

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RAFAEL MARQUES PEREIRA LEAL

**Ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos
de uso veterinário**

Piracicaba
2012

RAFAEL MARQUES PEREIRA LEAL

**Ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos
de uso veterinário**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na
Agricultura da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no
Ambiente

Orientador: Prof^a Dr^a Jussara Borges Regitano

Piracicaba

2012

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Leal, Rafael Marques Pereira

Ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos de uso veterinário / Rafael Marques Pereira Leal; orientadora Jussara Borges Regitano. - - Piracicaba, 2012.
134 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Lixiviação 2. Monitoramento ambiental 3. Poluição ambiental 4. Poluição do solo 5. Produção animal 6. Química ambiental 7. Química do solo I. Título

CDU 504.5 : 614.76

Dedico

A toda minha família, aos meus queridos amigos e a todas as pessoas de bem que, cada um a sua maneira, acreditam e trabalham em prol de um mundo melhor.

“Eu aprendi que as pessoas se esquecerão do que você disse, se esquecerão do que você fez, mas nunca de como você as fez se sentir”.

(Maya Angelou)

AGRADECIMENTOS

A vida, pela benção maior da existência e pelo privilégio de poder concluir esta etapa da minha formação profissional. A cada ano que se vai, desejo poder olhar para trás e afirmar a mim mesmo, com serenidade e convicção: obrigado vida, este foi o mais intenso e produtivo ano de minha existência, sob todo e qualquer aspecto.

Aos meus pais Edson e Sonia Leal pelo amor incondicional e por me proporcionarem todas as condições para minha busca por meus objetivos pessoais e profissionais.

A minha irmã Caroline pelo companheirismo, cumplicidade, pelos muitos interesses partilhados e pelos bons momentos vividos e a nossa espera.

A Paula Fabiane Martins pelo seu amor, incondicional apoio, companheirismo, alegria e simplicidade, que indubitavelmente contribuem para tornar a minha caminhada muito mais leve e plena.

A Magdalena Brzeska, que mesmo longe fisicamente continua sendo como uma segunda mãe para mim, irradiando afeto e apoio.

A Profa Dra. Jussara Borges Regitano pela oportunidade, orientação, incentivo, convívio e confiança em mim depositada.

Ao Prof Dr. Valdemar Luis Tornisielo pelo uso das instalações laboratório de Ecotoxicologia, pelos ensinamentos, e pelo inestimável apoio e incentivo em diversos momentos.

A Profa Dra. Susanne Rath pelo auxílio nas etapas iniciais da execução deste trabalho.

Ao prof Dr. Ajit K. Sarmah pela sua supervisão durante meu estágio Sanduíche na Nova Zelândia e por todo o aprendizado profissional por mim obtido durante essa etapa.

Ao Landcare Research Manaaki Whenua pela repecção e pelas ótimas condições para que eu pudesse de desenvolver meu estágio Sanduiche com tranquilidade.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e a Comissão de Pós Graduação do mesmo pela oportunidade e estrutura disponível para que este trabalho fosse realizado e, igualmente, pela preciosa oportunidade e aprendizado que tive ao integrar parte de suas comissões na qualidade de representante discente e membro da Associação local de Pós-Graduandos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo indispensável apoio obtido através de bolsa individual e de auxílio à pesquisa.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela valiosa aprovação de projeto de auxílio à pesquisa

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa para realização de Doutorado Sanduíche.

Aos técnicos e auxiliares do Lab. de Ecotoxicologia, Carlos Alberto Dorelli e Rodrigo Pimpinato, pela preciosa ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante minha estadia na Nova Zelândia, Bruno Botaro e Prakash Srinivasan, pelos memoráveis momentos de convívio que compartilhamos. Obrigado Nova Zelândia, foi uma experiência encantadora.

A Bibliotecária Chefe do CENA/USP, Marília Ribeiro Garcia Henyei, pelas nossas muito cativantes conversas e por toda a ajuda prestada na revisão final deste documento.

Aos amigos do laboratório de Ecotoxicologia, Aderbal, Franz, Nádia, Graziela, Paulo, Sérgio e todos que por ali passaram pela convivência e pela preciosa troca de conhecimentos e informações no dia a dia.

Aos amigos que fiz ao dividir sala nos momentos finais de meu Doutorado, Eloana, Bruna, Marina, Thiago, Fabrício e Altina. Meus sinceros desejos de muito sucesso e realização a cada um de vocês.

A minha querida professora de espanhol Mercedes Gomes, exemplo de sabedoria e vitalidade.

Aos meus queridos amigos de treino da Performance Assessoria Esportiva, em especial ao nosso competentíssimo treinador e ex-atleta profissional Wellington Fraga. Tem sido um enorme prazer compartilhar minha paixão pela corrida com vocês, superando gradualmente meus limites e me aproximando cada dia mais dos meus primeiros 42 km.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível, compartilhando comigo momentos e situações de enorme significado e aprendizado, bons ou ruins. Agradeço enormemente por fazerem parte da minha vida e por todo apoio e motivação.

*“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.*

*Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio
que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia,
amor que promove.*

*E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não
seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.*

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

*"Tudo o que você tem na vida pode ser tirado de você, exceto uma coisa, sua liberdade última
de escolher como você responderá a situação". Viktor Frankl*

RESUMO

LEAL, R.M.P. **Ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos de uso veterinário**. 2012. 134 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Muitos antibióticos de uso veterinário não são totalmente metabolizados no organismo animal, ocasionando a presença de resíduos destes compostos em várias matrizes ambientais, tais como esterco animal, solos e sedimentos fluviais. A ocorrência destes resíduos no ambiente pode favorecer a resistência de microrganismos aos agentes antibióticos, ocasionar problemas de ordem toxicológica em determinados organismos e, além disso, interferir nos ciclos biogeoquímicos mediados por microrganismos. Apesar do uso de antibióticos de uso veterinário ser elevado no Brasil, até o momento não existem dados quanto à ocorrência e comportamento ambiental dos principais compostos atualmente empregados no país. Neste sentido, este trabalho investigou a ocorrência em amostras ambientais (cama de frango e solo) de uma importante classe de antibióticos, as fluoroquinolonas, além de aspectos do comportamento de fluoroquinolonas e sulfonamidas através de ensaios de sorção. No exterior, estudou-se a dissipação e a sorção de fluoroquinolonas em solos neozelandeses. Para a quantificação de resíduos de fluoroquinolonas em amostras de cama de frango e solo, a metodologia analítica foi adaptada e validada. No geral, os resíduos de fluoroquinolonas ocorreram em concentrações equiparáveis (mg kg^{-1} para cama de frango e $\mu\text{g kg}^{-1}$ para solo) aos encontrados em outros países (China, Áustria e Turquia) e os seus coeficientes de sorção às partículas do solo foram sempre elevados ($K_d = 544$ a $1.277.874 \text{ L kg}^{-1}$), maiores do que aqueles encontrados internacionalmente ($K_d = 260$ to 5.012 L kg^{-1}), e bastante superiores aos encontrados na cama de frango ($K_d \leq 65 \text{ L kg}^{-1}$), o que demonstra que o transporte destas moléculas ocorre somente em associação às partículas do solo, podendo atingir fontes de águas superficiais. Já os coeficientes de sorção das sulfonamidas foram relativamente baixos ($K_d = 0,7$ a $70,1 \text{ L kg}^{-1}$), mostrando seu potencial de lixiviação no perfil dos solos. A textura e a capacidade de troca catiônica influenciaram significativamente o potencial de sorção das fluoroquinolonas e das sulfonamidas aos solos, evidenciando a importância dos processos de troca iônica na sorção desses antibióticos em solos tropicais. Nos solos neozelandeses, com maior capacidade tampão, o potencial de sorção das fluoroquinolonas também foi elevado, mas menor que em solos brasileiros, sendo que a adição de cama de frango diminuiu o seu potencial de sorção. A dissipação das fluoroquinolonas variou consideravelmente ($DT_{50} = 16$ a >70 dias), tendo sido mais rápida em sub-superfície apesar da sua menor atividade biológica. Antibióticos são usados rotineiramente na produção animal, representando uma fonte potencial de poluição ao meio ambiente que tem sido largamente ignorada, devendo ser melhor investigada no Brasil.

