



LEANDRO ALVES PEREIRA

**SORÇÃO E DISSIPAÇÃO DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS
EM SOLOS BRASILEIROS**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LEANDRO ALVES PEREIRA

**SORÇÃO E DISSIPAÇÃO DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS
EM SOLOS BRASILEIROS**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SUSANNE RATH

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR LEANDRO ALVES PEREIRA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SUSANNE RATH.**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

P414s Pereira, Leandro Alves, 1980-
Sorção e dissipação de fármacos veterinários em solos brasileiros / Leandro Alves Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Susanne Rath.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Sorção. 2. Dissipação de fármacos veterinários. 3. Solos brasileiros. I. Rath, Susanne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Sorption and dissipation of veterinary drugs in Brazilian soils

Palavras-chave em inglês:

Sorption

Dissipation of veterinary drugs

Brazilian soils

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Susanne Rath [Orientador]

Ricardo Mathias Orlando

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

José Roberto Guimarães

Anne Hélène Fostier

Data de defesa: 07-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

A minha família pelo apoio em todos os momentos de minha vida

Agradecimentos

Agradeço à profa. Susanne por me aceitar como aluno de doutorado, pela paciência, pela tranquilidade e compreensão diante das minhas falhas e erros.

Muito obrigado à profa. Isabel Jardim por sua disponibilidade, consideração e serenidade.

À profa. Anne Hêlène Fostier pela contribuição e sugestões tão construtivas para a realização deste trabalho.

Agradeço à Andreza Camilotti Dionízio e à Lucília Vilela de Melo pelo auxílio, pela extrema competência e profissionalismo.

Muito obrigado à Alessandra Vieira pelo apoio e pelas palavras tão preciosas de incentivo e motivação.

Agradeço a minha amiga de longa data, Eliane Vasconcelos Stefaneli, pelo apoio nas horas difíceis.

Ao meu fiel amigo Harley Marcos Troiano por estar sempre presente nos momentos em que eu mais necessitei.

Ao amigo Jaime Câmara Lomelino pelo cuidado para comigo.

Muito obrigado ao prof. Ricardo Mathias Orlando e sua esposa Cyntia Cabral Ribeiro pelo auxílio e disponibilidade nos momentos em que eu necessitei.

A todos que fizeram parte da minha história no Laboratório Paracelsus e no LabCrom : Leonardo, Martins, Renata, Daiane, Rafael, Lívia, Fabrício, Mônica, Keity, Renata Nome, Luana, Carla, Marcelo, Cláudio, Elisa e Fernanda.

Agradeço à FAPESP pela concessão da minha bolsa de doutorado (Processo 2010/06488-7). Ao assessor do meu projeto pelo profissionalismo e pela extrema rapidez em todos os pareceres.

Ao IQ-UNICAMP e seus funcionários tão prestativos e cordiais.

Muito obrigado a minha família que é minha base de apoio. Obrigado aos meus pais que podem comemorar junto comigo esta conquista. Agradeço a vocês por sempre orarem por mim e por não medirem esforços para me ajudar.

Minha eterna gratidão àquele que sempre cuidou de mim, que guardou a minha vida e que renova minha esperança a cada dia - Meu Deus, muito obrigado!

Súmula Curricular

Nome: Leandro Alves Pereira

E-mail: leandro3qi@yahoo.com.br

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6769313601568045>

Formação acadêmica

- Doutorado em Ciências com habilitação em Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2014.
Título da tese: Sorção e dissipação de fármacos veterinários em solos brasileiros
Orientação: Profa. Dra. Susanne Rath
Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

- Mestrado em Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008
Título da dissertação: Desenvolvimento de um método de Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa (MISPE) para a determinação de Fenitrotiona em tomate
Orientação: Profa. Dra. Susanne Rath
Bolsa: CAPES

- Bacharelado e licenciatura em Química, Universidade Federal do Espírito Santo, 2005

Artigos publicados em periódicos

1. Barros, Leonardo Augusto de, Pereira, Leandro Alves, Custódio, Rogério, Rath, Susanne. A Novel Computational Approach for Development of Highly Selective Fenitrothion Imprinted Polymer: Theoretical Predictions and Experimental Validations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.25, p.619 - 628, 2014.
2. Pereira, Leandro Alves, Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes, Fostier, Anne Hélène, Rath, Susanne. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. *Química Nova*, v.35, p.159 - 169, 2012.
3. Pereira, Leandro Alves, Rath, Susanne. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.393, p.1063 - 1072, 2009.

Apresentação de trabalhos em congressos

1. Pereira, Leandro Alves, Rath, Susanne, Anne Hélène Fostier. Adsorção de Oxitetraciclina em solos característicos do Estado de São Paulo, 2013. São Pedro; III Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais
2. Pereira, Leandro Alves, Rath, S., Anne Hélène Fostier. Sorção das formas catiônica de zwitteriônica de danofloxacino em solos característicos do Estado de São Paulo, 2013. Águas de Lindóia; 36^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química
3. Pereira, Leandro Alves, Rath, Susanne, Anne Hélène Fostier. Adsorção de ivermectina em solos característicos do Estado de São Paulo, 2012. UEL; Londrina-PR; VI ENQAmb- Encontro Nacional de Química Ambiental; Inst.promotora/financiadora: Universidade Estadual de Londrina

4. Barros, L. A., Pereira, Leandro Alves, Rath, S. Modelagem Molecular Visando a Síntese de um Polímero de Impressão Molecular para Fenitrotiona, 2009. Fortaleza - CE; 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química
5. Barros, L. A., Pereira, Leandro Alves, Rath, S. Seletividade de Adsorção de um Polímero de Impressão Molecular para Fenitrotiona em Relação a seus Análogos, 2009. Fortaleza - CE; 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química
6. Pereira, Leandro Alves, Rath, S. Desenvolvimento de Polímeros de Impressão Molecular para Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa (MISPE) e Aplicação na Determinação de Fenitrotiona, 2007. João Pessoa; 14^o Encontro Nacional de Química Analítica; Universidade Federal da Paraíba

Resumo

Sorção e dissipação de fármacos veterinários em solos brasileiros

A produção animal em larga escala é dependente da administração de fármacos veterinários (FV) para fins terapêuticos e profiláticos. Devido a sua baixa absorção uma grande quantidade destas substâncias é excretada via fezes e urina dos animais medicados. Desta forma, os FV podem ser sorvidos em solos ou lixiviados pelo campo e para cursos de água. Devido aos riscos em potencial oferecidos aos micro-organismos do solo e da água, às plantas, bem como a possibilidade de dispersão de bactérias resistentes, o consumo de FV tornou-se uma questão de saúde pública. Diante deste cenário este trabalho avaliou a sorção da danofloxacina (DANO), da oxitetraciclina (OTC) e da ivermectina (IVM) em dois solos característicos do Estado de São Paulo, o Neossolo Quartzarênico (N1, solo arenoso) e o Argissolo Vermelho-Amarelo (S2, solo argiloso), segundo as diretrizes estabelecidas pela OECD 106. Os estudos realizados indicaram, em geral, aumento da capacidade de sorção dos fármacos nos solos de acordo com a ordem: OTC, IVM < DANO. Em nenhum dos casos foi observada a sorção irreversível das espécies. Para o antiparasitário IVM, que é amplamente empregado para o controle de ecto- e endoparasitas, foram realizados um estudo de lixiviação em coluna e outro de dissipação aeróbica. Esses estudos foram conduzidos de acordo com as normas da OECD 312 e da OECD 307, respectivamente. A IVM foi lixiviada até 18 cm de profundidade das colunas de solo, concentrando-se entre 0 a 12 cm no solo N1 e entre 0 a 6 cm no solo S2. De acordo com as condições de temperatura e umidades adotadas (19,3 °C e 78%, respectivamente) a dissipação do fármaco foi mais rápida no solo argiloso S2 ($DT_{50} = 11,5$ dias) em relação ao solo arenoso N1 ($DT_{50} = 15,5$ dias).

Abstract

Sorption and dissipation of veterinary drugs in Brazilian soils

The animal production on large-scale is dependent on the use of veterinary drugs (VD) for therapeutic and prophylactic purposes. Due to its low absorption a large amount of these substances is excreted via faeces and urine of treated animals. Thus, VD can be sorbed in soils or leached through the field to watercourses. Due to the potential risks offered to microorganisms in the soil and water, to plants and the possibility of spread of resistant bacteria, consumption of VD has become a public health issue. Under this scenario this study evaluated the sorption of danofloxacin (DANO), oxytetracycline (OTC) and ivermectin (IVM) in two characteristics soils of the State of São Paulo, named Neossolo Quartzarênico (N1, sandy soil) and Argissolo Vermelho-Amarelo (S2, clay soil), according to the OECD 106 guidelines. The studies indicated increased soil sorption capacity following to the order: OTC, IVM < DANO. In none of the cases irreversible sorption of the species was observed. For the antiparasitic drug IVM, which is widely employed for the control of endo- and ecto-parasites, soil column leaching and aerobic degradation studies were carried out according to OECD 312 and OECD 307 guidelines, respectively. IVM was leached to a depth of 18 cm of soil columns and concentrated from 0 to 12 cm in soil N1 and from 0 to 6 cm in soil S2. Under the conditions of temperature and humidity adopted (19 °C and 78.3%, respectively) the dissipation was faster in the clay soil S2 (DT₅₀ = 11.5 days) in comparison to the sandy soil N1 (DT₅₀ = 15.47 days).

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	xxi
Lista de Tabelas.....	xxv
Lista de Figuras.....	xxvii
Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1 O solo.....	3
1.2 Os solos do Estado de São Paulo.....	8
1.3 O consumo e a introdução de fármacos veterinários no meio ambiente.....	10
1.4 Impactos provocados pela presença de fármacos veterinários no meio ambiente.....	13
1.5 Aspectos regulatórios envolvendo o consumo de fármacos veterinários....	17
1.6 Estudos de sorção e dessorção de fármacos no solo.....	21
1.7 Modelos cinéticos de sorção.....	23
1.8 A degradação de fármacos no solo.....	25
1.9 Estudos de degradação de fármacos no solo	27
1.10 Estudos de lixiviação em coluna.....	28
1.11 A extração e a determinação de fármacos em solos.....	29
Capítulo 1.1.....	31
1.1.1 Objetivos.....	33
Capítulo 2: Danofloxacina.....	35
2.1 A danofloxacina.....	37
2.2 Parte experimental.....	40
2.2.1 Reagentes, solventes e padrões.....	40
2.2.2 Materiais e equipamentos.....	40
2.2.3 Condições cromatográficas.....	41
2.2.4 Solos.....	41
2.3 Métodos.....	44
2.3.1 Avaliação da estabilidade da danofloxacina em solução.....	44
2.3.2 Otimização da razão solo/solução.....	44

2.3.3 Avaliação de cinética de sorção da danofloxacin nos solos.....	45
2.3.4 Validação do método para a determinação de danofloxacin no extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	45
2.3.5 Construção das isothermas de sorção e dessorção da danofloxacin nos solos N1 e S2.....	46
2.4 Resultados e discussão.....	47
2.4.1 Estudos iniciais.....	47
2.4.2 Validação do método para a determinação de danofloxacin no extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	57
2.4.3 Construção das isothermas de sorção e dessorção da danofloxacin nos solos N1 e S2	63
Capítulo 3: Oxitetraclina.....	75
3.1 A oxitetraclina.....	77
3.2 Parte experimental.....	79
3.2.1 Reagentes, solventes e padrões.....	79
3.2.2 Materiais e equipamentos.....	80
3.2.3 Condições cromatográficas.....	80
3.3 Métodos.....	80
3.3.1 Avaliação da estabilidade da oxitetraclina em solução.....	80
3.3.2 Otimização da razão solo/solução.....	81
3.3.3 Avaliação de cinética de sorção da oxitetraclina nos solos.....	81
3.3.4 Validação do método para a determinação de oxitetraclina no extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	82
3.3.5 Construção das isothermas de sorção e dessorção da oxitetraclina nos solos N1 e S2.....	82
3.4 Resultados e discussão.....	83
3.4.1 Estudos iniciais.....	83
3.4.2 Validação do método para a determinação de oxitetraclina no extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	90
3.4.3 Isothermas de sorção e dessorção da oxitetraclina nos solos N1 e S2...	93

Capítulo 4: Ivermectina.....	101
4.1 A Ivermectina.....	103
4.2 Parte experimental.....	105
4.1 Reagentes, solventes e padrões.....	105
4.2.2 Materiais e equipamentos.....	106
4.2.3 Condições cromatográficas.....	106
4.3 Métodos.....	107
4.3.1 Avaliação da estabilidade da ivermectina em solução.....	107
4.3.2 Otimização da razão solo/solução.....	107
4.3.3 Avaliação de cinética de sorção da ivermectina nos solos.....	108
4.3.4 Otimização das condições de extração de ivermectina do extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	108
4.3.5 Otimização das condições de extração de ivermectina nos solos.....	109
4.3.6 Determinação do balanço de massa da ivermectina nos solos.....	110
4.3.7 Validação do método para a determinação de ivermectina no extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	111
4.3.8 Validação do método de determinação da ivermectina nos solos N1 e S2.....	112
4.3.9 Construção das isotermas de sorção e dessorção da ivermectina nos solos N1 e S2.....	112
4.3.10 Estudo de lixiviação de ivermectina nos solos N1 e S2.....	113
4.3.11 Estudo cinético de degradação da ivermectina nos solos.....	114
4.4 Resultados e Discussão.....	115
4.4.1 Estudos Preliminares.....	115
4.4.2 Desenvolvimento dos procedimentos de extração da ivermectina do extrato aquoso e dos solos N1 e S2.....	121
4.4.3 Balanço de massa da ivermectina nos solos N1 e S2.....	124
4.4.4 Validação do método para a determinação da ivermectina no extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	125
4.4.6 Isotermas de sorção e dessorção da ivermectina nos solos N1 e S2.....	130
4.4.7 Estudo de lixiviação de ivermectina nos solos N1 e S2.....	135
4.4.8 Estudo de dissipação da ivermectina nos solos N1 e S2.....	138

Capítulo 5	147
5.1 Conclusões.....	149
Capítulo 6	153
6.1 Referências bibliográficas.....	155

Lista de abreviaturas

C_{aq}^{des} : concentração de fármaco desorvido presente na fase aquosa

C_{aq} : concentração de fármaco em equilíbrio na fase aquosa

C_s^{des} : concentração de fármaco remanescente no solo

C_s^{ads} : concentração de fármaco sorvido no solo

q_t : concentração de fármaco sorvido no tempo t

q_e : concentração máxima de soluto sorvido no equilíbrio

k_1 : constante de velocidade de pseudo-primeira-ordem

k_2 : constante de velocidade de pseudo-segunda-ordem

$1/n$: expoente de Freundlich

ABA: abamectina

AH: ácido húmico

AVM: avermectinas

BR: Tampão Britton-Robinson

C: concentração da substância

C_0 : concentração inicial da substância

CAP: concentração ambiental previsível

CIPRO: ciprofloxacina

CPSE: concentração previsível sem efeito

CPSE: concentração previsível sem efeito

CTC: capacidade de troca catiônica

DAD: detector de arranjo de diodos

DANO: danofloxacina

DPR: estimativa do desvio padrão relativo

DT₅₀: tempo para a redução da concentração da substância em 50%

EMA: Agência Europeia de Medicamentos, do inglês *European Medicines Agency*

FBC: fator de bioconcentração

FLD: detector de fluorescência

FV: fármacos veterinários

H: índice de histerese

IVM: ivermectina

JECFA: Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares, do inglês *Joint Expert Committee on Food Additives*

K: constante de primeira ordem

K_D: coeficiente de distribuição

K_F : coeficiente de sorção/dessorção de Freundlich

K_{ow} : coeficiente de partição octanol-água

LD: limite de detecção

LMR: limite máximo de resíduo

LQ: limite de quantificação

OECD: Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, do francês *Organisation de Coopération et de Développement Économiques*

OTC: oxitetraciclina

pF: capacidade de retenção de água do solo

PPO: pseudo-primeira-ordem

PSO: pseudo-segunda-ordem

QR: quociente de risco

r: coeficiente de correlação linear

r²: coeficiente de determinação

SH: substâncias húmicas

SINDAN: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal

TETRAS: tetraciclinas

TMP: trimetoprima

t_r: tempo de retenção

u.a.: unidade de absorbância

u.f.: unidade de fluorescência

VICH: Comitê Veterinário Internacional de Harmonização, do inglês *Veterinary International Committee on Harmonization*

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Principais propriedades físico-químicas da danofloxacin.....	39
Tabela 2.2: Características físico-químicas e granulométricas dos solos N1 e S2.....	43
Tabela 2.3: Parâmetros cinéticos de sorção da danofloxacin nos solos N1 e S2 obtidos através do ajuste ao modelo de pseudo-segunda-ordem.....	56
Tabela 2.4: Parâmetros de validação para a determinação cromatográfica da danofloxacin no extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	62
Tabela 2.5: Parâmetros de sorção da danofloxacin nos solos N1 e S2.....	66
Tabela 2.6: Parâmetros de sorção da danofloxacin em diferentes solos.....	71
Tabela 3.1: Principais propriedades físico-químicas da oxitetraciclina.....	77
Tabela 3.2: Parâmetros cinéticos de sorção da oxitetraciclina nos solos N1 e S2 obtidos através do ajuste ao modelo de pseudo-segunda-ordem.....	90
Tabela 3.3: Parâmetros de validação para a determinação cromatográfica da oxitetraciclina no extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	93
Tabela 3.4: Parâmetros de sorção da oxitetraciclina nos solos N1 e S2.....	95
Tabela 3.5: Parâmetros de sorção da oxitetraciclina em diferentes solos.....	96
Tabela 4.1: Principais propriedades físico-químicas da ivermectina B _{1a}	104
Tabela 4.2: Procedimentos avaliados para a extração de ivermectina do extrato aquoso dos solos N1 e S2.....	109
Tabela 4.3: Procedimentos avaliados para a extração de ivermectina dos solos.....	110
Tabela 4.4: Parâmetros cinéticos de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 obtidos através do ajuste ao modelo de pseudo-segunda-ordem.....	121
Tabela 4.5: Parâmetros de validação para a determinação cromatográfica da ivermectina nos solos N1 e S2.....	130
Tabela 4.6: Parâmetros de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2.....	132
Tabela 4.7: Parâmetros de sorção da ivermectina em diferentes solos.....	133

Tabela 4.8: Parâmetros cinéticos de degradação da ivermectina nos solos N1 e S2 sob temperatura e humidade controladas e não controladas.....	142
Tabela 4.9: Medição da respiração microbiana nos solos N1 e S2 durante o estudo cinético de degradação da IVM.....	145

Lista de Figuras

Figura 1.1: Modelo estrutural proposto para o ácido húmico. Adaptado de Schulten e Schnitzer (1995).....	4
Figura 1.2: Representação esquemática de uma camada tetraédrica formada por unidades SiO_4^{4-} (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).....	5
Figura 1.3: Representação esquemática de uma camada octaédrica formada por unidades SiO_4^{4-} (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).....	5
Figura 1.4: Diagrama esquemático da estrutura da caulinita (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).....	6
Figura 1.5: Diagrama esquemático da estrutura da illita (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).....	7
Figura 1.6: Diagrama esquemático da estrutura da montmorilonita (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).....	7
Figura 1.7: Mapa pedológico do estado de São Paulo.....	8
Figura 1.8: Faturamento do mercado veterinário nacional por classe terapêutica. Fonte: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN, 2014).....	10
Figura 1.9: Principais rotas de entrada de fármacos veterinários no meio ambiente. Adaptado de Pereira <i>et al.</i> , 2003.....	12
Figura 1.10: Esquema proposto pela VICH para a avaliação dos riscos ambientais provocados por fármacos veterinários. CAP: concentração ambiental previsível, QR: quociente de risco, K_{ow} : coeficiente de partição octanol-água. Adaptado de VICH, 2004.....	19
Figura 2.1: Estruturas das fluoroquinolonas.....	37
Figura 2.2: Equilíbrio ácido-base para as quinolonas 7-piperazinilas.....	38
Figura 2.3: Diagrama de especiação da danofloxacina em função de pH.....	47
Figura 2.4: Concentração média ($n = 5$) de danofloxacina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada em tampão Britton-Robinson 40 mmol L^{-1} nos valores de pH 5,0; 7,5 e 10,0, em função do tempo.....	48

Figura 2.5: Porcentagem média (n = 2) de sorção de danofloxacina nos solos N1 (retângulo branco) e S2 (retângulo sombreado) em função da razão de solo/solução.....	50
Figura 2.6: Cromatograma do extrato do solo N1 (1:80, m/v) em tampão BR 40 mmol L ⁻¹ (pH 5,0) fortificado com danofloxacina (10 µg mL ⁻¹) com e sem adição de EDTA. Coluna: X Bridge™ Shield RP 18, 4,6 x 200 mm, 5 µm. Coluna de guarda: X Bridge™ Shield RP 18 4,6 x 20 mm, 5 µm. Fase móvel: ácido fórmico 0,1% : metanol (71:29, v/v) no modo isocrático. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 10 µL. Temperatura: 30 °C. Detecção: FLD. Comprimentos de onda: 245 nm (excitação) e 450 nm (emissão). u.f: unidade de fluorescência.....	52
Figura 2.7: Curvas de concentração de danofloxacina sorvida no tempo t (q _t) em função do tempo para os solos N1 e S2.....	53
Figura 2.8: Ajuste dos dados de sorção da danofloxacina nos solos N1 e S2 ao modelo de pseudo-primeira-ordem. Onde q _e representa a concentração máxima de fármaco sorvido no equilíbrio.....	54
Figura 2.9: Ajuste dos dados de sorção da danofloxacina nos solos N1 e S2 ao modelo de pseudo-segunda-ordem.....	54
Figura 2.10: Ajuste dos dados de sorção da danofloxacina nos solos N1 e S2 ao modelo de Elovich.....	55
Figura 2.11: Curvas de concentração de danofloxacina sorvida no tempo t (q _t) em função do tempo ajustadas ao modelo de pseudo-segunda-ordem.....	56
Figura 2.12: Cromatogramas dos extratos brancos dos solos N1 (a) e S2 (b) em tampão Britton-Robinson (1:80, m/v) 40 mmol L ⁻¹ (pH 5,0; 7,5 e 10,0) acrescido de azida de sódio 1,5 mmol L ⁻¹ . Coluna: X Bridge™ Shield RP 18, 4,6 x 200 mm, 5 µm. Coluna de guarda: X Bridge™ Shield RP 18 4,6 x 20 mm, 5 µm. Fase móvel: ácido fórmico 0,1% : metanol (71:29, v/v) no modo isocrático. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 10 µL. Temperatura: 30 °C. Detecção: FLD. Comprimentos de onda: 245 nm (excitação) e 450 nm (emissão). u.f: unidade de fluorescência.....	58

Figura 2.13: Curvas analíticas e gráficos de resíduos construídos para a danofloxacina no extrato aquoso do solo N1 (1:80, m/v) em tampão Britton-Robinson 40 mmol L ⁻¹ + azida de sódio 1,5 mmol L ⁻¹ em pH 5,0, 7,5 e 10,0.....	60
Figura 2.14: Curvas analíticas e gráficos de resíduos construídos para a danofloxacina no extrato aquoso do solo S2 (1:80, m/v) em tampão Britton-Robinson 40 mmol L ⁻¹ + azida de sódio 1,5 mmol L ⁻¹ em pH 5,0, 7,5 e 10,0.....	61
Figura 2.15: Isotermas de sorção (círculo preto) e dessorção (círculo branco) da danofloxacina no solo N1 em pH 5,0; 7,5 e 10,0 ajustadas à forma logarítmica da Equação de Freundlich.....	64
Figura 2.16: Isotermas de sorção (círculo preto) e dessorção (círculo branco) da danofloxacina no solo S2 em pH 5,0; 7,5 e 10,0 ajustadas à forma logarítmica da Equação de Freundlich.....	65
Figura 3.1: Estrutura das tetraciclinas.....	78
Figura 3.2: Equilíbrio ácido-base para a oxitetraciclina. Adaptado de Mamani, 2007.....	84
Figura 3.3: Diagrama de especiação da oxitetraciclina em função do pH.....	84
Figura 3.4: Concentração média (n = 5) de oxitetraciclina 1 mg mL ⁻¹ , preparada em tampão Britton-Robinson 40 mmol L ⁻¹ nos valores de pH 2,5; 5,0 e 8,5, em função do tempo.....	85
Figura 3.5: Porcentagem média (n = 2) de sorção de oxitetraciclina nos solos N1 (retângulo branco) e S2 (retângulo sombreado) em função da razão solo/solução.....	86
Figura 3.6: Curvas de concentração de oxitetraciclina sorvida no tempo t (q _t) em função do tempo para os solos N1 e S2.....	87
Figura 3.7: Ajuste dos dados de sorção da oxitetraciclina nos solos N1 (círculo) e S2 (triângulo) ao modelo de pseudo-primeira-ordem.....	88
Figura 3.8: Ajuste dos dados de sorção da oxitetraciclina nos solos N1 (círculo) e S2 (triângulo) ao modelo de pseudo-segunda-ordem.....	88
Figura 3.9: Ajuste dos dados de sorção da oxitetraciclina nos solos N1(círculo) e S2 (triângulo) ao modelo de Elovich.....	89

Figura 3.10: Curvas de concentração de oxitetraciclina sorvida no tempo t (q_t) em função do tempo ajustadas ao modelo de pseudo-segunda-ordem.....	89
Figura 3.11: Cromatogramas dos extratos brancos dos solos N1(A), S2 (B) e de uma solução de oxitetraciclina $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ (C). Razão de solo:solução de 1:10 (m/v) em tampão Britton-Robinson 40 mmol L^{-1} (pH 2,5) acrescido de azida de sódio $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Coluna X Bridge™ Shield RP 18, $4,6 \times 200 \text{ mm}$ ($5 \text{ }\mu\text{m}$) e coluna de guarda X Bridge™ Shield RP 18 $4,6 \times 20 \text{ mm}$ ($5 \text{ }\mu\text{m}$). Fase móvel: ácido oxálico $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,1% de trietilamina:acetonitrila (90:10, v/v) no modo isocrático. Vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção: $5 \text{ }\mu\text{L}$. Temperatura: $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Detector: DAD (355 nm).....	91
Figura 3.12: Curvas analíticas e gráficos de resíduos construídos para a oxitetraciclina no extrato aquoso dos solos N1 e S2 (1:10, m/v) em tampão Britton-Robinson 40 mmol L^{-1} + azida de sódio $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 2,5.....	92
Figura 3.13: Isotermas de sorção (círculo preto) e dessorção (círculo branco) da oxitetraciclina nos solos N1 e S2 em pH 2,5 ajustadas à forma logarítmica da Equação de Freundlich.....	94
Figura 4.1: Estrutura das avermectinas.....	103
Figura 4.2: Concentração média ($n = 5$) de ivermectina $15 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ preparada em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo.....	115
Figura 4.3: Porcentagem média ($n = 2$) de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 em função da razão de solo/solução.....	117
Figura 4.4: Curvas de concentração de ivermectina sorvida no tempo t (q_t) em função do tempo para os solos N1 e S2.....	118
Figura 4.5: Ajuste dos dados de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 ao modelo de pseudo-primeira-ordem.....	118
Figura 4.6: Ajuste dos dados de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 ao modelo de pseudo-segunda-ordem.....	119
Figura 4.7: Ajuste dos dados de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 ao modelo de Elovich.....	119

Figura 4.8: Curvas de concentração de ivermectina sorvida no tempo t (q_t) em função do tempo ajustadas ao modelo de pseudo-segunda-ordem.....	120
Figura 4.9: Recuperações médias ($n=3$) de ivermectina $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ no extrato aquoso dos solos N1 e S2 (1:40 m/v em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$).....	122
Figura 4.10: Eficiência de extração (recuperação média, %, $n = 3$) de ivermectina nos solos N1 e S2 através de extração por solvente e assistida por vortex ou ultrassom.....	123
Figura 4.11: Balanço de massa para a IVM nos solos N1 e S2.....	125
Figura 4.12: Cromatogramas dos extratos brancos dos solos N1 e S2 (1:40, m/v em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e do padrão de IVM derivatizada em concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Coluna: Purospher Star RP18 $4,0 \times 55 \text{ mm}$ ($3 \mu\text{m}$) e coluna de guarda Lichrospher 100 RP 18. Fase móvel: ACN:H ₂ O (93:7,v/v) no modo isocrático em vazão de 1 mL min^{-1} . Volume de injeção: $10 \mu\text{L}$. Detecção: FLD com λ de excitação de 365 nm e λ de emissão de 470 nm . Temperatura: $30 \text{ }^\circ\text{C}$	126
Figura 4.13: Curva analítica e gráfico de resíduos construídos através da derivatização da ivermectina com 1-metilimidazol e anidrido trifluoroacético.....	127
Figura 4.14: Cromatogramas dos extratos brancos dos solos N1 e S2 (extração por ultrassom empregando 2 ciclos de 20 minutos com 10 mL de metanol cada) e do padrão de IVM derivatizada em concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Coluna: Purospher Star RP18 $4,0 \times 55 \text{ mm}$ ($3 \mu\text{m}$) e coluna de guarda Lichrospher 100 RP 18. Fase móvel: ACN:H ₂ O (93:7,v/v) no modo isocrático em vazão de 1 mL min^{-1} . Volume de injeção: $10 \mu\text{L}$. Detecção: FLD com λ de excitação de 365 nm e λ de emissão de 470 nm . Temperatura: $30 \text{ }^\circ\text{C}$	128
Figura 4.15: Curvas analíticas e gráficos de resíduos construídos através da fortificação de 5 g de solo com ivermectina e extração por ultrassom em 2 ciclos de 20 minutos com 10 mL de metanol cada.....	129
Figura 4.16: Isotermas de sorção (círculo preto) e dessorção (círculo branco) da ivermectina nos solos N1 e S2 ajustadas à forma logarítmica da equação de Freundlich.....	131

Figura 4.17: Aparato montado para a realização dos estudos de lixiviação em coluna.....	136
Figura 4.18: Porcentagem de ivermectina recuperada em função da profundidade das colunas de solo.....	137
Figura 4.19: Gráfico de temperatura e de umidade ambiente em função do tempo monitoradas durante o estudo cinético de degradação da ivermectina....	139
Figura 4.20 Ajuste à equação de primeira ordem das curvas cinéticas de degradação da ivermectina nos solos N1 e S2 em condição controlada (temperatura de 19,3 ° C e humidade de 78 %, linha azul) e ambiente (linha vermelha).....	141

Capítulo 1: *Introdução*

1.1 O solo

O solo é um sistema de três fases com componentes sólidos, líquidos e gasosos, no qual a fase sólida representa cerca de 50% do volume total de matéria. Apesar das proporções não serem fixas e sofrerem variações de acordo com o material de origem, aspectos climáticos e profundidade, estima-se que destes 50%, aproximadamente 95% sejam de material mineral, enquanto o restante é constituído por matéria orgânica (Chesworth, 2008; USDA, 2010).

A matéria orgânica é formada desde moléculas simples (ácidos orgânicos, aminoácidos e carboidratos) até polímeros complexos, sendo que estes últimos, entre outros, constituem as substâncias húmicas (SH) do solo. As SH são formadas por material macromolecular e heterogêneo, resultante da decomposição de plantas, animais e biomassa microbiana. São compostos sem estequiometria definida, apresentando atividade física, química e resistência à biodegradação. Além disto, as SH são importantes elementos do solo, já que regulam o processo de nutrição das plantas, controlam a mobilidade de íons, a umidade e a mobilização de moléculas orgânicas (Chesworth, 2008; FAO, 2006).

De acordo com sua solubilidade, as SH podem ser classificadas em três frações:

- ✓ ácidos húmicos (AH): fração solúvel em todas as condições de pH;
- ✓ ácidos fúlvicos: fração solúvel em meio alcalino;
- ✓ humina: fração insolúvel em qualquer condição de pH.

Atualmente, duas abordagens são aceitas para explicar a estrutura dos AH: a macromolecular e a supramolecular. A primeira teoria estabelece que as variações estruturais dos AH são similares àsquelas observadas em macromoléculas biológicas como proteínas e polissacarídeos e dependem, desta forma, do pH do meio. Já a segunda teoria, que é a mais aceita, estabelece que os AH formam agregados que são estabilizados por interações fracas, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas de van der Waals (Piccolo, 2001).

Uma proposta estrutural para os AH é apresentada na Figura 1.1.

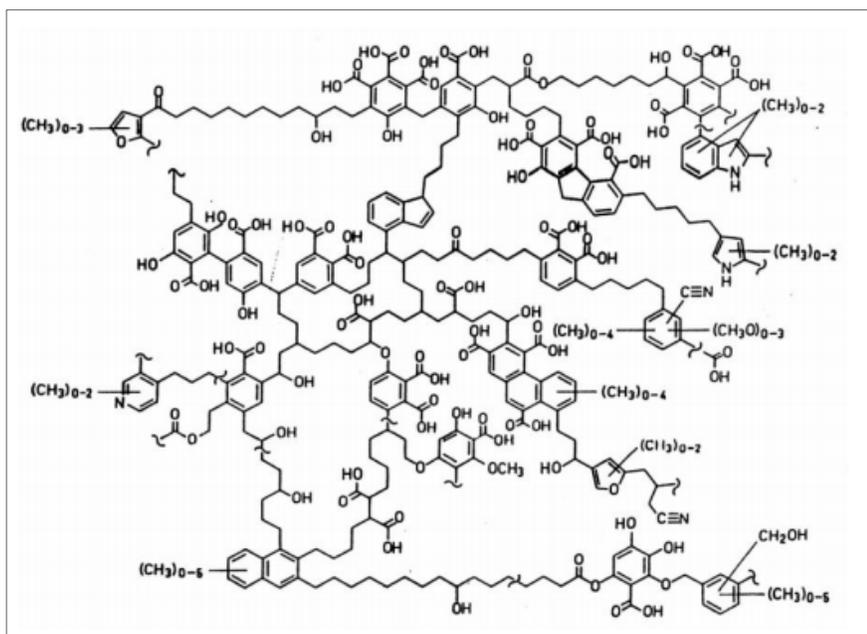


Figura 1.1: Modelo estrutural proposto para o ácido húmico. Adaptado de Schulten e Schnitzer (1995).

Os AH e fúlvicos têm influência direta nas reações de troca catiônica no solo, uma vez que podem adquirir cargas negativas devido à presença de grupos polifenólicos e carboxílicos em sua estrutura (Chesworth, 2008). Outros tipos de interações como ligações de hidrogênio, interação hidrofóbica entre grupamentos alifáticos, transferência de carga e sobreposição de sistemas π aromáticos são também observados entre os AH e compostos orgânicos (Piccolo, 2001).

A fase líquida do solo é chamada de solução do solo, sendo composta pela mistura de água, sais minerais e moléculas de baixa massa molar, tais como aminoácidos, peptídeos e açúcares, além de substâncias húmicas dissolvidas (Chesworth, 2008).

A fração mineral do solo pode ser separada em três partes, as quais são classificadas de acordo com o tamanho das partículas constituintes (argila < 0,002 mm, silte entre 0,002 e 0,05 mm e areia > 0,05 mm) (Chesworth, 2008).

A argila é proveniente da degradação de rochas constituídas essencialmente por silicatos de alumínio hidratados denominados minerais de argila ou argilominerais que podem conter sílica livre e outras impurezas (Holtz e Kovacs, 1981).

Os argilominerais são constituídos por unidades tetraédricas com um cátion central de Si rodeado por O^{2-} ou OH^- e unidades octaédricas com um cátion central de Al, Fe ou Mg também rodeado por O^{2-} ou OH^- . A expansão horizontal destas unidades dá origem a duas camadas: uma tetraédrica e outra octaédrica (Holtz e Kovacs, 1981) (Figuras 1.2 e 1.3).

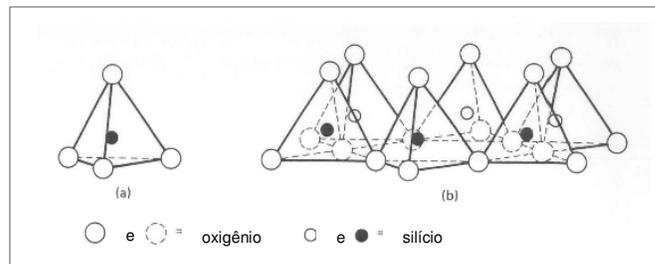


Figura 1.2: Representação esquemática de uma camada tetraédrica formada por unidades SiO_4^{4-} (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).

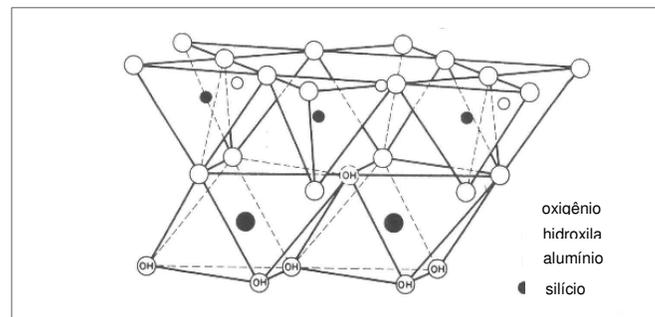


Figura 1.3: Representação esquemática de uma camada octaédrica formada por unidades SiO_4^{4-} (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).

As argilas são geralmente agrupadas segundo os argilominerais que predominam em sua constituição. Dentre estes, os mais importantes são a caulinita, a illita e a montmorilonita.

O grupo da caulinita é caracterizado por apresentar predominância de argilominerais de estrutura cristalina constituída pela alternância de uma camada tetraédrica (silício-oxigênio) e uma camada octaédrica (alumínio-hidroxilas), também chamada de gibbsita, em razão de 1 : 1 (Holtz e Kovacs, 1981) (Figura 1.4).

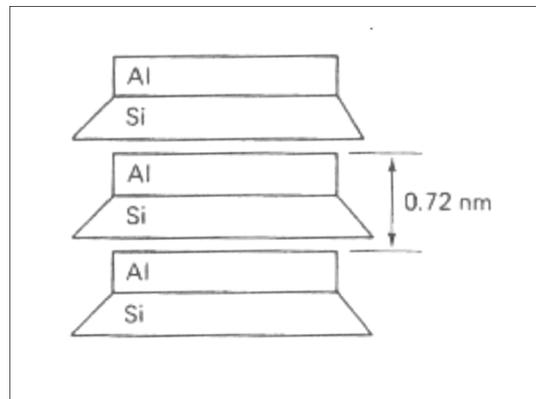


Figura 1.4: Diagrama esquemático da estrutura da caulinita (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).

No grupo da illita a estrutura cristalina é formada por camadas constituídas por três folhas, sendo uma central dioctaédrica ou trioctaédrica de alumínio e hidroxilas ligadas a duas folhas tetraédricas de silício e oxigênio, tendo cátions potássio adsorvidos entre as camadas (Holtz e Kovacs, 1981) (Figura 1.5).

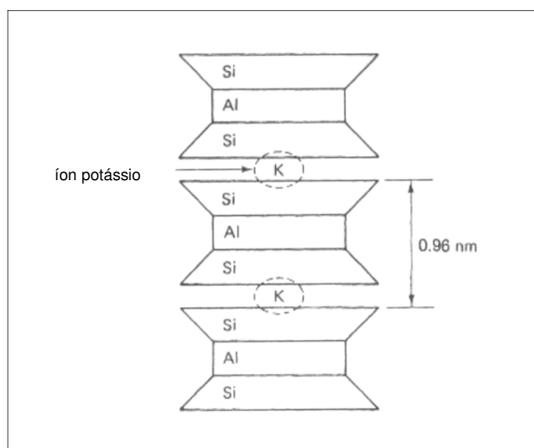


Figura 1.5: Diagrama esquemático da estrutura da ilita (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).

O grupo da montmorilonita, igualmente ao da ilita, reúne argilominerais com camadas 2 : 1 constituídas de 3 folhas (Figura 1.6). Contudo, diferencia-se do primeiro grupo pelos tipos de hidratação dos cátions adsorvidos entre as camadas. A montmorilonita é capaz de adsorver moléculas de água entre o espaçamento das camadas, graças à ausência de ligações fortes e à distância entre as mesmas. As argilas deste grupo são também chamadas de esmectitas (Holtz e Kovacs, 1981).

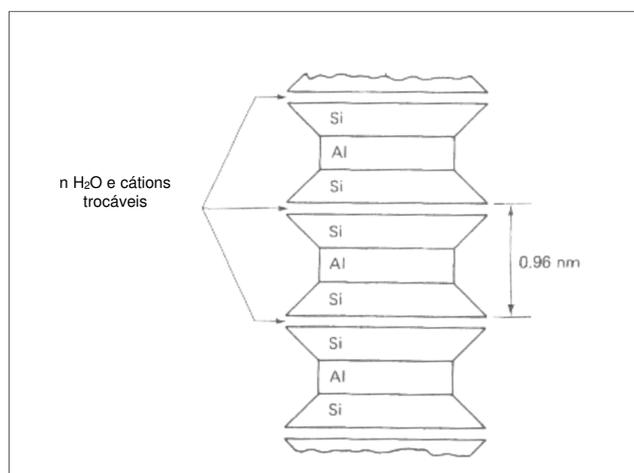


Figura 1.6: Diagrama esquemático da estrutura da montmorilonita (Adaptado de Holtz e Kovacs, 1981).

1.2 Os solos do estado de São Paulo

Os solos característicos do estado de São Paulo são apresentados na Figura 1.7. Este mapa foi cedido pelo Dr. Jener Fernando Leite de Moraes, pesquisador do Laboratório de Geoprocessamento do Instituto Agronômico de Campinas. O mapa foi elaborado por tratamento dos dados em programa ARC-GIS com colaboração do Dr. Adelson Soares Filho, do Instituto de Geociências da UNICAMP. De acordo com estudos realizados, calcula-se que os argilossolos vermelho-amarelos representem 41,2% da superfície do Estado, os latossolos vermelhos 30,2%, os latossolos vermelho-amarelos 9,4% e os neossolos quartzarênicos 3,6%. Estes quatro solos cobrem, portanto, 84,4% de toda a superfície do Estado.

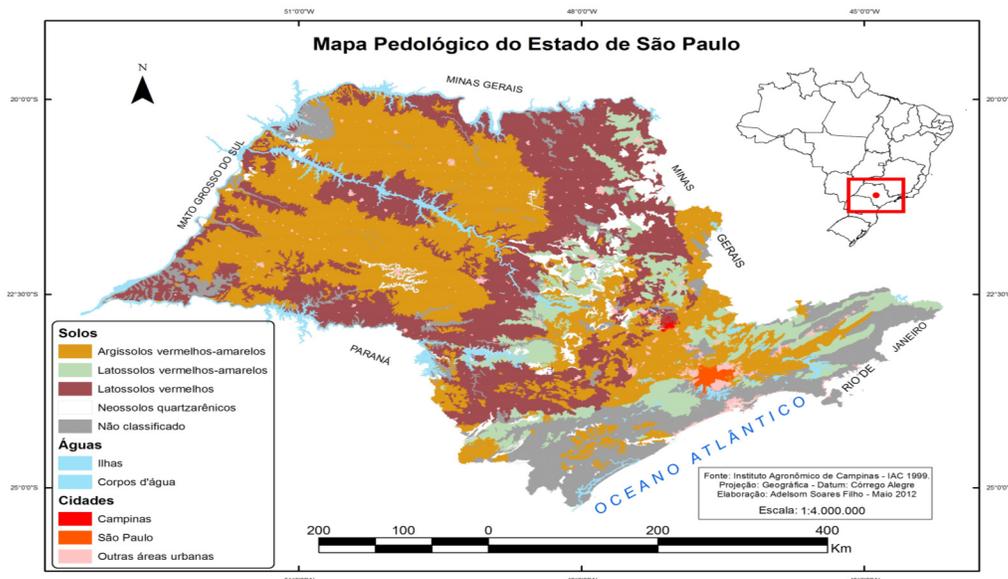


Figura 1.7: Mapa pedológico do estado de São Paulo.

Os latossolos são constituídos por material mineral apresentando horizonte B latossólico imediatamente abaixo de qualquer tipo de horizonte A, dentro de 200 cm da superfície do solo ou dentro de 300 cm se o horizonte A apresentar mais que 150 cm de espessura. Esta classe de solos constitui o agrupamento mais extenso do estado de São Paulo. São, em geral, solos com boas propriedades físicas e situados, na maioria dos

casos, em relevo favorável ao uso intensivo de máquinas agrícolas, com exceção dos solos localizados em regiões serranas (ABAG/RP, 2014).

