura sincronizada utilizando $\Delta\lambda = 20$ e 55, para amostras de ácidos húmicos do solo P aren, OTC e interação AH-OTC

Figura 29: Espectros de Fluorescência nos três valores de pH, nos modos de emissão e varredura sincronizada utilizando $\Delta\lambda = 20$ e 55, para amostras de ácidos húmicos do solo P arg, OTC e interação AH-OTC

Os espectros apresentados não evidenciaram diferenças representativas no que diz respeito aos tipos de ácidos húmicos, com relação à interação AH-OTC. Ocasionalmente, observaram-se algumas alterações no formato das bandas para a amostra do AH extraído de MN arg, sem alterações nos deslocamentos dos comprimentos de onda. A intensidade de fluorescência sofreu algumas variações nos espectros das amostras em geral.

Sabe-se que nas substâncias húmicas, os grupos doadores de elétrons (hidroxil e metoxil) ligados ao anel aromático aumentam a intensidade de fluorescência, provavelmente por conta do aumento da probabilidade de transição entre o estado excitado (singleto) e o fundamental (SENESI, 1990).

Santos (2014) relata a influência de determinados grupamentos na fluorescência. Os grupos OH, OCH₃, OC₂H₅, NH₂, NHR e NR₂ são

responsáveis por aumentar a intensidade de fluorescência deslocando o pico para λ mais longos; enquanto que COOH, COH, COR e COOR deslocam o pico para λ mais longos diminuindo a intensidade de fluorescência; já NO₂ e NO deslocam muito o λ para o vermelho com diminuição da intensidade de fluorescência.

Em geral, os espectros típicos de substâncias húmicas apresentam duas bandas com a intensidade máxima em torno de 360 nm e 465 nm, além de um ombro em torno de 470 dependendo o modo de aquisição do espectro. Pequenos deslocamentos nesses máximos indicam diferenças na origem da amostra e concentração de núcleos aromáticos altamente substituídos e/ou sistemas conjugados insaturados capazes de exibir alto grau de ressonância. A banda na região de 440 a 480 nm é característica de compostos aromáticos policondensados ou aromáticos ligados a grupos funcionais do tipo hidroxil e metoxil (SENESI, 1990; CHEN et al., 2003). Além disso, associa-se o pico em torno de 370 nm a fluoróforos mais simples, com baixo nível de policondensação aromática e poucos cromóforos conjugados (SENESI et al., 1991; VALEUR, 2001; BERTONCINI et al., 2005).

Cabe ressaltar que a região do espectro que compreende comprimentos de onda mais para o vermelho está associada a núcleos aromáticos substituídos e/ou conjugados, ou sistemas insaturados conjugados com elétron bastante delocalizado, enquanto que na região mais próxima ao azul é associada a compostos mais simples.

Jung et al. (2005) utilizaram a fluorescência para a caracterização de estruturas semelhantes aos AH, oriundas de aminoácidos. Eles observaram que a diminuição da intensidade de sinal de Fluorescência sugere a incorporação de uma estrutura molecular à outra, com uma estabilização energética se dando por ressonância eletrônica para permitir a reorganização estrutural do sistema e que a incorporação do grupamento amino na estrutura húmica leva a mudanças acentuadas nas propriedades de fluorescência das moléculas de AH. No contexto dessas considerações e levando-se em conta os espectros apresentados, sugere-se que a diminuição da intensidade de fluorescência em nas condições pós sorção (AH-OTC), especialmente nas condições de pH 8,5, comparando-se com o sinal de AH, pode ter ocorrido em função da presença de grupamentos amina provenientes da OTC, em interação. Esses

apontamentos corroboram com alguns obtidos na literatura (VAZ-JUNIOR, 2010) e vão ao encontro com os resultados observados para os resultados da subtração de espectros nas análises de espectroscopia na região do UV/Vis para pH 8,5.

De modo a investigar a predominância de compostos mais simplificados em menores comprimentos de onda ou mais complexos, em comprimentos de onda maiores, considerando os espectros dos AH e os espectros pós sorção (OTC-AH), foram plotados gráficos comparando-se as razões entre as áreas A_2 e A_1 dos mesmos, obtidos nos modos de emissão, varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 20$ e $\Delta\lambda = 55$, para os diferentes ácidos húmicos, em pH 2,5; 5,0 e 8,5. Eles são apresentados a seguir, nas figuras 30, 31, 32 e 33.