Palavras-chave: Produção animal. Antibióticos de uso veterinário. Contaminação ambiental. Poluentes orgânicos.

ABSTRACT

LEAL, R.M.P.L. **Occurrence and environmental behavior of residues of veterinary antibiotics**. 2012. 134 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Many antibiotics used for veterinary purposes are not fully metabolized in the animal body, resulting in the presence of residues in a wide range of environmental matrices such as animal manures, soils and sediments. The occurrence of these residues in the environment can favour microorganisms resistance to antibiotic agents, cause toxicological problems to certain organisms and, besides, also interfere in the biogeochemical cycles mediated by microorganisms. Despite the high use of veterinary antibiotics in Brazil, so far there are no data regarding the occurrence and environmental behavior of the main compounds currently in use in the country. This work represented a first investigation on the occurrence of an important class of antibiotics, the fluoroquinolones, in environmental samples (poultry litter and soil), also investigating aspects of the environmental behavior of fluoroquinolones and sulfonamides in these matrices through sorption experiments. Overseas, dissipation and sorption behavior of fluoroquinolones were studied for New Zealand soils. For the quantification of fluoroquinolone residues in poultry litter and soil samples, an analytical methodology was adapted and validated. Overall, the results demonstrated the occurrence of fluoroquinolone residues in concentrations (mg kg^{-1} for poultry litter and $\mu\text{g kg}^{-1}$ for soil) comparable to those found elsewhere (China, Austria and Turkey), a high sorption potential of fluoroquinolones to soils (K_d from 544 to 1,277,874 L kg^{-1}), higher than the reference values for soil ($K_d = 260$ to 5,012 L kg^{-1}), and much higher than for poultry litter ($K_d \leq 65 \text{ L kg}^{-1}$), showing that the transport of these molecules will only occur in association with the soil particles, possibly reaching superficial water sources. In the case of sulfonamides, sorption coefficients were relatively low ($K_d = 0.7$ to 70.1 L kg^{-1}), showing their leaching potential in the soil profile. Texture and cation exchange capacity greatly affected the sorption of sulfonamides and fluoroquinolones to soils, emphasizing the importance of ion exchange processes on the sorption of antibiotics in tropical soils. In New Zealand soils, with a higher buffer capacity, sorption of fluoroquinolones was also high, but lower than to Brazilian soils, and the addition of poultry litter to soil reduced the sorption potential of these compounds. Fluoroquinolones dissipation varied considerably ($\text{DT}_{50} = 16$ to >70 days), being faster in sub-surface samples despite its lower biological activity. Antibiotics are routinely used in animal production, representing a potential source of pollution to the environment that has been largely ignored and should be further investigated in Brazil.

Key-words: Animal production. Veterinary antibiotics. Environmental contamination. Organic pollutants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Revisao da Literatura.....	19
1.1.1 Produção Animal no Brasil	19
1.1.2 Uso de Antibióticos na Produção Animal	20
1.1.3 Vias de Entrada e Ocorrência de Antibióticos no Ambiente.....	21
1.1.4 Comportamento e Dinâmica de Antibióticos no Ambiente.....	29
1.1.5 Impacto dos Antibióticos a Organismos Terrestres e Aquáticos.....	35
1.1.6 Necessidades e Perspectivas da Pesquisa nos Ambientes Tropicais	41
1.1.7 Considerações	42
Referências	43
2 ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS DE SOLO E CAMA DE FRANGO.....	51
2.1 Introdução	53
2.2 Material e Métodos	54
2.2.1 Descrição dos métodos testados	54
2.2.2 Escolha dos compostos em estudo	56
2.2.3 Reagentes e Padrões Analíticos.....	57
2.2.4 Fortificação das Amostras de Solo e Cama de Frango.....	57
2.2.5 Análises por cromatografia líquida (HPLC-FLD).....	58
2.2.6 Otimização das condições cromatográficas.....	58
2.2.7 Validação da metodologia analítica.....	60
2.3 Resultados e Discussão.....	60
2.3.1 Recuperação obtida nos métodos testados.....	60
2.3.2 Validação de metodologia analítica.....	62

2.3.2.1 Seletividade.....	62
2.3.2.2 Curva Analítica, linearidade e sensibilidade.....	65
2.3.2.3 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	65
2.3.2.4 Precisão	66
2.3.2.5 Exatidão	67
Referências.....	69
3 OCORRÊNCIA E SORÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS DE CAMA DE FRANGO E SOLO	71
3.1 Introdução	73
3.2 Material e Métodos	74
3.2.1 Reagentes e padrões analíticos.....	74
3.2.2 Amostras de solo e de cama de frango.....	75
3.2.3 Procedimentos de Extração	75
3.2.4 Análises por cromatografia líquida (HPLC-FLD)	76
3.2.5 Sorção e Desorção.....	77
3.3 Resultados e Discussão	78
3.3.1 Sorção e dessorção	78
3.3.2 Concentrações ambientais de fluoroquinolonas.....	85
3.4 Conclusões	88
Referências.....	88
4 ATRIBUTOS DO SOLO E A SORÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS E SULFONAMIDAS EM SOLOS BRASILEIROS	91
4.1 Introdução	93
4.2 Materiais e Métodos.....	96
4.2.1 Solos.....	96
4.2.2 Reagentes e padrões analíticos.....	98
4.2.3 Experimentos de sorção	98
4.2.4 Análises por cromatografia líquida	99

4.3 Resultados.....	100
4.3.1 Sorção de fluoroquinolonas e sulfonamidas.....	100
4.3.2 Interações entre atributos do solo e sorção.....	102
4.4 Discussão.....	107
4.4.1 Atributos de solo influenciando a sorção das fluoroquinolonas.....	107
4.3.2 Atributos de solo influenciando a sorção das sulfonamidas.....	108
4.5 Conclusões.....	110
Referências	111
5 DISSIPACÃO E SORÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS EM SOLOS DA NOVA ZELÂNDIA	114
5.1 Introdução.....	116
5.2 Material e Métodos.....	117
5.2.1 Reagentes e padrões analíticos	117
5.2.2 Amostras de Solo e Cama de Frango	118
5.2.3 Experimentos de Sorção	119
5.2.4 Experimentos de Degradação	120
5.2.5 Atividade da enzima desidrogenase (DHA)	121
5.2.6 Extração e análises cromatográficas.....	121
5.3 Resultados e Discussão.....	122
5.3.1 Degradação	122
5.3.2 Sorção	126
5.4 Conclusões.....	131
Referências	132

1 INTRODUÇÃO

A produção animal é uma das atividades mais expressivas do agronegócio brasileiro. A fim de assegurar a produtividade e a competitividade do setor, a utilização de medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia é uma prática bastante comum. Dentre os medicamentos utilizados, os agentes antibióticos correspondem a uma das classes mais prescritas (THIELE-BRUHN, 2003). Atualmente, o Ministério da Agricultura autoriza o uso de cerca de 15 compostos antimicrobianos como aditivos na alimentação animal e outros 50 para fins terapêuticos, muitos dos quais de uso comum entre as diversas espécies animais, tais como bovinos, suínos, aves, cães, caprinos etc. (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2006).