Os latossolos tendem a apresentar elevada porosidade e friabilidade, o que facilita seu manejo agrícola. São solos com boa drenagem interna, mesmo os argilosos. Devido ao elevado teor de óxidos de ferro, os latossolos férricos apresentam alta capacidade de adsorção de fósforo. Esses solos, quando ácidos, possuem virtual ausência de alumínio ao longo do perfil, mas a natureza oxídica do material desses solos permite que se manifeste, a pouca profundidade, a predominância de cargas positivas sobre as negativas. Conseqüentemente, a retenção de ânions (sulfatos, fosfatos, nitratos) é maior do que a de cátions, fato que demanda práticas específicas de manejo (ABAG/RP, 2014).

Os argissolos são basicamente solos constituídos por material mineral, apresentando horizonte B textural com argila de baixa atividade imediatamente abaixo do horizonte A ou E. O acréscimo de argila em profundidade e a capacidade de troca de cátions inferior a 27 cmol/kg de argila são os principais atributos diagnósticos para todos os argissolos. Estes solos, quando apresentam elevado gradiente textural são muito susceptíveis à erosão, sendo necessários cuidados especiais principalmente nos arênicos e espessarênicos. Nas regiões serranas é comum a presença de afloramentos rochosos associadas aos argissolos. Essas características estão geralmente associadas a relevos fortemente ondulados e montanhosos, o que limita tais solos ao uso agrícola (ABAG/RP, 2014).

Os neossolos são solos pouco evoluídos e sem horizonte B diagnóstico. Os neossolos quartzarênicos (areias quartzosas) apresentam a sequência de horizontes A-C, sem contato lítico dentro de 50 cm de profundidade, com textura areia ou areia franca nos horizontes até a profundidade mínima de 150 cm a partir da superfície do solo ou até um contato lítico. São essencialmente quartzosos, tendo nas frações areia grossa e areia fina 95% ou mais de quartzo, calcedônia e opala e, praticamente, ausência de minerais primários alteráveis (ABAG/RP, 2014).

1.3 O consumo e a introdução de fármacos veterinários no ambiente

A produção animal em larga escala depende da administração de fármacos veterinários (FV) para a prevenção, para o controle de doenças e de parasitas, além da promoção de crescimento das espécies. Deste modo, antimicrobianos, endectocidas, coccidiostáticos, antiprotozoários, antifúngicos, promotores de crescimento, hormônios, anestésicos, tranquilizantes, agentes antiinflamatórios não esteroidais são utilizados para assegurar a saúde animal (Boxall *et al.*, 2003; Díaz-Cruz *et al.*, 2003; Sarmah *et al.*, 2006; Kemper, 2008).

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN) o mercado farmacêutico veterinário movimentou, a nível mundial, a quantia de 20 bilhões de dólares no ano de 2010 (SINDAN, 2014). Segundo este mesmo órgão o faturamento da indústria nacional para o ano de 2013 foi estimado em 2 bilhões de dólares, sendo 40% deste valor referente à comercialização de antiparasitários e antimicrobianos (Figura 1.8).

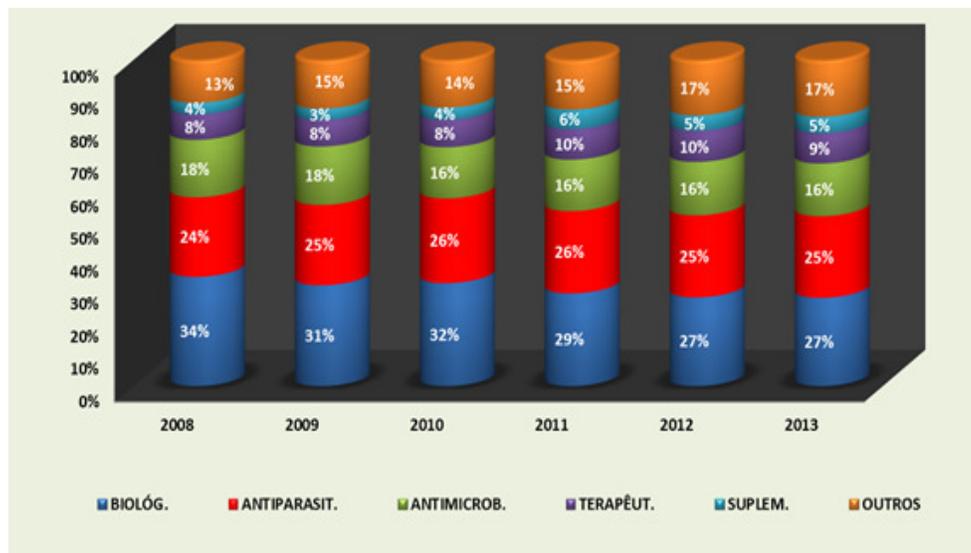


Figura 1.8: Faturamento do mercado veterinário nacional por classe terapêutica. Fonte: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN, 2014).

Nos Estados Unidos 11 milhões de kg de antimicrobianos são comercializados anualmente, sendo quase metade deste montante destinado à avicultura (UCS, 2014). Desde de 2010 a Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês *European Medicines Agency*) monitora o consumo de antimicrobianos em seus países membros. Segundo este órgão, o comércio de FV na União Europeia foi de aproximadamente 8 mil toneladas no ano de 2011 (EMA, 2014). Contudo, apesar do Brasil ser o quinto maior mercado farmacêutico veterinário mundial, o país não dispõe de estatísticas abrangentes a respeito das quantidades destas substâncias que são empregadas em suas criações (Regitano e Leal, 2010).

Uma vez administrados, a taxa de excreção dos FV dependerá das propriedades físico-químicas da substância utilizada, do modo de aplicação, da espécie animal e do tempo de tratamento. Estima-se que em alguns casos até 90% da dose aplicada seja eliminada, em sua forma não metabolizada ou como metabólitos ativos, já que a absorção destas substâncias geralmente ocorre de forma incompleta no organismo dos animais (Kemper, 2008, Jechalk *et al.*, 2014).

Conforme mostra a Figura 1.9 a introdução de FV no ambiente pode ocorrer pela contaminação por efluentes industriais e domésticos, pelas más condições de armazenagem dos produtos não utilizados ou com prazo de validade expirado, através de tratamentos administrados na aquicultura e por meio dos excrementos dos animais. Dentre estes, as fezes e a urina são as maiores fontes de contaminação, já que o esterco é muitas vezes lançado diretamente no pasto ou empregado como fertilizante em terras cultiváveis sem nenhum cuidado prévio (Boxall *et al.*, 2003; Díaz-Cruz *et al.*, 2003; Durso e Cook, 2014; Gao *et al.*, 2015; Sarmah, 2006).

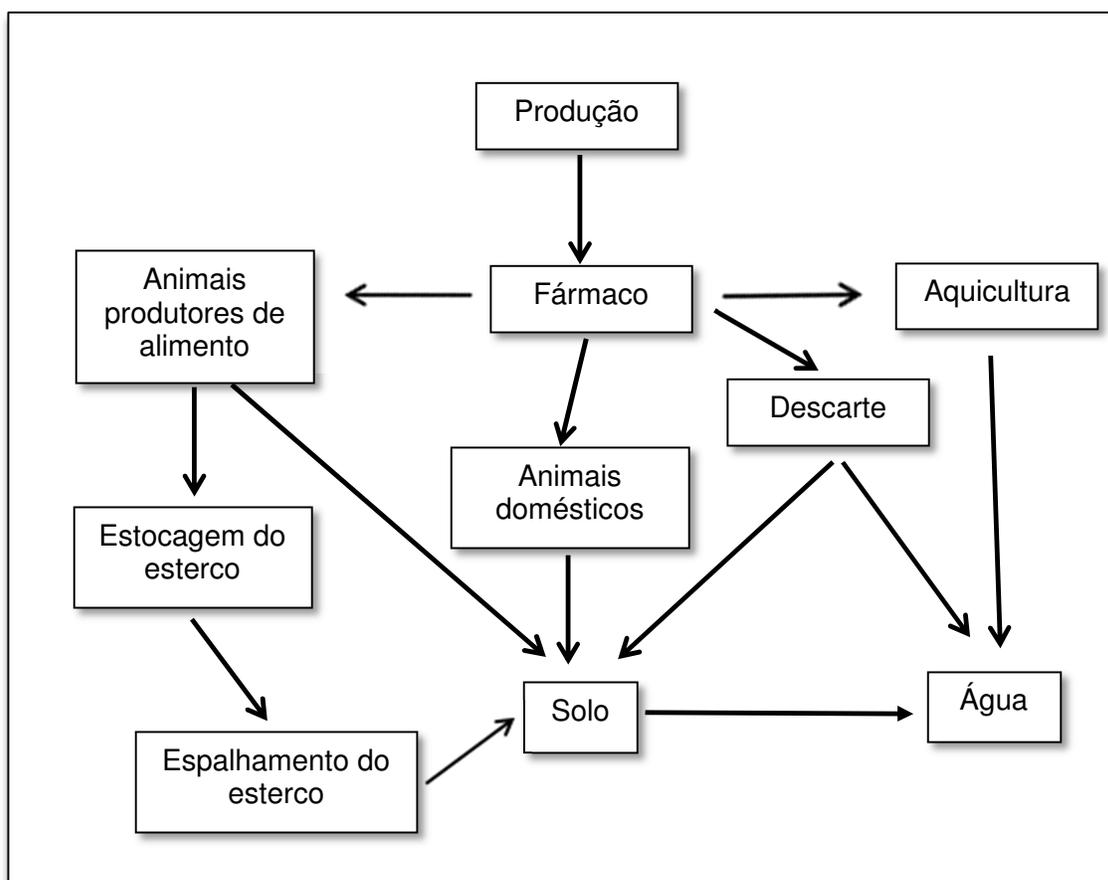


Figura 1.9: Principais rotas de entrada de fármacos veterinários no ambiente. Adaptado de Pereira *et al.*, 2012.

O uso controlado de fertilizantes naturais certamente é benéfico, uma vez que contribui para a reciclagem da matéria orgânica e dos nutrientes no solo (Xiang *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos estima-se que a cada ano 132 milhões de toneladas de estrume, produzido por bovinos, suínos e aves sejam utilizados como fertilizantes em uma área de 9 milhões de hectares (Dolliver *et al.*, 2007). Entretanto, para que esta prática seja segura deve-se minimizar os riscos de contaminação ambiental através da degradação parcial, total ou mineralização dos resíduos de FV. No entanto, na maioria das

vezes o esterco é coletado, armazenado e espalhado pelo solo sem nenhum tratamento prévio, o que contribui para a dispersão destes contaminantes.

Uma vez que os sistemas atuais de tratamento dos esgotos não são capazes de eliminar completamente os FV, a aplicação de biossólidos, provenientes do processo de tratamento de esgotos urbanos, pode se tornar uma ameaça ao meio ambiente, já que fármacos de uso humano e seus metabólitos podem atingir ecossistemas terrestres ou aquáticos por meio de lixiviação vertical no solo, por meio da descarga direta de efluentes domésticos e agrícolas em rios e por meio do escoamento superficial, o qual ocasiona no transporte de partículas dos solos por ação da água das chuvas (Jechalk *et al.*, 2014, Stuart *et al.*, 2012).

A aquicultura é outra importante forma de dispersão de medicamentos de uso veterinário no ambiente. Estima-se que até 70% dos produtos administrados, geralmente na forma de aditivos alimentares, não é ingerida pelos peixes, contaminando desta forma a água (Bjorlunk *et al.*, 1991).

1.4 Impactos provocados pela presença de fármacos no ambiente

Devido à presença de grupos polifenólicos e carboxílicos ionizáveis nas substâncias húmicas (SH) e aos hidróxidos metálicos, que possuem carga negativa ou positiva de acordo com o pH em que se encontram, o solo funciona como sítio de sorção de diversos compostos, dentre estes, os FV (Chesworth, 2008). Para tanto, vários mecanismos podem estar envolvidos: adsorção à superfície de constituintes minerais, troca iônica, sorção à matéria orgânica, formação de complexos com íons metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} ou Al^{3+}) e ligação de hidrogênio entre grupos polares dos FV e os ácidos húmicos do solo (Mackay e Vasudevan, 2012).

Uma vez sorvidos, a persistência de fármacos em sedimentos e solos dependerá grandemente de sua fotoestabilidade, de sua taxa de degradação e de sua capacidade de lixiviação pela água. Por outro lado, FV com baixa capacidade de sorção poderão alcançar águas superficiais e lençóis freáticos, sendo acumulados em peixes, mariscos, algas e

crustáceos ou até mesmo contaminar a água potável (Díaz-Cruz *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2012).

Apesar dos solos serem naturalmente habitados por micro-organismos, que produzem antimicrobianos, a concentração destes compostos no ambiente tem aumentado, em decorrência da dispersão destas substâncias. Tal situação é ainda agravada pelo fato de que a sorção ou fixação destes fármacos no solo nem sempre acompanha a eliminação de sua atividade antimicrobiana (Thiele-Bruhn, 2003; Beause, 2004; Jechalke *et al.*, 2014).

Em consequência deste fato, severos danos podem ser provocados, já que muitos micro-organismos são sensíveis aos antimicrobianos. Estima-se que cerca de 10^6 e 10^9 bactérias por grama, presentes em solos cultiváveis e florestais, sejam responsáveis pela imobilização de minerais e processos naturais de decomposição. Com a morte destes micro-organismos a capacidade do solo em degradar outros contaminantes, tais como os agrotóxicos, seria prejudicada (Boxall *et al.*, 2003; Kemper, 2008).

A bioacumulação de FV em plantas e pequenos organismos é outro impacto provocado pela dispersão destes compostos no solo. Kinney e colaboradores verificaram a bioacumulação de trimetoprima (TMP) e diversos compostos orgânicos em minhocas após a aplicação de esterco e de lodo de esgoto contaminados ao solo (Kinney *et al.*, 2008). Recentemente, estudos indicaram que doses subletais de albendazol e de oxitetraciclina (OTC) afetaram a reprodução de organismos desta espécie (Gao *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2012).

Boxall e colaboradores detectaram florfenicol e TMP em alface e nas raízes da cenoura, ambas cultivadas em solos contaminados com estes fármacos (Boxall *et al.*, 2006). A sulfametazina foi detectada, em concentrações variando entre 0,1 a 1,2 mg kg⁻¹, em tecidos de milho, alface e batata (Dolliver *et al.*, 2007). Clortetraciclina, entre 2 a 17 ng g⁻¹, foi encontrada no repolho, milho e na cebola verde, ambos cultivados em solos fertilizados com esterco contaminado (Kumar *et al.*, 2005).

Mesmo não havendo evidências de que a bioacumulação de antimicrobianos em plantas ofereça riscos à saúde humana, há estudos que mostraram que o crescimento de espécies vegetais foi prejudicado por alguns destes fármacos. Empregando concentrações

elevadas de sulfadimetoxina no solo, Migliori e colaboradores confirmaram a inibição do desenvolvimento pós germinativo de várias plantas. *Hordeum disthicum* e *Zea mays* apresentaram massa inferior em relação às plantas cultivadas em solos não contaminados. O tamanho das raízes, cotilédones e da folhagem da *Amaranthus retroflexus*, *Plantago major* e *Rumex acetosella* foi menor quando comparado às amostras de controle (Migliori *et al.* 1997; Migliori *et al.* 1998). Jjemba constatou que o metronidazol, em concentrações menores que 0,5 mg g⁻¹ de solo, afetou severamente o crescimento da soja (Jjemba, 2002). Aristilde e colaboradores verificam que a ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas interferiram na atividade de fotossíntese causando deformidades em plantas e inibição do crescimento das raízes do espinafre (Aristilde *et al.*, 2010). Nos experimentos realizados por Michelini e colaboradores foi verificado que a sulfadiazina acumulou-se na *Salix Fragilis L.* provocando diminuição do tamanho das raízes da planta e alterando a capacidade de captação de água pela mesma (Michelini *et al.*, 2012).

Outra preocupação em relação aos antimicrobianos é o desenvolvimento de bactérias resistentes, provocado por seleção natural, troca de material genético entre bactérias do solo e aquelas presentes nas fezes de animais ou entre bactérias produtoras de antimicrobianos (Sengeløv *et al.*, 2003; Chander *et al.*, 2005, Jechalke *et al.*, 2013).

Esta preocupação, entre outras, fez com que a União Europeia proibisse o emprego de antimicrobianos com a finalidade de promover o crescimento em animais produtores de alimento, já que existe o receio de que bactérias resistentes possam infectar o homem por meio do consumo destes produtos. Outra ação tomada foi a elaboração de guias normativos que orientam a avaliação dos novos antimicrobianos no que diz respeito ao seu potencial em promover o desenvolvimento de bactérias resistentes (FDA, 2003).

Genes cada vez mais resistentes têm sido espalhados em solos de uso agrícola através do esterco de animais que são submetidos ao tratamento com antimicrobianos (Durso e Cook, 2014, Jechalke, *et al.*, 2014). Brandt e colaboradores comprovaram que a aplicação de esterco contaminado com sulfadiazina estimulou a transferência horizontal de genes e o crescimento bacteriano em solos (Brandt *et al.*, 2009). Em experimentos de campo foi observado que em esterco de porcos, também contaminados com sulfadiazina, houve aumento dos genes *sul1* e *sul2* relacionados ao ribossomo RNA16S bem como a transferência de resistência ao fármaco (Jechalke *et al.*, 2013). Um número elevado de

genes resistentes à tetraciclina foram observados por mais de 16 meses em solos contaminados com o fármaco (Hong *et al.*, 2013). Em vários estudos foi verificado o surgimento de genes resistentes à fluoroquinolonas após a dispersão de estrume de animais em solos (Campos *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2012; Veldman *et al.*, 2011, Vredenburg *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2015).

Foi comprovado que até mesmo fármacos com alta capacidade de sorção, tais como as fluoroquinolonas e tetraciclinas (TETRAS) não permanecem imóveis, uma vez que têm sido encontrados em ambientes aquáticos de áreas urbanas e rurais (O' Connor e Aga, 2007; Picó e Andreu, 2007). Estudos realizados também têm comprovado a presença de inúmeros fármacos em sedimentos, lodos e águas de rios, devido a descarga de efluentes domésticos e agroindustriais nos mesmos (Vazquez-Roig *et al.*, 2010; We *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas ácido nalidíxico, eritromicina, tilosina, norfloxacin, clortetraciclina, doxiciclina, demeclociclina, tetraciclina, ciprofloxacina, enrofloxacin, lincomicina, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfacloropiridazina, sulfametazina, sulfametoxazol, acetilsulfametoxazol e TMP foram encontrados em águas de rios e córregos (Zuccato *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2001; Hilton e Thomas, 2003; Yang e Carlson, 2003; Ashton *et al.*, 2004; Castiglioni *et al.*, 2004; Kolpin *et al.*, 2004; Thomas e Hilton, 2004; Yang e Carlson, 2004; Watkinson *et al.*, 2009). Tilosina foi encontrada em águas potáveis e o sulfametoxazol em águas subterrâneas (Zuccato *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2001). Recentemente flunixin, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno e cloranfenicol foram encontrados em lodos de rios (Azzouz e Ballesteros, 2012). Diversos fármacos de uso humano e veterinário, dentre estes a ofloxacin, a ciprofoxacin, o diazepam, o metoprolol, o propranolol e a carbanazepina foram detectados em sedimentos de áreas pantanosas da Espanha (Vazquez-Roig *et al.*, 2010). Carmona e colaboradores detectaram cloranfenicol, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno e tianfenicol em águas minerais e do rio Turia no oeste da Espanha (Carmona *et al.*, 2014). Sulfametazina, sulfametoxazol, sulfadoxina, sulfaquinoxalina, clortetraciclina, tetraciclina e OTC foram detectados em águas de rios, localizados ao redor de áreas produtoras de criações de bovinos e suínos na província de Jiangsu na China (Wei *et al.*, 2011). Ketoprofeno, acetaminofeno, carbamazepina, propranolol, metoprolol e albendazol foram encontrados

em águas de consumo humano coletadas nas regiões de Novi Sad e Zrenjanin na Sérvia (Petrović *et al.*, 2014).

Diante das ameaças oferecidas aos ecossistemas terrestres e aquáticos, os fármacos de uso humano e veterinário bem como seus produtos de degradação são referidos como poluentes emergentes. Embora muitas destas substâncias não sejam relativamente novas as mesmas têm sido continuamente introduzidas no meio ambiente devido à atividade humana (Horvat *et al.*, 2012).

1.5 Aspectos regulatórios envolvendo o consumo de fármacos veterinários

Diante dos possíveis riscos, provocados pela dispersão de FV no ambiente, houve interesse crescente da comunidade científica em questões envolvendo o consumo destas substâncias nas últimas décadas. Atualmente, a disseminação de FV no ambiente é tratada, em países desenvolvidos, como uma questão de saúde pública.

Como reflexo desta política avaliações dos impactos provocados por fármacos a organismos como peixes, algas, micróbios, minhocas, plantas e daphnias passaram a ser requeridos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1980, e pela União Europeia, em 1998 (EMA, 1997). Desde 2006 países europeus proibiram a utilização de antimicrobianos para a promoção do crescimento de animais produtores de alimentos (European Commission, 2003). Outra ação tomada foi a elaboração de guias normativos que orientam a avaliação dos novos antimicrobianos no que diz respeito ao seu potencial em promover o desenvolvimento de bactérias resistentes (FDA, 2003).

Considerando que a exposição à resíduos de FV pode vir a ser prejudicial à saúde humana, a Comissão do Codex Alimentarius vem estabelecendo limites máximos de resíduos (LMR) para alimentos. Esses LMR são estabelecidos por meio de avaliações toxicológicas e segundo as recomendações do Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA, *Joint Expert Committee on Food Additives*) da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação e da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006).

Apesar de haver recomendações para alimentos, até os dias atuais não existem legislações que estabeleçam limites específicos para a concentração de FV no solo. Somente no ano de 2001 a Agência Europeia de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*) determinou um limite genérico de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para resíduos de FV em solos. Este valor foi estabelecido com base em estudos toxicológicos realizados com os FV autorizados nos Estados Unidos e está abaixo dos níveis prejudiciais observados em minhocas, micróbios e plantas (VICH, 2000).

No âmbito internacional os Estados Unidos, o Japão, a União Europeia e o Comitê Veterinário Internacional de Harmonização (VICH, *Veterinary International Committee on Harmonization*) têm se empenhado para padronizar os estudos que avaliam os possíveis riscos provocados por FV ao meio ambiente e ao homem.

Segundo estabelecido pela EMA, a avaliação dos impactos causados por FV no ambiente deve ser realizada em duas fases, conforme esquematizado na Figura 1.10.

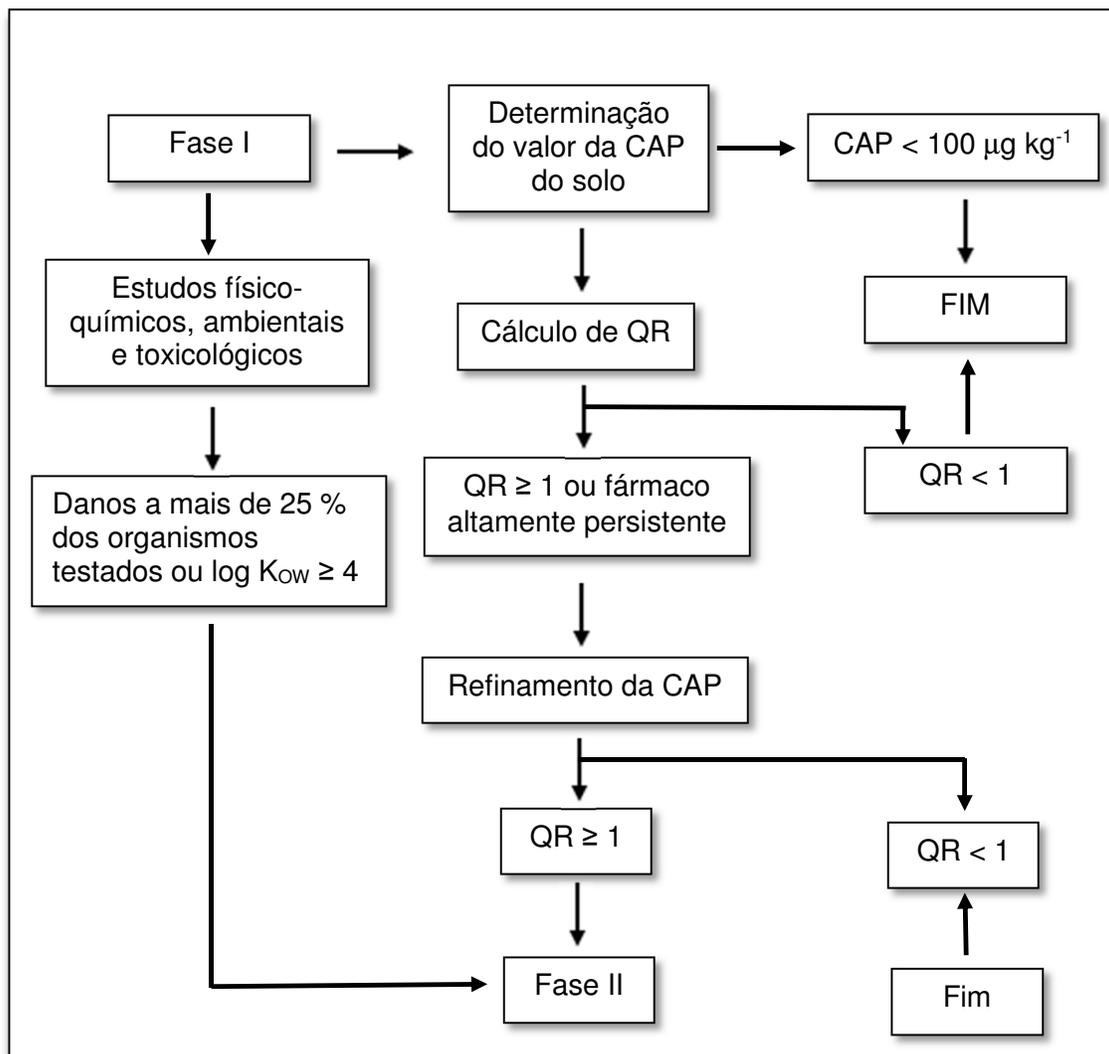


Figura 1.10: Esquema proposto pela VICH para a avaliação dos riscos ambientais provocados por fármacos veterinários. CAP: concentração ambiental previsível, QR: quociente de risco, K_{ow} : coeficiente de partição octanol-água. Adaptado de VICH, 2004.

A fase I consiste em três ações: 1) cálculo da concentração ambiental previsível (CAP) do FV e/ou metabólitos que são lançados no solo por meio das fezes e urina dos

animais; 2) cálculo do quociente de risco (QR) e 3) realização de estudos físico-químicos, ambientais e toxicológicos (VICH, 2004).

Para que a CAP seja determinada utilizam-se equações que levam diversos parâmetros em consideração como: o número de animais criados no espaço por ano, o tipo de criação, a dose diária do fármaco, os dias de tratamento, a massa corpórea do animal, a densidade do solo, entre outros. A partir da CAP o valor de QR pode ser calculado por meio da Equação 1.1 (EMEA, 2008):

$$QR = \frac{CAP}{CPSE} \quad \text{Equação 1.1}$$

onde: CPSE é a concentração previsível sem efeito.

Se QR for menor que 1 nenhuma ação precisa ser tomada, pois considera-se que o FV e/ou seus metabólitos não ofereçam riscos significativos ao meio ambiente. Por outro lado, se QR for maior que 1 ou se o fármaco for altamente persistente, a CAP precisa ser recalculada para que seu valor seja refinado. Para tanto, informações a respeito do metabolismo e da excreção do fármaco, além de sua biodegradação no esterco, no solo e em ambientes aquáticos devem ser consideradas. A partir do refinamento da CAP um novo valor de QR é então determinado. Se este valor for inferior a 1 a avaliação termina. Do contrário, a fase II deve ser realizada (VICH, 2004).

Na fase I também é feito o levantamento de dados físico-químicos, farmacológicos, toxicológicos e toxicocinéticos, além de informações sobre a degradabilidade e a persistência do FV e seus metabólitos no ambiente. Conforme estabelecido pela EMEA, as seguintes avaliações devem ser feitas (VICH, 2004):

1) Estudos das propriedades físico-químicas do FV: solubilidade na água, constantes de dissociação na água, espectro de absorção UV-VIS, coeficiente de partição octanol-água, pressão de vapor e ponto de fusão.

2) Estudos ambientais: sorção e dessorção do FV no solo, fotólise, hidrólise, biodegradação no solo e degradação em sistemas aquáticos. Sendo que estes dois últimos devem ser realizados no solo ou na água, dependendo de qual meio o FV é preferencialmente acumulado.

3) Estudos dos efeitos provocados pelo FV à organismos terrestres (plantas, minhocas, larvas da mosca e do besouro do esterco) ou aquáticos (algas, daphnia, peixes e crustáceos), dependendo de qual ambiente será mais atingido.

Se nesta última etapa forem verificados efeitos prejudiciais a mais de 25% dos micro-organismos do solo ou, se o log de K_{ow} (coeficiente de partição octanol-água) calculado para o FV for maior ou igual a 4, a EMA estabelece que a fase II seja realizada.

A fase II também consiste em avaliações dos efeitos provocados pelos FV à organismos terrestres e aquáticos. Contudo, novas espécies devem ser estudadas e a concentração de efeito não observado nos organismos avaliados deve ser calculada. Além disto, recomenda-se que fatores de bioconcentração (FBC) sejam calculados por meio da relação quantitativa estrutura atividade e que o valor de QR seja novamente determinado (VICH, 2004).

Se QR for novamente maior que 1 ou se os $FBC \geq 1000$, um laudo de avaliação dos impactos ambientais deve ser entregue às autoridades competentes, a fim de que a comercialização do novo FV seja autorizada (VICH, 2004).

1.6 Estudos de sorção e dessorção de fármacos no solo

Os estudos de sorção e dessorção de fármacos em solos são úteis para estimar a mobilidade e a distribuição destes compostos no ambiente, a disponibilidade para degradação, transformação, absorção por organismos, lixiviação e volatilidade dos mesmos no solo (OECD, 2000). De acordo com a EMA estes estudos devem ser feitos em concordância com o guia da OECD 106. Segundo este guia a sorção é realizada por meio da adição do fármaco à amostras de solos pré-equilibradas com CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, estas misturas são agitadas até que o equilíbrio entre as fases seja

atingido. A seguir, os frascos contendo as misturas devem ser centrifugados e o sobrenadante deve ser recolhido e analisado. A concentração da substância sorvida no solo (C_s^{ads}) é então calculada como a diferença entre sua concentração inicial e a concentração em equilíbrio na fase aquosa (C_{aq}). Por fim, os valores de C_s^{ads} são plotados em função de C_{aq} (OECD, 2000) para o cálculo dos coeficientes de sorção do fármaco nos solos.

Os estudos de dessorção são realizados com o objetivo de investigar se a retenção do contaminante no solo ocorre de forma reversível ou não. Tal informação é de grande importância, pois permite verificar a mobilidade do composto e prever se o mesmo pode ser lixiviado e carregado para mananciais de água (OECD, 2000).

De acordo com a OECD 106 o estudo é inicialmente realizado tal como no experimento de sorção. Contudo, após o estabelecimento da etapa de equilíbrio o sobrenadante é retirado e o volume da solução é repostado com CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (sem a substância de interesse). Em seguida, a mistura é novamente agitada e a fase aquosa é coletada para análise assim que um patamar de dessorção é alcançado. Por fim, a concentração da substância remanescente no solo (C_s^{des}) é plotada em função da concentração da substância dessorvida presente na fase aquosa (C_{aq}^{des}) (OECD, 2000).

A OECD 106 recomenda que os valores de C_s^{ads} e de C_s^{des} sejam plotados em função de C_{aq} e de C_{aq}^{des} , respectivamente, e que as isotermas obtidas sejam ajustadas à equação de Freundlich (Equações 1.2 e 1.3).

$$C_s = K_F \cdot C_{aq}^{1/n} \quad \text{Equação 1.2}$$

ou na forma linear: $\log C_s = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_{aq}$ Equação 1.3

onde: $1/n$ é o expoente de Freundlich e K_F é o coeficiente de sorção/dessorção de Freundlich.

O coeficiente de distribuição (K_D) é definido como a razão entre C_s^{ads} e C_{aq} , sob as condições de teste, quando o equilíbrio de sorção é alcançado (OECD, 2000).

$$K_D = \frac{C_s^{ads}}{C_{aq}} \quad \text{Equação 1.4}$$

Sendo assim, o valor de K_F torna-se igual ao valor de K_D , quando $1/n$ é próximo de 1.

Para a realização dos estudos de sorção/dessorção, a OECD 106 faz uma série de recomendações. Os solos devem ser coletados em até 20 cm de profundidade, sendo então secos, peneirados e caracterizados quanto a sua composição físico-química e granulométrica. Os experimentos devem empregar, no mínimo, 1 g de solo, devendo ser realizados em temperatura constante e controlada entre 20 e 25 °C. Testes preliminares devem ser feitos para a determinação da razão de solo/solução ideal, do tempo de equilíbrio de sorção, da quantidade da substância a ser empregada bem como sua estabilidade durante os estudos. Para a construção das isotermas devem-se empregar cinco níveis de fortificação dos solos, cobrindo preferencialmente duas ordens de magnitude (OECD, 2000).

1.7 Modelos cinéticos de sorção

A determinação do tempo de equilíbrio de sorção é uma etapa preliminar demandada pela OECD 106 para a realização dos estudos de sorção/dessorção de fármacos em solos (OECD, 2000). Esta avaliação pode ser feita por meio de medidas da concentração de fármaco, presente na fase aquosa, durante a agitação desta espécie com uma mistura de solo/solução de proporção definida.

O gráfico de concentração de fármaco sorvido no tempo (q_t) em função do tempo de agitação das misturas de solo/solução (t) permite identificar o período necessário para o estabelecimento do equilíbrio de sorção do fármaco entre as duas fases, o que é verificado por meio do alcance de um patamar.

A partir destes resultados é possível obter os parâmetros cinéticos de sorção do fármaco no solo. Para tanto, alguns modelos cinéticos têm sido comumente empregados, dentre eles, o modelo de pseudo-primeira-ordem (PPO), pseudo-segunda-ordem (PSO) e o de Elovich.

O modelo de PPO é expresso através da Equação 1.5. O gráfico $\log(q_e - q_t)$ em função de t é uma reta, onde $\log q_e$ e $-k_1/2,303$ correspondem ao intercepto e a inclinação da mesma, respectivamente (Plazinski *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2009).

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t \quad \text{Equação 1.5}$$

onde: q_e é a concentração máxima sorvida no equilíbrio e k_1 a constante de pseudo-primeira-ordem do modelo cinético.

O modelo de PSO (Equação 1.6) considera a capacidade de sorção proporcional à concentração do soluto e ao número de sítios ativos não ocupados no solo. Neste modelo q_e e a constante de velocidade de pseudo-segunda-ordem (k_2) são determinados diretamente a partir da inclinação e do intercepto do gráfico t/q_t em função do tempo (Plazinski *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2009).

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad \text{Equação 1.6}$$

A equação de Elovich (Equação 1.7) considera que a sorção ocorre em uma etapa inicial rápida, associada ao movimento do composto nos sítios mais acessíveis do sorvente, seguindo-se uma reação lenta devido à difusão do sorbato para dentro e para fora dos microporos do sorvente (Fernández-Bayo *et al.*, 2008; Plazinski *et al.*, 2009).

$$q_t = \frac{1}{Y} \ln(XY) + \frac{1}{Y} \ln t \quad \text{Equação 1.7}$$

onde: X e Y são constantes do experimento realizado. O intercepto $1/Y \ln(XY)$ coincide com a quantidade sorvida durante a etapa rápida, enquanto a inclinação $(1/Y)$ representa a etapa lenta de sorção (Fernández-Bayo *et al.*, 2008).

1.8 A degradação de fármacos no solo

A degradação de FV é iniciada no organismo de animais via processos metabólicos compostos principalmente por duas fases: reações de funcionalização de fase I, onde ocorrem oxidação, redução e hidrólise de grupos funcionais e reações biossintéticas de fase II, onde ocorrem reações de conjugação covalente as quais tornam a molécula mais hidrofílica para posterior excreção renal (Horvat *et al.*, 2012; Thiele-Bruhn, 2003).

Uma vez excretados, a capacidade de dissipação dos FV no ambiente dependerá de suas propriedades físico-químicas, além das condições ambientais como o tipo de solo, incidência de raios solares, temperatura e pH (Boxall, *et al.*, 2003; Horvat *et al.*, 2012; Sarmah *et al.*, 2006). Cabe destacar que o esterco pode reduzir a taxa de degradação destes contaminantes à medida que este serve como uma proteção à luz e, conseqüentemente, às reações de fotodegradação de alguns fármacos (Thiele-Bruhn, 2003; Kemper, 2008).

Desta forma, FV podem persistir no interior de pilhas de esterco devido à baixa ou mínima decomposição microbiana nesta área (Arikan *et al.*, 2009). Assim, compostos

susceptíveis às reações de fotodegradação como fluoroquinolonas, TETRAS e sulfonamidas podem ser gradativamente acumulados e posteriormente espalhados pelo solo (Thiele-Bruhn, 2003). Este comportamento foi verificado em estudos de determinação OTC em pilhas de esterco de bezerros. A concentração do fármaco, determinado nas camadas intermediárias e profundas dos excrementos, foi consideravelmente maior em relação àquela encontrada nas camadas superficiais, como resultado da diminuição da capacidade de degradação da substância (de Liguoro *et al.*, 2003).

Mesmo após sua degradação, a eliminação da atividade do fármaco pode não ser completa, uma vez que alguns subprodutos apresentam toxicidade similar ou maior que o composto original (Boxall, *et al.*, 2003; Jechalke *et al.*, 2014). Halling-Sørensen e colaboradores avaliaram a toxicidade da tetraciclina e de seus principais produtos de degradação à bactérias isoladas do solo e do lodo de esgoto. Com exceção das *pseudomonas*, os micro-organismos avaliados apresentaram sensibilidade à maioria dos compostos parentes. Estruturas como o hidrocloreto de 5a,6-anidrotetraciclina, α - e β -apo-OTC tiveram a mesma potência do fármaco original. Anidrotetraciclina, hidrocloreto de 4-epi-anidrotetraciclina, hidrocloreto de 5a,6-anidroclortetraciclina e hidrocloreto de 4-epi-clortetraciclina apresentaram alta toxicidade até mesmo às bactérias que carregavam genes resistentes às TETRAS (Halling-Sørensen *et al.*, 2002). Estudos mostraram que principal metabólito bioativo do albendazol, o albendazol-sulfóxido, também apresenta atividade anti-helmíntica (Daniel-Mwambete *et al.*, 2004).

Um modo de reduzir os efeitos ecológicos adversos, provocados pela dispersão de estrume contaminado no solo, pode ser a compostagem deste material. Este processo resulta na morte de organismos patogênicos, na diminuição da concentração do fármaco e na geração de um produto com pouco odor que pode ser armazenado ou espalhado pelo campo (Bao *et al.*, 2009; Arikan *et al.*, 2009b; McCarthy *et al.*, 2013). Por meio da compostagem foi possível degradar a clortetraciclina, reduzindo em cerca de 90% sua concentração inicial, em amostras de esterco bovino (Bao *et al.*, 2009). Arikan e colaboradores verificaram a degradação de 95% da concentração inicial da OTC durante a compostagem de fezes de bezerros e a redução do número de bactérias resistentes ao fármaco (Arikan *et al.*, 2007). Kühne e colaboradores estudaram a degradação da tetraciclina em estrume líquido de suínos e confirmaram que o tempo para a redução da concentração do composto em 50% (DT₅₀) reduziu de 9 para 4,5 dias quando os

excrementos foram continuamente misturados e aerados (Kühne *et al.*, 2000). Wang e colaboradores verificaram que o aumento na porcentagem da água de saturação do esterco (de 39 para 64%) reduziu o DT₅₀ da OTC de 9,3 para 7,8 dias sob condições aeróbicas (Wang *et al.*, 2008). Através da compostagem do esterco de aves foi possível reduzir a concentração da salinomicina de 22 mg kg⁻¹ para 2 x10⁻⁵ mg kg⁻¹ em 38 dias. Em comparação, a redução nas amostras de controle foi de 27,5 mg kg⁻¹ para 24 mg kg⁻¹ neste mesmo período (Ramaswamy, *et al.*, 2010). Por este mesmo processo a sulfadiazina foi completamente dissipada em 3 dias em esterco de suínos (Selvam *et al.*, 2012).

Além da compostagem, acréscimos na temperatura podem favorecer o aumento da taxa de degradação de FV bem como da descontaminação dos estercos. Nicholson e colaboradores verificaram que a *Escherichia coli*, a *Salmonella spp*, o *Campylobacter jejuni* e a *Listeria monocytogenes* sobreviveram em estercos armazenados por mais de três meses. Em contrapartida, com o aquecimento das pilhas de estrume (a temperaturas acima de 55 °C) este período foi reduzido para menos de um mês (Nicholson *et al.*, 2005).

1.9 Estudos de degradação de fármacos no solo

Os estudos de degradação de fármacos em solos permitem determinar as taxas de transformação das substâncias e as taxas de formação e de declínio dos subprodutos que podem ser expostos às plantas e aos organismos do solo. De acordo com a EMA estes estudos devem ser realizados em concordância com a OECD 307.

Segundo a OECD 307 amostras de solo devem ser tratadas com a substância teste em frascos do tipo biômetro ou sistemas de fluxo em condições controladas de temperatura e de umidade em meio aeróbico ou anaeróbico. Após intervalos apropriados de tempo amostras de solo são coletadas e analisadas para determinação da concentração dos fármacos e/ou de seus produtos de degradação. A concentração dos fármacos é então plotada em função do tempo, possibilitando o cálculo de DT₅₀ (OECD, 2002).

Para a realização destes estudos a OECD 307 faz uma série de recomendações. A coleta do solo deve ser feita em até 20 cm de profundidade e ocorrer, no máximo, 3 meses anteriores ao início do experimento. Os solos devem ser peneirados e caracterizados quanto a sua composição físico-química e granulométrica. Além disto, deve ser feita a determinação da capacidade de retenção de água do solo (pF) e a medida da atividade de biomassa microbiana, sendo que o valor de pF dos solos deve ser ajustado entre 2 e 2,5 por meio da adição de água aos mesmos. Os experimentos devem empregar entre 50 a 200 g de solo, sendo este incubado entre 2 e 28 dias, em condições de temperatura e umidade aproximadas àquelas que serão empregadas nos estudos. A pF e a biomassa microbiana devem ser monitoradas, sendo que no primeiro caso os frascos devem ser pesados para correção da perda de umidade por meio de adição de água aos solos. Os estudos devem ser conduzidos em até, no máximo, 120 dias (OECD, 2002).

Apesar das recomendações da OECD 307 é preciso lembrar que a persistência de FV não está condicionada apenas às características físico-químicas das substâncias, mas também aos fatores ambientais. Por isto, o DT₅₀ destes compostos em solos pode ser superestimado, já que as condições ambientais não são perfeitamente reproduzidas em laboratório. Em estudos realizados *in vitro*, empregando três solos distintos, a OTC apresentou DT₅₀ de 30 a 46 dias sob condições aeróbicas e de 43 a 62 dias sob condições anaeróbicas (Yang *et al.*, 2009). Entretanto, em estudos realizados *in vivo* por Blackwell e colaboradores e AGA e colaboradores o DT₅₀ encontrado para o fármaco foi de 22 a 23 dias (Blackwell *et al.*, 2007; Aga *et al.*, 2005).

1.10 Estudos de lixiviação em coluna

Os estudos de lixiviação em coluna permitem estimar a mobilidade vertical dos fármacos, uma vez que estes podem alcançar camadas mais profundas do solo por ação da chuva. De acordo com a OECD 312 estes experimentos são realizados com uma coluna feita de material inerte, a qual é preenchida com solo. Posteriormente, o solo é saturado com excesso de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹. Após o excesso de água ser drenado, por ação da gravidade, o solo é fortificado com o fármaco de interesse. Em seguida, uma precipitação pluviométrica é simulada com a adição de CaCl₂ à coluna. As alíquotas do

eluato são então coletadas e analisadas. O solo é removido da coluna e posteriormente seccionado. Cada segmento é analisado para determinação do fármaco de interesse. Por fim, as porcentagens recuperadas do contaminante são plotadas em função da profundidade do solo e das frações recolhidas do percolado. Utilizando-se uma substância como referência pode-se ainda comparar o fator relativo de mobilidade (razão entre as distâncias percorridas pela substância de interesse e pelo composto de referência) em diferentes tipos de solos (OECD, 2004).