Figura 30: Gráficos da Razão das áreas A_2/A_1 dos espectros de fluorescência obtidos para os ácidos húmicos de MN aren em solução tampão e pós sorção (interação OTC-AH), nos diferentes valores de pH e nos modos de (A) emissão; (B) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 20$ e (C) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 55$

Figura 31: Gráficos da Razão das áreas A_2/A_1 dos espectros de fluorescência obtidos para os ácidos húmicos de MN arg em solução tampão e pós sorção (interação OTC-AH), nos diferentes valores de pH e nos modos de (A) emissão; (B) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 20$ e (C) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 55$

Figura 32: Gráficos da Razão das áreas A_2/A_1 dos espectros de fluorescência obtidos para os ácidos húmicos de P aren em solução tampão e pós sorção (interação OTC-AH), nos diferentes valores de pH e nos modos de (A) emissão; (B) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 20$ e (C) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 55$

Figura 33: Gráficos da Razão das áreas A_2/A_1 dos espectros de fluorescência obtidos para os ácidos húmicos de P arg em solução tampão e pós sorção (interação OTC-AH), nos diferentes valores de pH e nos modos de (A) emissão; (B) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 20$ e (C) varredura sincronizada com $\Delta\lambda = 55$

Os gráficos mostraram poucas alterações no que diz respeito ao tipo de modo de fluorescência empregado para obtenção dos espectros. Para os ácidos húmicos provenientes do solo MNaren, por exemplo, observa-se leve predominância de fluorescência na região correspondente a compostos mais complexos nos espectros dos ácidos húmicos, como mostram os maiores valores da razão A_2/A_1 , para os valores de pH 5,0 e 8,5. Entretanto, é possível observar um destaque para as amostras pertencentes ao solo P aren, a qual apresenta valores da razão A_2/A_1 superiores para os espectros de interação OTC-AH em pH 5,0. Sabe-se que nesta condição de pH, as interações são mais favorecidas por conta da maior disponibilidade de sítios catiônicos e aniônicos no meio. Razões A_2/A_1 superiores inferem na predominância de sinais de fluorescência correspondentes a compostos mais complexos.

O comportamento das amostras de ácidos húmicos do solo Paren pode ser associado ao elevado grau de humificação do solo inteiro, comparando-se

às demais amostras analisadas, conforme evidenciaram os resultados provenientes da técnica de fluorescência induzida por laser, apresentados no item 5.1.6.

Com o intuito de investigar a resposta dos diferentes modos de análise de fluorescência conduzidos, e a maior influência quanto aos valores de pH estudados, além das características das amostras, realizou-se uma análise estatística utilizando-se a ferramenta ANOVA, através de testes de significância. As respostas referentes à compilação das médias do conjunto de acordo com o teste de Duncan estão apresentadas nas Tabelas 13 e 14, e dessa forma, foi possível observar algumas diferenças significativas entre as médias.

Não foram observadas diferenças para os ácidos húmicos do solo P arg, independente dos modos de varredura realizados.

De modo geral, reforçou-se a idéia de que as análises de fluorescência apresentam forte influência do pH, além do fato de que os experimentos realizados em pH 5,0 proporcionaram maiores possibilidades de interação, por conta da variedade de sítios, assim como já discutido anteriormente.

Foi possível constatar, para o modo de emissão, conforme a Tabela 12, que as amostras resultantes da interação AH-OTC foram significativamente diferentes para os três valores de pH, com relação às amostras de MN aren. Para os solos P arg e MN arg, observou-se que os resultados obtidos para o meio em pH 5,0 foram diferentes significativamente das demais condições, indicando influência da argila no processo. Isso pode ser notado baseando-se na disposição dos conjuntos de dados em colunas nas tabelas de significância, comparando-se as médias dos dados compilados. Em uma mesma tabela, as amostras diferentes significativamente encontram-se em colunas distintas.