Os órgãos regulamentadores e de pesquisa têm dado atenção especial aos riscos à saúde humana representados pela exposição direta aos resíduos de antibióticos presentes em alimentos de origem animal, considerando-se para isso os valores de Ingestões Diárias Aceitáveis (IDA) e Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos para estes produtos (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2006). Entretanto, a extensão e as possíveis implicações à saúde humana da exposição indireta a resíduos de antibióticos, via ambiente, ainda são pouco conhecidas (CAPLETON et al., 2006).

Uma série de estudos recentes sobre o tema, conduzidos quase que integralmente no exterior, tem detectado a presença destas substâncias, em pequenas concentrações (ng L^{-1} ou kg^{-1} a mg L^{-1} ou kg^{-1}), em diferentes matrizes ambientais, tais como excretos animais, lagoas de tratamento de resíduos de origem animal, solos e águas superficiais e subterrâneas (HIRSCH et al., 1999; THIELE-BRUHN, 2003; BOXALL et al., 2006; MARTÍNEZ-CABALLO et al., 2007). A ocorrência destes compostos no ambiente pode impactar negativamente organismos aquáticos e terrestres (toxicidade crônica ou aguda), além de exercer possível influência no aumento da resistência de microrganismos aos agentes antibióticos (KEMPER, 2008).

Muitos dos antibióticos administrados não são plenamente metabolizados no organismo animal, sendo excretados na urina e nas fezes, tanto na forma do composto original ou já parcialmente metabolizados (HALLING-SØRENSEN et al., 1998; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; KEMPER, 2008). A utilização de excretos animais e do lodo de esgoto para fins de adubação consiste numa das principais vias de disseminação destes compostos no ambiente (CHRISTIAN et al., 2003). Uma vez no ambiente, os resíduos de antibióticos podem acumular no solo, sofrer lixiviação ou ainda ser transportados, via escoamento

superficial, para os corpos hídricos (DÍAZ-CRUZ; ALDA; BARCELÓ, 2003). Além disso, alguns destes resíduos presentes no solo podem ser absorvidos e se acumular nos tecidos vegetais, resultando em risco à saúde humana quando da colheita e consumo de alimentos de origem vegetal (MIGLIORE; COZZOLINO; FIORI, 2003; BOXALL et al., 2006).

O destino e o comportamento ambiental destes compostos, assim como de outros xenobióticos, são influenciados por uma variedade de fatores, tais como as propriedades físico-químicas da molécula e do solo, além das condições ambientais e de manejo prevalentes (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; KEMPER, 2008). Por exemplos, as fluoroquinolonas tendem a persistirem no solo devido ao seu elevado potencial de sorção ($K_d = 260-5012 \text{ L kg}^{-1}$). Já as sulfonamidas podem ser facilmente transportadas até os cursos d'água, devido ao seu baixo potencial de sorção aos sítios de troca orgânicos e/ou minerais do solo ($K_d = 0,2 \text{ a } 2 \text{ L kg}^{-1}$), enquanto a tilosina é rapidamente degradada pela microbiota do solo (meia-vida < 8 dias) (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

Conhece-se muito pouco sobre os efeitos em diferentes organismos da exposição no longo prazo a baixas concentrações destes compostos (BOXALL, 2004). No ambiente, organismos aquáticos e terrestres estão expostos a ampla gama de moléculas residuais (JØRGENSEN; HALLING-SØRENSEN, 2000), que podem interagir entre si, manifestando efeitos aditivos, antagônicos, sinérgicos etc. (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

Apesar da importância da produção animal para o agronegócio brasileiro, o Brasil carece de pesquisas na área, não dispondo, entre outros, de levantamentos sobre a ocorrência de resíduos dos principais antibióticos de uso veterinário no ambiente, seus possíveis efeitos sobre o ecossistema e/ou tampouco qualquer estudo a respeito da dinâmica destes compostos em nossos solos, que apresentam, no geral, altas taxas de intemperismo e baixa fertilidade natural. Além disso, o Brasil apresenta condições de clima bastante distintas das regiões temperadas, onde a grande maioria dos estudos disponíveis na literatura foi realizada.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi obter informações preliminares sobre a ocorrência e aspectos do comportamento ambiental em condições tropicais de antibióticos de uso veterinário, comumente empregados em todo o mundo. Complementado o trabalho realizado no Brasil, estudou-se ainda o comportamento ambiental (ensaios de dissipação e sorção) de antibióticos de uso veterinário (fluoroquinolonas) em solos neozelandeses. Os objetivos específicos foram: (i) adaptar e validar metodologia analítica para quantificação de resíduos de quatro fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina e enrofloxacina) em solos e cama de frango; (ii) avaliação de amostras de solo e cama de frango coletadas regionalmente quanto à presença de resíduos de fluoroquinolonas;

(iii) avaliação do potencial de sorção e dessorção de fluoroquinolonas em amostras de cama de frango, solo e solo fertilizado com cama de frango; (iv) avaliação da influência dos atributos de solo no potencial de sorção de fluoroquinolonas e sulfonamidas em solos representativos do Estado de São Paulo.

1.1 Revisao da Literatura

1.1.1 Produção Animal no Brasil

As exportações do agronegócio brasileiro somaram US\$ 76,4 bilhões no ano de 2010, contra um total de US\$ 58,4 bilhões em 2007, o que correspondeu a 37,9 % do total das exportações brasileiras. O setor de carnes totalizou 17,8% das vendas externas, ficando atrás apenas das exportações oriundas dos complexos soja e sucroalcooleiro, com 22 e 18%, respectivamente. Atualmente, o país detém o posto de segundo produtor mundial de carne bovina e de terceiro em carne de frango, sendo o maior exportador mundial destes produtos; além do quarto lugar na produção e exportação de carne suína (FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO, 2011). Ademais, a aquicultura, em especial a carcinocultura e a criação de tilápias, encontra-se em fase de franca consolidação, com amplo potencial de crescimento (FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO, 2011).

A produção e a exportação de carnes no país cresceram nitidamente a partir de 2002 (Tabela 1.1), ilustrando a importância deste segmento dentro da economia nacional. A expectativa é de que o país supra aproximadamente 44,5% do mercado mundial de carnes até 2020, mantendo sua posição de primeiro exportador mundial de carnes bovina e de frango (BRASIL). Isto ratifica o Brasil como um dos principais líderes do setor, importância esta que deverá se manter ao longo dos próximos anos.

Tabela 1.1 – Evolução da produção e exportação brasileira de carnes bovina, suína e de frango

Produção Brasileira (em mil toneladas)										
Origem animal	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011*
Bovinos	6952	7159	7577	8151	8544	7808	7431	7618	7778	7505
Suínos	2565	2560	2600	2710	2830	2990	3015	3130	3170	3260
Frango	7499	7645	8408	9350	9355	10305	11033	11023	11420	11750
Exportação Brasileira (em mil toneladas)										
Bovinos	929	1208	1630	1857	2100	2194	1829	1611	1547	1795
Suínos	590	603	621	761	639	730	625	707	625	640
Frango	1577	1903	2416	2739	2502	2922	3242	3222	3350	3450

* Os dados referentes ao ano de 2011 são estimados. Fonte: FNP Consultoria e Comércio (2011).