1.11 A extração e a determinação de fármacos em solos

A etapa de extração é o passo crítico na análise de contaminantes em amostras sólidas. O método utilizado deve levar em conta a seletividade para os componentes de interesse, a recuperação do analito, o volume do solvente orgânico empregado, a toxicidade do solvente, o tempo de extração e o número de passos de *clean-up* requeridos após a extração (Cotta *et al.*, 2009).

A extração de fármacos em solos, lodos e esterco é usualmente realizada por sonicação ou agitação da amostra com solventes adequados. O emprego da extração assistida por micro-ondas e a extração líquida pressurizada tem sido crescente para a remoção destes compostos em matrizes sólidas ambientais, já que estas técnicas apresentam uma série de vantagens: menor consumo de amostra, menor consumo de solvente, geração de menor quantidade de resíduos e menor tempo de extração (Azzous e Ballesteros, 2012). Recentemente o método QuEChERS foi usado usado para extrair inúmeros fármacos em amostras de solos e sedimentos (Bragança *et al.*, 2012; Carmona *et al.* 2014; Cerqueira *et al.*, 2014).

Para a extração de moléculas ionizáveis geralmente são empregadas misturas de tampões fracamente ácidos e solventes orgânicos. O uso de solventes muito polares ou

fortemente apolares pode resultar em extrações incompletas, já que a dissociação e a protonação da maioria destes fármacos é dependente do pH (Thiele-Bruhn, 2003).

Uma vez que o procedimento de extração pode remover uma grande quantidade de interferentes dos solos uma etapa de limpeza de amostra torna-se necessária. Para tanto, são geralmente empregadas a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*), a extração líquido-líquido (ELL, do inglês *liquid-liquid extraction*) ou mais recentemente os polímeros de impressão molecular. (Azzous e Ballesteros, 2012; Horvat *et al.*, 2012).

No caso da SPE são usadas principalmente fases reversas e poliméricas. Em alguns casos o procedimento combina dois cartuchos em tandem, um contendo uma fase trocadora aniônica forte para remover a matéria orgânica e outro a fase C18 para reter os compostos de interesse (Vazquez-Roig *et al.*, 2010).

A determinação seletiva dos fármacos em solos é feita, principalmente, por cromatografia líquida. Em alguns trabalhos esta etapa foi realizada empregando-se o método imunoenzimático ELISA, a contagem de isótopos radioativos e a espectrofotometria UV-VIS (Aga *et al.*, 2005; Oppel *et al.*, 2004; Prasse *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). Devido ao fato da espectrometria de massas com tandem (MS^2) possuir baixo limite de detecção, alta seletividade e informar a respeito da estrutura dos compostos, o acoplamento desta técnica com a cromatografia líquida ou gasosa na análise de amostras ambientais tem sido crescente. Contudo, por conta do alto custo da instrumentação, a detecção por arranjo de diodos e fluorescência ainda é comum.

Capítulo 1.1:

1.1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o comportamento de fármacos veterinários em solos brasileiros. Os objetivos específicos compreenderam:

- ✓ Desenvolvimento de métodos de análise para a determinação de fármacos antimicrobianos e antiparasitários em soluções de solo;
- ✓ Realização de estudos de sorção e dessorção com três fármacos veterinários representantes de três classes diferentes: fluoroquinolonas: danofloxacina (DANO), tetraciclina: oxitetraciclina (OTC) e avermectinas: ivermectina (IVM) em solos brasileiros;
- ✓ Desenvolvimento de método para a determinação da ivermectina nos solos escolhidos;
- ✓ Realização de estudos de lixiviação em coluna de solos com a ivermectina;
- ✓ Realização de estudos de dissipação da ivermectina nos solos.

Capítulo 2:
Danofloxacina

2.1 A danofloxacin

A danofloxacin (DANO) é um antimicrobiano de uso exclusivamente veterinário, pertencente à classe das fluoroquinolonas, que é comercializado no Brasil pela Pfizer com o nome genérico Advocin® (SINDAN, 2014 c)

As fluoroquinolonas (Figura 2.1) são antimicrobianos sintéticos de segunda geração derivadas das quinolonas. Estes fármacos contêm um átomo de flúor na posição 6 e um grupo piperazinila na posição 7, os quais são responsáveis pela maior atividade antimicrobiana e menor toxicidade em relação aos fármacos de primeira geração (Posyniak *et al.*, 1999).

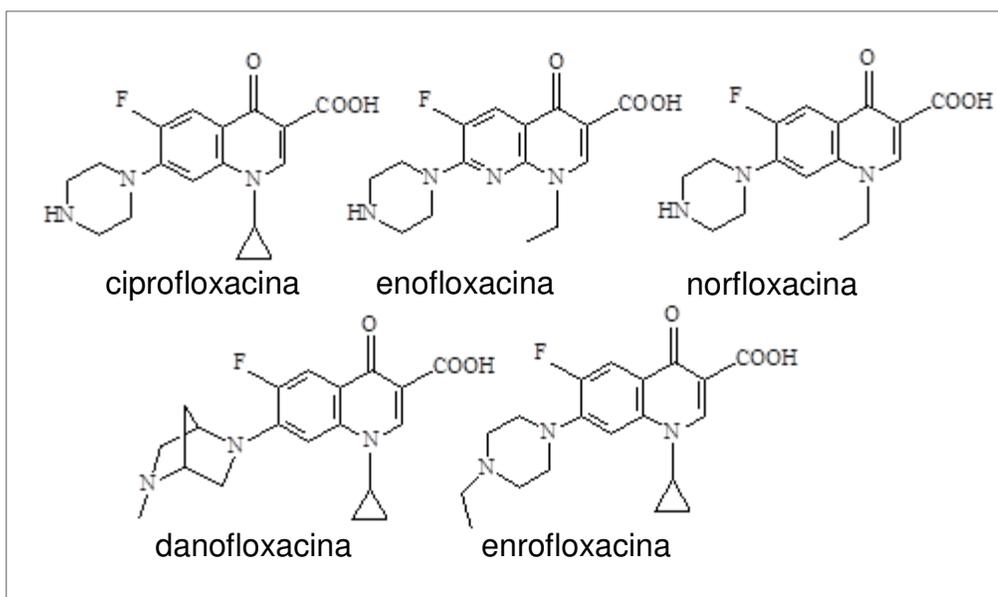


Figura 2.1: Estruturas das fluoroquinolonas.

As quinolonas 7-piperazinilas contêm grupos amina além de um grupo carboxilato. Desta forma, em solução aquosa estes compostos apresentam três formas em equilíbrio: catiônica, zwitteriônica e aniônica, de acordo com o pH do meio em que se encontram (Figura 2.2) (Babić *et al.*, 2007).

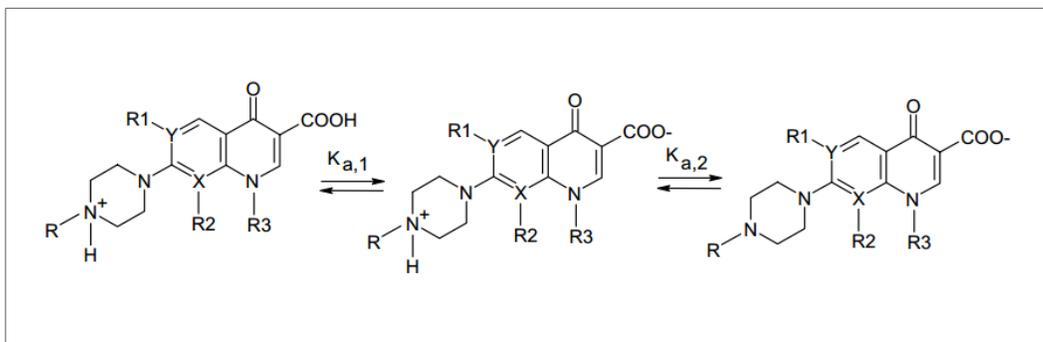


Figura 2.2: Equilíbrio ácido-base para as quinolonas 7-piperazinilas.

Devido a sua capacidade de inibição da DNA-girase a DANO é ativa contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e micoplasmas. O fármaco apresenta excelente atividade contra patógenos respiratórios em bovinos, suínos e aves, demonstrando eficácia no tratamento terapêutico de infecções respiratórias naturais e induzidas nestas espécies (Chen *et al.*, 1997; FDA, 2000).

As principais características físico-químicas da DANO são apresentadas na Tabela 2.1:

Tabela 2.1: Principais propriedades físico-químicas da danofloxacin.

Propriedade^a	Valor
Massa molar	357,38 g mol ⁻¹
Fórmula molecular	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃
Ponto de fusão	268-272 °C
Ponto de ebulição	569,35 °C em 760 mmHg
Densidade	1,485g/cm ³

a) Referência: FDA, 2000.

Estudos farmacocinéticos mostraram que entre 79 a 86% da dose de DANO, administrada subcutaneamente por 5 dias na forma de sal mesilato, foi excretada nas fezes e urina de novilhos 24 horas após a administração do fármaco (FDA, 2000). No ambiente a molécula tende a se ligar fortemente ao solo, acarretando em baixa biodisponibilidade e diminuição de sua capacidade de degradação por micro-organismos. Em vista deste fato, a DANO apresenta um DT₅₀ médio de 115 dias (FDA, 2000). Entretanto, o fármaco é rapidamente degradado em solução aquosa sob ação da luz solar, o que contribui para sua depleção em ambientes aquáticos e terrestres (FDA, 2000). Cabe destacar que a DANO apresenta valores de RQ menores do que 1 e que os efeitos adversos verificados em uma série de estudos, realizados com micro-organismos, plantas e minhocas, foram de baixo risco (FDA, 2000).

2.2 Parte experimental

2.2.1 Reagentes, solventes, padrões e soluções

O padrão analítico de DANO (99,8%) foi adquirido da Fluka (EUA).

A solução estoque do fármaco, na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi preparada em metanol grau HPLC (Tedia, EUA) mediante solubilização inicial do padrão em uma quantidade mínima de ácido fórmico. As soluções foram protegidas de luminosidade e armazenadas no freezer por até 3 meses. As soluções de trabalho foram preparadas para uso imediato, mediante diluições da solução estoque, em tampão Britton-Robinson (BR) 40 mmol L^{-1} . As soluções aquosas foram preparadas mediante emprego de água obtida em um sistema Milli-Q (Millipore, EUA).

O preparo do tampão foi feito através da mistura dos ácidos bórico (Sigma-Aldrich, EUA), fosfórico (Synth, Brasil) e acético (Synth, Brasil). O ajuste do pH do tampão foi realizado através da adição de algumas gotas de ácido clorídrico (Synth, Brasil). A azida de sódio acrescentada ao tampão foi da Sigma-Aldrich (EUA).

O EDTA empregado no preparo de amostras anterior análise cromatográfica foi da Aldrich (EUA).

2.2.2 Materiais e equipamentos

O padrão analítico de DANO foi pesado em uma balança analítica Sartorius modelo CPA 225D (Alemanha) com precisão de $\pm 0,01 \text{ mg}$.

A agitação das soluções do fármaco e das misturas de solo/solução tampão foi realizada em uma mesa de agitação horizontal com controle de temperatura da Marconi (Brasil). A temperatura da mesa e a velocidade de agitação foram mantidas em $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1788 g durante todos os experimentos.

A determinação cromatográfica da DANO foi realizada em um sistema cromatográfico Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, EUA) composto de uma bomba quaternária, um injetor automático de amostras, um compartimento termostaticado de coluna, um desgaseificador e um detector de fluorescência (FLD). Para a separação do fármaco foi usada uma coluna X Bridge™ Shield RP 18 (4,6 x 200 mm, com tamanho de partículas de 5 µm) e coluna de guarda X Bridge™ Shield RP 18 (4,6 x 20 mm, com tamanho de partículas de 5 µm).

A desgaseificação da fase móvel foi realizada em um banho de ultrassom modelo USC 700 (Unique Thorton, Brasil).

Uma centrífuga (Hettich, Alemanha) foi empregada para a centrifugação das misturas de solo e tampão.

2.2.3 Condições cromatográficas

O sistema cromatográfico empregado para a quantificação da DANO foi descrito no item 2.2.2. Uma solução de ácido fórmico 0,1% : metanol (71:29, v/v) foi usada como fase móvel no modo isocrático em vazão de 1,0 mL min⁻¹. O volume de injeção da amostra foi de 10 µL. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. A detecção do fármaco no FLD foi realizada empregando os comprimentos de onda de excitação e de emissão de 245 nm e 450 nm, respectivamente.

2.2.4 Solos

Neste trabalho foram empregados dois tipos de solos: o neossolo quartzarênico (N1) e o argissolo vermelho amarelo (S2). Os solos foram retirados de caixas lisimétricas (1 x 1 x 2 m) localizadas na EMBRAPA Meio Ambiente em Jaguariúna. As caixas foram preenchidas com solos coletados no ano de 2005. A localização do ponto de coleta dos solos foi a seguinte:

- ✓ N1: área de pastagem na Cidade de Santa Rita de Passa Quatro, SP (latitude 21°42'18,12" S e longitude 47°28'04,82" W, altitude 773 metros)

- ✓ S2: área coberta por Brachiaria na cidade de Jaguariúna, SP (latitude 21°42'59,50" S e longitude 47°01'00,05" W, altitude 609 metros)

As amostras de solo que foram utilizadas nos experimentos foram coletadas em julho de 2010 na parte superficial (0 a 20 cm) de cada um dos lisímetros. Em seguida, as amostras foram secas ao ar, peneiradas (≤ 2 mm) e estocadas em temperatura ambiente. A caracterização físico-química dos solos (Tabela 1.2) foi realizada pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) no Laboratório de Fertilidade do Solo – Centro de Solos e Recursos Ambientais. A análise granulométrica dos solos (Tabela 2.2) foi realizada pelo Laboratório de Qualidade do Solo da EMBRAPA em Jaguariúna.

Tabela 2.2: Características físico-químicas e granulométricas dos solos N1 e S2

Propriedade	Unidade	N1	S2
Matéria orgânica (MO)	%	1,53	3,23
pH (medido em CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹)	---	5	4,4
Areia	%	91,1	45,5
Silte (0,053 – 0,002 mm)	%	1,8	7,0
Argila (< 0,02 mm)	%	6,2	49,2
pF	g g ⁻¹	0,05	0,21
P	mg kg ⁻¹	3	5
K	mmolc kg ⁻¹	0,5	0,7
Ca	mmolc kg ⁻¹	5	9
Mg	mmolc kg ⁻¹	2	6
Na	mmolc kg ⁻¹	---	---
Al	mmolc kg ⁻¹	---	---
H+Al	mmolc kg ⁻¹	11,8	50,3
S.B	mmolc kg ⁻¹	7,5	15,7
C.T.C	mmolc kg ⁻¹	19,3	66
V%	%	38,9	23,8
S	mg dm ³	---	---
B	mg kg ⁻¹	0,11	0,2
Cu	mg kg ⁻¹	<0,1	0,8
Fe	mg kg ⁻¹	14	42
Mn	mg kg ⁻¹	4,8	1,1
Zn	mg kg ⁻¹	0,3	1,4

H + Al: acidez total, SB: Ca + Mg + K + Na, C.T.C: capacidade de troca catiônica = SB + (H + Al), V%: porcentagem de CTC saturada por bases a pH 7, V%=100/(SB/CTC), pF: capacidade de retenção de água no solo (determinada como pF = 2).

2.3 Métodos

2.3.1 Avaliação da estabilidade da danofloxacin em solução

Soluções de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DANO foram preparadas em tampão BR 40 mmol L^{-1} em quintuplicata nos valores de pH 5,0; 7,5 e 10,0. As soluções foram transferidas para tubos Falcon ® de polipropileno (utilizado em todos os experimentos subsequentes) que foram mantidos sob agitação a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1788 g em uma mesa de agitação horizontal por até 72 horas. Após determinados intervalos de tempo alíquotas foram coletadas e a concentração de DANO foi determinada em cada solução de acordo com as condições cromatográficas apresentadas no item 2.2.3.

2.3.2 Otimização da razão solo/solução

Amostras de 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 g dos solos N1 e S2 foram pesadas em duplicata em tubos Falcon ®. Em seguida, os tubos receberam 35 mL de tampão BR 40 mmol L^{-1} em pH 5 (acrescido de azida de sódio $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$). As misturas permaneceram sob agitação a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1788 g por 24 horas. Ao término deste tempo uma solução de 5 mL de DANO $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$ (preparada no mesmo tampão) foi acrescentada a cada frasco. Os frascos foram novamente mantidos sob agitação por mais 24 horas, conforme as condições anteriormente empregadas. Em seguida, o extrato aquoso foi processamento. Nesta etapa os frascos foram centrifugados (15 min a 1788 g) e uma alíquota de cerca de 2 mL do sobrenadante foi coletada e transferida para um segundo recipiente. A alíquota recebeu cerca de 10 mg de EDTA e foi levada ao ultrassom por 10 minutos. Por fim, a alíquota foi filtrada em filtro de seringa ($0,22 \mu\text{m}$), transferida para um vial e analisada de acordo com as condições cromatográficas descritas em 2.2.3.

2.3.3 Avaliação de cinética de sorção da danofloxacina nos solos

Amostras de 0,5 g dos solos N1 e S2 (pesadas em duplicata e para cada intervalo de tempo) foram transferidas para tubos Falcon ®. Em seguida, os tubos receberam 35 mL de tampão BR 40 mmol L⁻¹ em pH 5,0 (acrescido de azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹) e permaneceram sob agitação a 25 °C e 1788 g por 24 horas. Ao término deste tempo uma solução de 5 mL de DANO 0,20 mg mL⁻¹ (preparada no mesmo tampão) foi acrescentada a cada frasco. Os frascos foram novamente mantidos sob agitação por até 96 horas. Dois frascos de cada solo foram retirados, após 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas de agitação, centrifugados (15 minutos a 1788 g) e o extrato aquoso coletado foi processado de acordo com as condições descritas em 2.3.2. A quantificação da DANO em solução aquosa de solo foi realizada de acordo com as condições cromatográficas apresentadas em 2.2.3.

2.3.4 Validação do método para a determinação de danofloxacina no extrato aquoso dos solos N1 e S2

Os solos N1 e S2 foram agitados por 24 h com tampão BR 40 mmol L⁻¹ (acrescido de azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹) em pH 5,0; 7,5 e 10,0 e em razão de solo/solução de 1:80 (m/v). Os extratos aquosos obtidos foram então fortificados em triplicata, a partir da solução estoque de DANO 1000 µg mL⁻¹, fornecendo concentrações finais de 0,20; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg mL⁻¹. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados através de diluições da solução de 0,20 µg mL⁻¹ até que a razão sinal ruído fosse de 3 e 10, respectivamente. A precisão intra-dias do método (n = 6), expressa como estimativa do desvio padrão relativo (DPR), foi avaliada através da concentração de fármaco livre em solução após 24 horas de equilíbrio de misturas de solo/solução 1:80 (m/v) contendo uma concentração inicial de DANO de 7,5 µg mL⁻¹. As análises cromatográficas foram realizadas em quintuplicata com amostras independentes no mesmo dia, pelo mesmo analista e pelo mesmo equipamento. A precisão inter-dias foi avaliada em triplicata em três dias diferentes, pelo mesmo analista e no mesmo

equipamento. As alíquotas de 2 mL, tomadas à partir de cada solução e dos sobrenadantes, foram processadas de acordo com as condições descritas em 2.3.2. A determinação da DANO em solução aquosa de solo foi realizada de acordo com as condições cromatográficas descritas em 2.2.3.

2.3.5 Construção das isotermas de sorção e dessorção da danofloxacina nos solos N1 e S2

Uma alíquota de 35 mL de tampão Britton-Robinson 40 mmol L⁻¹ em pH 5,0; 7,5 e 10,0 (acrescida de azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹) foi adicionada às amostras de 0,5 g dos solos N1 e S2 que foram pesadas em triplicata em tubos Falcon ®. As misturas foram mantidas sob agitação a 25 °C e 1788 g por 24 h. Em seguida, as amostras receberam 5 mL de DANO 50, 100, 150, 200 e 250 µg mL⁻¹ (preparada nas mesmas soluções tampão empregadas no estudo). As misturas foram novamente agitadas por mais 24 h. Ao término deste período os frascos foram pesados, centrifugados (15 min a 1788 g) e a fase aquosa coletada foi processada, de acordo com o procedimento descrito no item 2.3.2, antes da injeção no sistema cromatográfico. Para a realização da etapa de dessorção a fase aquosa foi repostada, sem a adição do fármaco, com 40 mL dos mesmos tampões empregados na etapa de sorção. Os frascos foram agitados por mais 72 h. Em seguida os tubos foram pesados, centrifugados (1788 g por 15 min) e a fase aquosa coletada foi processada conforme o procedimento descrito em 2.3.2.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Estudos iniciais

Os estudos de sorção e dessorção foram realizados com base nas diretrizes estabelecidas pelo Guia OECD 106, em obediência às recomendações feitas pela EMA, já que o Brasil não dispõe de normas específicas para este caso.

De acordo com as diretrizes da OECD 106 as seguintes avaliações foram inicialmente realizadas: a determinação da estabilidade do fármaco de interesse, a otimização da razão ótima de solo/solução e a determinação dos tempos de equilíbrio de sorção e de dessorção do fármaco nos solos (OECD, 2000).

Uma vez que a DANO (Figura 2.1) é uma molécula anfótera ($pK_{a1} \approx 6,2$, $pK_{a2} \approx 8,6$) a avaliação da estabilidade deste fármaco foi realizada em pH 5,0; 7,5 e 10,0, valores nos quais as formas catiônica, zwitteriônica e aniônica da molécula são predominantes, conforme apresentado na Figura 2.3.

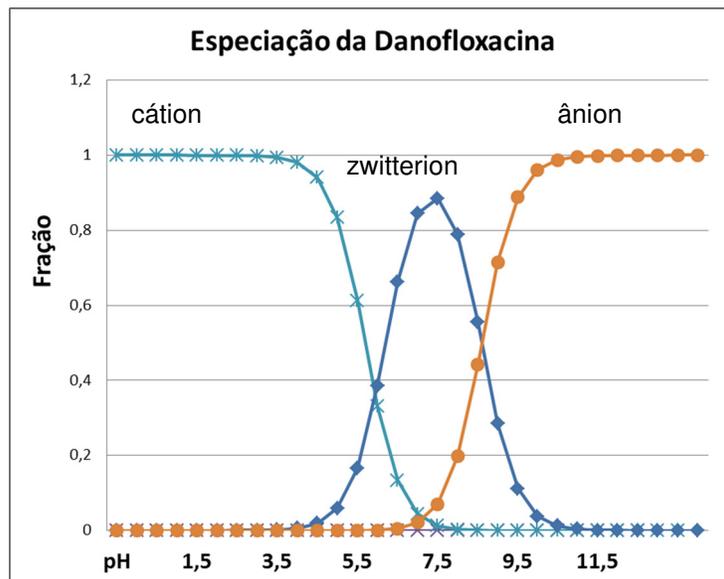


Figura 2.3: Diagrama de especificação da danofloxacina em função de pH.

Os estudos de sorção da DANO nos solos foram inicialmente realizados em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, que é o meio aquoso sugerido pela OECD 106, sendo o pH ajustado para 5,0, 7,5 e 10,0 pela adição de HCl ou NaOH. No entanto, uma alteração significativa nestes valores de pH foi verificada ao final dos experimentos, o que se justifica pelo meio não estar tamponado.

Cabe destacar que não existe uma recomendação no guia da OECD 106 à respeito do ajuste do pH para os estudos de sorção. Em função disto, o tampão Britton-Robinson (BR) foi escolhido para a continuidade dos experimentos, já que este permite o preparo de soluções tampão em uma ampla faixa de pH ($2 < \text{pH} < 12$) com os mesmos reagentes. Sendo assim, foi possível avaliar o comportamento da DANO em pH 5,0; 7,5 e 10,0 sem alteração da composição química do meio.

Os resultados da avaliação da estabilidade do fármaco em solução aquosa são apresentados na Figura 2.4.

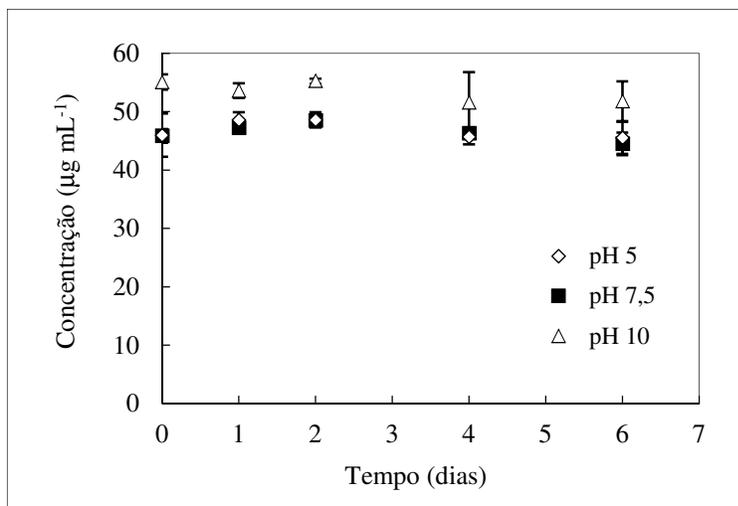


Figura 2.4: Concentração média ($n = 5$) de danofloxacina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparada em tampão Britton-Robinson 40 mmol L^{-1} nos valores de pH 5,0; 7,5 e 10,0, em função do tempo.

Por meio da Figura 2.4 é possível observar que a DANO apresentou estabilidade em meio aquoso, por até 6 dias, em todos os valores avaliados de pH. Desta forma, não houve diferença significativa ($p = 0,05$) entre a concentração média inicial do fármaco e a concentração média determinada no sexto dia do experimento.

Diante destes resultados, os valores de pH 5,0; 7,5 e 10,0 foram adotados para os experimentos subsequentes, já que pretendia-se avaliar a influência das diferentes formas ionizadas da DANO na capacidade de sorção do fármaco nos solos N1 e S2.

Dando prosseguimento aos estudos iniciais, foi feita a otimização da razão entre a massa dos solos N1 e S2 e o volume da solução aquosa que seriam empregados para a construção das isotermas de sorção. O objetivo desta etapa foi selecionar uma condição que possibilitasse a determinação da DANO no extrato aquoso, acima dos valores estabelecidos de LQ, após o período de equilíbrio do fármaco com os solos.

Para que esta avaliação pudesse ser feita uma solução de 40 mL de DANO $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi mantida em equilíbrio com 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 g dos solos N1 e S2 durante 24 horas, sendo este tempo escolhido de forma arbitrária. Por questões de redução do número de experimentos os estudos somente foram realizados com tampão BR em pH 5,0, já que este é o valor próximo ao pH natural dos solos (Tabela 2.2).

Ao término da etapa de agitação a concentração do fármaco não sorvido foi determinada na fase aquosa. As porcentagens médias de sorção do fármaco nos solos ($n = 2$) foram então calculadas para cada caso (Figura 2.5).

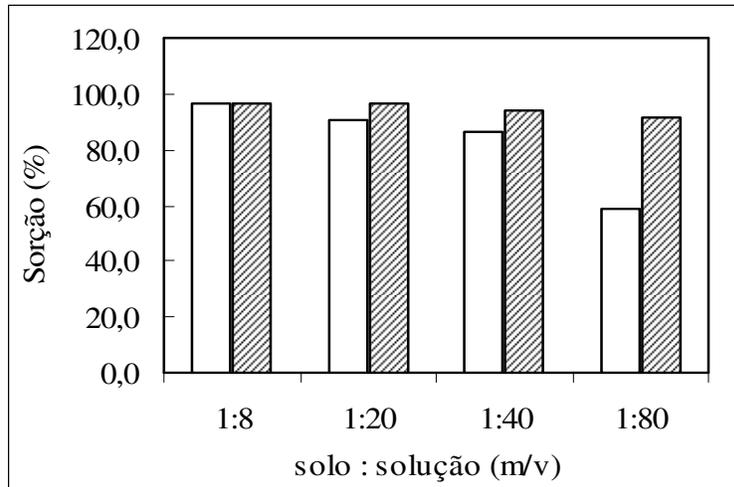


Figura 2.5: Porcentagem média (n= 2) de sorção de danofloxacina nos solos N1 (retângulo branco) e S2 (retângulo sombreado) em função da razão solo/solução.

Conforme pode ser visto na Figura 2.5 a diminuição da razão solo/solução acarretou em decréscimo na porcentagem de sorção da DANO no solo N1. Também pode ser observado que, em geral, a sorção foi maior no solo S2 do que no N1, aspecto que será discutido posteriormente.

Segundo estabelece o guia da OECD 106 deve-se adotar uma razão de solo/solução na qual a porcentagem de sorção do fármaco seja maior que 20% e, preferencialmente, acima de 50% (OECD, 2000). Com base nestes critérios a razão de 0,5 g de solo em 40 mL de solução (1:80, m/v) foi adotada para a DANO, uma vez que além de atender ao critério estabelecido pelo guia a diferença na porcentagem de sorção do fármaco nos dois solos foi máxima nesta condição.

Cabe destacar que neste estudo e nos estudos subsequentes a azida de sódio foi adicionada às misturas de solo/solução com a finalidade de inibir uma possível degradação da DANO por ação de micro-organismos dos solos.

Na determinação cromatográfica da DANO, à partir das soluções dos solos N1 e S2, foi verificado um efeito matriz pronunciado, o qual pode ser visualizado nos cromatogramas apresentados na Figura 2.6. Na presença da matriz solo o pico da DANO,

em torno de 7 min, sofre uma diminuição em área enquanto um novo e intenso pico em torno de 2 min aparece. Estudos realizados por Peruchi e colaboradores mostraram que a norfloxacin (NOR) apresentou este mesmo efeito (Peruchi *et al.*, 2015). Em ambos os casos este comportamento pode ser explicado pela formação de complexos entre as fluoroquinolonas com íons metálicos divalentes, através da formação de interações entre o oxigênio do grupo cetona ou carboxílico com os cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} , ou entre os ácidos húmicos e fúlvicos solúveis presentes no extrato dos solos (Peruchi *et al.*, 2015). Desta forma, é importante que este efeito seja eliminado, uma vez que a quantidade de fármaco sorvida no solo pode ser superestimada, já que a mesma é calculada de forma indireta através da quantificação da espécie em solução (Peruchi *et al.*, 2015). Uma vez que estes complexos formados possuem menor afinidade pela fase estacionária octadecil, os mesmos são eluídos no começo do cromatograma (Peruchi *et al.*, 2015), conforme também foi verificado para a DANO (Figura 2.6). Peruchi e colaboradores comprovaram que a adição de EDTA às soluções de solo eliminou o efeito matriz, o que também ocorreu com a DANO (Figura 2.6). O EDTA atuou complexando os cátions metálicos presentes em solução e, em consequência, suprimiu as interações entre a fluoroquinolona e as substâncias húmicas, possibilitando a quantificação do ativo em sua forma livre.

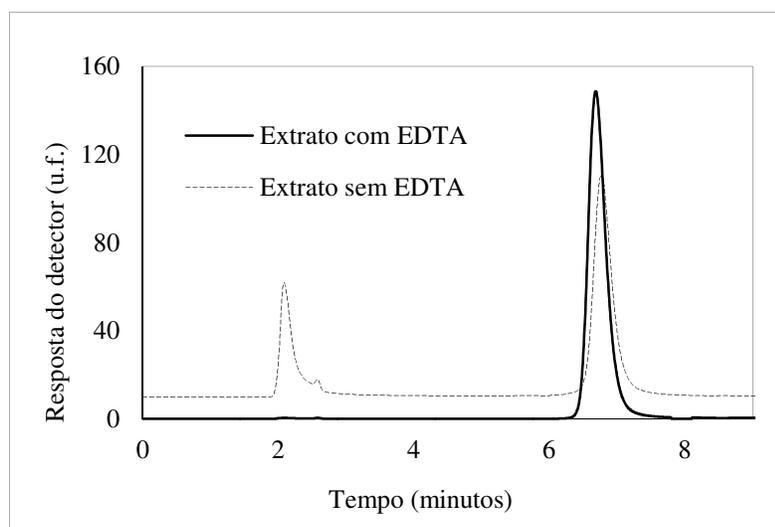


Figura 2.6: Cromatograma do extrato do solo N1 (1:80, m/v) em tampão BR 40 mmol L⁻¹ (pH 5,0) fortificado com danofloxacin (10 µg mL⁻¹) com e sem adição de EDTA. Coluna: X Bridge™ Shield RP 18, 4,6 x 200 mm, 5 µm. Fase móvel: ácido fórmico 0,1% : metanol (71:29, v/v) no modo isocrático. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 10 µL. Temperatura: 30 °C. Detecção: FLD. Comprimentos de onda: 245 nm (excitação) e 450 nm (emissão). u.f: unidade de fluorescência.

Estabelecida a razão ótima de solo/solução a última etapa dos estudos iniciais consistiu na determinação do tempo aparente de equilíbrio de sorção do fármaco nos solos N1 e S2. Neste caso, soluções de 40 mL de DANO 250 µg mL⁻¹ foram mantidas em agitação com 0,5 g dos solos por até 96 horas. Durante este período a concentração de fármaco sorvido no tempo t (q_t) foi determinada em diferentes intervalos de tempo, conforme mostra a Figura 2.7.

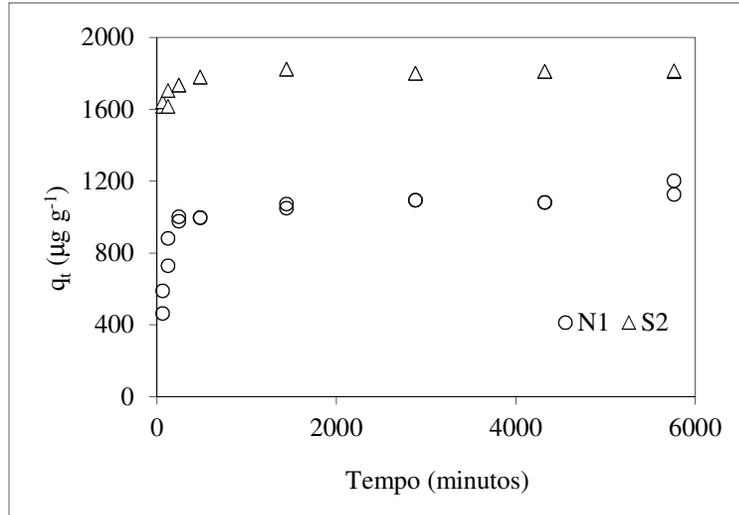


Figura 2.7: Curvas de concentração de danofloxacina sorvida no tempo t (q_t) em função do tempo para os solos N1 e S2.

As curvas cinéticas, mostradas na Figura 2.7, indicam que houve maior sorção da DANO no solo S2, corroborando com os resultados observados durante o estudo de otimização da razão solo/solução (Figura 2.5). Por meio das curvas construídas foi possível estabelecer o período de 24 horas (1440 minutos) como o tempo de equilíbrio aparente de sorção do fármaco nos solos. Os resultados também foram ajustados aos modelos de pseudo-primeira-ordem (PPO), pseudo-segunda-ordem (PSO) e de Elovich para o cálculo dos parâmetros cinéticos de sorção da DANO em N1 e S2.

Para o ajuste ao modelo de PPO os resultados foram plotados como $\log(q_e - q_t)$ em função do tempo, conforme mostra a Figura 2.8.

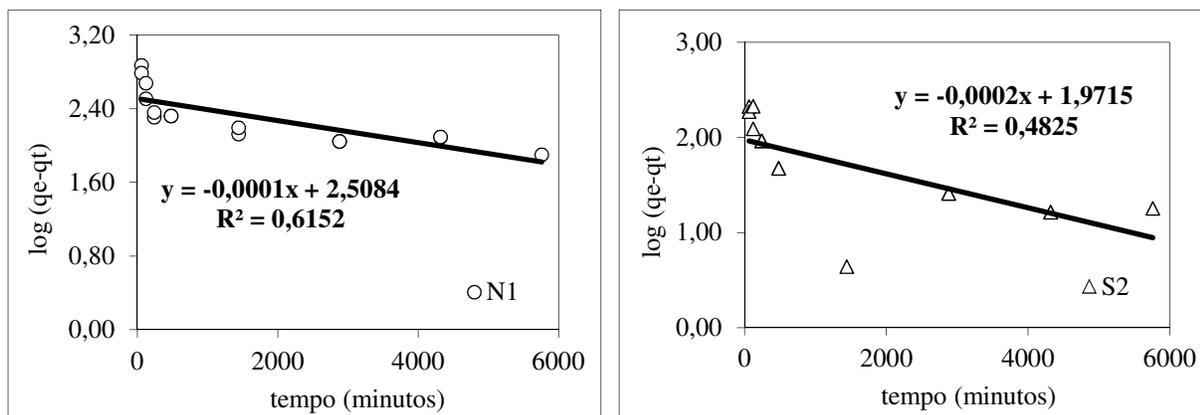


Figura 2.8: Ajuste dos dados de sorção da danofloxacina nos solos N1 e S2 ao modelo de pseudo-primeira-ordem, onde q_e representa a concentração máxima de danofloxacina sorvida no equilíbrio.

O ajuste ao modelo de PSO foi feito por meio do gráfico tempo/ q_t em função do tempo, conforme mostra a Figura 2.9.

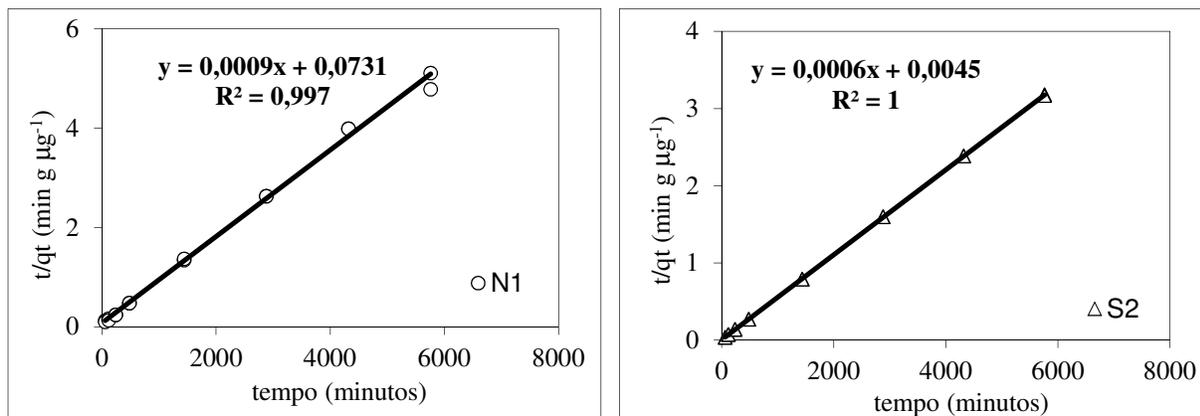


Figura 2.9: Ajuste dos dados de sorção da danofloxacina nos solos N1 e S2 ao modelo de pseudo-segunda-ordem.

O ajuste dos pontos experimentais ao modelo de Elovich foi feito por meio do gráfico de concentração de DANO sorvida nos solos em função do tempo, conforme mostra a Figura 2.10.

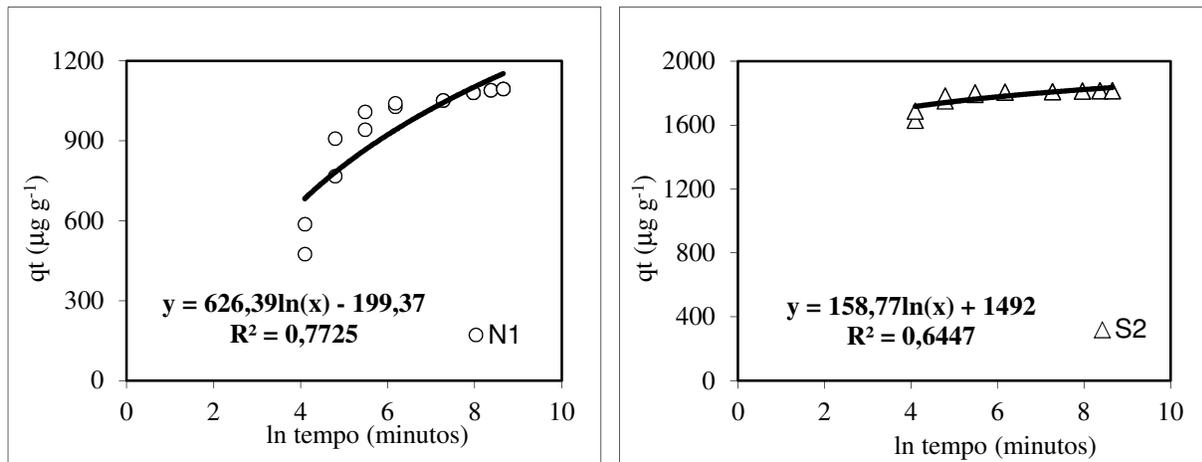


Figura 2.10: Ajuste dos dados de sorção da danofloxacina nos solos N1 e S2 ao modelo de Elovich.

A partir dos gráficos apresentados nas Figuras 2.8, 2.9 e 2.10 pode-se ver que os resultados experimentais ajustaram-se melhor ao modelo de PSO, o que é confirmado através dos valores dos coeficientes de determinação obtidos neste caso ($r^2 > 0,99$).

O modelo de PSO foi inicialmente proposto por Blanchard e colaboradores para descrever a cinética de remoção de metais pesados por zeólitas (Blanchard *et al.*, 1984). Apesar disto, este modelo têm sido empregado com sucesso na sorção de contaminantes em solos (Fernández-Bayo *et al.*, 2008). A equação de PSO na forma aqui apresentada (Equação 1.5) foi preconizada por Ho e McKay sendo baseada no modelo Langmiriano clássico de cinética de adsorção. Sendo assim, o processo de adsorção é tratado como uma reação química ocorrida na superfície de um sólido. Desta forma, a taxa de sorção é proporcional à concentração do soluto e ao número de sítios não ocupados no sorvente (Ho e McKay, 1998).

O ajuste dos dados de sorção da DANO nos solos N1 e S2 ao modelo de PSO (Equação 1.5) é mostrado na Figura 2.11.

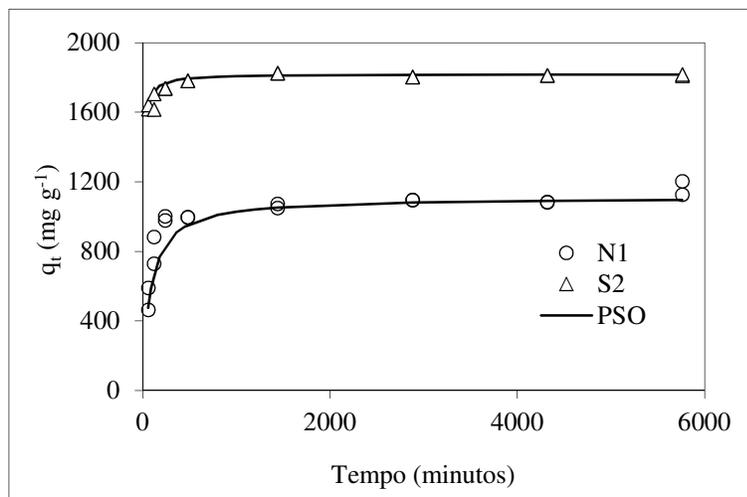


Figura 2.11: Curvas de concentração de danofloxacina sorvida no tempo t (q_t) em função do tempo ajustadas ao modelo de pseudo-segunda-ordem.

Os parâmetros cinéticos de sorção da DANO nos solos N1 e S2, calculados a partir do modelo de PSO, são apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Parâmetros cinéticos de sorção da danofloxacina nos solos N1 e S2 obtidos através do ajuste ao modelo de pseudo-segunda-ordem.

Solo	Parâmetro		
	q_e	k_2	r
	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	
N1	1111	$1,12 \times 10^{-5}$	0,9984
S2	1819	$7,99 \times 10^{-5}$	0,9999

onde k_2 é a constante de pseudo-segunda-ordem.

A partir da Tabela 2.3 é possível verificar que os valores calculados de q_e (1111 e 1819 $\mu\text{g g}^{-1}$ para os solos N1 e S2, respectivamente) estão de acordo com os resultados experimentais apresentados na Figura 2.11. Deste modo, pode-se considerar S2 como o solo com o maior número de sítios de sorção. Os valores mais altos de k_2 indicam que a sorção da DANO foi mais rápida no solo S2, o que requereu menor tempo de equilíbrio do fármaco com a mistura solo/solução neste caso.

2.4.2 Validação do método para a determinação de danofloxacina no extrato aquoso dos solos N1 e S2

A validação do método de determinação da DANO por HPLC-FLD foi realizada com o intuito de garantir a confiabilidade dos estudos de sorção e dessorção do fármaco nos solos N1 e S2.