Tabela 12: Resultados da compilação das médias do conjunto de dados analisado utilizando ANOVA- teste de Duncan, para as análises de fluorescência no modo emissão abordando as amostras dos solos MN aren, Mn arg e P aren.

Solo=MN AREN					
Duncan ^{a,b}					
	N		Subset		
pH		1	2	3	
2,5	2		-,0715		
8,5	2			,0693	
5,0	2				,2253
Sig.			1,000	1,000	1,000
Solo=MN ARG					
Duncan ^{a,b}					
	N		Subset		
pH		1	2		
8,5	2		-,1043		
2,5	2		-,0715		
5,0	2			,2177	
Sig.			,099	1,000	
Solo=P AREN					
Duncan ^{a,b}					
	N		Subset		
pH		1	2		
5,0	2		-,2852		
2,5	2			-,0279	
8,5	2			-,0137	
Sig.			1,000	,825	

Já para os modos de varredura sincronizada, as diferenças observadas não evidenciaram alterações expressivas para as condições em si, como mostra a Tabela 13. Para as amostras pertencentes ao solo P aren, assim como no modo de emissão, constatou-se que apresentam diferenças significativas diante às demais amostras e em outros valores de pH.

Tabela 13: Resultados da compilação das médias do conjunto de dados analisado utilizando ANOVA- teste de Duncan, para as análises de fluorescência no modo de varredura sincronizada abordando as amostras dos solos MN aren, Mn arg e P aren.

Solo=MN ARG					
Duncan					
			Subset		
pH	N	1	2	3	
8,5	4		-,5204		
2,5	4			-,2255	
5,0	4				,3113
Sig.			1,000	1,000	1,000
Solo=MN AREN					
ph_var Duncan ^{a,b}					
		N	1	2	
pH 2.5 Var 55		2	-,1123		
pH 2.5 Var 20		2	-,1096		
pH 5.0 Var 55		2	,1164		
pH 8.5 Var 55		2		,5124	
pH 8.5 Var 20		2		,6496	
pH 5.0 Var 20		2		,7577	
Sig.			,194	,168	
Solo=P AREN					
ph_var Duncan ^{a,b}					
		N	1	2	3
pH 5.0 Var 20		2	-3,4168		
pH 5.0 Var 55		2		-1,7416	
pH 2.5 Var 55		2			-,0746
pH 2.5 Var 20		2			-,0497
pH 8.5 Var 55		2			,0618
pH 8.5 Var 20		2			,0969
Sig.			1,000	1,000	,229

6. CONCLUSÕES

Com base na caracterização de solos do Estado de São Paulo, sob diferentes manejos (mata e pastagem) e textura, além de diferentes teores de matéria orgânica, foi possível investigar o comportamento do antibiótico OTC.

A sorção da OTC aos solos estudados seguiu a isoterma de Freundlich, evidenciando as características de homogeneidade e heterogeneidade de cada solo. Constatou-se a forte dependência da capacidade de sorção do composto com diversos fatores, como a textura dos solos, teor de matéria orgânica, pH, tipo de meio aquoso adotado e possível comportamento do composto de interesse neste meio, envolvendo a estrutura e as propriedades físico-químicas da molécula. O grau de humificação determinado para amostras de solo inteiro também foi relevante nas alterações dos grupamentos formados durante as interações entre a OTC e os AH.

Constatou-se que a concentração hidrogeniônica é o fator que mais tem influência no processo de sorção solo-OTC e AH-OTC; com destaque para a condição de pH 5,0, situação da qual mais se aproximam os valores de pH reais dos solos brasileiros. Tal condição apresentou as alterações mais expressivas no que diz respeito às possíveis interações ocorridas entre o antibiótico e os ácidos húmicos, em decorrência da maior oferta de sítios pra interação. Nestas condições, provavelmente o processo de transporte e lixiviação da OTC não é favorecido.

Posterior à concentração hidrogeniônica do meio, a variável textura do solo se mostrou importante, implicando também ser um forte fator no que tange à sorção da OTC aos solos estudados, seguida pelo teor de matéria orgânica e manejo. Ressalta-se que novos estudos devem ser conduzidos, no intuito de melhor avaliar a questão da influência do teor de matéria orgânica e manejo, visto que neste trabalho as amostras estudadas não apresentam grandes diferenças quanto a essas características.