1.1.2 Uso de Antibióticos na Produção Animal

Poucos países dispõem de estatísticas abrangentes a respeito das quantidades de fármacos veterinários utilizados nas criações animais (DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2007). No entanto, estima-se que mais de 70% destes compostos sejam agentes antibióticos (THIELE-BRUHN, 2003). Nos EUA, anualmente, são comercializados cerca de 11 milhões de kg de agentes antimicrobianos para a produção animal, sendo quase metade deste montante destinado à avicultura (UCS, 2001). Neste mesmo país, em 1999, foram utilizados cerca de 9,3 milhões de kg de antibióticos para a produção animal, sendo 87% deste total destinado a usos terapêuticos e o restante para promover maior eficiência alimentar e crescimento animal (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Já na Europa, neste mesmo período, o montante consumido foi da ordem de 3,9 milhões de kg (KOOLS; MOLTMANN; KNACKER, 2008).

Numa estimativa de 2004, cerca de 4,6 milhões de kg de antibióticos foram destinados à produção animal nos países da comunidade européia, sendo que as tetraciclina, os β -lactâmicos e as cefalosporinas foram os produtos mais consumidos (KOOLS; MOLTMANN; KNACKER, 2008). Na Coreia do Sul, neste mesmo ano, foram consumidos 1,4 milhões de kg de antibióticos de uso veterinário (KIM et al., 2008). No Reino Unido, em 2000, os grupos

farmacológicos mais empregados foram as tetraciclina, seguidas das sulfonamidas, β -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006), enquanto que os ingredientes ativos mais comercializados, em ordem decrescente, foram a amoxicilina, a sulfadiazina, a oxitetraciclina, a penicilina e a clortetraciclina (BOXALL et al., 2002a). Já na produção de suínos nos EUA, os antibióticos mais frequentemente utilizados foram a tilosina, a clortetraciclina e a bacitracina (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

No Brasil, de forma geral, não existem estatísticas a respeito das quantidades de antibióticos comercializadas para a produção animal. Dentre as poucas fontes de informações existentes, a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná realizou um estudo qualitativo sobre a comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte, o qual revelou o uso de 126 produtos comerciais, com 49 diferentes princípios ativos (SESA, 2005). No referido estudo, os grupos de medicamentos preventivos mais citados foram: fluoroquinolonas (34%), ionóforos (20%), macrolídeos (10%), quinolonas e tetraciclina (6%), sulfonamidas (4%) e lincosamidas (3%); enquanto que os grupos de medicamentos terapêuticos mais citados foram: ionóforos (25%), fluoroquinolonas (19%), sulfonamidas (14%), tetraciclina (11%), β -lactâmicos (7%), macrolídeos (5%) e aminoglicosídeos (4%). Em termos dos compostos, os ingredientes ativos preventivos mais utilizados foram: enrofloxacina, avilamicina, lasalocida, ciprofloxacina, fosfomicina, clortetraciclina, sulfadiazina + trimetropina, ácido 3-nitro, virginiamicina, lincomicina, norfloxacina e tilosina; enquanto que os ingredientes ativos para fins terapêuticos mais utilizados foram: norfloxacina, enrofloxacina, monensina, sulfadiazina + trimetropina, avilamicina, amoxicilina, clortetraciclina, sulfaclosporidazina + trimetropina, maduramicina, nicarbazina, neomicina, tiamulina e tilmicosina.

Este mesmo levantamento também constatou algumas irregularidades: o uso das tetraciclina e olaquinox como promotores de crescimento; o uso das tetraciclina, penicilina e sulfonamidas como terapêuticos e; o uso de tiamulina, ciprofloxacina, olaquinox, norfloxacina e enrofloxacina como promotores de crescimento. Todas estas formas de uso são proibidas pelo Ministério da Agricultura (MAPA).

1.1.3 Vias de Entrada e Ocorrência de Antibióticos no Ambiente

O uso de fármacos na aquicultura e no trato de criações animais intensivas (bovinos, suínos e aves) representa a principal via de entrada de antibióticos no ambiente, podendo

ocasionar a contaminação tanto de ambientes aquáticos quanto terrestres (BOXALL et al., 2003). Nas criações animais, os antibióticos podem atingir diretamente o ambiente através das excreções dos animais em pastejo ou, então, podem ser indiretamente disseminados ao ambiente através da aplicação de esterco animal no solo (BLACKWELL; KAY; BOXALL, 2007). Por outro lado, os antibióticos empregados na aquicultura são liberados diretamente nas águas superficiais, onde uma carga elevada de resíduos de antibióticos pode acumular nos sedimentos, com potencial de afetar negativamente o ecossistema aquático (ALEXY et al., 2004). Convém salientar que existe ainda a possibilidade de que os antibióticos atinjam o ambiente pela disposição final de medicamentos não usados ou fora da validade, mas, ao que parece, esta não parece ser uma fonte importante de contaminação ambiental (BOXALL et al., 2003).

A quantidade de antibióticos excretada varia com o tipo de substância, a dosagem, a espécie e a idade animal, dentre outros fatores (KEMPER, 2008). Não obstante, até 95% dos ingredientes ativos administrados aos animais podem ser integralmente eliminados sem sofrer qualquer metabolização no trato digestivo animal (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Mesmo quando a molécula é em grande parte metabolizada, alguns dos produtos de degradação excretados podem permanecer bioativos (THIELE-BRUHN, 2003). Num panorama geral sobre a intensidade de metabolismo dos principais grupos de antibióticos no organismo animal, verifica-se que as tetraciclinas e os macrolídeos apresentam baixa taxa de metabolismo (< 20% da dose administrada, Tabela 1.2), enquanto que as lincosamidas, as fluoroquinolonas e as sulfonamidas apresentam moderada a elevada taxa de metabolismo (> 20% da dose). Já os aminoglicosídeos apresentam comportamento bastante variável (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Taxa de metabolismo dos principais grupos de antibióticos empregados na produção animal

Grupo Farmacológico	Taxa de Metabolismo no Organismo Animal ¹
Tetraciclínas	Baixa
Macrolídeos	Baixa
Aminoglicosídeos	Baixa a Elevada
Lincosamidas	Moderada
Fluoroquinolonas	Moderada a Elevada
Sulfonamidas	Elevada

¹ Baixa: < 20%; Moderada: de 20 a 80%; Elevada: > 80% da dose administrada.

Fonte: BOXALL et al. (2004).

As principais vias de contaminação de ambientes terrestres e aquáticos aos resíduos de fármacos de uso veterinário são apresentadas na Figura 1.1. Uma vez no solo, a lixiviação, o escoamento superficial e a erosão podem transportar adiante estes resíduos, atingindo os cursos d'água (HIRSCH et al., 1999). Além disso, pequenas concentrações de antibióticos, de uso humano e animal, são comumente encontradas em amostras de lodo ou efluente provenientes de estações de tratamento de esgoto dos centros urbanos (WATKINSON; MURBY; COSTANZO, 2007). A disposição final destes efluentes nos cursos d'água, ou o aproveitamento agrícola do efluente ou do lodo como fertilizantes orgânicos, representam importante fonte de exposição do ambiente a uma ampla gama de fármacos de uso humano e/ou animal (GIGER et al., 2003; KIM et al., 2007).