A seletividade do método foi confirmada mediante avaliação dos cromatogramas dos extratos brancos dos solos e dos extratos brancos fortificados com a DANO. A partir das Figuras 2.6 e 2.12 é possível verificar a ausência de interferentes eluídos no mesmo tempo de retenção (t_r) do fármaco ($t_r \approx 7$ minutos) nos três valores de pH que foram selecionados.

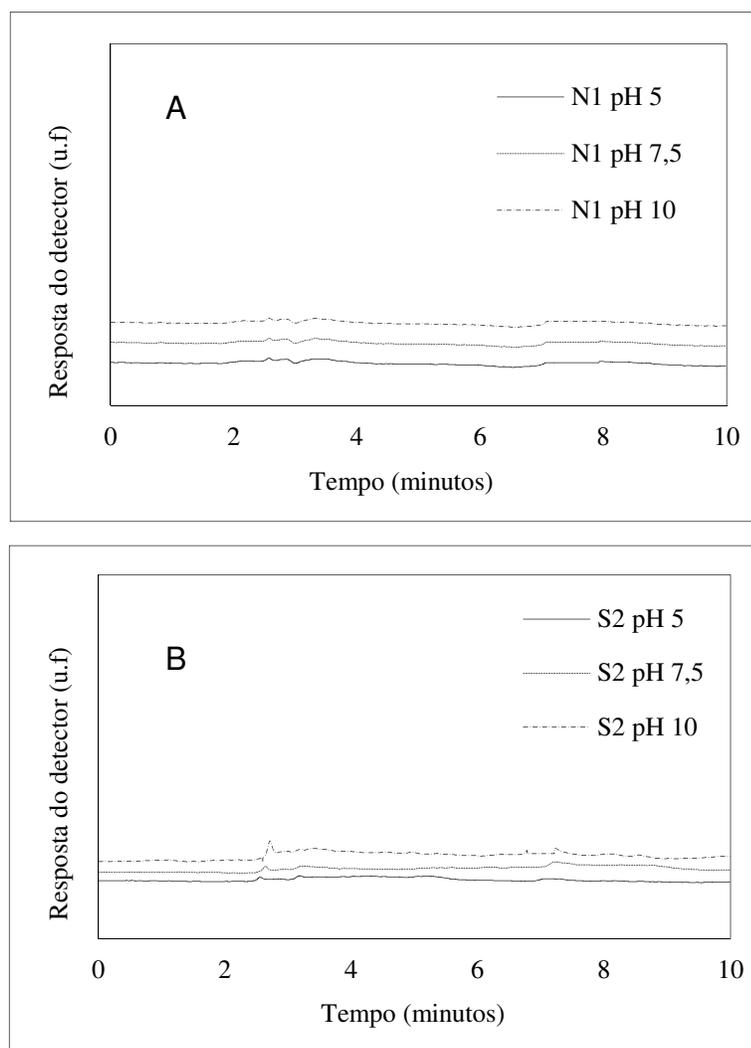


Figura 2.12: Cromatogramas dos extratos brancos dos solos N1 (A) e S2 (B) em tampão Britton-Robinson (1:80, m/v) 40 mmol L⁻¹ (pH 5,0; 7,5 e 10,0) acrescido de azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹. Coluna: X Bridge™ Shield RP 18, 4,6 x 200 mm, 5 µm. Fase móvel: ácido fórmico 0,1% : metanol (71:29, v/v) no modo isocrático. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 10 µL. Temperatura: 30 °C. Detecção: FLD. Comprimentos de onda: 245 nm (excitação) e 450 nm (emissão). u.f: unidade de fluorescência.

Devido a verificação de efeito matriz (Fig. 2.6) as curvas analíticas foram construídas nos extratos produzidos pela agitação dos solos com tampão BR em razão de 1:80 (m/v), acrescido de azida de sódio $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, e em pH 5,0; 7,5 e 10,0. Para tanto, os extratos foram fortificados em triplicata em cinco níveis de concentração, no intervalo de 0,2 - $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A linearidade e a sensibilidade do método, expressas respectivamente por meio do coeficiente de correlação linear (r) e do coeficiente angular, foram obtidas através do método dos mínimos quadrados ordinários.

Os valores de LQ e de LD foram estabelecidos por meio da fortificação dos extratos brancos dos solos com concentrações decrescentes de DANO até que a razão sinal/ruído fosse de 3 e 10 vezes, respectivamente.

A avaliação da precisão intra-dias e inter-dias foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 2.3.4.

As curvas analíticas construídas são apresentadas nas Figuras 2.13 e 2.14. Os gráficos de resíduos apresentados mostram dispersão aleatória dos resultados e não evidenciam tendência.

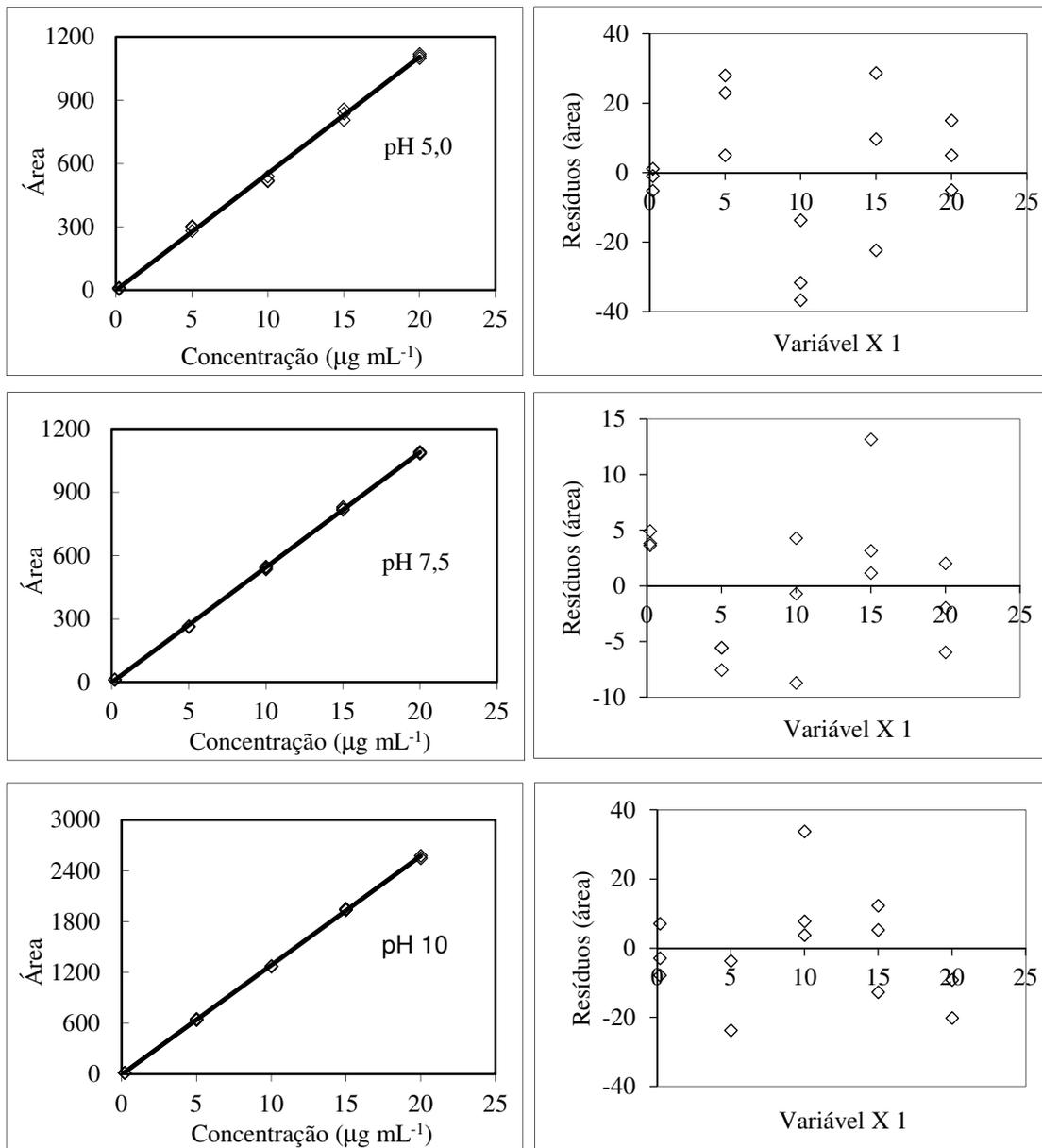


Figura 2.13: Curvas analíticas e gráficos de resíduos construídos para a danofloxacin no extrato aquoso do solo N1 (1:80, m/v) em tampão Britton-Robinson 40 mmol L⁻¹ + azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹ em pH 5,0; 7,5 e 10,0.

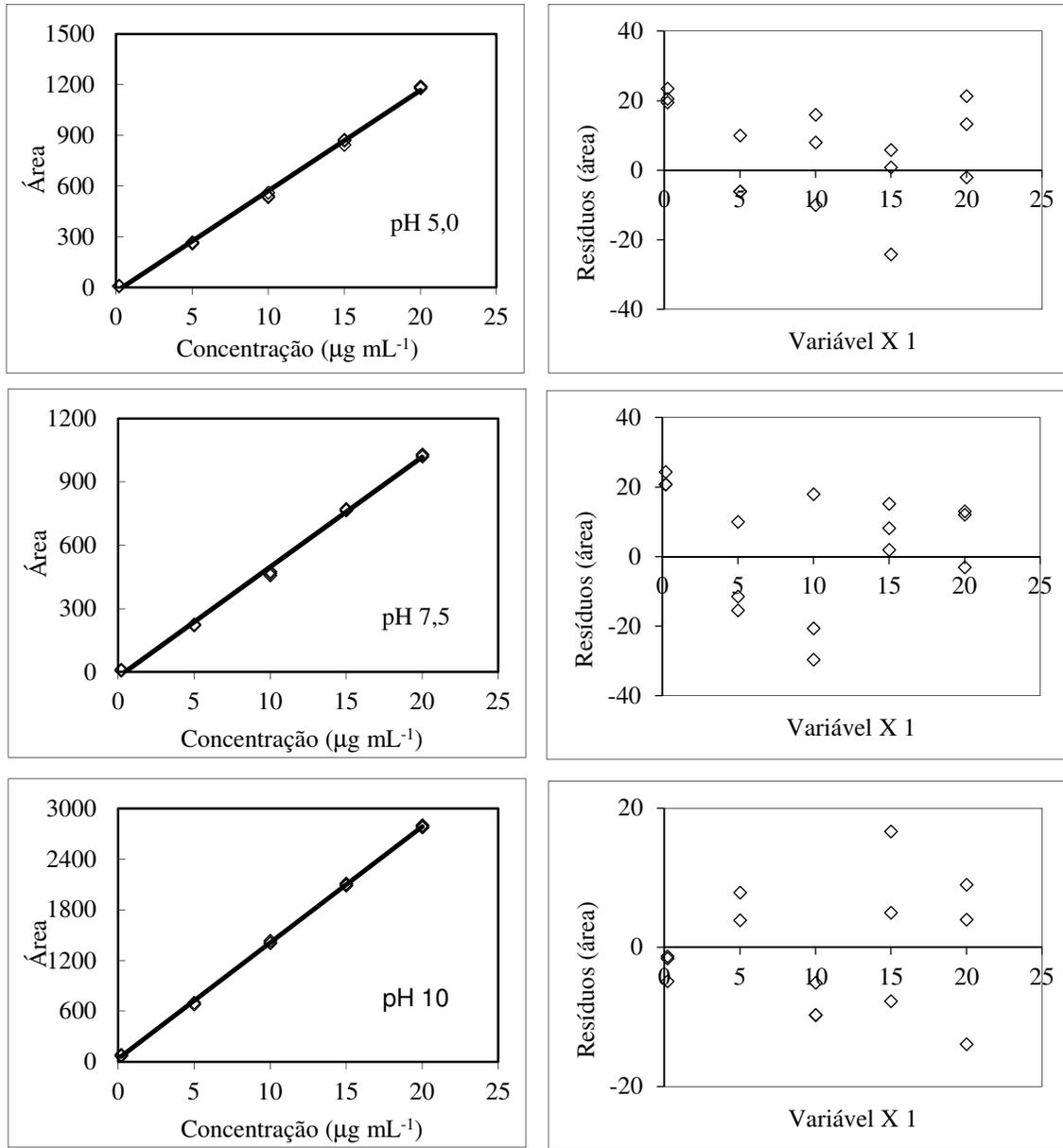


Figura 2.14: Curvas analíticas e gráficos de resíduos construídos para a danofloxacin no extrato aquoso do solo S2 (1:80, m/v) em tampão Britton-Robinson 40 mmol L⁻¹ + azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹ em pH 5,0, 7,5 e 10,0.

Os parâmetros de validação, obtidos para o método de determinação cromatográfica da DANO, são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Parâmetros de validação para a determinação cromatográfica da danofloxacin no extrato aquoso dos solos N1 e S2.

Solo	pH	Sensibilidade		LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão (DPR, %)	
		u.f. / ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r			Intra-dias	Inter-dias
N1	5,0	53,33	0,9987	0,025	0,01	3,5	6,3
	7,5	54,63	0,9998	0,025	0,01	2,5	4,1
	10,0	128,95	0,9998	0,020	0,01	3,0	3,8
S2	5,0	59,51	0,9988	0,025	0,01	0,7	1,0
	7,5	52,03	0,9986	0,025	0,01	1,0	1,0
	10,0	137,5	0,9998	0,020	0,01	1,8	2,1

u.f.: unidade de fluorescência.

Os valores dos coeficientes de correlação linear (r), apresentados na Tabela 2.4, indicam que as curvas apresentaram linearidade adequada na faixa de trabalho empregada ($r > 0,99$). Os valores de precisão obtidos ($\text{DPR} \leq 6,3 \%$) também foram considerados adequados para o nível de concentração avaliado. Cabe ressaltar que o guia da OECD 106 não faz menção quanto aos critérios de aceitação deste parâmetro.

2.4.3 Construção das isotermas de sorção e dessorção da danofloxacina nos solos N1 e S2

As isotermas de sorção da DANO foram construídas de acordo com a razão de solo/solução, com o tempo de equilíbrio de agitação e com a estabilidade do fármaco, em concordância com os resultados obtidos através dos estudos preliminares. A escolha da faixa de fortificação dos solos ($500 - 2500 \mu\text{g g}^{-1}$) foi adotada de modo que a concentração de DANO pudesse ser determinada na fase aquosa após o período de equilíbrio com a mistura solo/solução. A etapa de dessorção foi realizada após 72 horas, uma vez que foi verificado que este seria o tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio aparente do fármaco nesta segunda etapa.

As isotermas de sorção da DANO nos solos N1 e S2, ajustadas à forma linear da Equação de Freundlich nos diferentes pH, são apresentadas nas Figuras 2.15 e 2.16.

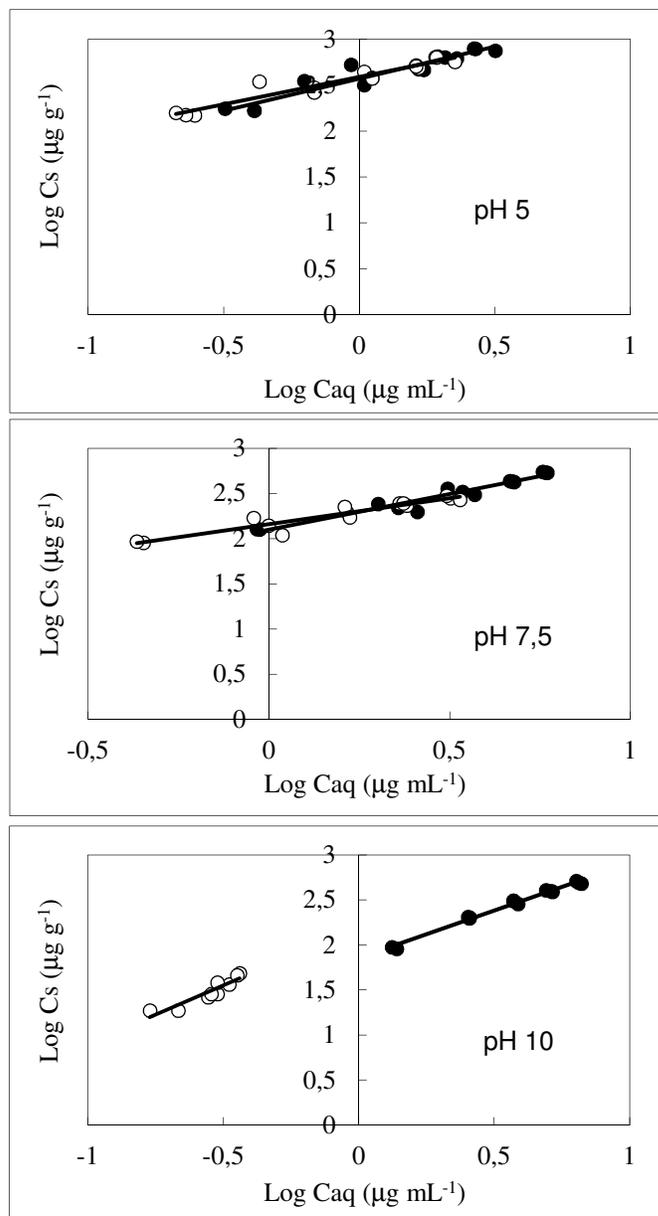


Figura 2.15: Isotermas de sorção (círculo preto) e dessorção (círculo branco) da danofloxacina no solo N1 em pH 5,0; 7,5 e 10,0 ajustadas à forma logarítmica da Equação de Freundlich.

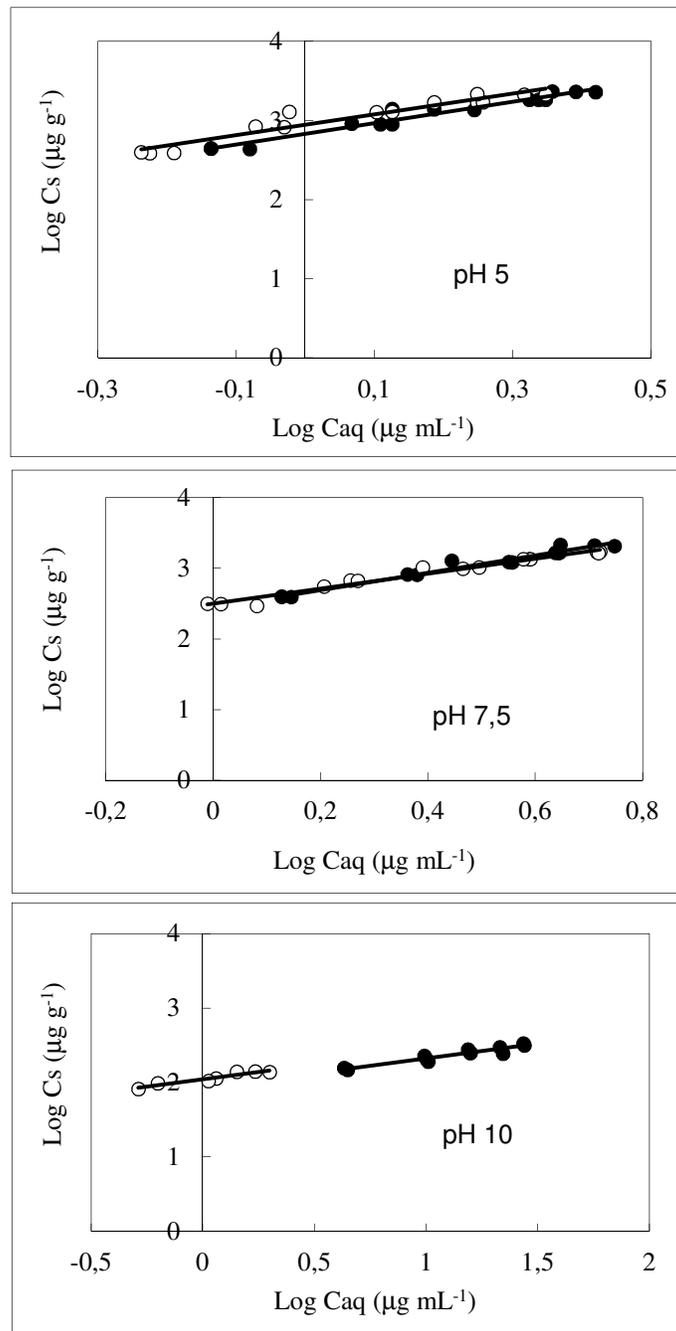


Figura 2.16: Isotermas de sorção (círculo preto) e dessorção (círculo branco) da danofloxacina no solo S2 em pH 5,0; 7,5 e 10 ajustadas à forma logarítmica da Equação de Freundlich.

Os parâmetros de sorção da DANO, calculados à partir do ajuste das isotermas ao modelo de Freundlich, são apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Parâmetros de sorção da danofloxacin nos solos N1 e S2.

Solo	Etapa	pH	K_F^a	$1/n$	H	r	K_D (mL g ⁻¹) ^b
N1	Sorção	5,0	371	0,697	0,85	0,9523	235 - 563
		7,5	126	0,790	0,72	0,9732	82 - 137
		10,0	72	1,050	1,24	0,9940	≈ 76
	dessorção	5,0	387	0,594		0,9623	252 - 806
		7,5	144	0,573	---	0,9487	79 - 214
		10,0	131	1,305		0,9215	≈ 107
S2	Sorção	5,0	676	1,357	0,96	0,9778	522 - 1044
		7,5	280	1,226	0,86	0,9843	278 - 484
		10,0	85	0,395	0,99	0,9629	10 - 36
	dessorção	5,0	882	1,309		0,9610	275 - 1355
		7,5	317	1,053	---	0,9839	≈ 335
		10,0	110	0,392		0,9543	22 - 159

- a) mL g⁻¹ somente se $1/n = 1$ e $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{g}^{-1}$ nos outros casos; b) coeficiente de distribuição = concentração sorvida no solo/concentração na fase aquosa, H: índice de histerese, definido como $\frac{1/n \text{ dessorção}}{1/n \text{ sorção}}$

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2.5 é possível verificar que as isotermas apresentaram ajuste adequado à forma linearizada da Equação de Freundlich ($r > 0,92$ em todos os casos).

Teoricamente a sorção apresenta um comportamento linear quando $1/n = 1$. Nestes casos, K_D se torna uma constante ($K_D = K_F$) sendo independente da concentração inicial de fármaco adicionada aos solos, conforme foi observado para o solo N1 em pH 10 e para o solo S2 durante a etapa de dessorção em pH 7,5. Por outro lado, nos casos em que $1/n$ é significativamente diferente da unidade K_D deixa de ser constante, apresentando dependência com a concentração do meio, conforme mostra a Tabela 2.5.

Desta forma, o índice K_D , embora usado em muitos trabalhos apresentados na literatura, não é o melhor o parâmetro para a comparação da capacidade de sorção de fármacos em solos, quando esta não segue um comportamento linear ou quando os estudos de sorção são realizados em diferentes intervalos de concentração da substância de interesse. No manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos (IBAMA, 1990) o IBAMA classifica a capacidade de sorção de contaminantes em solos através dos valores de K_F , parâmetro que também será adotado neste trabalho para esta finalidade. Contudo, o índice K_D será igualmente apresentado e discutido no texto, afim de que os resultados obtidos sejam correlacionados com os dados encontrados na literatura.

Estudos já realizados mostraram que a retenção de moléculas ionizáveis em solos, incluindo as fluoroquinolonas, pode ocorrer via três mecanismos: troca catiônica, ponte catiônica e complexação, já que esta matriz apresenta diferentes sítios de sorção.

De acordo com Mackay e Vasudevan estes sítios são agrupados em cinco classes. Os sítios negativos são formados pela matéria orgânica, pelos aluminossilicatos e pelos óxidos metálicos de Fe e Al. Os sítios positivos são formados pelos óxidos metálicos de Fe e Al e pelos aluminossilicatos. Os sítios neutros e polares são constituídos pela matéria orgânica, pelos óxidos metálicos e pelos aluminossilicatos. Os átomos de Fe e Al superficiais são encontrados na forma de óxidos metálicos e o sítio apolar é formado pela matéria orgânica e pelos grupos siloxano neutros (Mackay e Vasudevan, 2012).

Deste modo, a sorção via troca catiônica envolve a substituição dos cátions, que estão associados aos sítios negativos do solo por moléculas do fármaco com carga positiva, o que segundo Mackay e Vasudevan (2012) pode ocorrer de diferentes maneiras:

- ✓ Interação eletrostática com os grupos SiO_4^{4-} permanentemente negativos e ocupação do espaço entre as camadas das argilas antes preenchido por íons como Na^+ , Ca^{2+} , K^+ e Mg^{2+} (Figuras 1.5 e 1.6).
- ✓ Substituição dos íons que estão associadas à superfície dos óxidos metálicos de ferro e alumínio, sendo que a adsorção a estes minerais ocorre por meio dos grupos metal-OH, os quais na forma desprotonada (metal-O⁻) apresentam-se complexados com espécies catiônicas.
- ✓ Substituição dos íons que estão associados aos grupos R-COO⁻ e R-O⁻ presentes nas substâncias húmicas.

A ponte catiônica é outro mecanismo possível de sorção e ocorre via atração coulômbica ou complexação entre os grupos negativamente carregados das moléculas dos fármacos e os cátions que estão associados aos sítios de carga negativa dos solos (Mackay e Vasudevan, 2012; Vasudevan *et al.*, 2009). A complexação pode ocorrer via formação de ligações entre os grupos R-COOH ou R-OH dos fármacos com íons ferro e alumínio dos óxidos metálicos superficiais e dos aluminossilicatos (Mackay e Vasudevan, 2012; Vasudevan *et al.*, 2009).

Conforme mostra o equilíbrio ácido-base das quinolonas 7-piperazinilas e o diagrama de especiação da DANO (ambos apresentados nas Figuras 2.2 e 2.3), a molécula encontra-se nas formas catiônica, zwitteriônica e aniônica nos valores de pH 5,0; 7,5 e 10, os quais foram respectivamente adotados para a realização dos estudos de sorção.

Sendo assim, espera-se que em meio ácido a DANO tenha interagido com os solos N1 e S2 via mecanismo de troca catiônica, já que nesta condição o grupo amino terciário da molécula encontra-se protonado e via complexação, através da ligação entre o grupo carboxílico do fármaco com os íons ferro e alumínio que estão localizados nos óxidos metálicos superficiais e nos aluminossilicatos. Em pH 7,5 são esperadas interações via troca catiônica e ponte catiônica, já que nesta condição o grupo amino terciário da DANO é protonado e o grupo carboxílico da molécula encontra-se desprotonado. Em pH 10 são esperadas interações via ponte catiônica, uma vez que a molécula encontra-se na forma aniônica devido a desprotonação do grupo ROOH.

Em estudos realizados na literatura foi observado que os valores de K_D da ciprofloxacina (CIPRO) sofreram decréscimo à medida em que o pH do meio aumentou. De acordo com Vasudevan e colaboradores estes resultados indicaram o mecanismo de troca catiônica como o processo dominante na sorção do fármaco em solos com altos valores de CTC. Deste modo, a sorção foi mais alta em pH ácido, condição na qual a forma positiva (protonada) da molécula é predominante, decrescendo à medida em que a concentração desta espécie tornou-se menor em solução (Vasudevan *et al.*, 2009).

O mecanismo de sorção da CIPRO via troca catiônica também foi confirmado por outros estudos. Por meio de análises por difração de raios X e de infravermelho com transformada de Fourier Wu e colaboradores verificaram o aumento do espaçamento das intercamadas de montmorilonita sob condições ácidas, o que é um indicativo da substituição dos cátions adsorvidos no solo pela molécula do fármaco (Wu *et al.*, 2010).

Os resultados apresentados na Tabela 2.5 corroboram com os estudos realizados com a CIPRO por Vasudevan e colaboradores. Houve diminuição da capacidade de sorção da DANO, conforme ocorreu aumento no valor do pH do meio, ou seja, à medida em que a fração das espécies positivamente carregadas também diminuiu em solução (Figura 2.3). Desta forma, a sorção nos solos avaliados seguiu a seguinte ordem: forma catiônica > zwitteriônica > aniônica ($K_F^{pH5} > K_F^{pH7,5} > K_F^{pH10}$ e $K_D^{pH5} > K_D^{pH7,5} > K_D^{pH10}$).

Uma vez que a DANO é um análogo estrutural da CIPRO (Figura 2.1) espera-se que as moléculas apresentem similaridade no mecanismo de sorção. Sendo assim, a forte retenção do fármaco em meio ácido (pH 5,0) sugere o mecanismo de troca catiônica como dominante na sorção da DANO nos solos N1 e S2. Desta forma, a argila exerceu um papel importante neste processo, à medida em que deve ter ocorrido a substituição das espécies catiônicas, adsorvidas nas intercamadas deste mineral, por moléculas positivamente carregadas de DANO.

Além do comportamento similar ao da CIPRO esta hipótese é evidenciada pelo fato da sorção da DANO ser maior no solo S2, conforme foi verificado nos estudos preliminares e por meio dos valores de K_D e de K_F , o que é justificado pelo fato deste solo possuir textura argilosa com maior CTC em relação ao solo arenoso N1 (Tabela 2.1).

Apesar dos indícios apontarem a troca catiônica como o processo predominante para a sorção de DANO, cogita-se que outros mecanismos tenham contribuído para a retenção do fármaco em valores mais altos de pH, já que interações via ponte catiônica, entre os grupos negativamente carregados da molécula e íons presentes no solo, bem como a complexação superficial com íons Al e Fe também foram sugeridas em estudos realizados com a CIPRO e a ENRO em $\text{pH} > 5,5$ (Vasudevan *et al.*, 2009; Nowara *et al.*, 1997).

De acordo com o IBAMA a capacidade de sorção de contaminantes pode ser classificada nos seguintes níveis: pequena $0 \leq K_F \leq 24$, média $25 \leq K_F \leq 49$, grande $50 \leq K_F \leq 149$ e elevada $K_F \geq 150$ (IBAMA, 1990). A partir deste parâmetro a sorção da DANO em N1 e S2 pode ser considerada entre grande à elevada.

A Tabela 2.6 mostra uma compilação dos parâmetros de sorção da DANO apresentados na literatura.

Tabela 2.6: Parâmetros de sorção da danofloxacin em diferentes solos

Molécula	Textura do solo	Localização	pH	Silte (%)	Argila (%)	Areia (%)	CTC	solo/solução (m/v)	MO (%)	Tempo (h)	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	K	1/n Sorção	Referência
DANO	Arenoso	São Paulo	5/7,5/10	1,8	6,2	91,1	19,3	1:80	1,53	24	6,25 - 31,25	72 – 371 ^a	0,697-1,05	Este trabalho
DANO	Argiloso	São Paulo	5/7,5/10	7,0	49,2	45,5	66	1:80	3,23	24	6,25 - 31,25	85 – 676 ^a	0,395 - 1,357	Este trabalho
DANO mesilato	Franco-arenoso	Iowa (EUA)	5,6	37,6	9,2	53,2	125	1:1000	5,2	16	2,7 - 23,3	2280 ^a	0,20	FDA, 2000
DANO mesilato	Franco-argiloso	Califórnia (EUA)	7,6	24	33	43	196	1:1000	3,1	16	2,7 - 23,3	2430 ^a	0,602	FDA, 2000
DANO mesilato	Franco-argiloso	Mississippi (EUA)	7,0	55	31,4	13,6	294	1:1000	1,0	16	2,7 - 23,3	3800 ^a	0,491	FDA, 2000
DANO	Areia-franca	São Paulo	5,1	10	6	84	7	1:15	1,15	24	6	847,7 ^b	----	Leal <i>et al.</i> , 2013
DANO	Areia-franca	São Paulo	3,8	4	8	88	12,6	1:15	1,65	24	6	1249,6 ^b	----	Leal <i>et al.</i> , 2013
DANO	Muito argiloso	São Paulo	6,9	20,7	68,4	10,9	62,2	1:15	16,5	24	6	17194 ^b	----	Leal <i>et al.</i> , 2013
DANO	Argilo-siltoso	São Paulo	3,9	38	47,6	14,4	133,6	1:15	36,8	24	6	31717 ^b	----	Leal <i>et al.</i> , 2013

CTC: capacidade de troca catiônica ($\text{mmol}_c \text{kg}^{-1}$), MO: matéria orgânica, a: valor determinado como K_F , b: valor determinado como K_D (L kg^{-1}). Todos os estudos de sorção realizados em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com exceção dos experimentos deste trabalho.

A partir dos resultados coletados na literatura e reportados na Tabela 2.6 verifica-se que os valores de K_F e de K_D apresentaram uma correlação positiva com a CTC dos solos, o que reforça a hipótese de que a troca catiônica é o mecanismo predominante no processo de sorção deste fármaco.

Os valores de K_F da DANO em solos norte-americanos ($2280 \leq K_F \leq 3800$) foram superiores àqueles observados em N1 e S2 ($72 \leq K_F \leq 676$), o que pode ser devido à menor CTC dos solos brasileiros (19,3 e 66 $\text{mmol}_c \text{kg}^{-1}$, respectivamente) em comparação com os estrangeiros ($\text{CTC} \geq 125 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$). As condições experimentais também permitem concluir que a capacidade de sorção da DANO foi menor em N1 e S2, já que os estudos aqui realizados empregaram uma razão de solo/solução de 1:80 (m/v) ao passo que no caso do estudo norte americano a razão adotada foi de 1:1000 (m/v).

Os valores de K_D para o solo N1 em pH 5,0 ($235 \leq K_D \leq 563$) foram menores em relação aos resultados reportados para a areia franca ($K_D = 847$ e 1249 L kg^{-1}). A DANO apresentou K_D de 17194 L kg^{-1} em solo muito argiloso e entre 10 a 1044 L kg^{-1} no solo S2. Contudo, é importante ressaltar o fato de que no trabalho realizado por Leal e colaboradores a sorção da DANO foi avaliada em uma única concentração, empregando-se CaCl_2 em razão de solo/solução de 1:15 (m/v) (Leal *et al.*, 2013). Uma vez que os estudos realizados com N1 e S2 foram feitos em tampão BR, é plausível que a presença de várias espécies aniônicas em solução, tais como os íons citrato, fosfato e acetato, tenham limitado o acesso da DANO aos sítios positivos de sorção dos solos. Além deste fato, o solo argiloso empregado por Leal e colaboradores apresentava uma porcentagem de matéria orgânica muito superior em relação à S2 (36,8 e 3,23 %, respectivamente), o que favoreceu a maior sorção do fármaco neste caso.

Recentemente, Peruchi e colaboradores avaliaram a sorção da norfloxacin em N1 e S2. Neste estudo os experimentos foram realizados com 1 g de solo em 100 mL de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e 48 h de equilíbrio de sorção. O fármaco apresentou valores de K_F de 643 e $1183 \mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{ g}^{-1}$, respectivamente (Peruchi *et al.*, 2015). Estes valores são de magnitude semelhante àqueles observados para a DANO em pH 5,0 (371 e $676 \mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{ g}^{-1}$), o que é justificado pelo fato de ambas as moléculas serem análogas estruturais e apresentarem os mesmos mecanismos de interação com os solos.

O fenômeno de histerese ocorre devido à sorção irreversível de uma fração do sorvato no sorvente, podendo ser provocada pelos seguintes fatores: limitação à difusão molecular intrapartículas, remoção de coloides e cosolutos no sobrenadante anteriormente à etapa de dessorção, reações que originam produtos covalentemente alterados, deformação dos poros e o aprisionamento do sorvato dentro da matéria orgânica condensada bem como a expansão de moléculas hidrofóbicas de sorvato (Weber *et al.*, 1998).

De acordo com Mamy e Barriuso (2007) a histerese pode ser avaliada por meio do índice de histerese (H) (Equação 2.2).

$$H = \frac{1/n_{dessorção}}{1/n_{sorção}} \quad \text{Equação 2.1}$$

Um valor de H próximo a 1 é um indicativo de que a dessorção ocorre tão rapidamente quanto a sorção e, desta forma, a histerese é ausente. Um valor de $H < 1$ indica que a taxa de dessorção é menor em relação à taxa de sorção, confirmando a ocorrência de histerese (Pusino *et al.*, 2004). Na prática, a ausência da histerese tem sido atribuída quando $0,7 < H < 1$, o que implica na reversibilidade do processo de sorção. Por outro lado, quanto menor for H, maior é o efeito de histerese (Mamy e Barriuso, 2007).

Por meio do índice H (Tabela 1.5) verifica-se que a histerese da DANO não foi confirmada nos solos avaliados, visto que o parâmetro apresentou valores maiores que 0,7. Sendo assim, o processo de sorção do fármaco não foi irreversível em N1 e S2. Entretanto, é preciso enfatizar que não há um consenso no valor absoluto de H que deva ser adotado para indicar a presença de histerese, o que faz com que este índice seja muitas vezes usado de forma indevida quando, por exemplo, a dessorção do fármaco é muito lenta (Peruchi *et al.*, 2015).

Capítulo 3:
Oxitetraciclina

3.1 A oxitetraciclina

A oxitetraciclina (OTC) é um antimicrobiano de largo espectro de uso animal e humano, pertencente ao grupo das tetraciclina (TETRAS), que é produzido por micro-organismos do gênero *Streptomyces rinosus* via imersão ou fermentação (Goodman e Gilman, 1990).

As principais características físico-químicas da OTC são apresentadas na Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Principais propriedades físico-químicas da oxitetraciclina.

Propriedade	Valor
Massa molar	460,43 g. mol ⁻¹
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉
Ponto de fusão	184,5 °C
Solubilidade	313 mg L ⁻¹ (25 °C)
Constantes de dissociação ^a	pK _{a1} = 3,22; pK _{a2} = 7,46 e pK _{a3} = 8,94

a: determinado por potenciometria (Babic *et al.*, 2007).

As TETRAS (Figura 3.1) constituem um grupo de fármacos com estrutura e atividade comuns, sendo ativos contra uma grande variedade de micro-organismos gram-positivos e gram-negativos por meio da inibição da biossíntese de proteínas no ribossomo 30 S. São eficazes contra micro-organismos resistentes à agentes que atuam na parede celular bacteriana, sendo empregados no tratamento de mastites em bovinos e para fins profiláticos por meio da adição, em níveis sub-terapêuticos, à ração animal (Goodman e Gilman, 1990; Schenck e Callery, 1998).

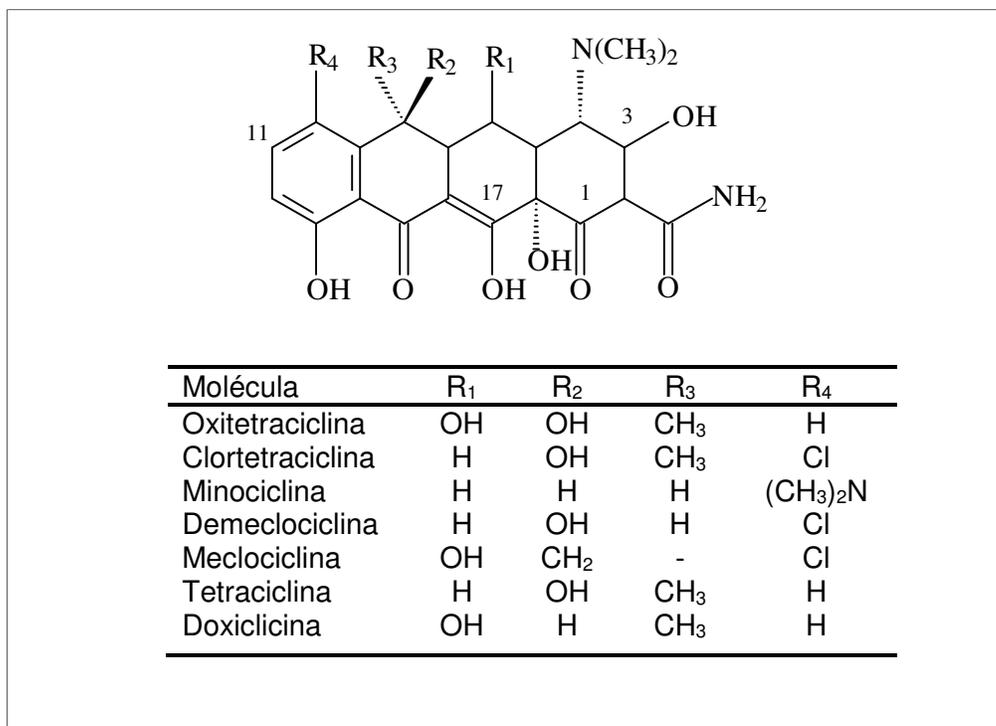


Figura 3.1: Estrutura das tetraciclina.

As TETRAS são umas das principais classes de antimicrobianos comercializados e aplicados na pecuária brasileira (Rutz e Lima, 2001). Dentre estes, a OTC é o medicamento tetraciclínico de maior uso no país (SESA, 2005). Segundo a Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento cerca de 27 estabelecimentos têm autorização para produzir fármacos com princípio ativo à base de OTC no Brasil (MAPA, 2014).

As TETRAS possuem múltiplos grupos ionizáveis, sendo espécies zwitteriônicas presentes na faixa de pH entre 3 e 9. Sendo assim, estes antimicrobianos podem interagir com sítios positivos e negativos do solo (O'Connor e Aga, 2007; Andreu *et al.*, 2009).

Uma vez administrados, a porcentagem excretada destes fármacos pode ser maior que 75% (Aga *et al.*, 2005). No solo, as TETRAS formam quelatos com cátions di- ou trivalentes e se ligam a grupos hidroxila ou às substâncias húmicas (Andreu *et al.*, 2009; Hamscher *et al.*, 2002).

Como resultado desta capacidade, as TETRAS são resíduos persistentes que se acumulam no solo e permanecem estáveis durante o período de estocagem do esterco (Bao *et al.*, 2009). A tetraciclina, a clortetraciclina e a OTC foram encontradas em campos fertilizados com estrume de animais (Andreu *et al.*, 2009).

A presença de TETRAS no ambiente ocasiona uma série de impactos negativos. Genes resistentes a estes fármacos foram encontrados em *Escherichia coli* isolada em fezes de animais (O'Connor e Aga, 2007). A clortetraciclina reduziu significativamente o crescimento de 12 bactérias isoladas do solo (Bao *et al.*, 2009). Além disto, alguns produtos de degradação, como é o caso da anidroclortetraciclina, são mais tóxicos à micro-organismos do que o composto original (O'Connor e Aga, 2007).

Sassman e Lee (2005) estudaram a sorção destes compostos em solos com diferentes propriedades e encontraram valores de K_D entre 13 a 310000 L kg⁻¹, o que mostrou que a retenção destes fármacos depende das características e composição de cada matriz. Além disto, as TETRAS foram encontradas em mananciais de água próximos a áreas de criação de animais. Sendo assim, apesar de serem fortemente sorvidas no solo, estes fármacos podem ser lixiviados por ação da chuva (O'Connor e Aga, 2007).

3.2 Parte experimental

3.2.1 Reagentes, solventes, padrões e soluções

A OTC.HCl (95%) foi adquirida da Sigma-Aldrich (EUA). As soluções estoque do fármaco foram preparadas em metanol grau HPLC (Tedia, EUA) em concentração de 10 mg mL⁻¹ sendo protegidas de luminosidade e armazenadas no freezer por até 3 meses. As soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque para uso imediato em tampão Britton-Robinson (BR) 40 mmol L⁻¹ produzido de acordo com o item 2.2.1.

A ACN e a trietilamina empregadas na fase móvel foram adquiridas da Tedia (EUA) e da Synth (Brasil), respectivamente.

3.2.2 Materiais e equipamentos

Os materiais e equipamentos empregados nos experimentos com a OTC, dentre eles a balança analítica, a mesa de agitação, o sistema cromatográfico, a coluna de separação e a coluna de guarda são os mesmos descritos em 2.2.2. A coleta e caracterização dos solos é apresentada em 2.2.4.

3.2.3 Condições cromatográficas

O sistema cromatográfico empregado para a quantificação da OTC foi apresentado no item 2.2.2. Uma solução de ácido oxálico $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,1% de trietilamina:acetonitrila (90:10, v/v) foi usada como fase móvel, no modo isocrático em vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de injeção da amostra foi de $5 \mu\text{L}$. A temperatura da coluna foi mantida em $30 \text{ }^\circ\text{C}$. A detecção do fármaco no detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foi realizada empregando o comprimento de onda de 355 nm .