Salienta-se a importância de um maior levantamento acerca do monitoramento e da dinâmica de fármacos veterinários em solos, em especial os tropicais, evidenciando os possíveis impactos dessas substâncias no ambiente, e nos organismos aquáticos e terrestres.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, V. K. High-performance liquid chromatographic methods for determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. *J. Chromatogr. A*, 624, p.411-423, 1992.

ALFREDSSON G, BRANZELL C, GRANELLI K, LUNDSTRÖN A. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. *Ana lítica Chimica Acta*, 2005, 529:47-51.

ALVES, C. Análise de fármacos em fluidos biológicos empregando o acoplamento SPME-LC/MS. São Carlos, Tese de Doutorado, (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

AMIR, S., HAFIDI, M., LEMEE, L., MERLINA, G., GUIRESSE, M., PINELLI, E., REVEL, J.C., BAILLY, J.R., AMBLES, A. Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by thermochemolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 410-422, 2006.

ANDREU, V., BLASCO, C., PICÓ, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, p. 534-556, 2007.

ANVISA, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003. Publicada no Diário Oficial da União de 02/05/2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acessado em 02/2013.

ATKINS, P.; DE PAULA, J. Atkins's physical chemistry. (8th Ed.) Oxford: Oxford University Press, 2006, p. 916 - 922.

BOXALL, A.B.A. Veterinary medicines and the environment. In *Comparative and Veterinary Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology, Part 2*, v. 99, p. 291-314, 2010.

BOXALL, A.B.A.; JOHNSON, P.; SMITH, E.J.; SINCLAIR, C.J.; STUTT, E. & LEVY, L.S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food Chem.*, 54:2288-2297, 2006.

BOXALL, A.B.A.; KAY, P.; BLACKWELL, P.A. & FOGG, L.A. Fate of veterinary medicines applied to soils. In: KÜMMERER, K., ed. *Pharmaceuticals in the environment*. 2.ed. Berlin, Springer-Verlag, 2004. p.165- 180.

BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. Resíduos de antibióticos no leite. Comunicado Técnico, 44. Embrapa Gado de Leite (2005). Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/publicacoes/comunicado/COT44.pdf>>. Acesso em: outubro/2013.

CAMPBELL, I.D.; DWEK, R.A. *Biological spectroscopy*. Menlo Park: Cumming/Benjamin, 1984.

CARVALHO, E.R.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H. Interactions of chlorine with tropical aquatic fulvic acids and formation of intermediates observed by fluorescence spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 53, p. 421, 2004.

CHEN, W.; WESTERHOFF, P.; LEENHERR, J.; BOOKSH, K. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, v. 37, p. 5701-5710, 2003.

Chesworth, W. *Encyclopedia of soil science*, Springer, Dordrecht, 2008.

CHRISTIAN, T.; SCHNEIDER, R.J.; FARBER, R.A.; SKUTLAREK, D.; MEYER, M.T.; GOLDBACH, H.E. Determination of antibiotic residues in manure, soil and surface waters. *Acta Hydrochimica et hydrobiologica*, Weinheim, v.31, n.1, p.36-44, 2003.

CIMITILE, M. Crops absorb livestock antibiotics, science shows. *Environmental Health News*, 2009.

CLAPP, C.E.; HAYES, M.H.B.; SENESI, N.; BLOOM, P.R.; JARDINE, P.M. (Eds.) *Humic substances and chemical contaminants*. Madison: Soil Society of America, 2001.

CUNNINGHAM, V.L. Special characteristics of pharmaceuticals related to environmental fate. In: KÜMMERER, K., ed. *Pharmaceuticals in the environment*. 2.ed. Berlin, Springer-Verlag, 2004. p.13-24.

DENOBILO, M. NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n.2, p. 209-218, 2004.

DÍAZ-CRUZ, M.S. & BARCELÓ, D. Recent advances in LCMS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 26:637-646, 2007.

DÍAZ-CRUZ, M.S.; DE ALDA, M.J.L. & BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 22:340-351, 2003.

DING, C.; HE, J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 87, n. 3, p. 925-941, 2010.