Resíduos de diversos fármacos de uso veterinário têm sido detectados em amostras de solo (HAMSCHE; SCZESNY; HÖPER, 2002; HEBERER, 2002; THIELE-BRUHN, 2003; MARTÍNES-CARBALLO et al., 2007), água superficial (HIRSCH et al., 1999; KOLPIN et al., 2002) e lençol freático (HIRSCH et al., 1999; CAMPAGNOLO et al., 2002). Informações sobre a ocorrência e as concentrações médias de resíduos dos principais antibióticos veterinários em diferentes matrizes ambientais encontram-se na Tabela 1.3. De forma geral, as concentrações ambientais são relativamente baixas (ng ou µg por kg⁻¹ ou L⁻¹), sendo consideradas insuficientes para ocasionar efeitos tóxicos agudos aos organismos expostos (BOXALL et al., 2003). No entanto, concentrações na faixa de mg kg⁻¹ foram

reportadas para compostos com alta afinidade às partículas sólidas, tal como os resíduos de fluoroquinolonas em sedimento (YANG et al., 2010), esterco animal (ZHAO; DONG; WANG, 2010) e lodo de esgoto (GOLET et al., 2003).

Ainda se conhece pouco sobre qual(ais) o(s) efeito(s) crônico(s) da exposição a baixas concentrações destes resíduos em longo prazo; qual(ais) o(s) efeito(s) em espécies que não as poucas já estudadas; qual(ais) o(s) impacto(s) ambientais oriundos dos produtos de degradação destes antibióticos (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; DING; HE, 2010). Efeitos tóxicos crônicos podem ocorrer mesmo para fármacos de baixa persistência no ambiente (meia-vida < 5 dias), considerando-se que tais compostos sejam continuamente usados e liberados no ambiente (DAUGHTON; TERNES, 1999).

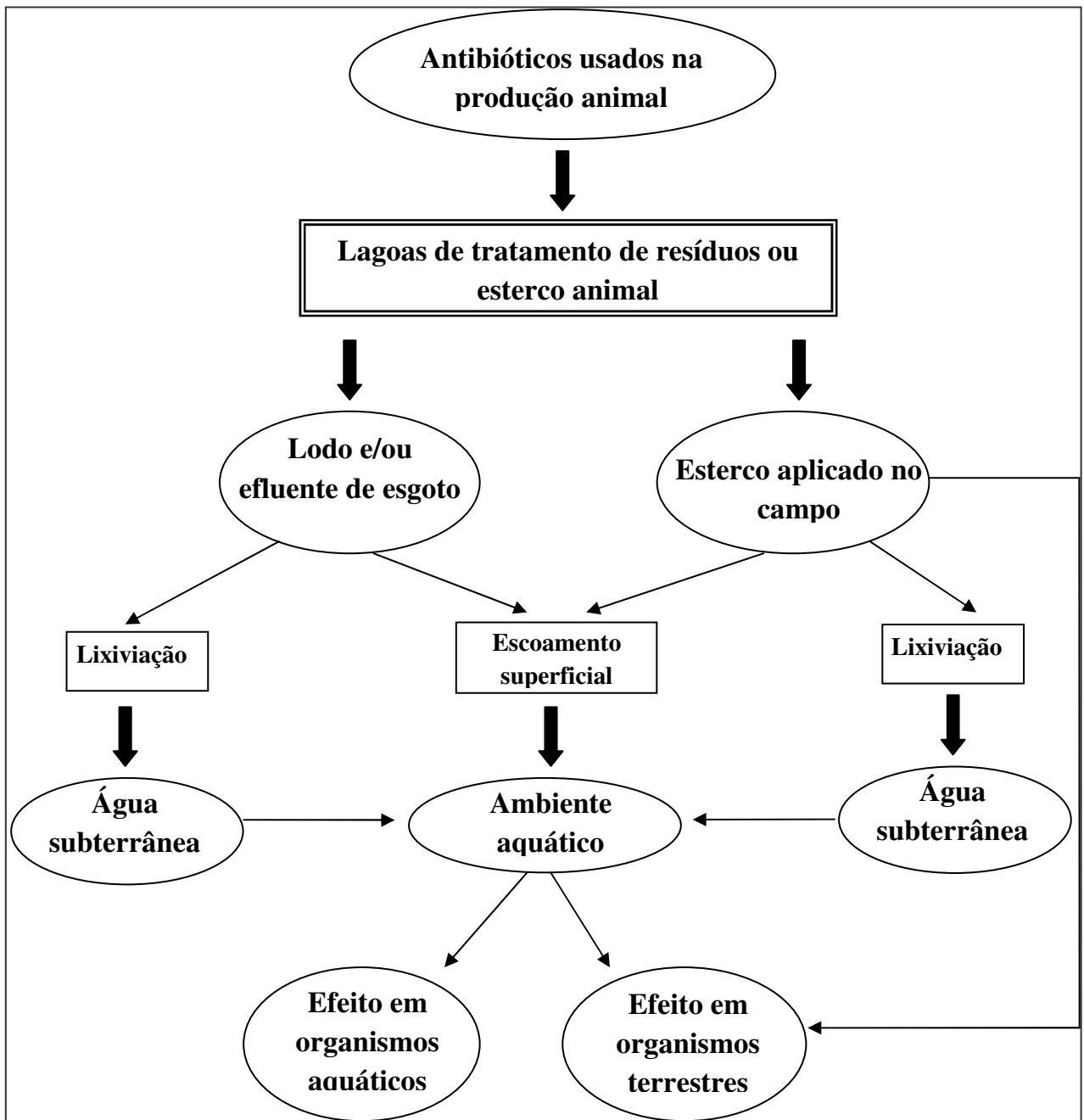


Figura 1.1 - Principais vias de exposição ambiental aos fármacos de uso veterinário. Adaptado Sarmah, Meyer e Boxall (2006)

Tabela 1.3 – Ocorrência dos Principais Antibióticos de Uso Veterinário no Ambiente

Grupo Farmacológico	Antibiótico	Concentrações Médias	Matriz	Localidade	Referência
β-lactâmicos	Amoxicilina	< 10 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
	Piperacilina	até 15 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	0,28 µg kg ⁻¹	Esterco Animal	Reino Unido	Boxall et al. (2005)
		5ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
	Enrofloxacina	2,8 mg kg ⁻¹	Esterco de Frango	Áustria	Martínez-Carballo et al.(2007)
Macrolídeos	Azitromicina	até 13 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
	Claritromicina	até 20 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
	Clindamicina	até 30 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
	Eritromicina	até 300 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
		até 1,70 µg L ⁻¹	Água Superficial	Alemanha	Hirsch et al. (1999)
	Roxitromicina	até 30 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
	Tilosina	90 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
	Lincomicina	8,5 µg kg ⁻¹	Solo	Reino Unido	Boxall et al. (2005)
		21,1 µg L ⁻¹	Água Superficial	Reino Unido	Boxall et al. (2005)
Sulfonamidas	Trimetoprina	até 71 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
		até 0,20 µg L ⁻¹	Água Superficial	Alemanha	Hirsch et al. (1999)
		até 17mg kg ⁻¹	Esterco de Frango	Áustria	Martínez-Carballo et al. (2007)
		0,5 µg kg ⁻¹	Solo	Reino Unido	Boxall et al. (2005)