3.3 Métodos

3.3.1 Avaliação da estabilidade da oxitetraciclina em solução

Soluções de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de OTC foram preparadas em tampão BR 40 mmol L^{-1} em quintuplicata nos valores de pH 2,5; 5,0 e 8,5. As soluções foram transferidas para tubos Falcon de polipropileno (usados em todos os estudos subsequentes) e os frascos foram mantidos sob agitação a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1788 g em uma mesa de agitação horizontal por até 72 horas. Após determinados intervalos de tempo alíquotas foram coletadas e a concentração de OTC foi determinada em cada solução de acordo com as condições cromatográficas apresentadas no item 3.2.3.

3.3.2 Otimização da razão solo/solução

Amostras de 1; 2,5 e 5 g dos solos N1 e S2 foram pesadas em duplicata em tubos Falcon. Em seguida, os tubos receberam 20 mL de tampão BR 40 mmol L⁻¹ (acrescido de azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹) em pH 2,5 e as misturas permaneceram sob agitação a 25 °C e 1788 g por 24 horas. Ao término deste tempo uma solução de 5 mL de OTC 2 mg mL⁻¹ (preparada no mesmo tampão) foi acrescentada a cada frasco. Os frascos foram novamente mantidos sob agitação por mais 48 horas, conforme as condições anteriormente empregadas. Em seguida, os frascos foram centrifugados (15 min a 1788 g) e uma alíquota de cerca de 1 mL do sobrenadante foi coletada e filtrada (0,22 µm) antes da injeção no sistema cromatográfico.

3.3.3 Avaliação de cinética de sorção da oxitetraciclina nos solos

Amostras de 2,5 g dos solos N1 e S2 (pesadas em duplicata e para cada intervalo de tempo) foram transferidas para tubos Falcon. Em seguida, os tubos receberam 20 mL de tampão BR 40 mmol L⁻¹ (acrescido de azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹) em pH 2,5. As misturas permaneceram sob agitação a 25 °C e 1788 g por 24 horas. Ao término deste tempo uma solução de 5 mL de OTC 2 mg mL⁻¹ (preparada no mesmo tampão) foi acrescentada a cada frasco. Os frascos foram novamente mantidos sob agitação por até 96 horas. Durante este período de tempo dois frascos de cada solo foram tomados após 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas de agitação. Os frascos foram centrifugados (15 min a 1788 g) e uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi filtrada e transferida para um vial. A determinação da OTC em solução aquosa de solo foi realizada de acordo com as condições cromatográficas descritas em 3.2.3.

3.3.4 Validação do método para a determinação de oxitetraciclina no extrato aquoso dos solos N1 e S2

Os solos N1 e S2 foram agitados por 48 h com tampão BR 40 mmol L⁻¹ (acrescido de azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹) em pH 2,5 e em razão de solo/solução de 1:10 (m/v). Os extratos aquosos obtidos foram então fortificados em triplicata, a partir da solução estoque de OTC 10 mg mL⁻¹, fornecendo concentrações finais de 0,05; 0,1; 0,5; 0,75 e 1 mg mL⁻¹. Os valores de LD e de LQ foram determinados por meio de diluições sucessivas da solução de 0,5 mg mL⁻¹ até que a razão sinal ruído fosse de 3 e 10, respectivamente. A precisão intra-dias do método, expressa como estimativa do desvio padrão relativo (DPR), foi avaliada por meio da concentração de fármaco livre em solução após 72 horas de equilíbrio de misturas de solo/solução 1:10 (m/v) contendo uma concentração inicial de OTC de 1,2 mg mL⁻¹. As análises foram realizadas em quintuplicata com amostras independentes no mesmo dia, pelo mesmo analista e pelo mesmo equipamento. A precisão inter-dias foi avaliada em triplicata em três dias diferentes, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. Os frascos contendo as amostras de solo foram centrifugados (15 min a 1788 g) e uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi filtrada e transferida para um vial. A determinação da OTC em solução aquosa de solo foi realizada de acordo com as condições cromatográficas descritas em 3.2.3.

3.3.5 Construção das isotermas de sorção e dessorção da oxitetraciclina nos solos N1 e S2

Amostras de 2,5 g dos solos N1 e S2 foram pesadas em triplicata em tubos Falcon e foram adicionados de 20 mL de tampão Britton-Robinson 40 mmol L⁻¹ (acrescido de azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹) pH 2,5. As misturas foram mantidas sob agitação a 25 °C e 1788 g por 24 h. Em seguida, foram adicionados em cada tubo 5 mL de OTC 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 mg mL⁻¹ (preparada na mesma solução tampão). A fortificação final dos solos foi na faixa de 4 a 20 mg g⁻¹. As misturas foram novamente agitadas por mais 72 h. Ao

término deste período os frascos foram pesados, centrifugados (15 minutos a 1788 G) e a fase aquosa foi coletada. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi filtrada e analisada conforme as condições descritas em 3.2.3. Para a realização da etapa de dessorção a fase aquosa foi repostada, sem a adição do fármaco, com 25 mL do mesmo tampão empregado na etapa de sorção. Os frascos foram agitados por mais 24 h. Em seguida os tubos foram pesados, centrifugados (1788 g por 15 minutos) e a fase aquosa foi novamente analisada.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Estudos iniciais

A OTC possui três grupos funcionais distintos – o sistema tricarbonilmetano, o sistema fenólico dicetona e o sistema dimetil amônio, apresentando propriedades ácidas e básicas e três valores de pKa (Babic, et al., 2007).

Desta forma, a OTC pode existir como um cátion (+ 0 0) quando o sistema dimetil amônio é protonado, como um zwitterión (+ - 0) quando o grupo fenólico dicetona é desprotonado e como um ânion (+ - - ou 0 - -) quando ocorre perda de prótons dos grupos tricarbonilmetano e fenólico dicetona em meio básico (Kulshrestha *et al.*, 2004, Figura 3.2).

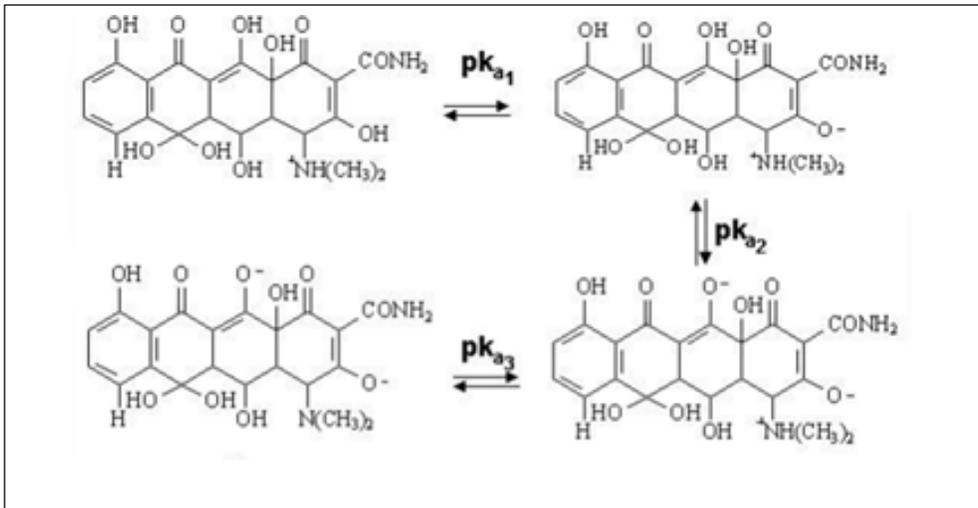


Figura 3.2: Equilíbrio ácido-base para a oxitetraciclina. Adaptado de Mamani, 2007.

A distribuição das espécies está mostrada na Figura 3.3.

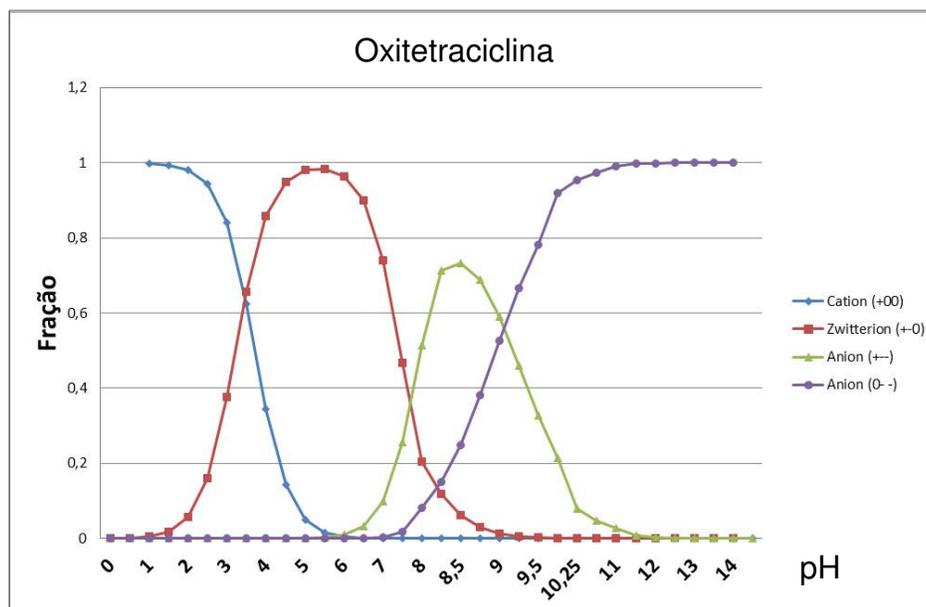


Figura 3.3: Diagrama de especiação da oxitetraciclina em função do pH.

Por conta desta característica a avaliação da estabilidade da OTC foi realizada em meio ácido (pH 2,5 e 5,0) e básico (pH 8,5), valores nos quais as formas catiônica, zwitteriônica e aniônica da molécula são predominantes. Assim como no caso da DANO, os estudos também foram feitos empregando-se o tampão BR como meio aquoso.

Os resultados do estudo de estabilidade são apresentados na Figura 3.4.

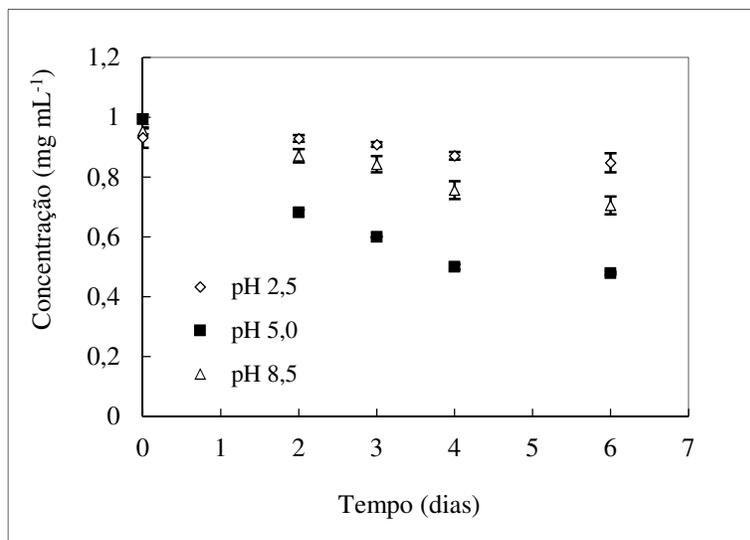


Figura 3.4: Concentração média ($n = 5$) de oxitetraciclina $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, preparada em tampão Britton-Robinson 40 mmol L^{-1} nos valores de pH 2,5; 5,0 e 8,5, em função do tempo.

Conforme pode ser visto na Figura 3.4, houve decréscimo na concentração inicial de OTC durante o período de seis dias. O fármaco apresentou menor estabilidade em pH 5,0, visto que neste meio sua concentração diminuiu mais rapidamente em função do tempo. Em dois dias foi observada diferença significativa ($p = 0,05$) entre a concentração média de OTC e a concentração média inicial do fármaco para os valores de pH 5,0 e 8,5. No caso do pH 2,5 esta diferença somente foi observada no quarto dia. Em função disto, o pH 2,5 foi inicialmente escolhido para a continuidade dos estudos, já que a OTC apresentou maior estabilidade nesta condição. As soluções contendo os produtos de

degradação foram analisadas por LC-MS/MS, mas não foi possível identificar nestes estudos preliminares a identidade dos mesmos.

A otimização da razão de solo/solução foi feita avaliando-se a porcentagem de OTC sorvida após o período de equilíbrio de 48 horas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.5.

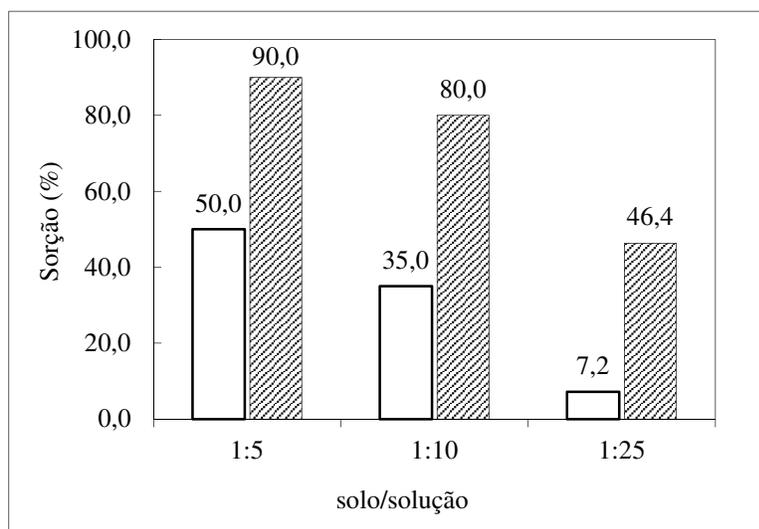


Figura 3.5: Porcentagem média (n = 2) de sorção de oxitetraciclina nos solos N1 (retângulo branco) e S2 (retângulo sombreado) em função da razão solo/solução.

Os resultados mostrados na Figura 3.5 indicam que a OTC apresentou maior sorção no solo S2 e que a retenção do fármaco decresceu a medida em que a proporção entre a massa de solo e o volume da solução aquosa tornou-se menor, ou seja, para um maior volume de solução.

Com base nas diretrizes da OECD 106 a razão de solo/solução de 1:10 m/v foi escolhida para a continuidade dos estudos, visto que esta condição atendeu ao critério de sorção mínima de 20% estabelecida pelo guia.

A última etapa dos estudos preliminares consistiu na determinação do tempo aparente de equilíbrio de sorção do fármaco nos solos N1 e S2. Neste caso, soluções de 25 mL de OTC $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$, preparadas em tampão BR pH 2,5, foram mantidas em agitação com 2,5 g dos solos por até 96 horas. Durante este período a concentração de

fármaco sorvido no tempo t (q_t) foi determinada em diferentes intervalos de tempo, conforme mostra a Figura 3.6.

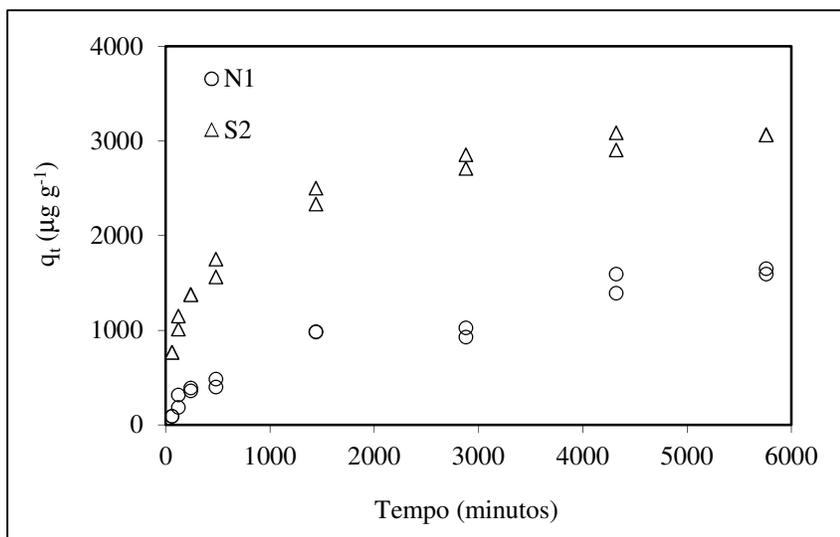


Figura 3.6: Curvas de concentração de oxitetraciclina sorvida no tempo t (q_t) em função do tempo para os solos N1 e S2.

As curvas cinéticas, mostradas na Figura 3.6, indicam que houve maior sorção da OTC no solo S2, corroborando com os resultados observados durante o estudo de otimização da razão solo/solução (Figura 3.5). Por meio das curvas construídas foi possível adotar o período de 72 horas (4320 minutos) para o estabelecimento do equilíbrio aparente de sorção do fármaco nos solos.

Em trabalhos nos quais a sorção da OTC foi avaliada nos meios ácido, neutro e básico o período de equilíbrio empregado foi de, no máximo, 24 horas (Figuerola *et al.*, 2004; Kushhrestha *et al.*, 2004; Sassman e Lee, 2005; Pils e Laird, 2007; Xu e Li, 2010). Entretanto, uma vez que o tempo de 72 horas comprometeu a estabilidade do fármaco os estudos tiveram continuidade somente com o pH 2,5, já que nesta condição não foi observada degradação considerável da OTC, tal como ocorreu em pH 5,5 e 8,5 (Figura 3.4). Desta forma, o emprego do tempo de 72 h para o equilíbrio da OTC em pH 5,5

utilizado por Jones e colaboradores (Jones *et al.*, 2005) não foi adequado, visto que a estabilidade do fármaco é comprometida, conforme mostraram os estudos aqui realizados.

Os dados apresentados na Figura 3.6 foram ajustados aos modelos de PPO, PSO e de Elovich para o cálculo dos parâmetros cinéticos de sorção da OTC em N1 e S2 (Figuras 3.7, 3.8 e 3.9).

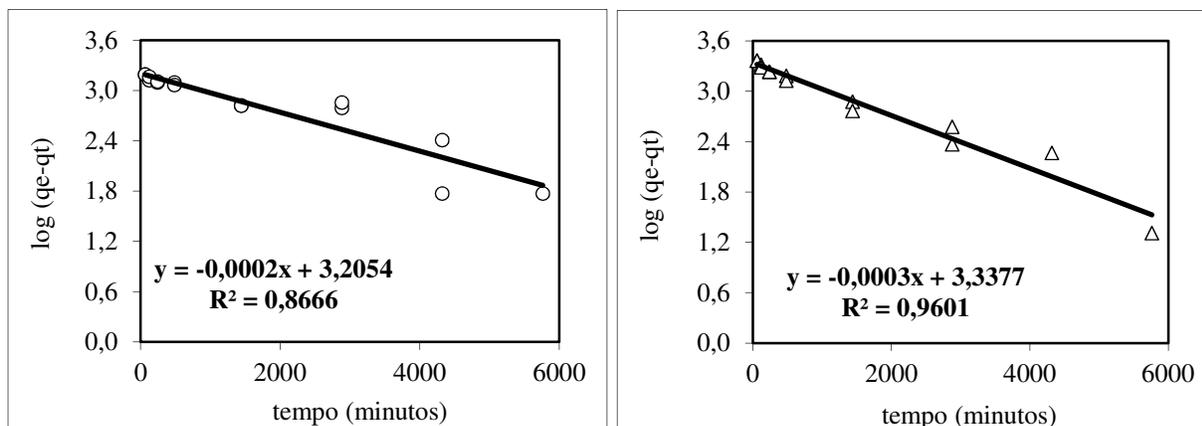


Figura 3.7: Ajuste dos dados de sorção da oxitetraciclina nos solos N1 (círculo) e S2 (triângulo) ao modelo de pseudo-primeira-ordem.

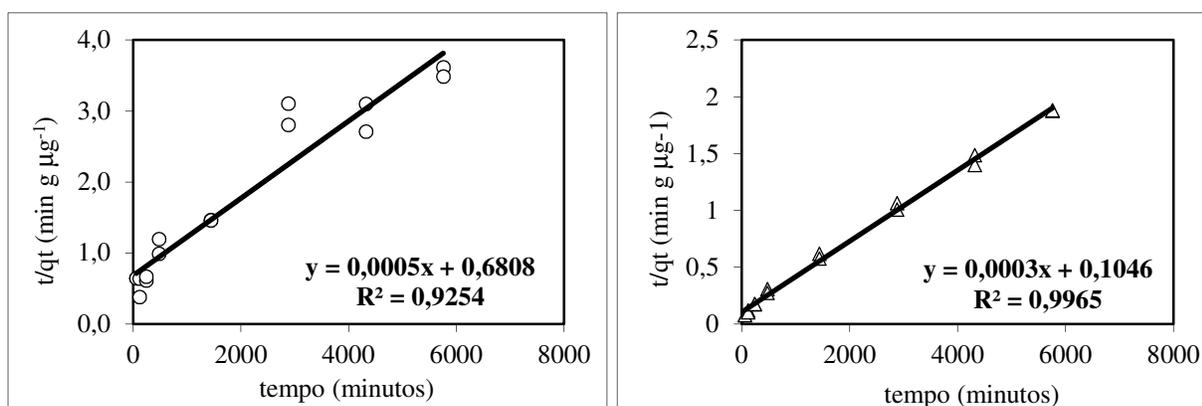


Figura 3.8: Ajuste dos dados de sorção da oxitetraciclina nos solos N1 (círculo) e S2 (triângulo) ao modelo de pseudo-segunda-ordem.

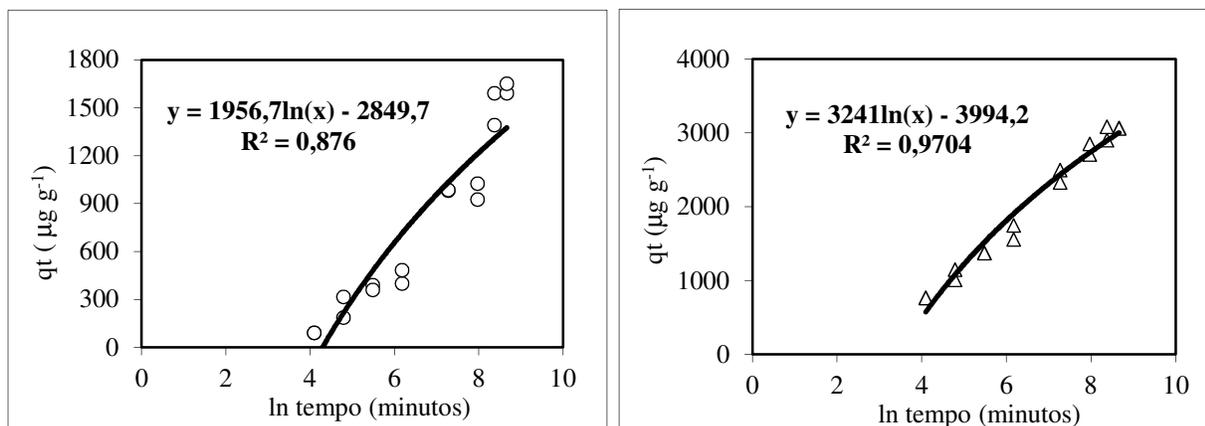


Figura 3.9: Ajuste dos dados de sorção da oxitetraciclina nos solos N1 (círculo) e S2 (triângulo) ao modelo de Elovich.

Por meio das Figuras 3.7, 3.8 e 3.9 é possível verificar que os dados experimentais, obtidos para N1 e S2, apresentaram melhor ajuste à equação de PSO, o que é confirmado por meio da Figura 3.10. Por isto, este modelo foi adotado para o cálculo dos parâmetros cinéticos de sorção da OTC nos solos (Tabela 3.2).

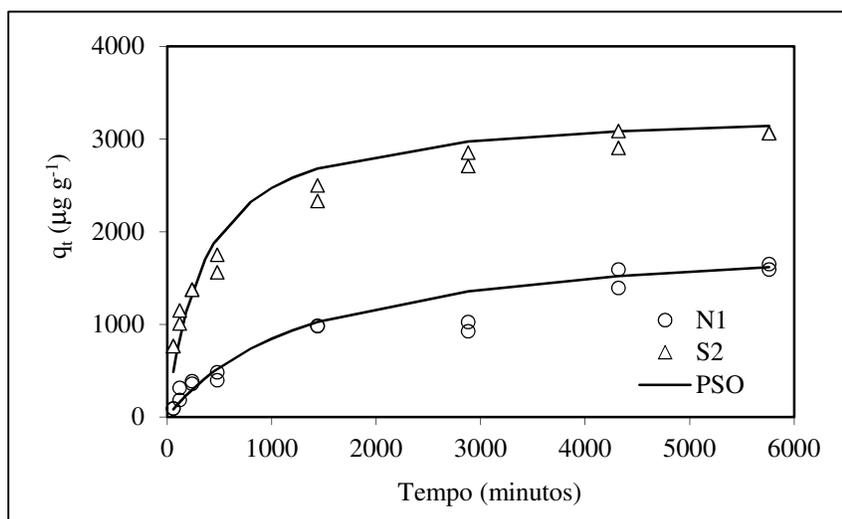


Figura 3.10: Curvas de concentração de oxitetraciclina sorvida no tempo t (q_t) em função do tempo ajustadas ao modelo de pseudo-segunda-ordem.

Tabela 3.2: Parâmetros cinéticos de sorção da oxitetraciclina nos solos N1 e S2 obtidos através do ajuste ao modelo de pseudo-segunda-ordem.

Solo	Pseudo- segunda-ordem		
	Q _e (μg g ⁻¹)	k ₂ (g μg ⁻¹ min ⁻¹)	r ²
N1	2000	3,67 x 10 ⁻⁷	0,9254
S2	3333	8,60 x 10 ⁻⁷	0,9965

onde: q_e é a concentração máxima sorvida no equilíbrio e k_2 a constante de pseudo-segunda-ordem do modelo cinético.

Os valores teóricos de q_e , apresentados na Tabela 3.2, estão em concordância com os resultados experimentais obtidos (Figura 3.10) e confirmam que a OTC apresentou maior capacidade de sorção no solo S2. A constante cinética k_2 mostra que a sorção do fármaco foi mais rápida no solo S2, indicando o mesmo comportamento já observado para a DANO.

3.4.2 Validação do método para a determinação de oxitetraciclina no extrato aquoso dos solos N1 e S2

A seletividade do método de determinação cromatográfica da OTC por HPLC-DAD foi avaliada mediante análise dos cromatogramas dos extratos brancos dos solos e dos extratos brancos fortificados com o fármaco. A partir da Figura 3.11 é possível verificar a ausência de interferentes eluídos no mesmo tempo de retenção (t_r) da OTC ($t_r \approx 17,5$ minutos). A pureza do pico cromatográfico também confirmou que o sinal é atribuído exclusivamente a um único composto, indicando que não houve coeluição de outros interferentes juntamente com o fármaco.

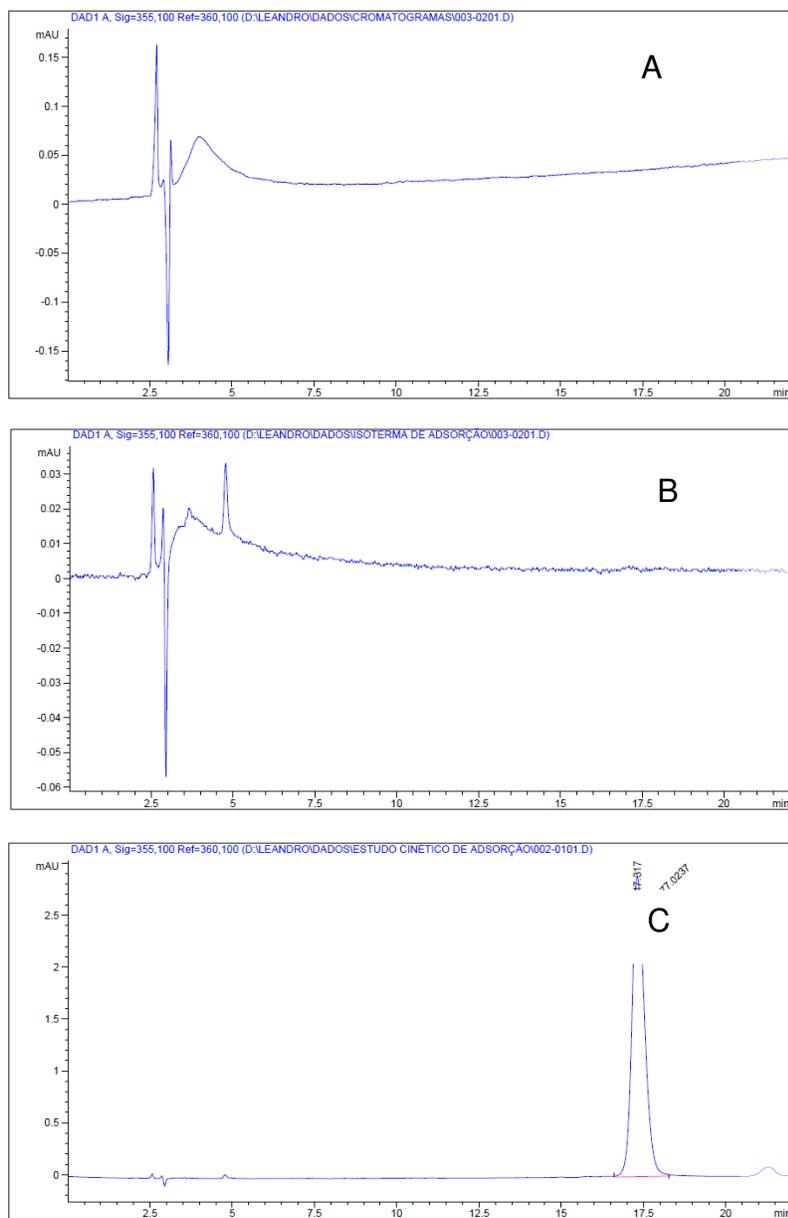


Figura 3.11: Cromatogramas dos extratos brancos dos solos N1(A), S2 (B) e de uma solução de oxitetraciclina $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ (C). Razão de solo:solução de 1:10 (m/v) em tampão Britton-Robinson 40 mmol L^{-1} (pH 2,5) acrescido de azida de sódio $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Coluna X Bridge™ Shield RP 18, $4,6 \times 200 \text{ mm}$ ($5 \mu\text{m}$) e coluna de guarda X Bridge™ Shield RP 18 $4,6 \times 20 \text{ mm}$ ($5 \mu\text{m}$). Fase móvel: ácido oxálico $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,1\%$ de trietilamina:acetonitrila (90:10, v/v) no modo isocrático. Vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção: $5 \mu\text{L}$. Temperatura: $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Detector: DAD (355 nm).

A validação do método foi realizada mediante fortificação da matriz branco (solução de solo), uma vez que houve diferença entre o coeficiente angular das curvas construídas em tampão e no extrato dos solos, indicando efeito matriz. As curvas analíticas e os respectivos gráficos de resíduos são mostrados na Figura 3.12. Os gráficos de resíduos apresentados mostram dispersão aleatória dos resultados e não evidenciam tendência.

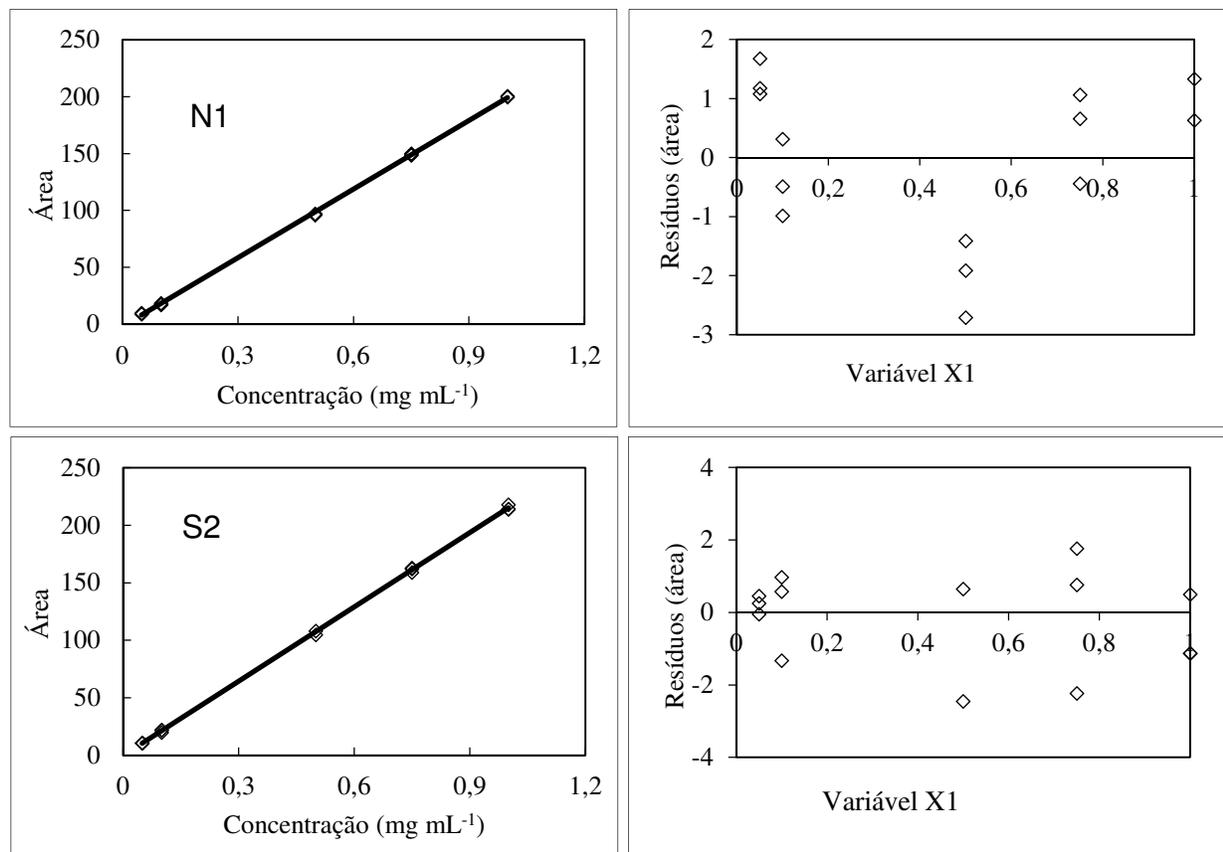


Figura 3.12: Curvas analíticas e gráficos de resíduos construídos para a oxitetraciclina no extrato aquoso dos solos N1 e S2 (1:10, m/v) em tampão Britton-Robinson 40 mmol L⁻¹ + azida de sódio 1,5 mmol L⁻¹ em pH 2,5.

Os parâmetros de validação, obtidos para o método de determinação cromatográfica da OTC, são apresentados na Tabela 3.3. Os valores de r indicam que as curvas apresentaram linearidade adequada na faixa de trabalho empregada ($r > 0,999$).

Tabela 3.3: Parâmetros de validação para a determinação cromatográfica da oxitetraciclina no extrato aquoso dos solos N1 e S2

Solo	Sensibilidade u.a. / (mg mL ⁻¹)	r	LQ (mg mL ⁻¹)	LD (mg mL ⁻¹)	Precisão (DPR, %)	
					Intra- dias	Inter- dias
N1	201,31	0,9998	0,010	0,001	3,0	3,8
S2	215,56	0,9998	0,010	0,001	4,8	5,7

u.a: unidade de absorvância

3.4.3 Isotermas de sorção e dessorção da oxitetraciclina nos solos N1 e S2

As isotermas de sorção da OTC (Figura 3.13) foram construídas em pH 2,5 empregando a razão de solo/solução de 1:10 (m/v) com tempo de equilíbrio de 72 h e faixa de concentração entre 0,4 a 2 mg mL⁻¹, o que representa no solo uma concentração de 4 a 20 mg g⁻¹. A etapa de dessorção foi realizada em 24 h para que não houvesse comprometimento da estabilidade do fármaco durante o ensaio.

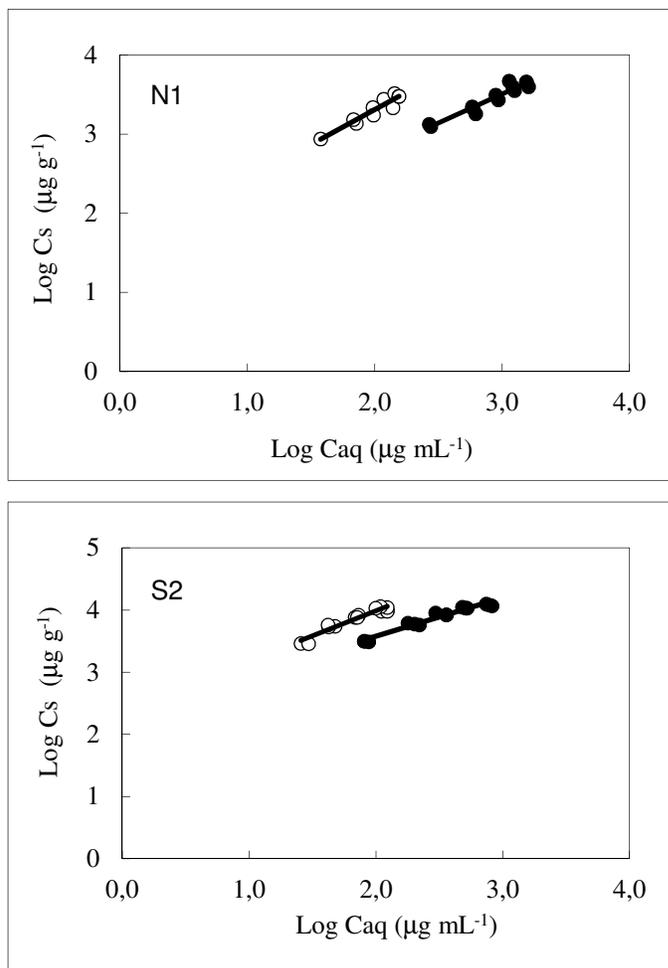


Figura 3.13: Isotermas de sorção (círculo preto) e dessorção (círculo branco) da oxitetraciclina nos solos N1 e S2 em pH 2,5 ajustadas à forma logarítmica da Equação de Freundlich.

Os parâmetros de sorção da OTC, calculados a partir do ajuste das isotermas ao modelo de Freundlich, são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Parâmetros de sorção da oxitetraciclina nos solos N1 e S2.

Solo	Etapa	K_F^a	$1/n$	H	R	K_D (mL g ⁻¹) ^b
N1	Sorção	20,3	0,733	1,21	0,9626	2,0 - 4,5
	Dessorção	34,4	0,887		0,9528	2,4 – 115
S2	Sorção	219,9	0,618	1,30	0,9814	14,3 – 36
	dessorção	239	0,846		0,9623	81 – 138

a) $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{g}^{-1}$; b) coeficiente de distribuição = concentração sorvida no solo/concentração na fase aquosa, H: índice de histerese, definido como:

$$\frac{1/n \text{ dessorção}}{1/n \text{ sorção}}$$

De acordo com os resultados da Tabela 3.4 as isotermas apresentaram ajuste adequado ao modelo de Freundlich, o que é verificado através do parâmetro r ($r > 0,95$). O valor de K_D sofreu variação em função da concentração inicial de fármaco nos solos, indicando a ocorrência de um processo de sorção não linear. Os valores de K_F e de K_D para a etapa de sorção foram inferiores àqueles observados para a dessorção, apontando um desfavorecimento desta segunda etapa, assim como ocorreu com a DANO. Contudo, apesar de pequena, a dessorção não foi considerada irreversível, já que o índice H foi maior que 0,7.

De acordo com critérios estabelecidos pelo IBAMA a capacidade de sorção da OTC pode ser classificada como pequena no solo N1 ($0 \leq K_F \leq 24$) e elevada no solo S2 ($K_F \geq 150$) (IBAMA, 1990).

A Tabela 3.5 mostra uma compilação dos parâmetros de sorção de OTC encontrados na literatura.

Tabela 3.5: Parâmetros de sorção da oxitetraciclina em diferentes solos.

Molécula	Textura do solo	Localização	pH	Silte (%)	Argila (%)	Areia (%)	CTC	solo/solução (m/v)	MO (%)	Tempo (h)	Fase aquosa	Concentração	K_F^b	1/n sorção	Referência
OTC.HCl	Arenoso	São Paulo	2,5	1,8	6,2	91,1	19,3	1:10	1,53	72	BR pH 2,5	0,4 -2 mg mL ⁻¹	20,3	0,733	Este trabalho
OTC.HCl	Argiloso	São Paulo	2,5	7,0	49,2	45,5	66	1:10	3,23	72	BR pH 2,5	0,4 -2 mg mL ⁻¹	219,9	0,618	Este trabalho
OTC.HCl	Franco-argilossiltoso	Pennsylvania (EUA)	5,5	70,7	12,4	16,9	104	1:200	5,1	72	MES 100 mmol L ⁻¹	0,005-1,25 mmol L ⁻¹	78,3	0,57	Jones <i>et al.</i> , 2005
OTC.HCl	Franco-siltoso	Carolina do Norte (EUA)	5,5	53,5	26,9	19,5	23,8	1:200	1,45	72	MES 100 mmol L ⁻¹	0,005-1,25 mmol L ⁻¹	35,3	0,37	Jones <i>et al.</i> , 2005
OTC.HCl	Argilossiltoso	Los Angeles (EUA)	5,5	48,5	42,4	9,0	216,2	1:200	0,81	72	MES 100 mmol L ⁻¹	0,005-1,25 mmol L ⁻¹	103,4	0,6	Jones <i>et al.</i> , 2005
OTC.HCl	Areia	Delaware (EUA)	5,5	3,8	1,4	94,0	8,2	1:200	2,9	72	MES 100 mmol L ⁻¹	0,005-1,25 mmol L ⁻¹	16,6	0,56	Jones <i>et al.</i> , 2005
OTC.HCl	Muito argiloso	Texas (EUA)	5,5	22,7	65,1	12,2	533,4	1:200	7,1	72	MES 100 mmol L ⁻¹	0,005-1,25 mmol L ⁻¹	277,5	0,56	Jones <i>et al.</i> , 2005
OTC dihidrato	Haplaquente ^a	China	6,9	---	---	---	352	1:62,5	11,7	24	CaCl ₂ 0,01 mmol L ⁻¹	0,05-0,4 mol L ⁻¹	495	0,47	Ling-Ling <i>et al.</i> , 2010
OTC dihidrato	---	Indiana (EUA)	6,0	---	24	---	146	1:58	2,3	20	CaCl ₂ 0,01 mmol L ⁻¹	0,4-65 μ mol L ⁻¹	92	0,59	Sassman e Lee, 2005

OTC.HCl: hidrocloreto de oxitetraciclina, CTC: capacidade de troca catiônica (mmol_c/kg), MES: ácido 2-(4-morfolino)etanosulfônico, BR: Tampão Britton-Robinson, a) classificação norte-americana, b) μg^{1-1/n} (mL)^{1/n} g⁻¹

Tabela 3.5: Continuação

Molécula	Textura do solo	Localização	pH	Silte (%)	Argila (%)	Areia (%)	CTC	solo/solução (m/v)	MO (%)	Tempo (h)	Fase aquosa	Concentração	K _F ^b	1/n sorção	Referência
OTC	Sedimentos de rio	China	7,0	1,5-2,7	---	95-98	---	1:5	---	24	CaCl ₂ 0,01 mmol L ⁻¹	0,2-10 mg L ⁻¹	1,4-1,5	1,4-1,5	Cheng <i>et al.</i> , 2013
OTC.HCl	---	China	4,96	---	78	---	20,24	1:200	43,5	24	KNO ₃ 0,01 mmol L ⁻¹	8-258 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	71,7	0,44	Kong <i>et al.</i> , 2012
OTC.HCl	---	China	4,0	---	48	---	18,77	1:200	26,7	24	KNO ₃ 0,01 mmol L ⁻¹	8-258 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	73,8	0,36	Kong <i>et al.</i> , 2012
OTC.HCl	----	China	5,16	---	32	---	16,85	1:200	16,7	24	KNO ₃ 0,01 mmol L ⁻¹	8-258 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	91,6	0,63	Kong <i>et al.</i> , 2012
OTC.HCl	---	China	4,52	---	46,3	---	18,22	1:200	17,3	24	KNO ₃ 0,01 mmol L ⁻¹	8-258 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	118	0,62	Kong <i>et al.</i> , 2012
OTC.HCl	----	China	7,06	---	48,2	---	---	1:200	7,6	24	KNO ₃ 0,01 mmol L ⁻¹	8-258 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	120,5	0,65	Kong <i>et al.</i> , 2012
OTC	Franco siltoso	China	5,64	58,5	15,6	25,9	10,35	1:10	1,83	24	H ₂ O pH 5,5/70/8,5	1-40 mg L ⁻¹	2102-3012	0,99-1,14	Kim, <i>et al.</i> , 2012
OTC	Franco arenoso	China	8,13	38,9	4,9	56,2	5,2	1:10	0,82	24	H ₂ O pH 5,5/70/8,5	1-40 mg L ⁻¹	1965-2513	0,99-1,14	Kim, <i>et al.</i> , 2012

Os dados apresentados na Tabela 3.5 mostram que a OTC exibiu valores de K_F significativamente inferiores aos valores reportados para a DANO ($K_F \geq 2280$, Tabela 2.6), até mesmo em solos com alta CTC. Desta forma, os resultados da literatura sugerem que a OTC possua menor capacidade de sorção em solos em comparação com a fluoroquinolona. Entretanto, cabe destacar que os estudos de sorção da OTC foram realizados nas mais diversas condições experimentais o que dificulta a correlação direta entre estes resultados.