DORETTO, K.M. Desenvolvimento de métodos visando a quantificação de sulfonamidas em medicamentos de uso veterinário e estudos de sorção/dessorção em solos. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2012.

EHLERS, G.A.C., LOIBNER, A.P. Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: A review of geosorbent characterization and (bio)availability prediction. *Environmental Pollution*, v. 141, p. 949-512, 2006.

Ehlers, G.A.C., Loibner, A.P. Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: A review of geosorbent characterization and (bio)availability prediction. *Environmental Pollution*, v. 141, p. 949- 512, 2006.

EMA, 2008. European Medicines Agency: Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP).

EMA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1, Revised Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medical Products in Support of the VICH Guidelines GL6 and GL38. Acessada em janeiro/2016.

ENKE, C. G; CECH, N. B.,. Pratical Implications of some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. *Mass Spectrometry*, 2001, 20, 362.

EPA, 2007. Environmental Protection Agency. Validation and Peer Review of U.S. Environmental Protection Agency Sampling Methods for Chemical and Radiochemical Parameters, 2007.

FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; BERMÚDEZ-COUSO, A.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; NÓVOA-MUÑOZ, J.C.; M.J. FERNÁNDEZ-SANJURJO; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, E. Kinetics of tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline adsorption and desorption on two acid soils *Environmental Science Pollutants Research*, 2015, 22, 425–433

FERRARESI, T.M. “Espectroscopias de infravermelho próximo e médio na quantificação de atributos do solo, com ênfase na matéria orgânica e na biomassa microbiana”; Dissertação de mestrado, 2010, 119 p.

FERREIRA, J.A.; MARTIN-NETO, L.; VAZ, C.M.P.; REGINATO, J.B. Sorption interactions between imazaquin and a humic acid extracted from a typical brazilian oxisol. *Journal of Environmental Quality*, v. 31, p. 1665 - 1670, 2002.

FIALHO, L. L.; SILVA, W. T. L.; MILORI, D. M. B. P.; SIMÕES, M. L.; MARTIN-NETO, L. Characterization of organic matter from composting of different residues by physicochemical and spectroscopic methods. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 1927-1934, 2010.

Foth, H.D. *Fundamentals of Soil Science*. Michigan State University. John Wiley & Sons, 8th ed., New York, 1990.

FREITAS, S.K.B, S. Desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de antibióticos em preparações farmacêuticas e leite. 2011. 165f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

GILES, C.H.; SMITH, D.; HUITSON, A. A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 47, p. 755-765, 1974.

GU, C.; KARTHIKEYAN, K.G. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminium and iron hydrous oxides. *Environmental Science and Technology*, Easton, v. 39, p. 9166- 9173, 2005

HALLING-SØRENSEN, B.; SENDELØV, G.; INGERSLEV, F. & JENSEN, L.B. Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 44:7-16, 2002.

HAMSCHER, G.; SCZESNY, S.; HOPER, N.H. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, Washington, DC, v. 74, n.7, p. 1509-1518, 2002.

HAYES, P.L.; GIBBS-DAVIS, J.M.; MUSORRAFITI, M.J.; MIFFLIN, A.L.; SCHEIDT, K.A.; GEIGER, F.M. Environmental biogeochemistry studied by second-harmonic generation: a look at the agricultural antibiotic oxytetracycline. *Journal of Physical Chemistry-C*, v. 111, p. 8796-8804, 2007.

HAYS, V. W. Benefits and risks of antibiotics use in agriculture. In: MOATS, W. A. (Ed.). *Agricultural uses of antibiotics*. Washington, 1986, p. 74-87.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K. & KRATZ, K-L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.*, 225:109-118, 1999.

HUANG, W., PENG, P., YU, Z., FU, J. Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Applied Geochemistry*, v. 18, p. 955-972, 2003.

JENKINSON, E.J.; ADAMNS, D.E.; WILD, A. Model estimates of CO₂ emissions from soil in response to global warming. *Nature*, v. 351, p. 304-306, 1991.

JONES, G. M. On-farm tests for drug residues in milk. Virginia Cooperative Extension, Virginia State University, 2009. Disponível em: <http://pubs.ext.vt.edu/404/404-401/404-401.html>. Acesso em abril/2015.