continua

conclusão

Grupo Farmacológico	Antibiótico	Concentrações Médias	Matriz	Localidade	Referência
Sulfonamidas	Sulfametoxazole	até 98 ng L ⁻¹	Água Superficial	Noroeste Alemanha	Christian et al. (2003)
		0,22 µg L ⁻¹	Água Subterrânea	EUA	Lindsey; Meyer; Thurman (2001)
		1,02 µg L ⁻¹	Água Superficial	EUA	Lindsey; Meyer; Thurman (2001)
		0,47 µg L ⁻¹	Água Subterrânea	Alemanha	Hirsch et al (1999)
	Sulfadimetoxina	0,06-15 µg L ⁻¹	Água Superficial	EUA	Lindsey; Meyer; Thurman (2001)
		390 µg kg ⁻¹	Esterco Bovino	Itália	De Liguoro et al. (2007)
	Sulfametazina	0,22 µg L ⁻¹	Água Superficial	EUA	Lindsey; Meyer; Thurman (2001)
		0,16 µg L ⁻¹	Água Subterrânea	Alemanha	Hirsch et al. (1999)
		2 µg kg ⁻¹	Solo	Alemanha	Hamscher et al. (2005)
		1,2 mg kg ⁻¹	Planta (Milho)	EUA	Dolliver et al. (2007)
	Sulfatiazole	0,08 µg L ⁻¹	Água Superficial	EUA	Lindsey; Meyer; Thurman (2001)
	Sulfadiazina	51 mg kg ⁻¹	Esterco de Frango	Áustria	Martinez-Carballo et al. (2007)
		91 mg kg ⁻¹	Esterco de Peru		
Tetracilinas	Clortetraciclina	0,15 µg L ⁻¹	Água Superficial	EUA	Lindsey; Meyer; Thurman (2001)
		4,6-7,3 µg kg ⁻¹	Solo (0-30 cm)	Norte Alemanha	Hamscher; Sczesny; Höper (2002)
		até 46 mg kg ⁻¹	Esterco de Suíno	Áustria	Martínez-Carballo et al. (2007)
	Oxitetraciclina	0,07-1,34 µg L ⁻¹	Água Superficial	EUA	Lindsey; Meyer; Thurman (2001)
		71,7 µg L ⁻¹	Runoff	Inglaterra	Kay; Blackwell; Boxall (2005a)
		27 µg kg ⁻¹	Solo	Noroeste Alemanha	Pawelzick et al. (2004)
		até 29 mg kg ⁻¹	Esterco de Suíno	Áustria	Martínez-Carballo et al. (2007)

Clortetraciclina, oxitetraciclina, enrofloxacin, amoxicilina, florfenicol, lincomicina, tilosina, sulfadiazina, e trimetoprima são algumas das moléculas de antibióticos que apresentam alto potencial de disseminação no ambiente, devido ao uso em criações animais intensivas e, ou, na aquicultura, à rota de administração principalmente tópica ou oral e às baixas taxas de metabolismo no organismo animal (BOXALL et al., 2003). No Reino Unido, em estudo recente, amoxicilina, benzilpenicilina, trimetoprima e sulfadiazina foram algumas das substâncias classificadas como prioritárias para realização de estudos de monitoramento ambiental, devido ao uso intenso, ao potencial de transporte no ambiente e à toxicidade destes compostos (CAPLETON et al., 2006). Na Coreia do Sul, 20 fármacos de uso veterinário foram selecionados como altamente prioritários para fins de monitoramento no meio aquático, sendo a grande maioria pertencente à classe dos antibióticos, como, por exemplo, amoxicilina, florfenicol, oxitetraciclina, tilosina e virginamicina (KIM et al., 2008).

Na Alemanha, resíduos de antibióticos do grupo das tetraciclina, β -lactâmicos e fluoroquinolonas foram detectados em poucas ou mesmo nenhuma das amostras de água analisadas, devido à forte sorção que as tetraciclina apresentam às partículas orgânicas e, ou, minerais do solo/sedimento e à baixa estabilidade dos β -lactâmicos no ambiente (CHRISTIAN et al., 2003). Outra hipótese aventada para a ausência de tetraciclina foi a sua elevada taxa de fotodegradação, com valores de meia-vida de apenas algumas horas (WEBB, 2004). Em contrapartida, nessas mesmas amostras, resíduos de moléculas do grupo das sulfonamidas, macrolídios e lincosamidas foram detectados com maior frequência (CHRISTIAN et al., 2003). A origem destes resíduos foi atribuída à disposição de esgoto tratado nos cursos d'água.

Muitos dos ingredientes ativos (antibióticos) de uso rotineiro nas criações animais não foram ainda investigados quanto ao seu potencial de atingir o ambiente, seu comportamento e possível impacto ambiental (DÍAZ-CRUZ; ALDA; BARCELÓ, 2003; BOXALL et al., 2003). No ambiente, coexistem as moléculas originais e seus metabólitos, sendo que os metabólitos são, geralmente, menos tóxicos que a molécula original. No entanto, em alguns casos, como para a tetraciclina, os produtos de degradação podem ser tão ou até mesmo mais tóxicos que o composto original (HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; TJØRNELUND, 2002; BOXALL, 2004), o que ilustra a importância de se compreender detalhadamente o comportamento e a dinâmica dos agentes antimicrobianos e de seus resíduos no ambiente.

1.1.4 Comportamento e Dinâmica de Antibióticos no Ambiente

O comportamento e o destino dos compostos antimicrobianos no ambiente são regulados por uma gama de processos físicos, químicos e biológicos, o que também se aplica a outros xenobióticos. Após o composto de interesse atingir o solo, os processos de sorção, transformação (degradação) e transporte (lixiviação e escoamento superficial) serão os principais responsáveis em ditar seu destino final no ambiente (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Estes processos são, por sua vez, governados pelas propriedades físico-químicas da molécula do antibiótico (estrutura molecular, tamanho, forma, solubilidade, especiação, hidrofobicidade etc.) e do solo (pH, textura, matéria orgânica etc.), além também das condições edafo-climáticas locais (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; KEMPER, 2008).

Os valores de algumas propriedades físico-químicas dos principais grupos de antibióticos de uso veterinário estão apresentados na Tabela 1.4. Esses compostos são representados por moléculas anfóteras, com vários grupos funcionais ionizáveis (diferentes valores de pK_a), massas molares bastante variáveis (172 a 916 g mol⁻¹) e baixos potenciais de volatilização (constante de Henry $< 4,1 \times 10^{-8}$ Pa m³ mol⁻¹, pressão de vapor $< 1,1 \times 10^{-11}$ mm Hg). Em relação aos pesticidas, que são as moléculas mais estudadas do ponto de vista de comportamento ambiental, os antibióticos apresentam, de forma geral, maiores valores de solubilidade em água e menores valores de coeficiente de partição octanol-água (Log K_{ow}), provavelmente devido à presença de grupos funcionais ionizáveis, o que sugere que essas moléculas apresentam menor potencial de bioacumulação e maior mobilidade no solo, devido a seu menor caráter hidrofóbico.