O tampão PIPES (piperazina-1,4-bis (ácido etanosulfônico)) foi empregado em pH 5,5 por Figueroa e Mackay para evitar a possível formação de complexos entre os íons cálcio e a OTC e para suprimir a competição com o fármaco por sítios de sorção no solo (Figueroa e Mackay, 2005). Carrasquillo e colaboradores empregaram este mesmo tampão em pH 7,0 na sorção de OTC em montmorilonita, kaolita e goetita (Carrasquillo *et al.*, 2008). Figueroa *et al.* avaliaram a sorção da OTC em montmorilonita e kaolita utilizando tampão bicarbonato de sódio com pH ajustado entre 4,0 e 9,0 (Figueroa *et al.*, 2004). O tampão MES (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico) em pH 5,5 foi utilizado na sorção de OTC em trinta solos representativos da costa leste dos Estados Unidos (Jones *et al.*, 2005). A razão de solo/solução encontrada na literatura para estudos com a OTC também é bastante diversa, variando deste 1:2 até 1:1000 (m/v) (Carrasquillo *et al.*, 2008; Figueroa *et al.*, 2004; Figueroa e Mackay, 2005; Jones *et al.*, 2005; Le Bris e Pouliquen 1996; Ling-Ling *et al.*, 2010; Kulshrestha *et al.*, 2004; Sassman e Lee, 2005).

A Tabela 3.5 também indica uma ampla faixa de K_F para a OTC ($1,4 \leq K_F \leq$ até 3014 $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{g}^{-1}$), o que é indicativo de que a sorção do fármaco é fortemente dependente das condições experimentais empregadas bem como das características físico-químicas dos solos avaliados. Deste forma, os valores de K_F observados para os solos N1 e S2 estão de acordo com os resultados reportados na literatura.

Os valores superiores de K_F e de K_D no solo argiloso S2 confirmam que o fármaco apresentou maior capacidade de sorção neste solo em comparação com o solo arenoso N1. Tal como ocorreu com S2 os resultados anteriormente apresentados também mostram o aumento da capacidade de sorção de TETRAS em solos com maiores teores de argila e de matéria orgânica.

Avaliando a sorção de TETRAS em dois solos Ling-Ling *et al.* verificaram que a retenção dos fármacos foi mais alta no solo com maior porcentagem de carbono orgânico (% CO) e que a adição de matéria orgânica aumentou significativamente a sorção da classe de fármacos (Ling-Ling *et al.*, 2010). Este comportamento pode ser explicado por meio do aumento da capacidade de interação destas moléculas com a matéria orgânica dos solos por meio de ligações com cátions divalentes, troca iônica e/ou por ligações de hidrogênio entre os grupos acídicos dos ácidos húmicos e os grupos polares das TETRAS (Ling-Ling *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2005).

Diferentemente destes resultados, Jones *et al.*, verificaram que em cerca de 30 solos, característicos da costa leste norte americana, houve uma correlação negativa entre o aumento da % CO dos solos e a capacidade de sorção da OTC pelos mesmos (Jones *et al.*, 2005). Pills e Laird observaram que a sorção da tetraciclina e da clortetraciclina foi maior nos componentes dos solos com menor % CO (% CO = 3,2 %) do que nos componentes do solo com maior % CO (% CO = 5,2%) (Pills e 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 mg L⁻¹ e aumentou quando a concentração do ácido húmico foi diminuída para 1,0 mg L⁻¹ (Kulshrestha *et al.*, 2004). A OTC também apresentou maior sorção em solos arenosos do que no esterco (Loke *et al.*, 2002).

De acordo com Pills e Laird os grupos funcionais polares e carregados das substâncias húmicas podem interagir diretamente com sítios negativamente carregados localizados na superfície de argilas. Em consequência, os sítios são mascarados e o acesso das TETRAS as intercadas de argilas é inibido (Pills e Laird, 2007). Segundo Kulshrestha e colaboradores a capacidade de sorção de argilas por ácidos húmicos pode ser excedida, resultando em ácidos húmicos livres com alto conteúdo de matéria orgânica dissolvida. Desta forma, quando ocorre aumento dos ácidos húmicos livres em solução mais OTC é desorvida das argilas associadas aos ácidos húmicos e, como consequência, ocorre diminuição na adsorção do fármaco pela argila (Kulshrestha *et al.*, 2004).

Segundo o modelo matemático, proposto por Figueroa e colaboradores para descrever as contribuições das espécies catiônica (OTC⁺) e zwitteriônica (OTC⁰) para a

sorção da OTC em solos, a grande dependência do K_D da OTC⁺ com a força iônica do meio sugeriu a predominância do mecanismo de troca catiônica como dominante para a espécie positiva da molécula (Figueroa *et al.*, 2004). De acordo com este modelo a interação da OTC⁺ com a superfície das argilas foi cerca de 20 vezes mais forte do que no caso da OTC⁰. Além deste fato, os valores de K_D do fármaco diminuíram a medida que houve aumento da basicidade do meio, conforme a fração das espécies catiônicas diminuiu em solução entre pH 4 a 9 (Figueroa *et al.*, 2004). Além das observações experimentais esta hipótese foi confirmada por resultados de difração de raios-X, os quais mostraram que a OTC⁺ é capaz de intercalar-se entre as camadas de argila, provocando aumento entre as distâncias das mesmas (Kulshrestha *et al.*, 2004).

Assim como ocorreu com a DANO, espera-se que a troca catiônica tenha sido o mecanismo dominante para a sorção da OTC nos solos N1 e S2, já que em pH 2,5 a molécula se encontrava com carga positiva devido à protonação do grupo amino terciário (Figuras 3.2 e 3.3). Contudo, uma vez que neste mesmo valor de pH uma pequena fração da OTC se encontrava na forma zwitteriônica, devido à desprotonação do grupo R-OH, o fármaco também pode interagir via mecanismo de ponte catiônica e complexação com os solos, de acordo com os mecanismos já discutidos para a DANO. Desta forma, a maior sorção em S2 pode ser devida aos maiores teores de argila e de CTC do solo argiloso em comparação com o solo arenoso N1 (Tabela 2.2).

Capítulo 4:
Ivermectina

4.1 A Ivermectina

A ivermectina (IVM) é uma lactona macrocíclica de uso humano e veterinário derivada do grupo das avermectinas (AVM), uma classe de agentes antiparasitários de largo espectro isolada do solo a partir do actinomiceto *Streptomyces avermitilis* (Shoop *et al.*, 1995).

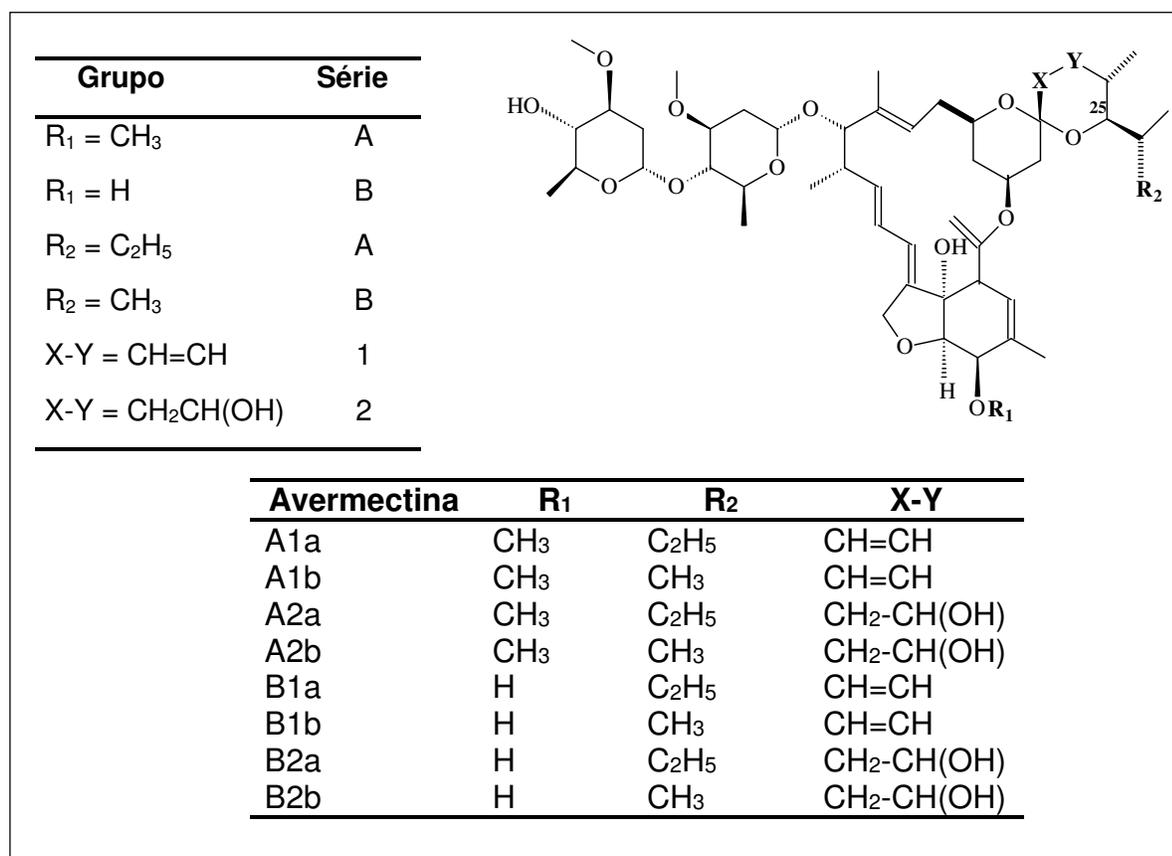


Figura 4.1: Estrutura das avermectinas.

As oito avermectinas naturais são classificadas de acordo com algumas características estruturais. As da série “A” possuem um grupo metoxila em C5 enquanto que as da série “B” possuem um grupo hidroxila nesta posição. As avermectinas da série “1” possuem dupla ligação entre C-22 e C-23, enquanto que os componentes da série “2”

têm uma ligação simples com o grupo hidroxila em C-23. As avermectinas da série “a” têm um grupo sec-butil em C-25 e as da série “b” possuem um substituinte isopropil nesta posição (Shoop *et al.*, 1995).

Dentro deste grupo de fármacos a IVM foi a primeira a ser comercializada, como uma mistura da 22,23 diidroavermectina B1a e da 22,23 diidroavermectina B1b, nos quais a proporção de B1a é maior que 80% (Figura 4.1). As características físico-químicas deste fármaco são apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Principais propriedades físico-químicas da ivermectina B1a.

Propriedade	Valor
Massa molecular	875,10 g mol ⁻¹
Fórmula molecular	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄
Ponto de fusão	155 °C
Solubilidade	4 mg L ⁻¹ em água, solúvel em metanol, clorofórmio e acetato de etila ^a
K _{ow}	1,65 x 10 ³

a) Referência: FDA, 1991.

A mistura das avermectinas B1a e B1b em proporção de 80:20 é comercializada com o nome genérico de abamectina (ABA). A 25-cicloexil-avermectina B₁ é conhecida como doramectina e a substituição do grupo hidroxila pelo acetamino no “C-4” do composto B1a dá origem a eprinomectina (Horvat *et al.*, 2012, Shoop *et al.*, 1995).

Devido a sua potente atividade inseticida e anti-helmíntica a IVM é comercializada mundialmente como um FV para bovinos, peixes e animais domésticos e na medicina humana para tratar oncocercose (Garric *et al.*, 2007; Krogh *et al.*, 2009). No Brasil o

fármaco é comercializado para fins veterinários por mais de 50 empresas em cinco tipos de formulações: solução injetável, pó oral, pasta oral, gel oral e para uso externo (SINDAN, 2014B).

A IVM se liga aos canais de íons glutamato-cloreto acarretando em aumento da permeabilidade dos íons cloreto, hiperpolarização, paralisia e eventualmente a morte de invertebrados que a ingerem ou a absorvem transcultaneamente. O fármaco também afeta o ácido gama-animobutírico relacionado com os canais de íons cloreto localizados no sistema nervoso periférico de invertebrados e no sistema nervoso central de vertebrados (Garric *et al.*, 2007; Geary, 2005; Suarez *et al.*, 2003).

A IVM não metabolizada (39-61 %) é excretada e pode entrar no ambiente via fezes de animais medicados. Apesar das AVM serem degradadas por fotólise estes fármacos são fortemente sorvidos em solos e sedimentos, o que aumenta a possibilidade de prejuízos a organismos do solo (Sun *et al.*, 2005).

Efeitos adversos causados pela IVM a organismos do esterco, artrópodes, anelídeos e planctons são reportados na literatura (Boonstra *et al.*, 2011; Iglesias *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2003; Shipp *et al.*, 2000; Suarez *et al.*, 2003; Thain *et al.*, 1997).

4.2 Parte experimental

4.2.1 Reagentes, solventes, padrões e soluções

A IVM (99,5% B1a) foi adquirida da Sigma-Aldrich (EUA). As soluções estoque do fármaco foram preparadas em metanol grau HPLC (Tedia, EUA) em concentração de 1000 µg mL⁻¹ sendo protegidas de luminosidade e armazenadas no freezer por até 3 meses. As soluções de trabalho foram preparadas para uso imediato em metanol grau HPLC a partir de diluições da solução estoque.

Os reagentes 1-metilimidazol e anidrido trifluoroacético foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

4.2.2 Materiais e equipamentos

Os materiais e equipamentos empregados nos experimentos com a IVM, dentre eles a balança analítica, a mesa de agitação e o sistema cromatográfico são os mesmos descritos em 2.2.2. A coleta e caracterização dos solos é apresentada em 2.2.4.

A separação cromatográfica da IVM foi realizada em uma coluna cromatográfica Purospher Star RP18 4,0 x 55 mm, com tamanho de partículas de 3 μm e uma coluna de guarda Lichrospher 100 RP 18.

4.2.3 Condições cromatográficas

Método 1 – HPLC-DAD

O sistema cromatográfico empregado para a quantificação da IVM foi descrito no item 2.2.2. Uma solução de metanol:água (83:17, v/v) foi usada como fase móvel no modo isocrático em vazão de 0,8 mL min⁻¹. O volume de injeção da amostra foi de 7 μL . A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. A detecção do fármaco no DAD foi realizada em 245 nm.

Método 2 – HPLC-FLD

A determinação da IVM foi realizada no sistema cromatográfico descrito em 2.2.2. Uma solução de ACN:água (93:7, v/v) foi usada como fase móvel no modo isocrático em vazão de 1 mL min⁻¹ com volume de injeção de 10 μL . A detecção foi realizada por FLD com λ de excitação de 365 nm e λ de emissão de 470 nm. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C.

4.3 Métodos

4.3.1 Avaliação da estabilidade da ivermectina em solução

Soluções de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ de IVM foram preparadas em quintuplicata em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram transferidas para frascos de vidro que foram mantidos sob agitação a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1788 g em uma mesa de agitação horizontal por até 72 horas. Após determinados intervalos de tempo alíquotas foram coletadas e a concentração de IVM foi determinada em cada solução de acordo com as condições cromatográficas apresentadas no item 4.2.3 (método 1).

4.3.2 Otimização da razão solo/solução

Amostras de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g dos solos N1 e S2 foram pesadas em duplicata em frascos de vidro com formato de tubos Falcon ®. Os frascos receberam 20 mL de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e permaneceram sob agitação a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1788 g por 24 horas. Ao término deste tempo as misturas foram fortificadas com $100 \mu\text{L}$ da solução estoque de IVM $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os frascos foram novamente mantidos sob agitação por mais 24 horas, conforme as condições anteriormente empregadas. Em seguida os frascos foram centrifugados (15 min a 1788 g) e o extrato aquoso foi coletado e transferido para um segundo recipiente de vidro. O extrato aquoso foi então submetido a um processo de extração líquido-líquido. O extrato recebeu 4 mL de clorofórmio, o tubo foi lacrado e a mistura foi agitada por 1 min no vortex. A fase aquosa (fase superior) foi coletada e descartada. A fase orgânica foi evaporada até *secura*, ressuspensa com 0,5 mL de metanol sendo filtrada em filtro de seringa de $0,22 \mu\text{m}$. A análise cromatográfica foi realizada de acordo com o método 1 (4.2.3).

4.3.3 Avaliação de cinética de sorção da ivermectina nos solos

Amostras de 0,5 g dos solos N1 e S2 (pesadas em duplicata e para cada intervalo de tempo) foram transferidas para frascos de vidro com formato de tubos Falcon. Em seguida os tubos receberam 20 mL de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e permaneceram sob agitação a 25 °C e 1788 g por 24 horas. Ao término deste tempo as misturas foram fortificadas com 100 µL da solução estoque de IVM 1 mg mL⁻¹. Os frascos foram novamente mantidos sob agitação por mais 96 horas, conforme as condições anteriormente empregadas. Durante este período de tempo dois frascos de cada solo foram tomados após 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas de agitação. Os frascos foram centrifugados (15 min a 1788 g) e o extrato aquoso coletado foi processado de acordo com as condições descritas em 4.3.2. A determinação da IVM em solução aquosa de solo foi realizada de acordo com o método 1 (4.2.3).

4.3.4 Otimização das condições de extração de ivermectina do extrato aquoso dos solos N1 e S2

Amostras dos solos N1 e S2 foram agitadas com CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ em razão de solo/solução de 1:40 (m/v) a 25 °C e 1788 g por 24 horas. Ao término deste tempo as amostras foram centrifugadas e o extrato aquoso foi coletado, filtrado e armazenado. Os extratos foram fortificados em triplicata com IVM em concentração final de 2,5 µg mL⁻¹, sendo posteriormente submetidos à extração líquido-líquido de acordo com os procedimentos apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Procedimentos avaliados para a extração de ivermectina do extrato aquoso dos solos N1 e S2.

Procedimento	Extração
1	Agitação no vortex por 1 min com 2 mL de clorofórmio
2	Agitação no vortex por 1 min com 4 mL de clorofórmio
3	Agitação no vortex por 1 min com 4 mL de acetato de etila

. Após a extração a fase aquosa (fase superior) foi coletada e descartada. A fase orgânica foi evaporada até secura, ressuspensa em 0,5 mL de metanol e analisada de acordo com as condições cromatográficas descritas em 4.2.3 (método 1).

4.3.5 Otimização das condições de extração de ivermectina nos solos

Amostras de 0,5 g dos solos N1 e S2 foram pesadas em triplicata em frascos de vidro com formato de tubos Falcon ® e foram fortificadas com 50 µL da solução estoque de IVM 1000 µg mL⁻¹. Os frascos foram armazenados por 24 h sendo protegidos de luminosidade. Após este período a IVM foi extraída dos solos por meio dos procedimentos descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Procedimentos avaliados para a extração de ivermectina dos solos.

Procedimento	Extração
1	Agitação no vortex por 4 minutos com 5 mL de metanol
2	Agitação no vortex em dois ciclos de 4 minutos com 5 mL de acetonitrila cada
3	Agitação no vortex em dois ciclos de 4 minutos com 5 mL de metanol cada
4	Extração por ultrassom em 2 ciclos de 20 minutos com 5 mL de metanol cada
5	Extração por ultrassom em 2 ciclos de 10 minutos com 5 mL de metanol cada

Após a extração os frascos foram centrifugados (15 min, 1788 *g*) e a fase orgânica foi coletada e transferida para um segundo frasco de vidro. A parede dos frascos contendo os solos foi cuidadosamente lavada com 2 mL de metanol e esta alíquota foi adicionada à fase orgânica contida no segundo frasco. O solvente foi então evaporado até *secura*, ressuspenso em 0,5 mL de metanol, filtrado em filtro de seringa de 0,22 μm e analisado de acordo com as condições cromatográficas descritas em 4.2.3 (método 1).

4.3.6 Determinação do balanço de massa da ivermectina nos solos

Amostras de 0,5 g dos solos N1 e S2 foram pesadas em quintuplicata em frascos de vidro com formato de tubos Falcon ®. As amostras receberam 20 mL de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} e foram agitadas por 24 h a 25 °C e 1788 *g*. Ao término deste tempo as amostras foram fortificadas com 50 μL da solução estoque de IVM 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram então agitadas por mais 24 h. Em seguida os frascos foram centrifugados por 15 min a

1788 g. A fase aquosa e o solo foram cuidadosamente recolhidos e transferidos para dois recipientes. O extrato aquoso foi processado, de acordo com o procedimento descrito em 4.3.2, e analisado por meio das condições cromatográficas descritas em 4.2.3 (Método 1). A IVM foi extraída dos solos empregando-se o Procedimento 4 (Tabela 3.3) e a quantificação foi realizada mediante emprego das condições cromatográficas descritas em 4.2.3 (Método 1).

4.3.7 Validação do método para a determinação da ivermectina no extrato aquoso dos solos N1 e S2

Soluções de IVM em concentração de 0,25; 30; 60; 90 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas em triplicata em acetonitrila a partir de diluições da solução estoque do fármaco de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Uma alíquota de 500 μL foi retirada de cada solução e transferida para um frasco de vidro. Em seguida as alíquotas receberam 250 μL de 1-metilimidazol e 250 μL de anidrido trifluoroacético (ambos preparados em acetonitrila em proporção 1:1 (v/v)). A mistura foi homogeneizada e analisada de acordo com as condições cromatográficas descritas em 4.2.3 (método 2). A precisão intra-dias do método foi avaliada após 24 h de equilíbrio de misturas de solo/solução 1:40 (m/v) contendo 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do fármaco em CaCl_2 0,01 mol L^{-1} . Após o período de equilíbrio os frascos contendo as misturas foram centrifugados (15 min, 1788 g) e o extrato aquoso coletado foi processado de acordo com o procedimento descrito em 4.3.2. Entretanto, a ressuspensão foi realizada por meio da adição de 250 μL de 1-metilimidazol e 250 μL de anidrido trifluoroacético. A precisão inter-dias foi avaliada em triplicata em três dias diferentes, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. Os valores de LD e de LQ foram determinados através de diluições sucessivas da solução de 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ até que a razão sinal ruído fosse de 3 e 10, respectivamente.

4.3.8 Validação do método de determinação da ivermectina nos solos N1 e S2

Cinco gramas dos solos N1 e S2 foram pesados em triplicata em frascos de vidro com formato de tubos Falcon ®. As amostras receberam 50; 125; 250; 375; 500 e 625 µL da solução estoque de IVM na concentração de 1000 µg mL⁻¹. As amostras foram homogeneizadas, protegidas de luminosidade e permaneceram em repouso por 24 h. Após este período as amostras receberam 10 mL de metanol e foram submetidas à extração assistida por ultrassom por 20 min. Os frascos foram centrifugados por 15 min a 1788 g. O sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro de 0,22 µm e transferido para um segundo frasco. O procedimento de extração foi novamente repetido. Ao término do segundo ciclo, o extrato orgânico dos solos foi evaporado até secura e ressuspenso com 200 µL de 1-metilimidazol e 200 µL de anidrido trifluoroacético (ambos preparados em acetonitrila em proporção de 1:1, v/v). As soluções finais foram então analisadas de acordo com as condições cromatográficas descritas em 4.2.3 (método 2). A precisão intra-dias do método foi avaliada em quintuplicata através da recuperação média de IVM em amostras de 5 g de solos fortificados com 125 e 500 ng do fármaco. As análises foram realizadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. A precisão inter-dias foi avaliada em triplicata em dois dias diferentes, pelo mesmo analista, mesmo equipamento e nos mesmos níveis de fortificação.

4.3.9 Construção das isotermas de sorção e dessorção da ivermectina nos solos N1 e S2

Amostras de 0,5 g dos solos N1 e S2 foram pesadas em triplicata em frascos de vidro com formato de tubo Falcon ®. As amostras receberam 20 mL de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ e foram mantidas sob agitação por 24 horas a 25 °C e 1788 g. Em seguida, as amostras receberam 10, 25, 50, 75 e 100 µL da solução estoque de IVM de 1000 µg mL⁻¹. As

misturas permaneceram sob agitação por mais 24 horas. Após este período os frascos foram pesados, centrifugados (1788 *g* por 15 min) e a fase sobrenadante foi processada de acordo com as condições descritas em 4.3.2. A ressuspensão dos extratos foi realizada por meio da adição de 250 μL de 1-metilimidazol e 250 μL de anidrido trifluoroacético. A análise foi realizada conforme o método cromatográfico descrito em 4.2.3 (método 2). Para os estudos de dessorção a fase aquosa foi repostada por CaCl_2 0,01 mol L^{-1} sem a adição do fármaco e os frascos foram agitados por mais 72 h. Após este tempo, os frascos foram centrifugados (1788 *g* por 15 min), processados e o sobrenadante foi novamente analisado.

4.3.10 Estudo de lixiviação de ivermectina nos solos N1 e S2

Duas colunas de vidro, com 25 cm de comprimento e 4 cm de diâmetro interno, foram respectivamente preenchidas com 238 e 215 g dos solos N1 e S2. Os solos foram saturados com 400 mL de uma solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} com auxílio de um funil de separação. Após a drenagem do excesso de líquido dos solos 0,5 mL de uma solução de IVM de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (preparada em acetonitrila) foram transferidos para o topo da coluna de solo. Após um tempo de espera de 24 h uma precipitação pluviométrica foi simulada durante 2 horas e meia por meio da percolação de 250 mL de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} . O eluato da coluna foi coletado em alíquotas de 20 mL. Essas frações foram posteriormente analisadas. Ao final do processo, o solo foi retirado da coluna e seccionado em porções de 1 em 1 centímetro. As alíquotas do eluato foram processadas de acordo com o procedimento descrito em 4.3.2. A extração da IVM dos solos foi realizada por ultrassom em 2 ciclos de 20 minutos com 10 mL de metanol cada. A análise do eluato e dos solos foi realizada por cromatografia de acordo com o método 2 (item 4.2.3). A ressuspensão do fármaco foi realizada com a adição de 250 μL de 1-metilimidazol e 250 μL de anidrido trifluoroacético (preparados em acetonitrila em razão de 1:1, v/v).

4.3.11 Estudo cinético de dissipação da ivermectina nos solos

Os solos N1 e S2 foram coletados de caixas lisimétricas localizadas na Embrapa-Jaguariúna. Os solos foram secos ao ar livre, peneirados, protegidos de luminosidade e armazenados na geladeira a 15° C por 50 dias. Após este período 32 amostras de 50 g dos solos foram pesadas para frascos erlenmeyer. Dezesesseis frascos foram colocados em uma câmara de estabilidade mantida a 19,3 °C e 78% de umidade. A boca dos outros 16 frascos foi coberta por papel alumínio perfurado e os frascos foram expostos a luz solar, mas protegidos de chuva. Após 9 dias o solo N1 foi fortificado com 5 mL de uma solução de IVM 1 µg mL⁻¹ e o solo S2 com 10 mL de uma solução de IVM 0,5 µg mL⁻¹. Ambas as soluções foram preparadas em água. No mesmo dia foram coletadas alíquotas de 5 g dos solos em triplicata. Em seguida, a extração da IVM dos solos foi realizada por ultrassom em 2 ciclos de 20 minutos com 10 mL de metanol cada. As amostras de solo foram novamente analisadas após 5, 9, 13, 18, 30, 45 e 60 dias. Para cada intervalo de tempo a coleta das amostras foi realizada em um frasco distinto. Semanalmente os frascos foram pesados e a perda de umidade foi compensada com adição de água deionizada aos solos. A temperatura e a umidade relativa do ar foram monitoradas durante todo o experimento. No caso da condição não controlada isto foi feito com o auxílio de um termômetro submerso em um béquer com água colocado no local da coleta dos solos. A umidade relativa do ar foi obtida através de consulta no site do Instituto Nacional de Meteorologia (www.inmet.gov.br).

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Estudos iniciais

Diferentemente do ocorrido com a DANO e a OTC os experimentos realizados com a IVM foram feitos apenas no meio sugerido pela OECD 106 (CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, sem ajuste de pH), já que o fármaco não se apresenta ionizado no pH natural dos solos escolhidos ($\text{pH} \approx 5$).

Os resultados do estudo de estabilidade da IVM em solução são apresentados na Figura 4.2. Cabe destacar que esses estudos iniciais foram realizados em frascos de vidro.

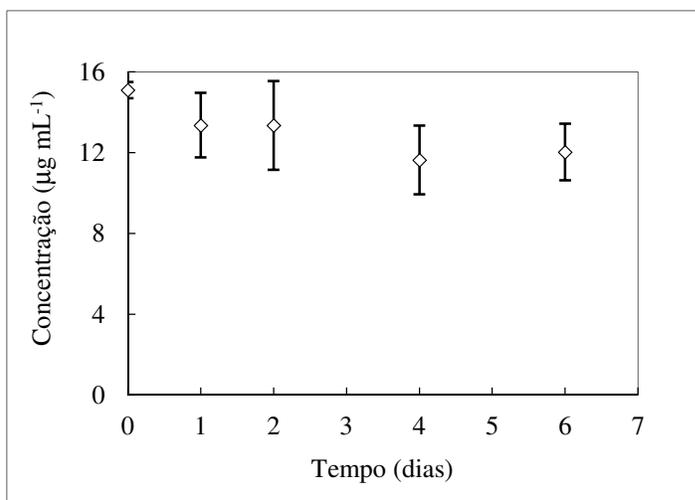


Figura 4.2: Concentração média ($n = 5$) de ivermectina $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparada em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo.

De acordo com a Figura 4.2 é possível verificar que a IVM exibiu decréscimo de sua concentração, sendo que ao término do sexto dia de experimento foi observada diferença significativa ($p = 0,05$) em relação à concentração média inicial do fármaco. Contudo, esta ocorrência é justificada pela adsorção da molécula à parede dos recipientes, fato já observado por outros autores (Krogh *et al.*, 2008) e depois confirmado em nosso

laboratório. Através de experimentos também realizados no Grupo Paracelsus foi possível constatar que a inserção de um batoque de metal na boca do recipiente permitiu a redução da sorção da molécula à tampa de polipropileno. Desta forma, todos os estudos envolvendo a IVM foram realizados em frascos de vidro no formato de tubo Falcon com batoque de metal, afim de que a adsorção do fármaco aos recipientes fosse minimizada.

Os trabalhos descritos na literatura mencionam que a adsorção da IVM aos frascos de vidro tornou-se desprezível quando o fármaco foi mantido em contato com os solos (Guber *et al.*, 1990; Krogh *et al.*, 2008). Entretanto, até este momento nenhum estudo quantitativo foi realizado afim de confirmar esta hipótese. Por conta disto, a adsorção da IVM aos frascos de vidro foi avaliada na presença de solo através de um estudo de balanço de massa, o qual será posteriormente discutido no texto.

No estudo realizado para estabelecer a relação ótima entre a massa de solo e o volume de solução foram avaliadas as razões de 1:5; 1:10; 1:20 e 1:40 m/v. Conforme pode ser visto na Figura 4.3 houve diminuição na porcentagem de IVM sorvida à medida que a razão de solo/solução foi reduzida. A razão de 1:40 (0,5 g de solo em 20 mL de solução) foi escolhida para a continuidade dos estudos, já que neste caso a porcentagem sorvida nos solos está acima do valor mínimo de 20% estabelecido pela OECD 106, além do fato da diferença de sorção da IVM nos solos ser maior nesta condição.

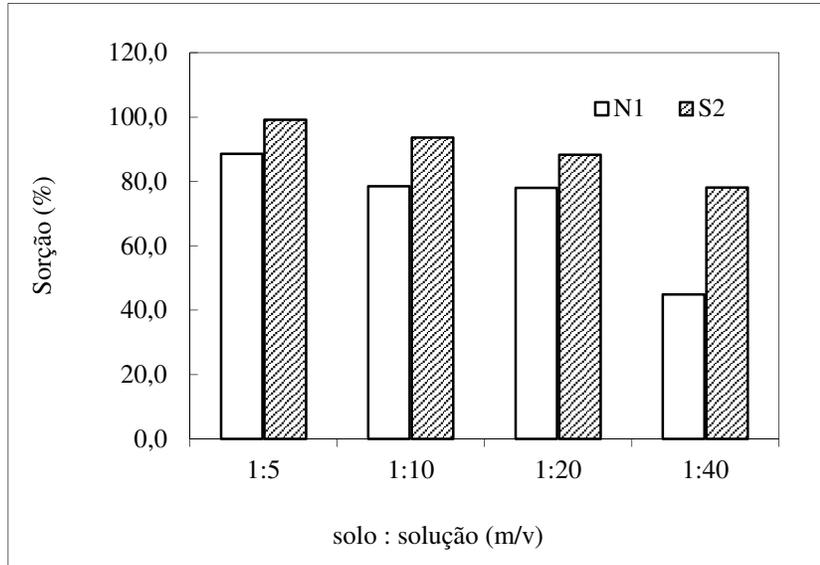


Figura 4.3: Porcentagem média (n = 2) de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 em função da razão de solo/solução.

As curvas cinéticas de sorção da IVM indicam que o tempo de 24 horas (1440 minutos) foi suficiente para o estabelecimento do equilíbrio aparente de sorção do fármaco nos solos N1 e S2 (Figura 4.4). Os dados apresentados na Figura 4.4 foram ajustados aos modelos de PPO, PSO e de Elovich para o cálculo dos parâmetros cinéticos de sorção da IVM (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7).

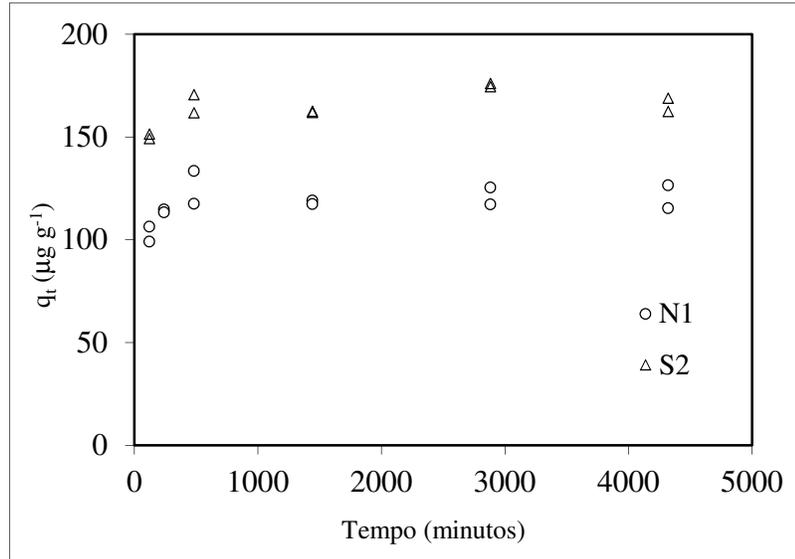


Figura 4.4: Curvas de concentração de ivermectina sorvida no tempo t (q_t) em função do tempo para os solos N1 e S2.

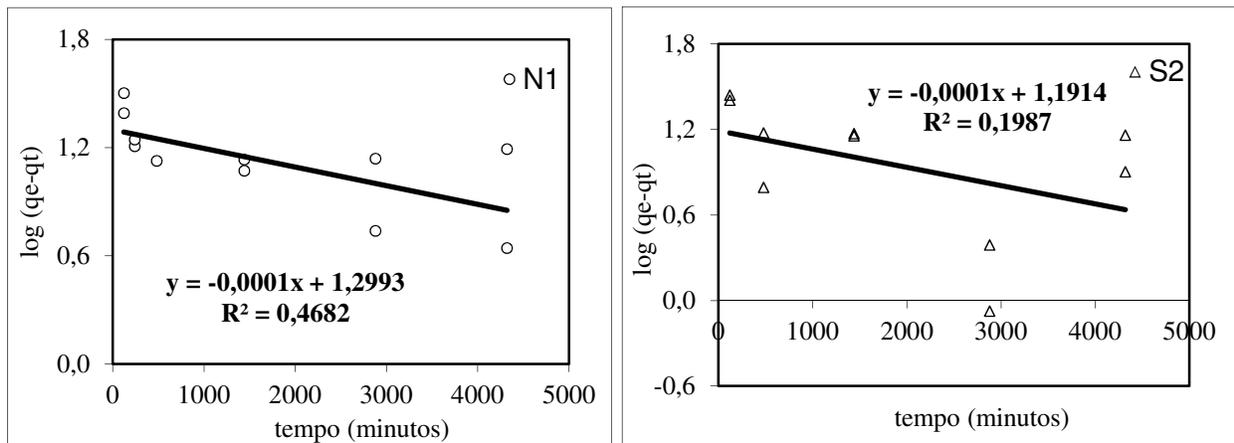


Figura 4.5: Ajuste dos dados de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 ao modelo de pseudo-primeira-ordem.

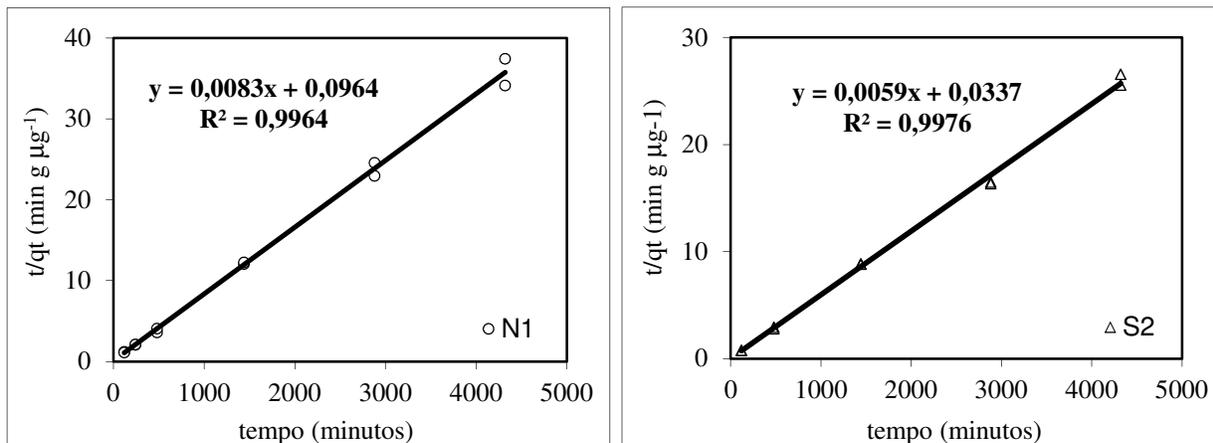


Figura 4.6: Ajuste dos dados de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 ao modelo de pseudo-segunda-ordem.

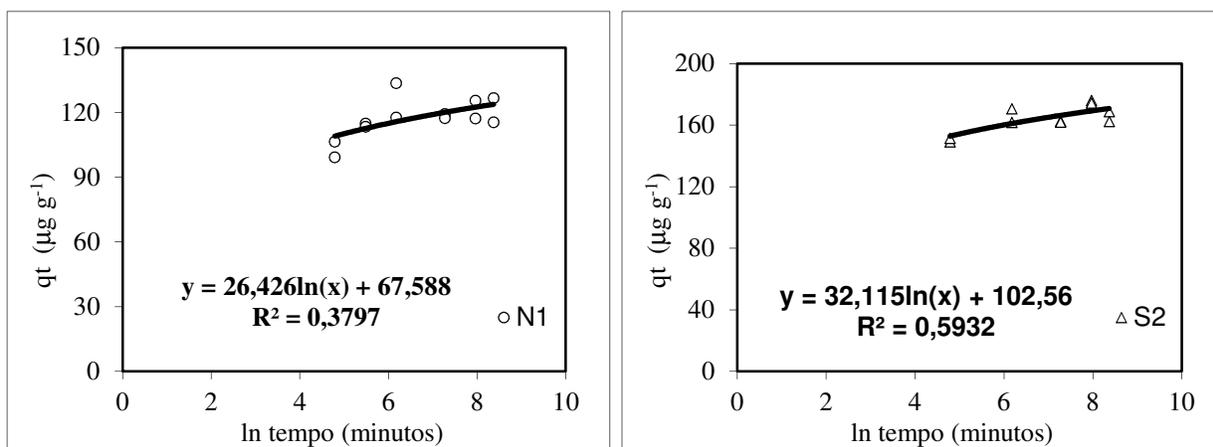


Figura 4.7: Ajuste dos dados de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 ao modelo de Elovich.

De acordo com os dados apresentados nas Figuras 4.5, 4.6 e 4.7 é possível verificar que os dados experimentais ajustaram-se melhor ao modelo de PSO ($r^2 > 0,99$). Este ajuste (linha tracejada) está apresentado na Figura 4.8.

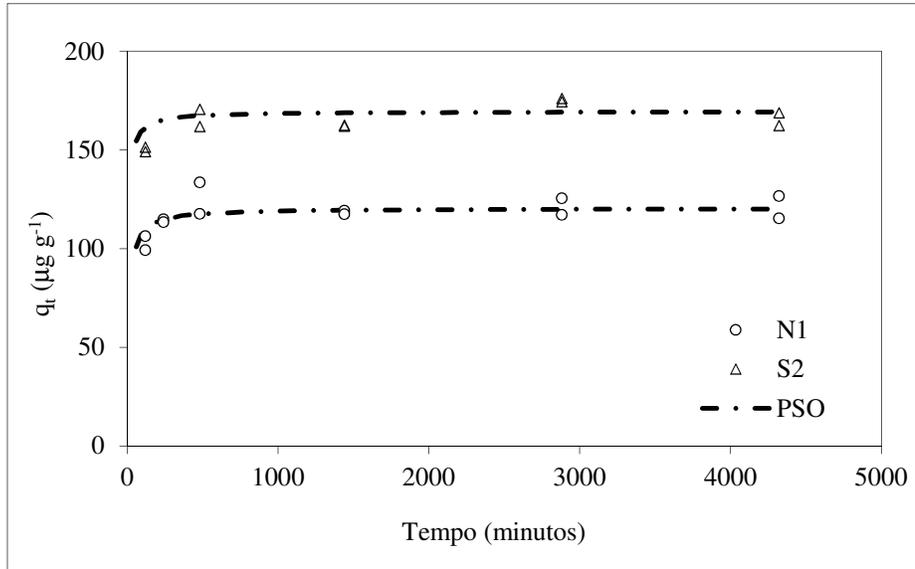


Figura 4.8: Curvas de concentração de ivermectina sorvida no tempo t (q_t) em função do tempo ajustadas ao modelo de pseudo-segunda-ordem.

Os parâmetros cinéticos de sorção, calculados a partir do ajuste das curvas ao modelo de PSO são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Parâmetros cinéticos de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2 obtidos através do ajuste ao modelo de pseudo-segunda-ordem.

Solo	Parâmetro		
	q_e ($\mu\text{g g}^{-1}$)	k_2 ($\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	r
N1	120,5	$7,15 \times 10^{-4}$	0,9981
S2	169,5	$1,03 \times 10^{-3}$	0,9987

onde k_2 é a constante de pseudo-segunda-ordem.

A partir da Tabela 4.4 é possível verificar que os valores teóricos de q_e (120,5 e 169,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para os solos N1 e S2, respectivamente) estão de acordo com os resultados experimentais apresentados na Figura 4.8. Através dos valores de k_2 pode-se constatar que a sorção da IVM foi mais rápida no solo S2, mesmo comportamento observado para a DANO e a OTC.

4.4.2 Desenvolvimento dos procedimentos de extração da ivermectina do extrato aquoso e dos solos N1 e S2

Devido à baixa solubilidade da IVM em CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ (em torno de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi necessário usar concentrações na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ para a fortificação dos solos. Desta forma, foi preciso avaliar procedimentos de pré-concentração do fármaco, uma vez que a quantificação do mesmo seria realizada de forma indireta, ou seja, na solução aquosa que ficou em contato com os solos.

As soluções do solo para este estudo foram obtidas mediante agitação das matrizes N1 e S2 com CaCl_2 0,01 mol L⁻¹, adotando-se a razão de solo/solução de 1:40 (m/v). Para

a pré-concentração da IVM foi empregada a extração líquido-líquido (ELL), usando, para tanto, dois solventes: clorofórmio (2 mL e 4 mL) e acetato de etila (4 mL). As eficiências de extração do fármaco, calculadas a partir da recuperação em 20 mL de solução de solo fortificado, são apresentadas na Figura 4.9.