JUNG, A.-V.; FROCHOT, C.; PARANT, S.; LARTIGES, B.S.; SELVE, C.; VIRIOT, M., - L.; BERSILLON, J.-L. Synthesis of amino-phenolic humic-like substances and comparison with natural aquatic humic acids: A multianalytical techniques approach. *Organic Geochemistry*, v. 36, p. 1252- 1271, 2005.

JUNIOR, S.V. Estudo da sorção do antibiótico oxitetraciclina a solos e ácidos húmicos e avaliação dos mecanismos de interação envolvidos. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2010.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.*, 8:1-13, 2008.

- KIM, Y.; JUNG, J.; KIM, M.; PARK, J.; BOXALL, A.B.A. & CHOI, K. Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 26:167-176, 2008.
- KOOLS, S.A.E.; MOLTSMANN, J.F. & KNACKER, T. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 50:59-65, 2008.
- KRASOVITSKII, B.M.; BOLOTIN, B.M. Organic luminescent materials. Weinheim: Wiley-VCH, 1987, p. 340.
- KULSHRESTHA, P.; GIESE, R.F.; AGA, D.S. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: insights on factors affecting its mobility in soil. *Environmental Science & Technology*, v. 38, p. 4097-4105, 2004.
- LEAL, R.M.P. Ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos de uso veterinário. 2013. 136f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- LIGUORO, M.DE., CIBIN, V., CAPOLOGO, F., HALLING-SØRENSEN, B., MONTESSISSA, C. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*, v.52, p.203-212, 2003.
- LING-LING, L.; LI-DONG, H.; REN-SHIH, C.; KA-HANG, F.; YONG-SONG, Z. Sorption and dissipation of tetracyclines in soils and compost. *Pedosphere*, 2010, 20, 807-816.
- LOKE., M.L., TJØRNELUND, J., HALLING-SØRENSEN, B. Determination of the distribution coefficient ($\log K_d$) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure. *Chemosphere*, v. 48, p. 351-361, 2002.
- MACEDO, A.N. Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios de química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino. 2012. 113f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- MAPA, 2011^a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsssp/bibliote/informe_eletronico/2011/iels.jan.11/iels06/U_PT-MAPA-SDA-577_271210.pdf. Acessado em 06/2013.
- MAPA, 2011^b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica. Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf. Acessado em 06/2013.
- MARIANA-LUCIO, M.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Modeling the binding of triazine herbicides to humic substances using capillary electrophoresis. *Environmental Chemistry Letters*, v. 4, 2006.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; BARREIRO-GONZÁLEZ, C.; SCHARF, S. & GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environ. Pollut.*, 148:570-579, 2007.

MASEL, R.I. Principles of adsorption on solid surfaces. New York: Wiley, 1996, p. 108 - 336.

McDONALD, S.; BISHOP, A.G.; PRENZLER, P.L.; ROBARDS, K. Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta*, v. 527, p. 105 – 124, 2004.

MIFFLIN, A.L.; KONEK, C.T.; GEIGER, F.M. Tracking oxytetracycline mobility across environmental interfaces by second harmonic generation. *Journal of Physical Chemistry-B*, v. 110, p. 22577-22585, 2006.

MIGLIORE, L.; COZZOLINO, S. & FIORI, M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere*, 52:1233-1244, 2003.

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, v. 167, p. 739-749, 2002.

MILORI, D.M.B.P.; GALETI, H.V.A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. "Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy". *Soil Science Society of America Journal*, v. 70, p. 57-63, 2006.

MILORI, D.M.B.P.; GALETI, H.V.A.; MARTIN-NETO, L.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; SALTON, J. "Humification degree of organic matter in whole soil determined by laser-induced fluorescence". In: MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; DA SILVA, W.T.L. (Ed.). *Humic substances and soil and water environment*. São Carlos: Rima, 2004. p. 609.