Tabela 1.4 - Valores de algumas propriedades físico-químicas dos principais grupos de antibióticos em uso na produção animal

Grupo Farmacológico	Massa Molar	Solubilidade em água	Log K_{ow}	pK_a (25°C)	Constante de Henry	Pressão de Vapor
	g mol ⁻¹	mg L ⁻¹			Pa m ³ mol ⁻¹	mm Hg
Tetraciclinas	444,5 a 527,6	230 a 52.000	-1,3 a 0,05	3,3 / 7,7 / 9,3	1,7 x 10 ⁻²³ a 4,8 x 10 ⁻²²	1,6 x 10 ⁻²⁸ a 6,3 x 10 ⁻³⁰
Sulfonamidas	172,2 a 300,3	7,5 a 1.500	-0,1 a 1,7	2 a 3 / 4,5 a 10,6	1,3 x 10 ⁻¹² a 1,8 x 10 ⁻⁸	1,1x10 ⁻¹¹ a 3,6 x10 ⁻¹¹
Aminoglicosídeos	332,4 a 615,6	10 a 500	-8,1 a -0,8	6,9 a 8,5	8,5 x 10 ⁻¹² a 4,1 x 10 ⁻⁸	1,6 x 10 ⁻²⁸
β-lactâmicos	334,4 a 470,3	22 a 10.100	0,9 a 2,9	2,7	2,5 x 10 ⁻¹⁹ a 1,2 x 10 ⁻¹²	1,7 x 10 ⁻¹⁸ a 1,2x 10 ⁻¹⁹
Macrolídeos	687,9 a 916,1	0,45 a 15	1,6 a 3,1	7,7 a 8,9	7,8 x 10 ⁻³⁶ a 2,0 x 10 ⁻²⁶	nd ¹
Fluoroquinolonas	229,5 a 417,6	3,2 a 17.790	-1,0 a 1,6	8,6	5,2 x 10 ⁻¹⁷ a 3,2 x 10 ⁻⁸	2,1 x10 ⁻¹³ a 8,4x 10 ⁻¹⁴

*¹ nd= não disponível

Fonte: Thiele-Bruhn (2003); Sarmah, Meyer e Boxall, (2006) e Park e Choi (2008)

Algumas moléculas de antibióticos são mais hidrofóbicas (ou menos polares, como é o caso de alguns macrolídeos e β-lactâmicos), enquanto outras são bastante solúveis e/ou se dissociam a valores de pH encontrados no ambiente (ou mais polares, como é o caso das tetraciclinas e alguns β-lactâmicos), apresentando com isso diferentes potenciais de sorção (K_d e K_{oc} , onde K_d = coeficiente de sorção e K_{oc} = coeficiente de sorção normalizado em relação ao teor de carbono orgânico do solo, sendo que $K_{oc} = K_d \times 100 / \%C_{org}$) e de mobilidade no solo (THIELE-BRUHN, 2003), conforme pode ser observado na Tabela 1.5. Além disso, um mesmo composto pode apresentar potencial de sorção bastante variável dependendo das propriedades físico-químicas dos solos (BOXALL et al., 2004), em especial o pH da solução do solo e a quantidade e qualidade da matéria orgânica e dos minerais presentes na fração argila (THIELE-BRUHN, 2003). A enrofloxacin, por exemplo, apresenta coeficientes de sorção (K_d) que variam em até 30 vezes para diferentes classes de solos

(BOXALL et al., 2004). Apesar dessa variação, os o seu potencial de sorção é sempre alto ($K_d \gg 5 \text{ L kg}^{-1}$), conferindo a molécula um baixo potencial de mobilidade no perfil do solo. No entanto, a enrofloxacin pode ser carregada junto aos sedimentos do solo durante processos erosivos.

Tabela 1.5 - Coeficientes de adsorção e persistência no solo dos principais antibióticos

Composto	Textura/Matriz	pH	C_{org}	K_d	K_{oc}	Meia-Vida
			%	L kg^{-1}	L kg^{-1}	d
Clortetraciclina	franco argilosa, franco arenosa	-	-	1280 a 2386	-	> 30
Enrofloxacin	argilosa	4,9	1,63	3037	186340	-
Tilosina	franco argilosa, franco arenosa	-	2,2 a 4,4	66 a 92	-	< 8
Sulfadiazina	Solo, argila, fração areia	6,7 a 7,0	1,6 a 4,4	1,4 a 2,8	37 a 125	-
Benzilpenicilina	-	-	-	-	-	< 3 h
Procaína	-	-	-	-	-	< 3 h
Virginiamicina	-	-	-	-	-	> 64

Fonte: Sarmah, Meyer e Boxall (2006) e Boxall et al. (2002a).

Em resumo, pode-se dizer que compostos mais móveis e com relativa persistência ($K_d < 5 \text{ L kg}^{-1}$ e $t_{1/2} > 21$ dias), como a sulfadiazina (Tabela 1.5), podem ser lixiviados e atingir o lençol freático, ou as águas de drenagem ou de enxurrada; enquanto que aqueles com elevado potencial de sorção ($K_d > 5 \text{ L kg}^{-1}$), como a clortetraciclina e a enrofloxacin (Tabela 1.5), tendem a se acumular nas camadas superficiais do solo, onde a taxa de dessorção torna-se relevante no entendimento de seu comportamento ambiental, principalmente no que se refere à sua remobilização à microbiota do solo. Apesar das quantidades sorvidas variarem largamente conforme as diferentes classes de solo, antibióticos do grupo das tetraciclins e fluoroquinolonas apresentam elevados coeficientes de sorção a esta matriz ($K_d = 70$ a 5000 L kg^{-1}) sendo, portanto, considerados imóveis no perfil de solo (TOLLS, 2001). Já os compostos do grupo das sulfonamidas, como a sulfametazina, apresentaram baixa afinidade às partículas do solo ($K_d = 0,2$ a 2 L kg^{-1}) e, portanto, são considerados móveis no perfil do solo. Isto pode ser ratificado pelas observações de que resíduos de sulfonamidas foram detectados em quatro amostras de águas subterrâneas

(HIRSCH et al., 1999), enquanto que resíduos de tetraciclina não foram encontrados nestas mesmas amostras de águas superficiais ou subterrâneas analisadas (CHRISTIAN et al., 2003). Um estudo com lisímetros avaliou a lixiviação da oxitetraciclina, da sulfacloropiridazina e da tilosina após aplicação de esterco de suíno, mostrando que apenas a sulfacloropiridazina (molécula do grupo farmacológico das sulfonamidas) foi encontrada na água percolada (KAY; BLACKWELL; BOXALL, 2005b).

O valor de K_d para os antibióticos também varia com o tipo de solo. No entanto, as variações nas quantidades sorvidas não estão necessariamente correlacionadas com o teor de carbono orgânico dos solos, como é o caso para a maioria das substâncias orgânicas hidrofóbicas, tais como os pesticidas e outros poluentes aromáticos (TOLLS, 2001; BOXALL et al., 2003). Tal fato se justifica em razão dos agentes antibióticos serem, em geral, moléculas grandes, complexas e com grupos multifuncionais ionizáveis em valores de pH ambientalmente relevantes (CUNNINGHAM, 2004), o que restringe a importância do papel da partição hidrofóbica no processo de sorção. Portanto, apesar da sorção dos antibióticos à fração orgânica do solo ser mais relevante do que aos minerais de argila, o uso do valor de K_{oc} que normaliza o coeficiente de sorção exclusivamente ao teor de carbono orgânico do solo, como forma de expressar o potencial de sorção do produto independentemente da influência do solo, parece não ser adequado para os antibióticos, ou pelo menos não para a maioria deles, que compreendem moléculas polares ionizáveis a valores de pH normalmente encontrados no ambiente (THIELE-BRUHN, 2003).