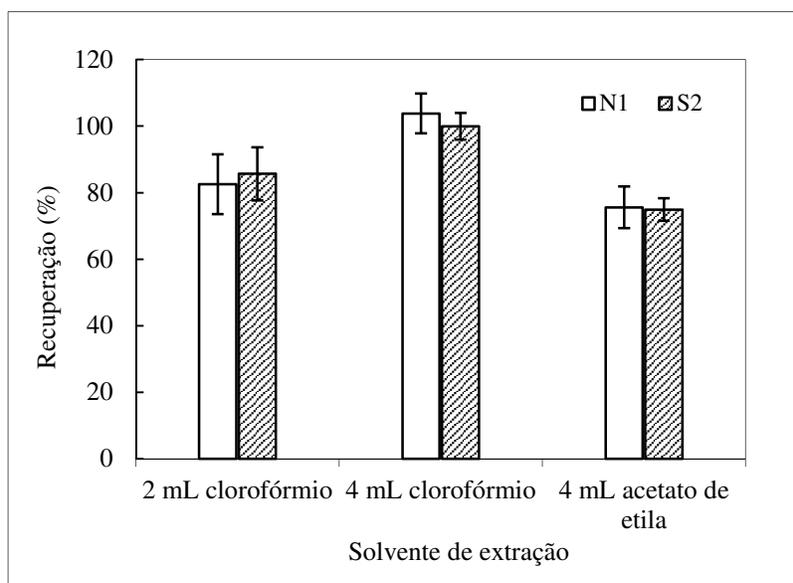


Figura 4.9: Recuperações médias ($n = 3$) de ivermectina $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ no extrato aquoso dos solos N1 e S2 (1:40 m/v em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$).

A partir da Figura 4.9 é possível observar que os melhores resultados de recuperação foram obtidos usando um volume de 4 mL de clorofórmio como solvente extrator para 20 mL de solução de solo e, por isto, esta condição foi adotada para a extração do fármaco, a partir do extrato aquoso dos solos, anteriormente à determinação cromatográfica do mesmo.

Também foi avaliado o uso da extração líquido-sólido (ELS) para extrair a IVM diretamente dos solos. Esse procedimento seria necessário para a realização do estudo posterior de balanço de massa. Para tanto, 0,5 g dos solos N1 e S2 foram inicialmente fortificados com IVM em concentração de $100 \mu\text{g g}^{-1}$. Após 24 horas o fármaco foi extraído por vortex ou ultrassom em um ou dois ciclos com 5 mL de solvente. As eficiências de

extração, expressas como porcentagem de recuperação, obtidas em cada caso são apresentadas na Figura 4.10.

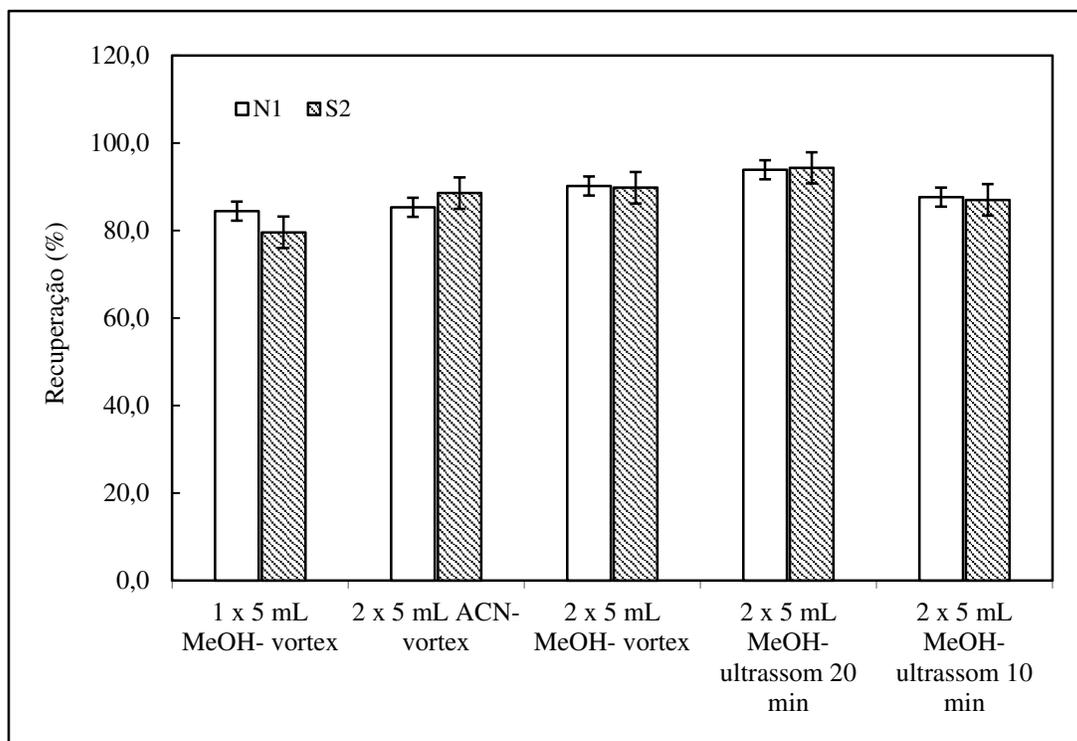


Figura 4.10: Eficiência de extração (recuperação média, %, n = 3) de ivermectina nos solos N1 e S2 através de extração por solvente e assistida por vortex ou ultrassom.

Os resultados apontam que tanto o metanol como a acetonitrila bem como o uso do vortex e do ultrassom foram eficientes na extração da IVM nos solos avaliados. O emprego de dois ciclos de extração possibilitou melhores taxas de recuperação, corroborando com os fundamentos teóricos da técnica de ELS.

Diante dos resultados apresentados na Figura 4.10 a extração assistida por ultrassom, em 2 ciclos de 20 minutos com 5 mL de metanol cada, foi adotada como procedimento para extração de IVM nos solos N1 e S2. Nas condições do laboratório o uso do ultrassom foi mais vantajoso em relação ao emprego do vortex, já que este procedimento permitiu a extração simultânea de várias amostras. Além disto, o ultrassom

possibilitou menor contato manual com as amostras e boa recuperação da IVM por meio de um aparato simples e de fácil operação, dispensando o uso de técnicas mais caras como a extração por micro-ondas ou a extração líquida pressurizada.

4.4.3 Balanço de massa da ivermectina nos solos N1 e S2

A adsorção da IVM à parede de recipientes de vidro foi verificada durante a realização do estudo de estabilidade em solução aquosa (4.4.1) bem como nos trabalhos anteriormente realizados. Contudo, mesmo sem apresentar nenhum resultado quantitativo, Mushtaq e colaboradores (1996) e Gruber e colaboradores (1990) mencionam que o efeito tornou-se desprezível quando o fármaco foi mantido em presença de solo. Por conta disto, este fenômeno foi avaliado de forma mais detalhada.

Para que esta hipótese fosse averiguada um estudo de sorção foi realizado empregando as condições de massa de solo, volume de solução e tempo de agitação idênticos àqueles otimizados nos estudos preliminares. Após o período de equilíbrio a IVM foi determinada na solução e no solo para fechar um balanço de massa. Em ambos os casos a extração do fármaco foi realizada de acordo com os procedimentos discutidos em 4.4.2. Uma vez que foi verificado que a IVM adsorve fortemente em frascos de polipropileno esses estudos foram realizados em frascos de vidro.

As recuperações médias ($n = 5$) da IVM no solo e na solução são mostradas na Figura 4.11.

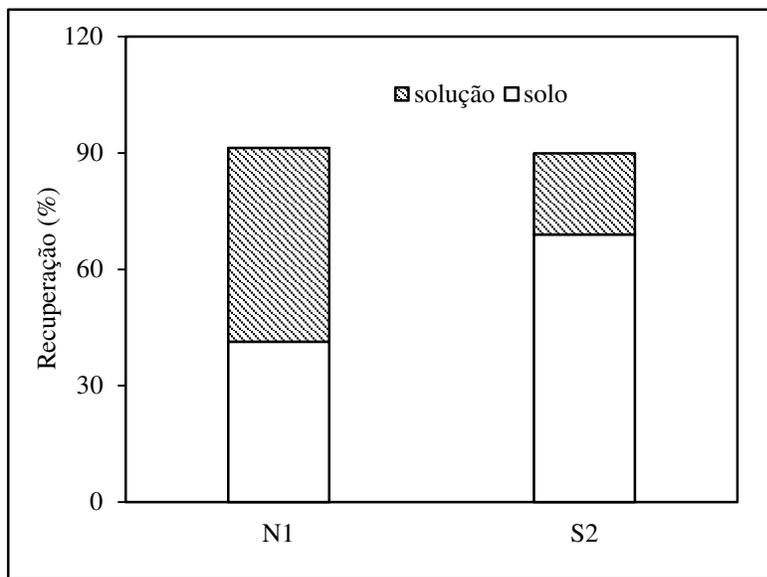


Figura 4.11: Balanço de massa para a IVM nos solos N1 e S2.

Conforme pode ser visto na Figura 4.11 houve cerca de 90% de recuperação da quantidade total de IVM adicionada às misturas de solo/solução. O fármaco não foi detectado no solvente de lavagem dos frascos de vidro utilizados durante a etapa de sorção. Com isto, pode-se concluir que a adsorção de IVM nos recipientes, verificada durante o estudo de estabilidade do fármaco (Figura 4.2), pode ser desprezada quando este é mantido na presença dos solos e frascos de vidro são empregados.

4.4.4 Validação do método para a determinação da ivermectina no extrato aquoso dos solos N1 e S2

Nos estudos preliminares anteriormente descritos a determinação da IVM foi feita por HPLC-DAD (método 1). Entretanto, devido à necessidade de redução dos valores de LQ e de LD um segundo método, empregando a HPLC com detecção por fluorescência,

foi adotada para a construção das isothermas de sorção/dessorção e para a realização dos estudos subsequentes (dissipação e lixiviação).

Uma vez que a IVM não possui fluorescência nativa foi preciso derivatizar a molécula anteriormente à sua determinação por HPLC-FLD, mediante adição de 1-metilimidazol e anidrido trifluoroacético, de acordo com o método descrito na literatura (Montigy *et al.*, 1990).

A seletividade do método foi verificada mediante comparação dos cromatogramas dos extratos brancos dos solos e de uma solução do padrão da IVM derivatizada (Figura 4.12).

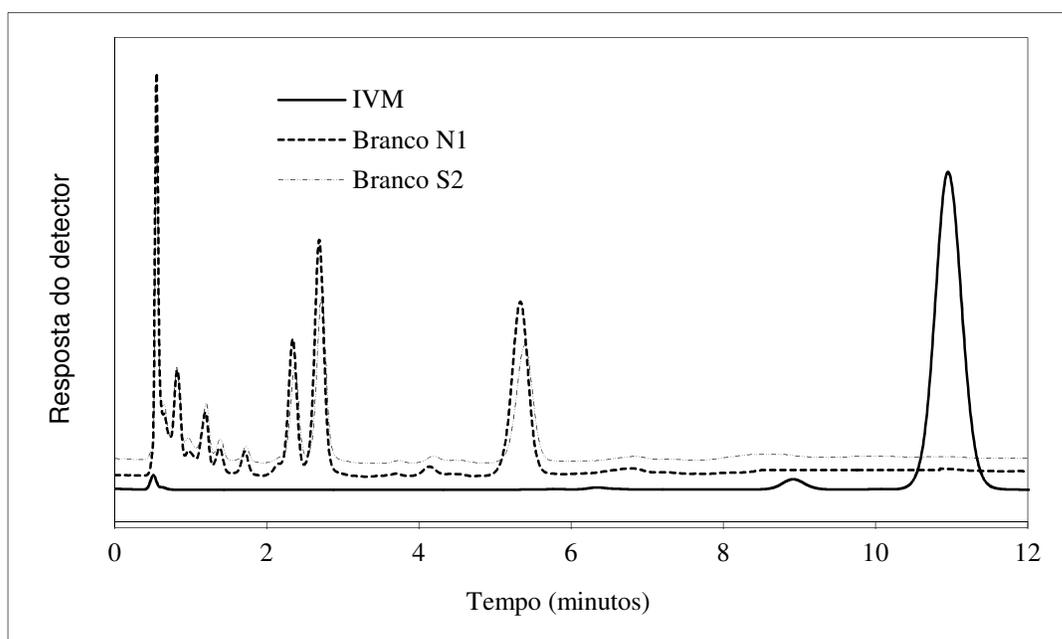


Figura 4.12: Cromatogramas dos extratos brancos dos solos N1 e S2 (1:40, m/v em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e do padrão de IVM derivatizada em concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Coluna: Purospher Star RP18 $4,0 \times 55 \text{ mm}$ ($3 \mu\text{m}$) e coluna de guarda Lichrospher 100 RP 18. Fase móvel: ACN:H₂O (93:7,v/v) no modo isocrático em vazão de 1 mL min^{-1} . Volume de injeção: $10 \mu\text{L}$. Detecção: FLD com λ de excitação de 365 nm e λ de emissão de 470 nm . Temperatura: $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para validar o método de determinação cromatográfica da IVM a curva analítica (Figura 4.13) foi construída em solvente, uma vez que não houve diferença de sensibilidade em relação às curvas construídas no extrato dos solos N1 e S2 (produzidos em razão solo/solução de 1:40, m/v).

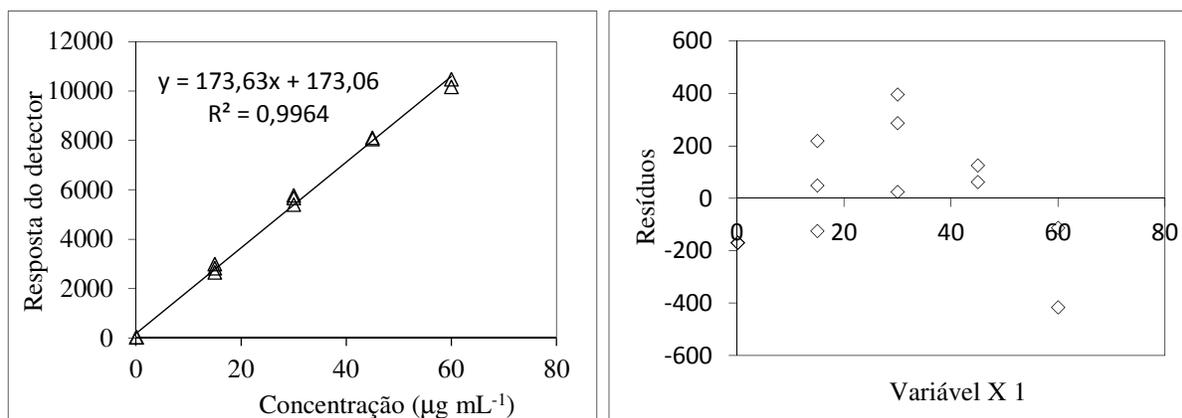


Figura 4.13: Curva analítica e gráfico de resíduos construídos através da derivatização da ivermectina com 1-metilimidazol e anidrido trifluoroacético.

Conforme pode ser visto na Figura 4.13 a curva analítica apresentou linearidade adequada no intervalo de concentração adotado ($r = 0,9981$). Os valores de LQ e de LD para o método desenvolvido foram de 0,12 e 0,05 µg mL⁻¹. As precisões intra-dias e inter-dias, expressas por meio dos valores de RSD, foram de 2,0 e 3,5%, respectivamente.

4.4.5 Validação do método para a determinação da ivermectina nos solos N1 e S2

A validação do método de determinação cromatográfica da IVM nos solos foi necessária, uma vez ele seria empregado para avaliar a lixiviação do fármaco em coluna de solo, assim como estudar sua cinética de degradação. Para a validação do método as amostras de solo foram fortificadas com IVM conforme descrito em 4.3.8. A extração do fármaco foi realizada por ultrassom empregando metanol como solvente extrator. A seletividade do método cromatográfico foi confirmada através da comparação dos

cromatogramas dos extratos brancos dos solos após a etapa de extração e de uma solução do padrão de IVM (Figura 4.14). Nas duas situações a IVM foi derivatizada anteriormente à análise cromatográfica.

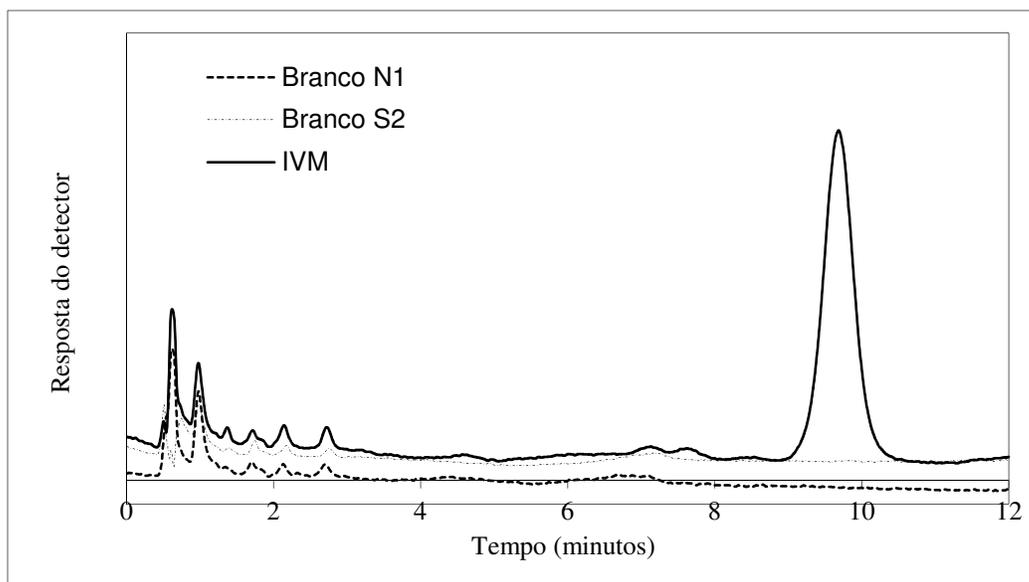


Figura 4.14: Cromatogramas dos extratos brancos dos solos N1 e S2 (extração por ultrassom empregando 2 ciclos de 20 minutos com 10 mL de metanol cada) e do padrão de IVM derivatizada em concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Coluna: Purospher Star RP18 4,0 x 55 mm ($3 \mu\text{m}$) e coluna de guarda Lichrospher 100 RP 18. Fase móvel: ACN:H₂O (93:7,v/v) no modo isocrático em vazão de 1 mL min^{-1} . Volume de injeção: $10 \mu\text{L}$. Detecção: FLD com λ de excitação de 365 nm e λ de emissão de 470 nm. Temperatura: $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

As curvas analíticas (Figuras 4.15) foram construídas por meio de fortificação da matriz solo em triplicata. A fortificação do solo foi realizada 24 horas antes do início do preparo de amostras, a fim de garantir a incorporação do fármaco na matriz. Para tanto, foram empregadas 5 g de solo, já que esta seria a massa utilizada para amostragem durante a realização do estudo cinético de degradação. Para o cálculo da recuperação as

curvas analíticas foram construídas no extrato de solvente orgânico dos solos, obtido após etapa de extração.

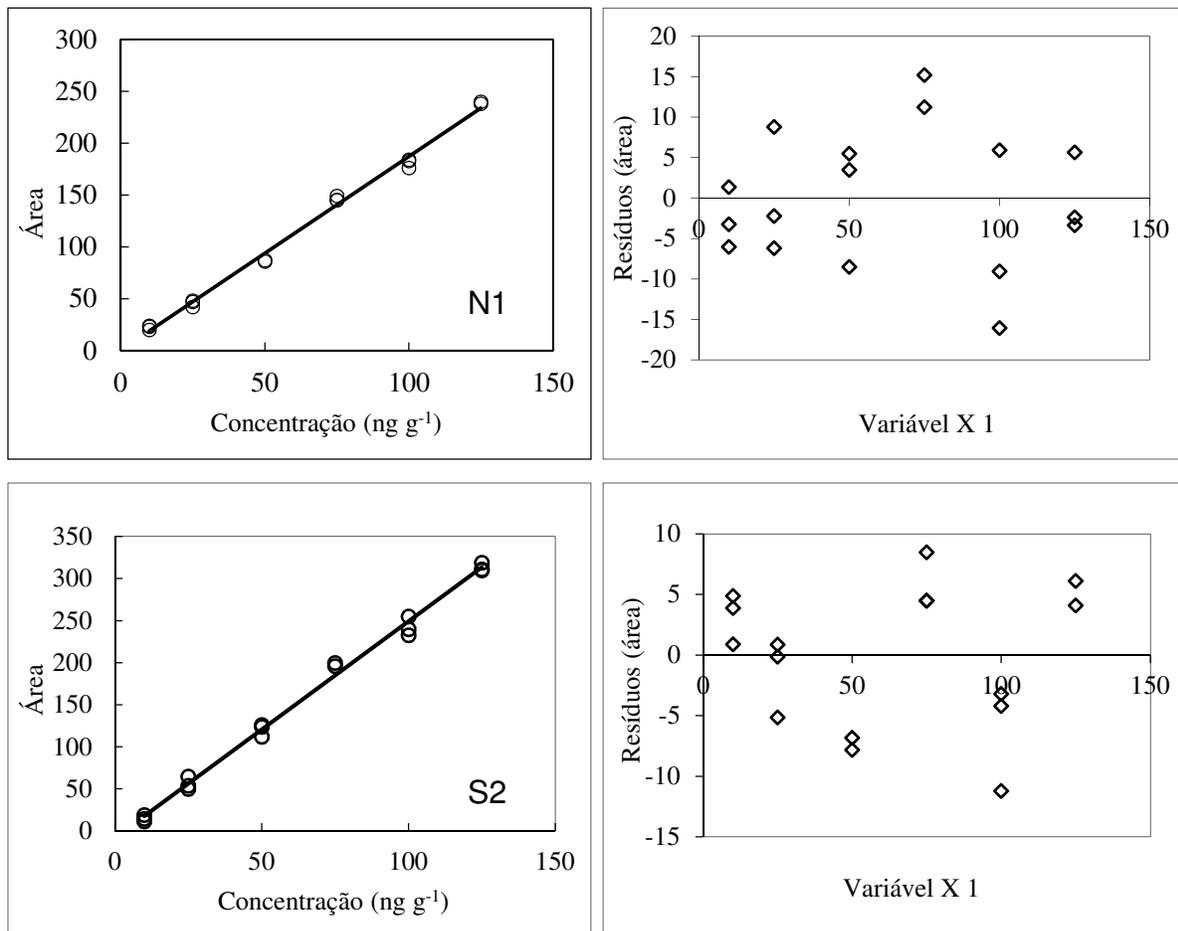


Figura 4.15: Curvas analíticas e gráficos de resíduos construídos através da fortificação de 5 g de solo com ivermectina e extração por ultrassom em 2 ciclos de 20 minutos com 10 mL de metanol cada.

Os gráficos de resíduos apresentados na Figura 4.15 (referentes às curvas analíticas construídas por meio de fortificação dos solos) mostram dispersão aleatória dos resultados e não evidenciam tendência. Os parâmetros de validação são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Parâmetros de validação para a determinação cromatográfica da ivermectina nos solos N1 e S2.

Solo	Sensibilidade u.f. / ng g ⁻¹	r	LQ (ng g ⁻¹)	LD (ng g ⁻¹)	Precisão (DPR, %)	
					Intra-dias	Inter-dias
N1	1,8676	0,9971	10	5	17 ^a	19 ^a
					13 ^b	9 ^b
S2	2,5715	0,9972	10	5	1 ^a	22 ^a
					1 ^b	5 ^b

a) determinado a partir de uma concentração de 25 ng g⁻¹, b) determinado a partir de uma concentração de 100 ng g⁻¹, u. f. : unidade de fluorescência

Para avaliar a recuperação da IVM os solos foram fortificados em concentração de 100 ng g⁻¹, já que esta seria a concentração inicial para a realização do estudo cinético de degradação do fármaco. As recuperações médias (n = 5) foram de 79 ± 2% para de solo N1 e de 82 ± 5% para o solo S2.

4.4.6 Isotermas de sorção e dessorção da ivermectina nos solos N1 e S2

As isotermas de sorção da IVM (Figura 4.16) foram construídas em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ em razão de 1:40 (m/v) com período de agitação de 24 horas. A etapa de dessorção foi realizada em 72 horas, já que este foi o tempo verificado para o alcance do equilíbrio entre as fases.

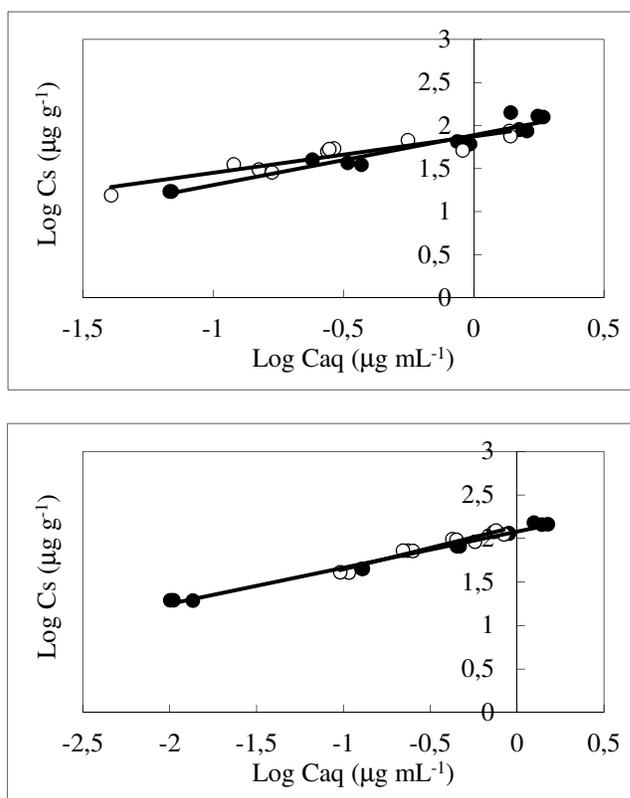


Figura 4.16: Isotermas de sorção (círculo preto) e dessorção (círculo branco) da ivermectina nos solos N1 e S2 ajustadas à forma logarítmica da equação de Freundlich.

Os coeficientes de sorção, obtidos a partir do ajuste das isotermas à forma linear da equação de Freundlich (Equação 1.3) são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Parâmetros de sorção da ivermectina nos solos N1 e S2.

Solo	Etapa	K_F^a	$1/n$	H	r	K_D (mL g ⁻¹) ^b
N1	sorção	77,7	0,581	0,72	0,9652	60 - 253
	dessorção	74,5	0,420		0,9227	47 - 386
S2	sorção	120	0,415	1,18	0,9733	97 - 1953
	dessorção	138	0,492		0,9944	60 - 431

a) $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{g}^{-1}$; b) coeficiente de sorção, definido como C_s^{ads}/C_{aq} ; H: índice de histerese, definido como $\frac{1/n \text{ dessorção}}{1/n \text{ sorção}}$

Os resultados indicados na Tabela 4.6 mostram que as curvas apresentaram ajuste satisfatório à forma logarítmica da equação de Freundlich ($r > 0,92$). Segundo os parâmetros estabelecidos pelo IBAMA a capacidade de sorção da IVM nos solos pode ser classificada como grande ($50 \leq K_F \leq 149$).

Por meio dos dados apresentados verifica-se que o processo de dessorção da IVM dos solos foi favorável, uma vez que os valores de K_F e de K_D desta etapa são próximos ou menores em relação aos valores observados para a sorção. A reversibilidade do processo de sorção também é confirmada pelo índice H, maior que 0,7.

A Tabela 4.7 apresenta uma compilação dos parâmetros de sorção de avermectinas, incluindo a IVM, reportados na literatura.

Tabela 4.7: Parâmetros de sorção da ivermectina em diferentes solos.

Molécula	Textura do solo	Localização	pH	Silte (%)	Argila (%)	Areia (%)	CTC	Solo/solução (m/v)	MO (%)	Tempo Eq. (h)	Fase aquosa	Conc. ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)	K_F^b	1/n sorção	Referência
EPR	Francosiltoso	Grécia	7,1	52	20	28	32,1	1:5	1,28	≈ 22	CaCl_2	0,1-10	11,9	1,07	Litskas <i>et al.</i> , 2011
EPR	Francosiltoso	Grécia	8,2	45	25	20	7,02	1:5	2,68	≈ 22	CaCl_2	0,1-10	39,8	0,7	Litskas <i>et al.</i> , 2011
EPR	Areia-franca	Grécia	6,1	10	5	85	3,28	1:5	0,2	≈ 22	CaCl_2	0,1-10	29,5	0,6	Litskas <i>et al.</i> , 2011
IVM	Francoarenoso	a	6,0	16,6	8,0	75,4	8,9	1:5	4,7	24h - 1 mês	CaCl_2	0,1-50	70,3-2000	0,778-1.04 ^e	Krogh <i>et al.</i> , 2008
ABA ^f	Francoargiloso	Wako, EUA	6,6	37,6	30,8	31,6	39,2	1:5	4,8	16	CaSO_4	0,0056-2,17	134	1,0	Gruber <i>et al.</i> , 1990
ABA	Areia	Lakeland, EUA	7,5	5,6	2,8	91,9	1,5	1:5	0,1	16	CaSO_4	0,0056-2,17	6,99	1,2	Gruber <i>et al.</i> , 1990
ABA	Francosiltoso	Three Bridges, EUA	7,5	61,6	26,8	11,6	12,5	1:5	2,1	16	CaSO_4	0,0056-2,17	18,2	1,3	Gruber <i>et al.</i> , 1990
IVM	Francoargiloso	Newton, EUA	5,5	58	27	16	16,5	1:5	3,9	16	CaCl_2	3,06-30,6	176	0,86	Halley <i>et al.</i> , 1989
IVM	Francoargilosiltoso	Fulton, EUA	6,3	45	35	20	1,5	1:5	2,5	16	CaCl_2	1,06-10,6	136	0,93	Halley <i>et al.</i> , 1989

CTC: capacidade de troca catiônica, MO: matéria orgânica, EPR: eprinomectina, ABA: abamectina, a) solo artificial, b) $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$ quando $1/n = 1$ e $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{g}^{-1}$ nos outros casos.

Os dados da literatura mostrados na Tabela 4.7 indicam que a IVM apresentou valores de K_F relativamente menores em relação à DANO ($2280 \leq K_F \leq 3800$, Tabela 2.5) e a OTC ($16,6 \leq K_F \leq 495$, Tabela 3.4), com exceção do solo artificial franco-arenoso no qual o período de equilíbrio de 1 mês resultou em K_F de 2000. Desta forma, os coeficientes de sorção encontrados para os solos N1 e S2 do estado de São Paulo ($77,7$ e $120 \mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{g}^{-1}$) estão dentro da faixa de valores reportados para a classe das AVM em outros solos.

Até o presente momento não foram reportados estudos que avaliassem o mecanismo de sorção de AVM em solos de forma aprofundada. Krogh e colaboradores sugeriram que a ausência de correlação linear, entre os valores do K_d da IVM e a porcentagem de matéria orgânica dos solos, indicou uma possível presença de diferentes mecanismos de sorção para a IVM e a ABA. Sendo assim, a ligação iônica e a complexação seriam mais importantes para o primeiro fármaco, ao passo que as interações hidrofóbicas seriam predominantes no segundo caso (Krogh *et al.*, 2008).

Entretanto, é de se esperar que ambas moléculas apresentem o mesmo mecanismo de sorção, uma vez que a única diferença estrutural entre a IVM e a ABA é de uma insaturação entre os carbonos 22 e 23. Desta forma, a baixa polaridade e solubilidade da IVM e o alto K_{ow} do fármaco são indícios de que a partição hidrofóbica seria o mecanismo predominante no processo de sorção da IVM nos solos N1 e S2. Sendo assim, o fato do fármaco apresentar menores valores de K_F , em comparação com a DANO e a OTC, pode ser justificado pela formação de interações químicas mais fracas com os solos e a ausência de mecanismos que envolvem a interação iônica.

A partição hidrofóbica resulta do alto custo energético para a formação de cavidades na água e das interações de van der Waals favoráveis entre o sorbato e o sorbente. Estas interações são particularmente importantes para compostos apolares com a matéria orgânica não polar e com os minerais superficiais pouco solvatados. Já o processo de complexação ocorre como resultado da troca de um grupo hidroxila ou molécula de água, ambos ligados à íons de Al ou Fe superficiais, por outro grupo funcional presente na estrutura do sorbato (Mackay e Vasudevan, 2012).

A complexação da IVM com a matéria inorgânica do solo foi sugerida por Krogh e colaboradores. Os valores do K_D do fármaco diminuiram cerca de 3 vezes quando a

concentração de CaCl_2 foi aumentada de 0,05 para 0,25 mol L^{-1} , o que apontou para a formação de complexos com menores coeficientes de sorção bem como a competição entre estes complexos e cátions dissolvidos por sítios de troca catiônica (Krogh *et al.*, 2008).

4.4.7 Estudo de lixiviação de ivermectina nos solos N1 e S2

Para a realização dos estudos de lixiviação foram confeccionadas duas colunas de vidro com 4 cm de diâmetro interno e 35 cm de comprimento, de acordo com as recomendações da OECD 312 (OECD, 2004). A escolha do vidro se deu pelo fato da IVM apresentar maior capacidade de adsorção no polipropileno ou outros materiais plásticos, o que poderia invalidar o estudo. As colunas foram seccionadas na base para permitir a retirada dos solos por meio de um êmbolo. O aparato utilizado para realização do estudo é apresentado na Figura 4.17. A IVM foi escolhida para esse estudo uma vez que esse fármaco é amplamente utilizado no Brasil e por apresentar um valor de sorção intermediário nos solos avaliados em comparação com a OTC e DANO.

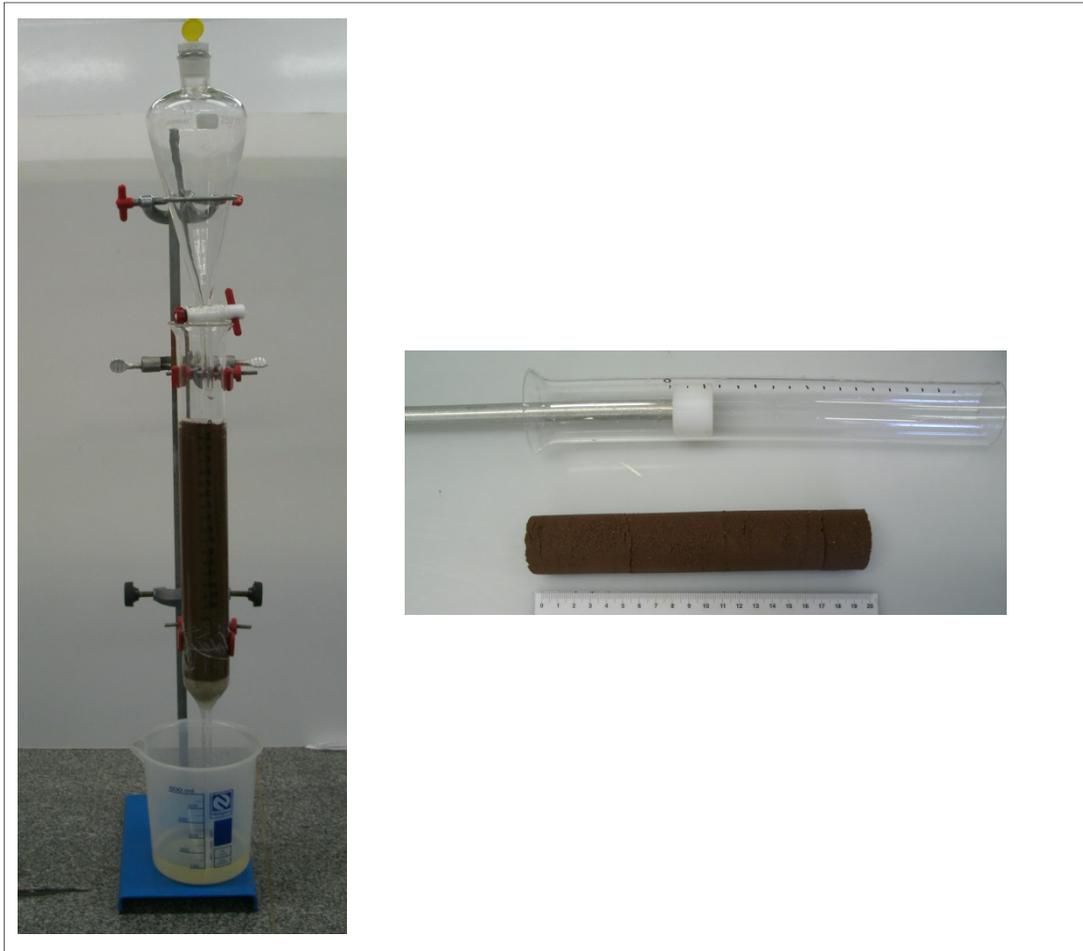


Figura 4.17: Aparato montado para a realização dos estudos de lixiviação em coluna.

Vinte e quatro horas após a adição de IVM no topo da coluna uma “chuva” foi simulada através da percolação de 250 mL de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} , conforme descrito no item 4.3.10, o que de acordo com o guia normativo correspondeu a uma precipitação pluviométrica de 200 mm (OECD, 2004). Segundo o Instituto Nacional de Meteorologia este é o volume histórico de chuva para o Estado de São Paulo durante o mês de dezembro (INMET, 2014).

O eluato foi coletado em alíquotas de 20 mL e a extração da IVM foi realizada com 4 mL de clorofórmio, de acordo com o método desenvolvido e descrito em 4.4.2. A IVM não foi detectada nas frações eluídas das colunas dos solos N1 e S2.

As colunas de solo foram seccionadas de 1 em 1 cm. A IVM foi extraída e analisada, de acordo com o método de determinação do fármaco nos solos anteriormente validado (4.4.5). Os teores de IVM, em função da profundidade dos solos, são apresentados na Figura 4.18.

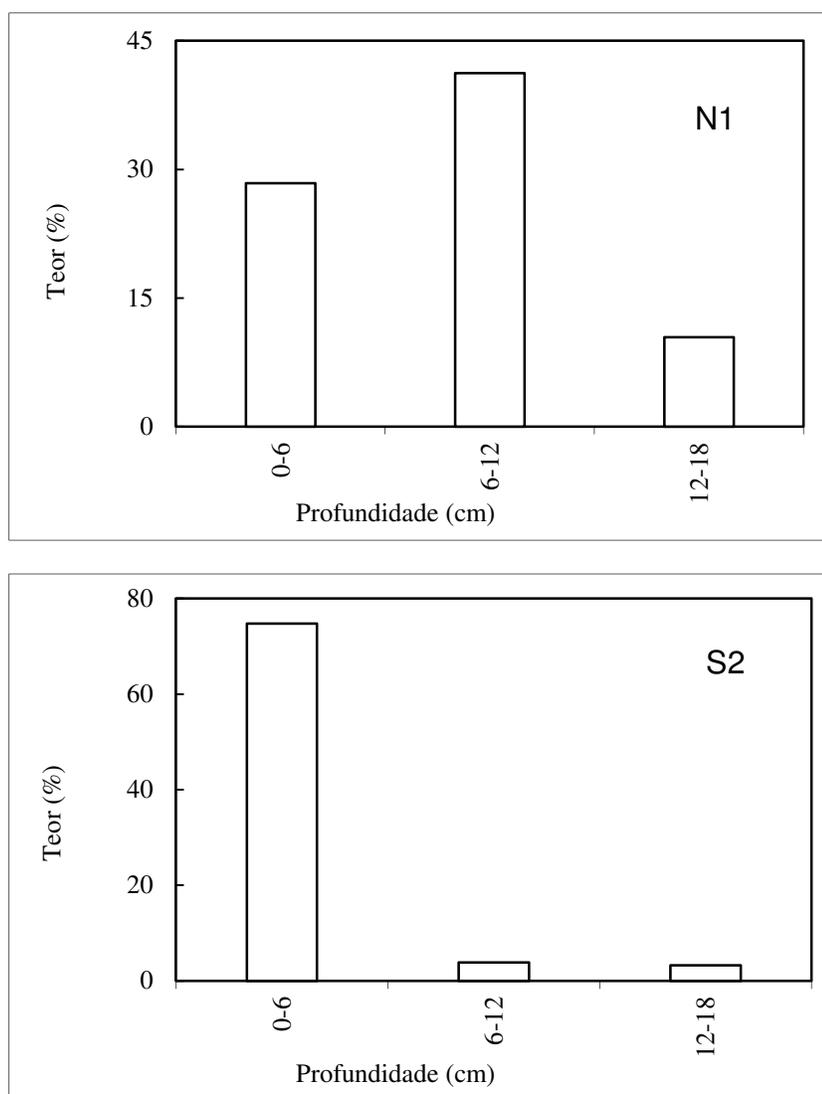


Figura 4.18: Porcentagem de ivermectina em função da profundidade das colunas de solo.

Apesar da IVM não ter sido recuperada de forma quantitativa (72,4 % no solo N1 e 81,8 % no solo S2) o estudo realizado forneceu um perfil qualitativo da lixiviação do fármaco. Por meio da Figura 4.18 é possível constatar que a mobilidade da IVM foi maior no solo arenoso N1, no qual fármaco concentrou-se entre 0 a 12 cm de profundidade, e menor no solo S2, no qual a porcentagem de recuperação da IVM foi maior entre 0 a 6 cm de profundidade. Sendo assim, a maior lixiviação no solo N1 pode ser justificada pela menor capacidade de retenção da IVM neste solo, conforme foi verificado do estudo de sorção (K_F N1 = 77,7 e K_F S2 = 120 $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{mL})^{1/n} \text{g}^{-1}$, Tabela 4.6).

Em estudos de lixiviação com colunas de 4,2 x 51,5 cm foi observado que entre 79,4 a 98,6% da quantidade de ABA concentraram-se nos primeiros 6 cm de profundidade nos solos arenoso, franco-arenoso e franco-argiloso. Contudo, o fármaco foi detectado no solo franco siltoso em profundidades superiores a 30 cm, o que pode ser devido à formação de caminhos preferenciais ao invés da capacidade de lixiviação do fármaco por si somente (Gruber *et al.*, 1990).

No trabalho realizado por Halley e colaboradores a ^3H -IVM ficou retida nos primeiros 5 cm de profundidade em colunas de 1,9 x 30 cm preenchidas com os solos franco siltoso, franco argiloso, franco e franco arenoso. Os estudos também mostraram que os produtos de degradação do fármaco apresentaram menor capacidade de sorção e maior mobilidade, visto que os mesmos foram detectados no lixiviado percolado 30 dias após a fortificação da coluna preenchida com o solo franco arenoso (Halley *et al.*, 1989).

4.4.8 Estudo de dissipação da ivermectina nos solos N1 e S2

Os estudos de dissipação permitem determinar a taxa de transformação de contaminantes nos solos, sendo requeridos para qualquer substância química que é aplicada diretamente no solo ou que pode alcançar este ambiente.

Para a realização deste estudo a dissipação da IVM nos solos N1 e S2 foi feita em meio aeróbico sob condições controladas e não controladas de temperatura e de umidade

do ar. Os valores adotados de temperatura e umidade (19,3 °C e 78%, respectivamente) correspondem às médias históricas do Estado de São Paulo, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2014).

No caso da condição não controlada a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foram monitoradas durante o período de duração do experimento. De acordo com a Figura 4.19 estes parâmetros variaram entre 23,5 a 38 °C e entre 53 a 76%, respectivamente.

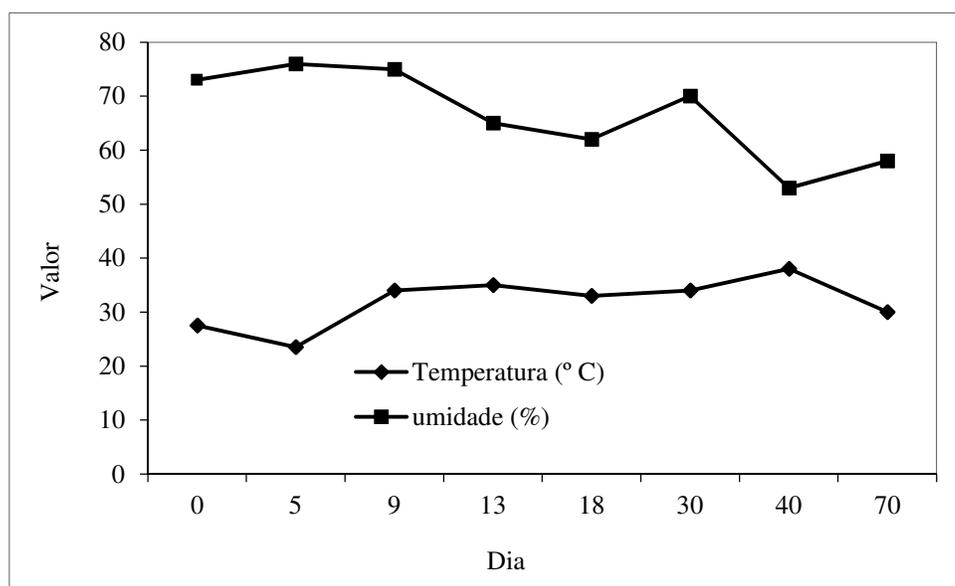


Figura 4.19: Gráfico de temperatura e de umidade ambiente em função do tempo monitoradas durante o estudo cinético de degradação da ivermectina.