MILORI, D.M.B.P.; [MARTIN-NETO, L.](#); P.R.; [FERREIRA, E. C.](#); SEGNINI, A.; [FERREIRA, E.J.](#) [SANTOS, C.H. DOS](#); [ROMANO, R.A.](#); [SILVA, W.T.A. da](#); [SIMÕES, M.L.](#); [POSADAS, A.](#) Avaliação de um equipamento portátil para determinação do grau de humificação da matéria orgânica de solos. In: INAMASU, R.Y.; NAIME, J. M.; RESENDE, A.V. de; BASSOI, L.H.; BERNARDI, A. C.. (Org.). *Agricultura de precisão: um novo olhar*. São Carlos: Editora Cubo, 2011. v. 1, p. 91-95.

MITSCHER, L.A. The chemistry of the tetracycline antibiotics. Marcel Dekker, Basel, p.330, 1978.

MORAES, M. C. B., LAGO, C. L. Espectrometria de Massas com Ionização por "Electrospray" Aplicada ao estudo de espécies Inorgânicas e Organometálicas. *Química Nova*, 2003, 26 (4), 556.

NARIMOTO, K.M. Técnicas espectroscópicas aplicadas à análise da matéria orgânica do solo em pomares de citros sob adição de lodo de esgoto. 2006. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

NERO, L. A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras do Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 27, p.391-393, 2007.

NIJEGORODOV, N.; MABBS, R. The dependence of the fluorescence properties, laser properties and photochemical stability of aromatic compounds on the molecular symmetry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 56, p. 2157 – 2166, 2000.

O'Connor S.; Aga, D. S. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26, 456-465.

OECD, 2000. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 1: Physical-chemical

OLESZCZUK, P.; PAN, B.; XING, B. Adsorption and desorption of oxytetracycline and carbamazepine by multiwalled carbon nanotubes. *Environmental Science & Technology*, v. 43, p. 9167 – 9173, 2009.

OLK, D.C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Decrease in humification of organic matter with intensifies lowland rice cropping: a wet chemical and spectroscopy investigation. *Soil Science Society of America Journal*, v. 64, p. 1337-1347, 2000.

Organization for the Economic Cooperation and Development.

PALERMO-NETO, J. & ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOZA, H.S.; GÓRNIK, S.L. & BERNARDI, M.M., eds. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. p.641-658.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introduction to spectroscopy*. (3th Ed.) New York: Thomson Learning, 2001, p. 13-83.

PEDERSEN, K. B; EDQVIST, L. E; Antimicrobials as growth promoters: resistance to common sense. Late lessons from early warnings: the precautionary principle. Disponível na World Wide Web em: <http://reports.eea.eu.int/environmental-issue-report-2001-22/en/issue-22-09.pdf> Acesso em janeiro 2014.

PEREIRA, L.A; JARDIM, I.C.S.F.; FOSTIER, A.H.; RATH, S. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. *Química Nova*, v. 35, p. 159-169, 2012.

PIGATIN, L.B.F. Compostos orgânicos de origem agroindustrial e urbana aplicados à produção vegetal e fertilidade do solo. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2011.

PILS, J. R. V.; LAIRD, D. A. Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K- and saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41, 1928-1933.

properties. Test nº 106: Adsorption – desorption using a batch equilibrium method.

PROVENZANO, M.R.; D'ORAZIO, V.; JERZYKIEWICZ, M.; SENESI, N. Fluorescence behaviour of Zn and Ni complexes of humic acids from different sources. *Chemosphere*, v. 55, p. 885-892, 2004.

RAICH-MONTIU, J., BELTRÁN, J.L., PRAT, M.D. Studies on the extraction of sulfonamides from agricultural soils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, p. 807-814, 2010.

REGITANO, J.B.; LEAL, R.M.P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *R. Bras. Ci. Solo*, v. 34, p.601-616, 2010.

RUTZ, F.; LIMA, G.J.M.M. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE AVES. Porto Alegre, 2001.

SANTOS, C.H. Análises espectroscópicas da matéria orgânica de solos sob aplicação de águas residuárias. 2008. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SANTOS, C.H. Estudos da matéria orgânica e composição elementar de solos arenosos de regiões próximas a São Gabriel da Cachoeira no Amazonas. 2014. 173f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T. & BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, 65:725-759, 2006.

second-harmonic generation: a look at the agricultural antibiotic oxytetracycline. *Journal of Physical Chemistry-C*, v. 111, p. 8796-8804, 2007.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte no Estado do Paraná. Curitiba: SESA/IESP, 2005. (Relatório Técnico).