Segundo as recomendações da OECD 307 os experimentos foram realizados com solos que haviam sido coletados dos lisímetros em um período menor que 3 meses. A massa de solo empregada no experimento foi escolhida de acordo com as orientações do guia normativo, o qual determina a utilização de, no mínimo, 50 g de material. Os solos foram fortificados com IVM em concentração de 100 ng g⁻¹, sendo este o nível máximo de resíduo de FV em solos estabelecido pela EMA (VICH, 2000).

Para a realização dos estudos a OECD 307 determina que a capacidade de retenção de água dos solos (pF) seja ajustada entre 2 e 2,5, sendo este parâmetro uma representação da quantidade de água que pode ser retida nos solos quando uma pressão de sucção de 2 à 2,5 kPa é aplicada aos mesmos. Por conta disto, a IVM foi adicionada ao solo S2 a partir de uma solução aquosa com volume de 10 mL, o que forneceu uma pF igual a 2. No caso do solo N1 o ajuste da pF para 2 seria feito com 2,5 mL de uma solução do fármaco. Contudo, o volume aquoso precisou ser duplicado, a fim de que fosse possível uma melhor homogeneização da IVM na amostra.

De acordo com a OECD 307 as curvas cinéticas de dissipação podem ser ajustadas ao modelo de primeira ordem (Equação 4.1), a menos que o valor de r^2 seja menor que 0,7 (OECD, 2002).

$$C = C_0 e^{-KT} \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde: C é a concentração da substância, C_0 é a concentração inicial da substância e K a constante de primeira ordem.

Desta forma, os tempos para redução da concentração do fármaco em 50 e 90% podem ser calculados através das Equações 4.2 e 4.3, respectivamente.

$$DT_{50} = \ln 2 / K \quad \text{Equação 4.2}$$

$$DT_{90} = \ln 10 / K \quad \text{Equação 4.3}$$

O ajuste à Equação 4.1 das curvas de concentração de IVM nos solos em função do tempo, sob condições de temperatura e de umidade controladas e não controladas, é mostrado na Figura 4.20.

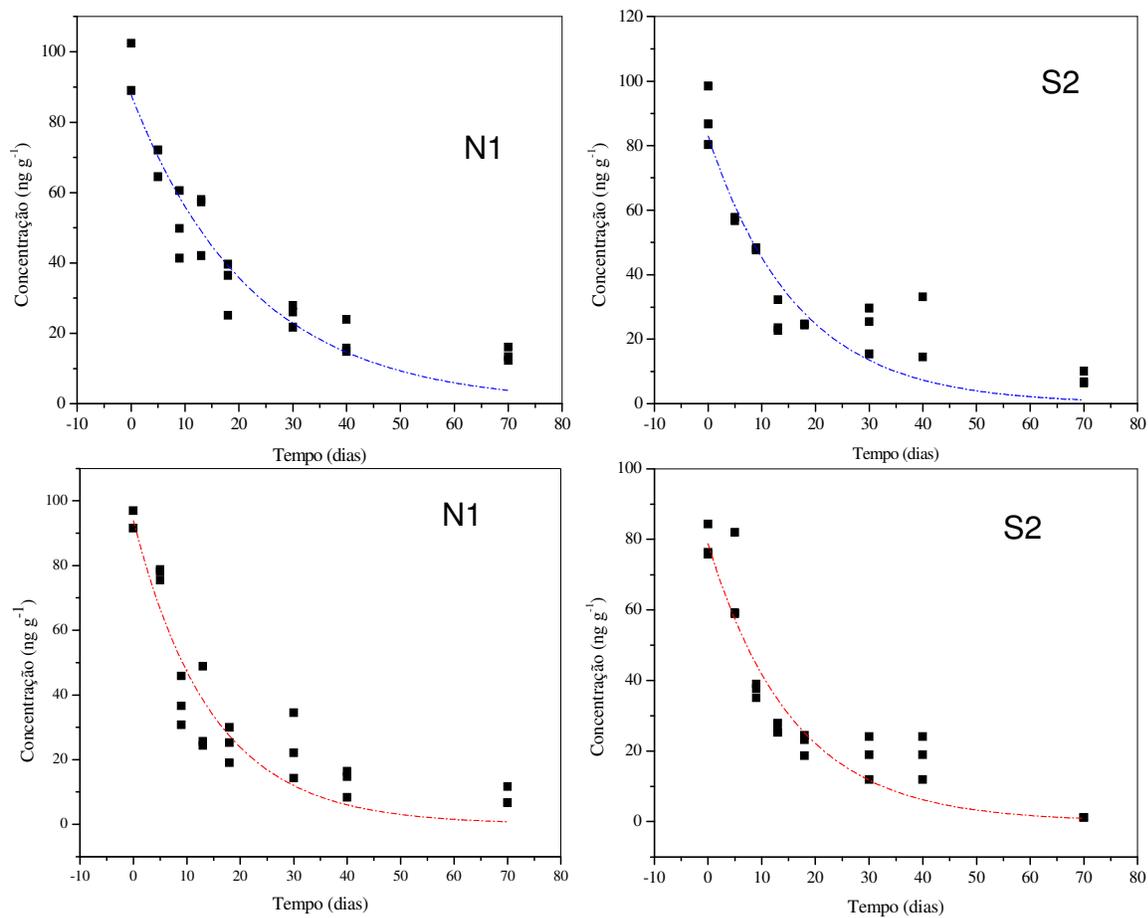


Figura 4.20 Ajuste à equação de primeira ordem das curvas cinéticas de dissipação da ivermectina nos solos N1 e S2 em condição controlada (temperatura de 19,3 ° C e umidade de 78 %, linha azul) e ambiente (linha vermelha).

Os parâmetros cinéticos de dissipação, obtidos a partir do ajuste das curvas à Equação 4.1, são apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Parâmetros cinéticos de degradação da ivermectina nos solos N1 e S2 sob temperatura e umidade controladas e não controladas.

Solo	Temperatura e umidade	r^2	K (dias ⁻¹)	DT ₅₀ (dias)	DT ₉₀ (dias)
N1	Controladas	0,88504	0,04479	15,5	51,4
	Ambiente	0,84867	0,06865	10,1	33,5
S2	Controladas	0,84435	0,06045	11,5	38,0
	Ambiente	0,8655	0,06348	10,9	36,3

onde K é a constante de primeira ordem.

Os resultados mostrados na Tabela 4.8 indicam que os dados experimentais apresentaram ajuste satisfatório ao modelo de primeira ordem, visto que os valores de r^2 estão acima do índice 0,7 requerido pela OECD 307. A dissipação da IVM no solo N1 foi mais rápida em condições ambientes em relação às condições fixas de temperatura e de umidade. No caso do solo S2 não houve diferença significativa nos valores de DT₅₀ e DT₉₀ obtidos em condições controladas e não controladas. Em condição ambiente a IVM foi dissipada em, praticamente, a mesma velocidade independentemente do tipo de solo. Entretanto, sob condições controladas a dissipação do fármaco foi mais rápida no solo S2.

A influência que a matéria orgânica e a capacidade de sorção exercem no tempo de meia vida das AVM não está esclarecida na literatura, já que a dissipação de fármacos

em solos é um processo complexo e dependente de uma série de fatores tais como as características físico-químicas da molécula, a incidência de raios solares e de chuvas, a temperatura, o tipo de solo bem como o tipo e a quantidade de micro-organismos presentes no mesmo.

Experimentos feitos com a OTC mostraram que a adição de estrume aos solos diminuiu a velocidade de degradação deste fármaco, na medida em que o esterco funcionou, possivelmente, como uma barreira de proteção à radiação UV (de Liguoro *et al.*, 2003). Esta pode ser a justificativa para a ^3H -IVM apresentar valores de DT_{50} de 93 à 240 dias em estrume e em solos franco arenosos homogeneizados com estrume (Halley *et al.*, 1989). Contudo, sob condições controladas de temperatura e umidade (23 ± 2 °C, $30 \pm 8\%$, respectivamente) a ABA (um análogo estrutural da IVM) e a doramectina apresentaram DT_{50} de somente 4 à 5 dias em fezes de ovelhas mesmo sob proteção de luminosidade (Celestina *et al.*, 2010).

Em estudos realizados sob condições aeróbicas a 20 °C a IVM apresentou valores de DT_{50} de 16,1 e 67 dias em solos franco-arenosos e de 37,1 dias no silte (Krogh *et al.*, 2009). De acordo com Krogh e colaboradores o tempo de dissipação da molécula está relacionado com sua maior disponibilidade na forma livre não sorvida. Desde modo, o DT_{50} da IVM foi menor no solo que também apresentou o menor coeficiente de sorção (Krogh *et al.*, 2009). Entretanto, nos experimentos realizados a 19,3 °C e 78% de umidade houve uma correlação negativa entre os valores de DT_{50} e DT_{90} da IVM e os coeficientes de sorção do fármaco nos solos N1 e S2 (DT_{50} N1/S2 = 15,47/11,46 dias, DT_{90} N1/S2 = 51,4/38 dias e K_F N1/S2 = 77,7/120).

Nos experimentos feitos por Bull e colaboradores a [H^3] AVM B_{1a} apresentou valores de DT_{50} que variaram, de acordo com a concentração inicial do fármaco, entre 14 a 56 dias na argila, no solo franco-arenoso e na areia. Ao todo, treze produtos de degradação foram separados por cromatografia de camada delgada e indentificados por espectrometria de massas. Neste estudo também foi verificado que a concentração de fármaco e de produtos de degradação não disponíveis para extração aumentou com o tempo, o que segundo Bull e colaboradores foi atribuído à formação de ligações entre os solos e estas espécies (Bull *et al.*, 1984).

Segundo Jechalke e colaboradores a sorção de fármacos em solos envolve reações primárias e secundárias. Inicialmente o processo é governado por um equilíbrio reversível sendo sucedido por uma etapa de dessorção com taxas de liberação lentas que ocasionam em histerese. Desta forma, a biodisponibilidade do fármaco diminui à medida em que aumenta o tempo de contato do mesmo com o solo, já que são formadas reações secundárias e ocorre difusão da substância para micro e nanoporos que são inacessíveis para os micro-organismos responsáveis pelos processos de degradação microbiana. Estes processos são chamados de “sequestro” e prolongam o tempo de permanência de fármacos em solos reduzindo também sua toxicidez, já que os mesmos não estarão mais biodisponíveis. Paralelamente à formação do equilíbrio de sorção e ao “sequestro”, uma fração do fármaco pode formar resíduos que não podem ser extraídos, devido à formação de ligações covalentes catalisadas enzimaticamente ou à difusão para os poros e as intercamadas de argilas. Dependendo do processo de sorção e sequestro, o tempo de dissipação de fármacos em solos pode ser muito variável (Jechalke *et al.*, 2014).

Indubitavelmente, os resultados indicados na Figura 4.20 mostram que houve uma redução na concentração de IVM recuperada durante o período de exposição do fármaco aos solos. Contudo, os dados não permitem concluir se houve somente degradação microbiana da molécula ou se a dissipação verificada foi também devida ao processo de “sequestro” e à diminuição da biodisponibilidade da IVM para degradação.

Desta forma, a dissipação mais rápida da IVM, verificada sob condições controladas em S2, não está esclarecida. É possível que os menores valores de DT_{50} sejam devido à maior atividade microbiana deste solo (Tabela 4.9) ou à difusão mais rápida do fármaco para os microporos do mesmo.

Segundo a Tabela 4.9 a respiração microbiana manteve-se praticamente estável em N1 e S2 durante a realização do estudo cinético de dissipação da IVM. Sendo assim, os resultados permitem concluir que o fármaco, em concentração inicial de 100 ng g^{-1} , não provocou efeitos adversos aos micro-organismos presentes nos solos avaliados, nas condições em que os experimentos foram realizados.

Tabela 4.9: Medição da respiração microbiana nos solos N1 e S2 durante o estudo cinético de degradação da IVM.

Solo	C-biomassa ($\mu\text{g C/g de solo.dia}$)		
	Tempo inicial (dia 0)	Dia 70 câmara	Dia 70 sol
N1	500,3	502,3	503,4
S2	803,3	866,2	701,3

Capítulo 5:

5.1 Conclusões

- ✓ Os estudos preliminares (estabilidade do fármaco nas condições experimentais, razão solo/solução e tempo aparente de equilíbrio) mostraram ser de grande importância para a otimização das condições que serão adotadas nos estudos de sorção. Sendo assim, é necessário que estas avaliações sejam feitas para cada fármaco ou classe de fármaco nos solos que forem utilizados;
- ✓ Apesar da OECD 106 não fazer menção sobre o assunto, a avaliação do efeito matriz, bem como a validação dos métodos para determinação dos fármacos são requisitos necessários para a garantia da confiabilidade dos resultados. No caso da DANO o efeito matriz mostrou ser um parâmetro crítico e que pode afetar de forma significativa os coeficientes de sorção da molécula;
- ✓ Os guias normativos apresentam algumas lacunas em suas diretrizes, o que os tornam difíceis de serem seguidos em algumas situações e cria a necessidade de adaptações às condições disponíveis em laboratório. A construção das isotermas de sorção nem sempre é viável com a quantidade mínima de 1 grama de solo recomendada pela OECD 106, já que tanto a massa de solo quanto o volume da solução são limitados pela capacidade dos recipientes que são utilizados nos estudos. O emprego de uma faixa de fortificação dos solos cobrindo duas ordens de magnitude nem sempre é possível, já que a concentração adotada do fármaco está sujeita a solubilidade do mesmo em cloreto de cálcio, como foi o caso da IVM, além dos limites de detecção e de quantificação do método. O ajuste da capacidade de retenção de água dos solos nos estudos de degradação, o qual segundo a OECD 307 deve ser entre 2 a 2,5, fica sujeito ao volume necessário para garantir a homogeneização da amostra. Também existe uma grande necessidade de padronização do meio de sorção adotado para estudos em diferentes valores de pH, já que em alguns casos o controle do pH não é conseguido através da adição de ácido ou base à solução de CaCl_2 , tal como ocorreu com a DANO e a OTC;

- ✓ A capacidade de sorção de fármacos depende de diversos fatores, como a textura dos solos, a porcentagem de matéria orgânica, o pH, o tipo de meio aquoso adotado, a estrutura e as propriedades físico-químicas da molécula. Somado a estes fatores, os estudos de sorção em solos têm sido realizados nas mais diversas condições, o que de certo modo dificulta a correlação direta destes resultados. Neste sentido, K_D não é o melhor parâmetro para a comparação da capacidade de sorção em diferentes solos, já que o mesmo é dependente da razão de solo/solução e em alguns casos do nível de fortificação da matriz. Sendo assim, K_F pode ser um melhor parâmetro para esta avaliação.

- ✓ A IVM apresentou uma capacidade de sorção intermediária entre a OTC e a DANO. De acordo com os critérios estabelecidos pelo IBAMA a sorção da IVM foi grande nos solos N1 e S2 ($K_F = 77,7$ e 120 , respectivamente). A OTC apresentou capacidade de sorção pequena em N1 ($K_F = 20,3$) e elevada em S2 ($K_F = 219,9$). A DANO exibiu capacidade de sorção grande à elevada em ambos os solos (K_F N1 = $72 - 371$ e K_F S2 = $85 - 676$). Comparado aos resultados reportados na literatura é possível verificar que a norfloxacinina apresentou os maiores coeficientes de sorção para os solos N1 e S2 (K_F N1 = 643 e K_F S2 = 1183) (Peruchi *et al.*, 2015). Contudo, valores de K_F ainda menores, entre $0,45$ e 20 , foram reportados para sulfonamidas nestes mesmos solos (Doretto *et al.*, 2013; Doretto *et al.*, 2014).

- ✓ A presença de histerese ou sorção irreversível não foi verificada nas isotermas durante o tempo aparente de sorção dos fármacos nos solos N1 e S2, já que o índice H foi maior que $0,7$ em todos os casos. Contudo, pode ter ocorrido histerese da IVM durante a realização do estudo de dissipação deste fármaco, uma vez que o período de exposição da molécula aos solos pode ter facilitado a difusão da mesma para microporos, tornando-a não disponível para degradação ou extração;

- ✓ A sorção da DANO foi pH-dependente. Desta forma, espera-se que a mesma tenha sido governada, principalmente, pelo mecanismo de troca catiônica o qual, segundo resultados reportados na literatura, também é esperado para a OTC em pH ácido. No

caso da IVM cogita-se que a partição hidrofóbica e a complexação tenham sido dominantes no processo de sorção em N1 e S2.

- ✓ As curvas cinéticas de sorção da DANO, da OTC e da IVM puderam ser satisfatoriamente ajustadas ao modelo de pseudo-segunda-ordem. De acordo com a constante k_2 a IVM apresentou a maior velocidade de sorção nos solos ($1,03 \times 10^{-3} \leq K_2 \geq 7,15 \times 10^{-4} \text{ g } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$). A DANO apresentou velocidade intermediária ($1,03 \times 10^{-3} \leq K_2 \geq 7,15 \times 10^{-4} \text{ g } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e a OTC exibiu a menor velocidade ($3,67 \times 10^{-7} \leq K_2 \geq 8,60 \times 10^{-7} \text{ g } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Entretanto, em todos os casos a sorção dos fármacos foi mais rápida no solo S2;
- ✓ Os estudos de lixiviação da IVM em coluna corroboram com os estudos de sorção do fármaco. Uma vez que a sorção aparente não é irreversível, a IVM pode ser lixiviada por ação da água da chuva, quando esta ocorre logo após a dispersão do fármaco no solo. Contudo, a mobilidade da molécula é limitada.
- ✓ A IVM em concentração de 100 ng g^{-1} não deve oferecer riscos significativos aos micro-organismos dos solos N1 e S2, visto que a biomassa microbiana manteve-se praticamente constante durante o estudo de dissipação do fármaco;
- ✓ Os estudos realizados neste trabalho foram importantes para avaliar a sorção da DANO, da OTC e da IVM em dois solos brasileiros, já que o país carece amplamente do monitoramento, do levantamento de informações sobre a dinâmica e o comportamento ambiental de fármacos veterinários em solos, bem como da avaliação dos possíveis impactos dos resíduos destas substâncias em organismos terrestres ou aquáticos (Regitano *et al.*, 2010). A importância do estudo também está no fato de mesmo discutir as limitações dos guias normativos, já que este aspecto tem sido pouco abordado na literatura, além de avaliar de forma mais aprofundada a questão envolvendo a adsorção da IVM aos recipientes empregados nos estudo de sorção deste fármaco.

Capítulo 6:

6.1 Referências Bibliográficas

- ABAG/RP, **2014**. Associação Brasileira do Agronegócio da região de Ribeirão Preto. Disponível em <http://www.abagrp.org.br/monitoramento/areas/pedologia.htm>. Acessado em Abril de 2014.
- Aga, D. S.; O'Connor, S.; Ensley, S.; Payero, J. O.; Snow, D.; Tarkalson, D. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 7165-7171.
- Andreu, V.; Vasquez-Roig, P.; Blasco, C.; Picó, Y. Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, 394, 1329-1339.
- Arikan, O. A.; Mulbry, W.; Rice, C. Management of antibiotic residues from agricultural sources: Use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals. *Journal of Hazardous Materials*, **2009b**, 164, 483-489.
- Arikan, O. A.; Sikora, L. J.; Mulbry, W.; Khan, S. U.; Foster, G. D. Composting rapidly reduces levels of oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves. *Bioresource Technology*, **2007**, 98, 169-176.
- Arikan, O.; Mulbry, W.; Ingram, D.; Millner, P. Minimally managed composting of beef manure at the pilot scale: Effect of manure pile construction on pile temperature profiles and on the fate of oxytetracycline and chlortetracycline. *Bioresource Technology*, **2009**, 100, 4447-4453.
- Aristilde, L.; Melis, Anastasios, M.; Sposito, G. Inhibition of photosynthesis by a fluoroquinolone antibiotic. *Environmental Science and Technology*, **2010**, 44, 1444-1450.
- Ashton, D.; Hilton, M.; Thomas, K. V. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, **2004**, 333, 167-184.
- Azzouz, A.; Ballesteros, E. Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. *Science of the Total Environment*, **2012**, 419, 208-215.
- Babić, S.; Horvat, A. J. M.; Pavlović, D. M.; Kaštelan-Macan, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, 26, 1043-1061.
- Bao, Y.; Zhou, Q.; Guan, L.; Wang, Y. Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures. *Waste Management*, **2009**, 29, 1416-1423.

- Beause, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, 23, 753-761.
- Bjorklund, H.V.; Rabergh, C. M. I.; Bylund, G. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*, **1991**, 97, 85-96.
- Blackwell, P. A.; Kay, P.; Boxall, A. B. A. The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. *Chemosphere*, **2007**, 67, 292-299.
- Blanchard, G.; Maunaye, M.; Martin, G. Removal of heavy metals from waters by means of natural zeolites. *Water Research*, **1984**, 18, 1501-1507.
- Boonstra, H.; Reichman, E. P; van den Brink, P. J. Effects of the Veterinary Pharmaceutical Ivermectin in Indoor Aquatic Microcosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **2011**, 60, 77-89.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 2288-2297.
- Boxall, A. B. A.; Kolpin, D. W.; Halling-Sørensen, B. H.; Tolls, J. Are veterinary medicines causing environmental risks?. *Environmental Science and Technology*, **2003**, 286A-294A.
- Bragança, I.; Plácido. A.; Paíga, P.; Domingues, V. F.; Delerue-Matos, C. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Science of the Total Environment*, **2012**, 1, 281-289.
- Brandt, K. K; Sjøholm, O., R. Krogh, K. A., Halling-Sørensen, B., Nybroe, O. Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates. *Environmental Science and Technology*, **2009**, 43, 2963-2968.
- Campos, M. J.; Palomo, G.; Hormeño, L.; Herrera- León.; Dominguez, L.; Vadillo, S.; Píriz, S.; Quesada, A. Prevalence of quinolone resistance determinants in non-typhoidal *Salmonella* isolates from human origin in Extremadura, Spain. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2014, 79, 64-69.
- Carmona, E.; Andreu, V.; Picó, Y. Occurrence of acid pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Science of the Total Environment*, **2014**, 484, 53-63.
- Carrasquillo, A. J.; Bruland, G. L.; Mackay, A. A.; Vasudevan, D. Sorption of ciprofloxacin and oxytetracycline zwitterions to soils and soil minerals: influence of compound structure. *Environmental Science and Technology*, **2008**, 42, 7634-7642.
- Castiglioni, S.; Fanelli, R.; Calamari, D.; Bagnati, R.; Zuccato E. Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River PO, Italy. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2004**, 39, 25-32.

- Celestina, T. V.; Kolar, L.; Kužner, J.; Flajs, V. C.; Pogačnik, M.; Eržen, N.; K. Factors influencing dissipation of avermectins in sheep faeces. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2010**, 73, 18-23.
- Cerqueira, M. B. R.; Guilherme, J. R.; Caldas, S. S.; Martins, M. L. Zanella, R.; Primel, E. G. Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. *Chemosphere*, **2014**, 107, 74-82.
- Chander, Y.; Kumar, K.; Goyal, S. M.; Gupta, S. C. Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. *Journal of Environmental Quality*, **2005**, 34, 1952-1957.
- Chen, Y.; Rosazza, J. P. N.; Reese, C. P.; Chang, H-Y.; Nowakowski, M. A.; Kiplinger, J. P. Microbial models of soil metabolism: biotransformations of danofloxacin. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **1997**, 19, 378-384.
- Chesworth, W. *Encyclopedia of Soil Chemistry*, Springer Dordrecht, **2008**.
- Chesworth, W. *Encyclopedia of Soil Chemistry*, Springer: Dordrecht, **2008**.
- Cotta, J. A. O.; Rezende, M. O. O.; Landgraf, M. D. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. *Química Nova*, **2009**, 32, 2026-2033.
- Daniel-Mwambete, K.; Torrado, S.; Cuesta-Bandera, C.; Ponce-Gordo, F.; Torrado, J. J. The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, **2004**, 272, 29-36.
- de Liguoro, M.; Cibir, V.; Capolongo, F.; Halling-Sørensen, B.; Montesissa, C. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*, **2003**, 52, 203-212.
- Díaz-Cruz, M. S.; de Alda, J. L.; Barceló, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22, 340-351.
- Dolliver, H.; Kumar, K.; Gupta, S. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of Environmental Quality*, **2007**, 36, 1224-1230.
- Doretto, K. M.; Rath, S. Sorption of sulfadiazine on Brazilian soils. *Chemosphere*, **2013**, 90, 2027-2034.
- Doretto, K. M.; Peruchi, L. M. Rath, S. Sorption and desorption of sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline and sulfamethazine in Brazilian soils. *Science of the Total Environment*, **2014**, 476-477, 406-414.
- Durso, L. M.; Cook, K. L. Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks. *Current Opinion in Microbiology*, **2014**, 19, 37-44.
- EMA, **1997**. Note for guidance: environmental risk assessment for veterinary medical products other than GMO-containing and immunological products. Committee for Veterinary and Medical Products, London 42.

- EMA, **2008**. Guideline on environmental impact assessment for veterinary medical products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004386.pdf. Acessada em abril de 2014.
- EMA, **2014**. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/10/WC500152311.pdf. Acessado em agosto de 2014.
- European Commission, **2003**. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition.
- FAO, **2006**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Guideline for soil description, 4th edition, Rome.
- FDA, **1991**. Environmental assessment of ivermectin, Merck & Co., Inc 1991. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/EnvironmentalAssessments/UCM072309.pdf>. Acessado em maio de 2014.
- FDA, **2000**. Danofloxacin 18% injectable solution for the treatment of respiratory disease in cattle. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/EnvironmentalAssessments/UCM072389.pdf>. Acessado em abril de 2014.
- FDA, **2003**. Guidande for Industry n^o 152. Evaluating the safety of antimicrobial new drugs with regard to their microbiological effects on bacteria of human health concern. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052519.pdf>. Acessada em abril de 2014.
- Fernández-Bayo, J. D.; Nogales, R.; Romero, E. Evaluation of the sorption process for imidacloprid and diuron in eighth agricultural soils from southern Europe using various kinetic models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 5266-5272.
- Figueroa, R. A.; Leonard, A.; Mackay, A. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. *Environmental Science and Technology*, **2004**, 38, 476-483.
- Figueroa, R. A.; Mackay, A. Sorption of oxytetracycline to iron oxides and oxide-rich soils. *Environmental Science and Technology*, **2005**, 39, 6664-6671.
- Gao, Y.; Sun, X.; Gu, X.; Sun, Z. Gene expression responses in different regions of *Eisenia fetida* with antiparasitic albendazole exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2012**, 89, 239-244.
- Gao, Y.; Li, X.; Guo, J.; Sun, X.; Sun, Z. Reproductive responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to antiparasitic albendazole exposure. *Chemosphere*, **2015**, 120, 1-7.
- Garric, J.; Vollat, B.; Duis, K.; Péry, A.; Junker, T.; Ramil, M.; Fink, G.; Terhanes, T. A. Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*, **2007**, 69, 903-910.

- Geary, T. G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in Parasitology*, **2005**, 21, 530-532.
- Goodman, L. S.; Gilman, A. G. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 8^o edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, **1990**.
- Gruber, V. F.; Halley, B. A.; Hwang, S. C.; Ku, C. C. Mobility of avermectin B_{1a} in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1990**, 38, 886-890.
- Halling-Sørensen, B.; Sengeløv, G.; Tjørnelund, J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **2002**, 42, 263-271.
- Hamscher, G.; Sczesny, S.; Höper H.; Nau, 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*, **2002**, 74, 1509-1518.
- Hilton, M. J.; Thomas, K. V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2003**, 1015, 129-141.
- Ho, Y. S.; Mackay, G. A comparison of chemisorption kinetic models applied to pollutant removal on various sorbents. *Process Safety and Environmental Protection*, **1998**, 76, 332-340.
- Holtz, R. D.; Kovacs, W. D. *An Introduction to Geotechnical Engineering*. Prentice Hall, New Jersey, **1981**.
- Hong, P. Y. Monitoring the perturbation of soil and groundwater microbial communities due to pig production activities. *Applied Environmental Microbiology*, **2013**, 79, 2620-2629.
- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004393.pdf. Acessada em abril de 2014.
- Horvat, A. J. M.; Petrović, M.; Babić, S.; Pavlović, D. M.; Ašperger, D.; Pelko, S.; Mance, A. D.; Kaštelan-Macan, M. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, **2012**, 31, 61- 84.
- IBAMA, **1990**. Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos: E-2. Teste para avaliação da mobilidade.
- Iglesias, L. E.; Saumell, C. A.; Fernandez, A. S.; Fuse, L. A., Lifschitz, A. L.; Rodriguez, E. M.; Steffan, P. E.; Fiel, C. A. Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. *Parasitology Research*, **2006**, 100, 93-102.
- INMET, **2014**. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>. Acessado em maio de 2014.

- Jechalke, S.; Heuer, H.; Siemens, J.; Amelung, W.; Smalla, K. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, **2014**, XX, 1-10.
- Jechalke, S., Christoph, K.; Rosendahl, I.; Groeneweg, I.; Weichelt, V.; Krögerrecklenfort, E.; Brandes, N.; Nordwig, M.; Ding, G.-C.; Siemens, J.; Heuer, H.; Smalla, K. Increase in abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from sulfadiazine-treated pigs. *Applied Environmental Microbiology*, **2013**, 79, 1704-1711.
- Jensen, J.; Krogh, P. H.; Sverdrup, L. E. Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). *Chemosphere*, **2003**, 50, 437-443.
- Jiang, H.-X.; Tang, D.; Liu, Y.-H.; Zhang, X.-H.; Zeng, Z.-L.; Xu, L.; Hawkey, P. M. Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2012**, 67, 2350-2353.
- Jjemba, P. K. The effect of chloroquine, quinacrine, and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota. *Chemosphere*, **2002**, 46, 1019-1025.
- Jjemba, P. K. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **2002**, 93, 267-278.
- Jones, A. D.; Bruland, G. L.; Agrawal, S. G.; Vasudevan, D. Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. *Environmental Science and Technology*, **2005**, 24, 761-770.
- Karci, A.; Balcioglu, A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science and Total Environment*, **2009**, 407, 4652-4664.
- Kemper, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, **2008**, 8, 1-13.
- Kim, Y.; Lim, S.; Han, M.; Cho, J. Sorption characteristics of oxytetracycline, amoxicillin, and sulfathiazole in two different soil types. *Geoderma*, **2012**, 185-186, 97-101.
- Kinney, C. A.; Furlong, E. T.; Kolpin, D. W.; Burkhardt, M. R.; Zaugg, S. D.; Werner, S. L.; Bossio, J. P.; Benotti, M. J. Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure. *Environmental Science and Technology*, **2008**, 42, 1863-1870.
- Kong, W.; Li, C.; Dolhi, J. M.; Li, S.; He, J.; Qiao, M. Characteristics of oxytetracycline sorption and potential bioavailability in soils with various physical-chemical properties. *Chemosphere*, **2012**, 87, 542-548.
- Kolls, S. A. E.; Moltmann, J. F.; Knacker, T. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2008**, 50, 59-65.

- Kolpin, D. W.; Skopec, M.; Meyer, M. T.; Furlong, E. T.; Zaugg, S. D. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of the Total Environment*, **2004**, 328, 119-130.
- Krogh, K. A.; Søbørg, T.; Brodin, B.; Halling-Sørensen, B. Sorption and mobility of ivermectin in different soils. *Journal of Environmental Quality*, **2008**, 37, 2202-2211.
- Krogh, K.; Jensen, G. G.; Schneider, M. K.; Fenner, K.; Halling-Sørensen, B. Analysis of the dissipation kinetics of ivermectin at different temperatures and four different soils. *Chemosphere*, **2009**, 75, 1097-1104.
- Kühne, M.; Ihnen, D.; Möller, G.; Agthe, O. Stability of tetracycline in water and liquid manure. *Journal of Veterinary Medicine A*, **2000**, 47, 379-384.
- Kulsshetha, P.; Giesse, R. F. Jr.; Aga, D. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: insights on factors affecting its mobility in soil. *Environmental Science and Technology*, **2004**, 38, 4097-4105.
- Kumar, K.; Gupta, S. C.; Baidoo, S. K.; Chander, Y.; Rosen, C. J. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality*, **2005**, 34, 2082-2885.
- Le Bris, H.; Pouliquen, H. Sorption of oxytetracycline and oxolinic acid to marine sediments. *Chemosphere*, **1996**, 33, 801-815.
- 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*, **2012**, 35, 159-169.
- Leal, R. M. P.; Figueira, R. F.; Tornisielo, V. L.; Regitano, J. B. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State. *Science of the Total Environment*, **2013**, 432, 433-349.
- Lindsey, M. E.; Meyer, M.; Thurman, E. M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 4640-4646.
- Lin, D.; Zhou, Q.; Xu, Y.; Chen, C.; Li, Y. Physiological and molecular responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to soil chlortetracycline contamination. *Environmental Pollution*, **2012**, 46-51.
- 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.
- Litskas, V. D.; Karamanlis, X. N.; Batzias, G. C.; Kamarianos, A. P. Sorption of the antiparasitic drug eprinomectin in three soils. *Chemosphere*, **2011**, 82, 193-198.
- 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*, **2002**, 48, 251-361.

- Mackay, A., A.; Vasudevan, D. Polyfunctional ionogenic compound sorption: challenges and new approaches to advance predictive models. *Environmental Science and Technology*, **2012**, 46, 9209-9223.
- Mamani, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando a cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, **2007**.
- Mamy, L.; Barriuso, E. Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils. *European Journal of Soil Science*, **2007**, 58, 174-187.
- Maniero, L. P.; Fostier, A. H.; Rath, S. Sorption of norfloxacin in soils: Analytical method, Kinetics and Freundlich isotherms. *Chemosphere*, **2015**, 119, 310-317.
- MAPA, **2014**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Relatório de produtos com licença vigente. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Registros_Autorizacao/listas%20de%20produtos/RPRODVI-2013-05-20.pdf. Acessado em maio de 2014.
- McCarthy, G.; Lawlor, P. G.; Gutierrez, M.; Gardiner, G. E. Assessing the Biosafety risks of pig manure for use as a feedstock for composting. *Science for the Total Environment*, **2013**, 463-464, 712-719.
- Michelini, L.; Reichel, R.; Werne, W.; Ghisi, R.; Thiele-Bruhn, S. Sulfadiazine uptake and effects on *Salix Fragilis* L. and *Zea mays* L. plants. *Water Air Pollution*, **2012**, 223, 5243-5257.
- Migliore, L.; Civitareale, C.; Brambilla, G.; Cozzolino, S.; Casoria, P.; Gaudio, L. Effects of sulphadimethoxine on cosmopolitan weeds (*Amaranthus retroflexus* L., *Plantago major* L. and *Rumex acetosella* L. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **1997**, 65, 163-168.
- Migliore, L.; Civitareale, C.; Cozzolino, S.; Casoria, P.; Brambilla, G.; Gaudio, L. Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants. *Chemosphere*, **1998**, 37, 2957-2961.
- Montigy, P. D.; Shim, J. S. K.; Pivnichny, J. L. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and n-methylimidazole as the derivatization reagent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1990**, 8, 507-511.
- Morris, A. K.; Masterton, R. G. Antibiotic resistance surveillance: action for international studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2002**, 49, 7-10.
- Mushtaq, M., Feely, W. F.; Syintsakos, L. R.; Wislocki, P. G. Immobility of emamectin benzoate in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44, 940-944.
- Nicholson, F. A.; Groves, S. J.; Chambers, B. J. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, **2005**, 96, 135-143.
- Nowara, A.; Burhenne, J.; Spittler, M. Binding of fluoroquinolone carboxylic derivatives to clay minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 1459-1463.

- 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 properties. Test n° 106: Adsorption – desorption using a batch equilibrium method. Organization for the Economic Cooperation and Development.
- OECD, **2002**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test n° 307: Aerobic and Anaerobic transformation in soil. Organization for the Economic Cooperation and Development.
- OECD, **2004**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 3: Degradation and Accumulation. Test n° 312: Leaching in soil columns. Organization for the Economic Cooperation and Development.
- Oppel, J.; Broll, G.; Löffler, D.; Meller, M.; Römbke, J.; Ternes, T. Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Science of the Total Environment*, **2004**, 328, 265-273.
- Petrović, M.; Škrbić, B.; Živančev, J.; Fernando-Climent, L.; Barcelo, D. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia. *Science of the Total Environment*, **2014**, 415-428.
- Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, **2001**, 166, 752-769.
- Picó, Y.; Andreu, V. Fluoroquinolones in soil- risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2007**, 387, 1287-1299.
- 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.
- Plazinski, W., Rudzinski, W., Plazinska, A. Theoretical models of sorption kinetics including surface reaction mechanism: A review. *Advanced Colloid Interface Science*, **2009**, 152, 2-13.
- Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Smeniuk, S.; Niedzielska, J.; Ellis, R. Determination of fluoroquinolones residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomedical chromatography*, **1999**, 13, 279-285.
- Pusino, A.; Pinna, M. V.; Gessa, C. Azimsulfuron sorption-desorption on soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 3462-3466.
- Qiu, H.; LV, L.; Pan, B-c.; Zhang, Q-j.; Zhang, W-m.; Zhang, Q-x. Critical review in adsorption kinetic models. *Journal of Zhejiang University Science A*, **2009**, 10, 716-724.
- Ramaswamy, J.; Prasher, S. O.; Ramanbhai, M. P.; Hussain, S. A.; Barrington, S. F.; The effect of composting on the degradation of a veterinary pharmaceutical. *Bioresource Technology*, **2010**, 101, 2294-2299.

- Regitano, J. B.; Lea, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, **2010**, 3, 601-616.
- Rutz, F.; Lima, G. J. M. M. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. X Congresso Brasileiro da Associação dos Criadores de Aves. Porto Alegre, **2001**.
- 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*, **2006**, 65, 725-759.
- Sassman S.; Lee, L. S. Sorption of three tetracyclines by several soils: Assessing the role of pH and cation exchange. *Environmental Science and Technology*, **2005**, 39, 7452-7459.
- Sassman, S. A.; Lee, L. S. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. *Environmental Science and Techonology*, **2005**, 39, 7452-7459.
- Schenck, F.; Callery, P. S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of Chromatography A*, **1998**, 812, 99-109.
- SESA, **2005**. Secretaria de Estado da Saúde. Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte no Estado do Paraná. Curitiba.
- Selvam, A.; Zhao, Z.; Wong, J. W. C.; Composting of swine manure spiked with sulfadiazine, chlortetracycline and ciprofloxacin. *Bioresource Techonology*, **2012**, 126, 412-417.
- Shipp, J. L.; Wang, K.; Ferguson, G. Residual toxicity of avermectin b1 and pyridaben to eight commercially produced beneficial arthropod species used for control of greenhouse pests. *Biological Control*, **2000**, 17, 125-131.
- Schoop, W. L.; Mrozik H.; Fisher, M. H. Structure and activity of avermectins and milbectins in animal health. *Veterinary Parasitology*, **1995**, 59, 139-156.
- Shukten, H. R.; Schnitzer, M; 3- Dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften*, **1995**, 82, 487-498.
- SINDAN, **2014**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. Disponível em <http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>. Acessado em abril de 2014.
- SINDAN, **2014B**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. Disponível em <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>. Acessado em maio de 2014.
- SINDAN, **2014C**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. Disponível em <http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>. Acessado em maio de 2014.

- Suarez, V. H.; Lifschitz, A. L.; Sallovitz, J. M.; Lanusse, C. E. Effects of ivermectin and doramectin faecal residues on the invertebrate colonization of cattle dung. *Journal of Applied Entomology*, **2003**, 127, 481-488.
- Sun, Y.; Diao, X.; Qidi, Z.; Shen, J. Bioaccumulation and elimination of avermectin B_{1a} in the earthworms. *Chemosphere*, **2005**, 60, 699-704.
- Stuart, M.; Lapworth, D.; Crane, E.; Hart, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, **2012**, 416, 1-21.
- Thain, J. E.; Davies, I. M.; Rae, G. H.; Allen, Y. T. Acute toxicity of ivermectin to the lugworm *Arenicola marina*. *Aquaculture*, **1997**, 159, 47-52.
- Thiele-Bruhn, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils- a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **2003**, 166, 145-167.
- Thomas, K. V.; Hilton, M. J. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, **2004**, 49, 436-44.
- UCS, **2014**. Union of Concerned Scientists. Hogging it: Estimates of antimicrobial abuse in livestock. Disponível em <http://www.uca.org/publications/>. Acessado em abril de 2014.
- USDA, **2010**. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Soil Survey Staff. Keys to soil taxonomy, 11^a edition, Washington.
- Vasudevan, D.; Bruland, G. L.; Torrance, B. S.; Upchurch, V. G.; Mackay, A. A. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma*, **2009**, 151, 68-76.
- Vazquez-Roig, P.; Segarra, R.; Blasco, C.; Andreu, V.; Picó, Y. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, 2471-2483.
- Veldman, K.; Cavaco, L. M.; Mevius, D.; Battisti, A.; Franco, A.; Botteldoorn, N.; Bruneau, M.; Perrin-Guyomard, A.; Cerny, T.; Escobar, C. D. F. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food, and the environment in 13 European countries. *Journal of Antimicrobiology Chemotherapy*, **2011**, 66, 1278-1286.
- VICH, **2000**. Environmental impact assessments (EIAs) for veterinary medical products (VMPS): Phase I. Disponível em http://www.vichsec.org/pdf/2000/GI06_st7.pdf. Acessada em abril de 2014.
- VICH, **2004**. Guideline on environmental impact assessment for veterinary medical products - Phase II. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm052500.pdf>
- Vredenburg, J.; Varela, A. R.; Hasan, B.; Bertilsson, S.; Olsen, B.; Narciso-da-Rocha, C.; Bonnedahl, J.; Stedt, J.; Da Costa, P. M.; Manaia, C. M. Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from birds of prey in Portugal are genetically distinct from

those isolated from water environments and gulls in Portugal, Spain and Sweden. *Environmental Microbiology*, **2013**, 16, 995-1004.

Wang, Q.; Yates, S. R. Laboratory study of oxytetracycline degradation kinetics in animal manure and soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 1683-1688.

Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Kolpin, D. W.; Costanzo, S. D. The occurrence of antibiotic in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, **2009**, 407, 2711-2723.

Weber, W. J. Jr.; Huang, W.; Yu, H. Hysteresis in the sorption and desorption of hydrophobic organic contaminants by soils and sediments. 2. Effects of soil matter heterogeneity. *Journal of Contaminant Hydrology*, **1998**, 31, 149-165.

Wei, R.; Ge, F.; Huang, S.; Chen, M.; Wang, R. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere*, **2011**, 82, 1408-1414.

WHO, **2006**. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain veterinary drug residues in food: sixty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series, no. 939, 2006.

Wu, Q.; Li, Z.; H. Z.; Hong, H.; Y. K.; Tie, L. Adsorption and intercalation of ciprofloxacin on montmorillonite. *Applied Clay Science*, **2010**, 50, 202-210.

Yang, J. F.; Ying, G. G.; Zhou, L. J.; Liu, S.; Zhao, J. L. Dissipation of oxytetracycline in soils under different redox conditions. *Environmental Pollution*, **2009**, 157, 2704-2709.

Yang, S.; Carlson, K. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes, *Water Research*, **2003**, 37, 4645-4656.

Yang, S.; Carlson, K. Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. *Water Research*, **2004**, 38, 3155-3166.

Xiong, W.; Sun, Y.; Ding, X.; Zhang, Y.; Zhong, X.; Liang, W. Responses of plasmid-mediated quinolone resistance genes and bacterial taxa to (fluoro)quinolones-containing manure in arable soil. *Chemosphere*, **2015**, 119, 473-478.

Xu, X-R.; Li, X-Y. Sorption and desorption of tetracycline on marine sediments. *Chemosphere*, **2010**, 78, 430-436.

Zuccato, E.; Calamari, D.; Natangelo, M.; Fanelli, R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Research. Letters*, **2000**, 355, 1789-1790.