SILVA, M. V. M.; SARMENTO, A. M. C.; FRANCA, A. P. Resíduos de antibióticos em leite: uma preocupação constante. Anais de evento: 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Expo-Gramado, Gramado, 19 a 22 de outubro de 2008.

SILVA, P; Farmacologia Ed.Guanabara Koogan, 4a edição, Rio de Janeiro, 1994.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.M. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. (6a Ed.) Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora, 2000.

SINDAN. 2015. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>. Acessada em agosto/2016.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Princípios de análise instrumental. 5 edição. Editora: bookman. São Paulo, 2002.

SOMORJAY, G.A. Introduction to surface chemistry and catalysis. New York: Wiley, 1994.

STEVENSON, F.J. Humus chemistry: genesis, composition, reaction. New York: Wiley Interscience, 1994. 443 p.

SWIFT, R.S. "Organic matter characterization". In: SPARKS, et al. (Eds.) Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. Soil Science Society of America Journal. Book Series: 5 Madison, *Soil Science Society of America Journal*, p. 1018-1020, 1996 .

TAPIA, O.; BERTRÁN, J. (Ed.) Understanding chemical reactivity: solvent effects and chemical reactivity. New York: Kluwer Academic, 2000, v. 17.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. J. Plant Nutr. Soil Sci., 166:145-167, 2003.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. Environ. Sci. Technol., 35:3397-3406, 2001.

TORRES, N.H.; AMÉRICO, J.H.P.; FERREIRA, L.F.R.; NAZATO, C.; MARANHO, L.A.; VILCA, F.Z.; TORNISIELO, V.L. Fármacos no meio ambiente – Revisão. Revista de estudos ambientais (online), v.14, n.4, p.67-75, 2012.

USDA. Foreign Agricultural Service. Country information. Western hemisphere – Brazil.

UYGUNER, C. S.; BEKBOLET, M. A comparative study on the photocatalytic degradation of humic substances of various origins. *Desalination*, v. 176, p. 167–176, 2005.

VALEUR, B. Molecular fluorescence: principles and applications. New York: Wiley, 2001. P. 54-58. BERTONCINI, E.I.; D'ORAZIO, V.; SENESI, N.; MATTIAZZO, M.E. Fluorescente analysis of humic and fulvic acids from two Brazilian oxisols as affected by biosolid amendment. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 381, p. 1281-1288, 2005.

VANZOLINI, K.L. Métodos para determinação enantiomérica dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol e águas residuais e de estuário. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

VAZ-JUNIOR, S. Estudo da sorção do antibiótico tetraciclina a solos e ácidos húmicos e avaliação dos mecanismos de interação envolvidos. 2010. 183f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

WANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J.; KENNEDY, I. Analysis of sulfonamide residues in edible animal products: A review. *Food Addit. Contam.*, 23, p.362-384, 2006.

WARREN, N., ALLAN, I.J., CARTER, J.E., HOUSE, W.A., PARKER, A. Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments – a review. *Applied Geochemistry*, v. 18, p. 159-194, 2003.

Washington, DC, 2010. Disponível em:
<http://www.fas.usda.gov/country/Brazil/Brazil.asp>.

WEHRHAN, A., KASTEEL, R., SIMUNEK, J., GROENEWEG, J., VEREECKEN, H. Transport of sulfadiazine in soil columns – Experiments and modeling approaches. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 89, p. 107-135, 2007.

WERSHAW, R.L. Molecular aggregation of humic substances. *Soil Science*, v. 164, p. 803 - 813, 1999.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION a. Antibiotic use in food-producing animals must be curtailed to prevent increased resistance in humans. WHO Press Releases, n° 73, out. 1999.

YANG, S., LIN, C., LIN, A.Y., HONG, P.A. Sorption and biodegradation of sulfonamide antibiotics by activated sludge: Experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions. *Water Research*, v. 45, p. 3389-3397, 2011.

YU, L.; FINK, G.; WINTGENS, T.; MELIN, T.; TERNES, T.A. Sorption behavior of potential organic wastewater indicators with soils. *Water Research*, v. 43, p. 951-960, 2010.