A literatura enfatiza a importância que os mecanismos de troca catiônica, a adsorção às superfícies dos minerais de argila, as reações de complexação com íons metálicos e a formação de ligações de hidrogênio têm para a sorção de antibióticos ao solo (TOLLS, 2001). Para as tetraciclina, por exemplo, o principal mecanismo envolvido na sorção foi a troca catiônica, sendo que o potencial de sorção foi diretamente influenciado pelo pH do meio e pela capacidade de troca de cátions dos minerais de argila predominantes na matriz do solo (SASSMAN; LEE, 2005). A sorção da tetraciclina também foi influenciada pela força iônica do meio, sendo que os maiores potenciais de sorção foram observados na presença de cátions de maior valência (Ca^{+2} ao invés de Na^{+} , por exemplo), devido à formação de complexos entre a tetraciclina e os cátions multivalentes (THIELE-BRUHN, 2003). Já a sorção da norfloxacin em solos tropicais altamente intemperizados, ou seja, com cargas variáveis, diminuiu com a presença de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (ácido cítrico, ácido málico etc.) na solução do solo. Isto se deveu, primariamente, à dissolução e à complexação

do alumínio (Al^{+3}) por estes ácidos orgânicos, o qual competiu pelos sítios de troca catiônica ativos do solo, resultando em menor sorção do antibiótico (ZHANG; DONG, 2008).

As sulfonamidas apresentam caráter ácido em condições naturais de pH e, portanto, os valores de K_d aumentaram consideravelmente (de < 1 a 30 L kg^{-1}) com a diminuição nos valores de pH (de 8 a 4), devido à neutralização de suas moléculas, protonadas em valores menores de pH (THIELE-BRUHN, 2003). Por outro lado, em valores maiores de pH ($> pK_a + 1$), a maioria das moléculas ($> 90\%$) encontra-se na forma aniônica, sendo repelida eletrostaticamente pela superfície coloidal dos solos. A sorção da sulfathiazola à fração orgânica do solo também é largamente influenciada pelo valor do pH, responsável pela especiação iônica dos substratos envolvidos na reação (KAHLE; STAMM, 2007). Neste caso, independentemente dos diferentes substratos orgânicos e tempos de contato avaliados, maiores valores de pH resultaram em menor sorção: K_{oc} de $100\text{-}10000 \text{ kg kg}^{-1}$ para valores de $pH < 5$ e K_{oc} de $10\text{-}1000 \text{ kg kg}^{-1}$ para valores de $pH > 7$ (KAHLE; STAMM, 2007). O potencial de sorção dos antibióticos também varia com a mineralogia do solo, normalmente seguindo a seguinte ordem: caulinita (não expansível, mineral do tipo 1:1) $<$ illita (não expandível, mineral do tipo 2:1) $<$ vermiculita e montmorilonita (expansíveis, minerais do tipo 2:1) (TOLLS, 2001; THIELE-BRUHN, 2003). Isto enfatiza a importância do mecanismo de troca catiônica para a sorção dos antibióticos, uma vez que esta também corresponde à ordem crescente dos minerais quanto à sua capacidade de troca de cátions (CTC).

Outro ponto relevante, porém pouco explorado, refere-se ao fato de que os metabólitos podem ter comportamento sortivo diferenciado, tal qual é o caso dos metabólitos oriundos da degradação da clortetraciclina (THIELE-BRUHN, 2003). Isto se torna particularmente importante quando estes permanecem ainda bioativos no ambiente. Além disso, a solução do solo pode apresentar concentrações elevadas de carbono orgânico dissolvido (COD), sendo que associações dos resíduos de antibióticos com COD podem incrementar a sua mobilidade e transporte (TOLLS, 2001; KAY; BLACKWELL; BOXALL, 2005c). Ademais, a prática de adição de adubos orgânicos (esterco animal, lodo de esgoto, etc.) ao solo pode alterar significativamente o comportamento sortivo dos antibióticos (BOXALL, 2008). Resultados contraditórios são comumente encontrados sobre o efeito desta prática na sorção destes compostos (BOXALL et al., 2002b; SUKUL et al., 2008). De forma geral, o efeito mais importante atribuído aos adubos orgânicos está ligado às alterações que os mesmos podem ocasionar no pH do solo e/ou na quantidade e qualidade da matéria orgânica adicionada

(BOXALL, 2008). Finalizando, sabe-se que mesmo moléculas fortemente sorvidas, como as tetraciclina, podem ser eventualmente transportadas na solução, através do rápido fluxo preferencial que ocorre nos macroporos (THIELE-BRUHN, 2003).

A persistência de xenobióticos no ambiente depende de diversos parâmetros, tais como as condições de oxiredução, temperatura, umidade e atividade microbiana (LOKE et al., 2000). Diversos antibióticos, tais como as tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e olaquinox, são susceptíveis a processos abióticos de degradação, como a hidrólise e a fotodegradação (HALLING-SØRENSEN et al., 2003; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006), sendo que o processo de fotodegradação no solo não parece ser relevante (THIELE-BRUHN, 2003).

A transformação dos antibióticos no solo é geralmente governada pela atividade microbiana, ou seja, muitos destes compostos são sensíveis às reações enzimáticas mediadas pela microbiota do solo (THIELE-BRUHN, 2003). Os macrolídeos, tal como a tilosina, assim como as penicilinas, são moléculas rapidamente degradadas (INGERSLEV; HALLING-SØRENSEN, 2001; THIELE-BRUHN, 2003). As penicilinas são pouco persistentes em razão da baixa estabilidade do anel da molécula, que pode ser quebrado pela enzima β -lactamase, bastante comum em bactérias ou, então, via hidrólise (CHRISTIAN et al., 2003). Por outro lado, concentrações residuais de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ de sulfadimidina e de $390 \mu\text{g kg}^{-1}$ de sulfadimetoxina foram encontradas no solo após 7 meses da fertilização com esterco líquido de porco (CHRISTIAN et al., 2003) e após 3 meses de maturação do esterco bovino (DE LIGUORO et al., 2007), respectivamente, indicando a elevada estabilidade destas moléculas nas matrizes estudadas. As fluoroquinolonas apresentam maior persistência, sendo que concentrações residuais de $0,27$ a $0,30 \text{ mg kg}^{-1}$ de norfloxacin e ciprofloxacina, respectivamente foram encontradas em um solo suíço após 21 meses da aplicação do lodo contaminado (GOLET et al., 2003). Na Turquia, concentrações de até $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ de resíduos de fluoroquinolonas foram encontradas em solos após 7 meses da adubação com esterco de frango ou bovino (KARCI; BALCIÖGLU, 2009).

No caso do ceftiofur, a degradação foi bastante rápida para as amostras de esterco não esterilizadas, sendo que o processo foi inibido nas amostras esterilizadas, ressaltando a importância da atividade microbiana no seu processo de transformação no ambiente (GILBERSTON et al., 1990). A temperatura e o pH do meio também tiveram papéis importantes, uma vez que a taxa de hidrólise do composto aumentou expressivamente com a elevação da temperatura de 22 para 47°C e a sua meia-vida ($t_{1/2}$) aumentou de 4 para 100 dias quando o pH passou de ~ 9 para ~ 5 (GILBERSTON et al., 1990). Já os valores de $t_{1/2}$ do

ivermectin em solos variaram de 7 a 14 dias para o período de verão e de 91 a 217 dias para o período de inverno, reforçando a influência direta da temperatura na maior ou menor persistência deste resíduo no ambiente (HALLEY; VANDEN-HEUVEL; WISLOCKI, 1993). Antibióticos com valores de $t_{1/2} > 60$ dias são considerados muito persistentes (BOXALL et al., 2002a), enquanto que aqueles compostos com $t_{1/2} > 14$ dias podem apresentar problemas ambientais, tais como lixiviação.

Outros pontos relevantes devem também ser considerados: i) a sorção e/ou fixação das moléculas de antibióticos às superfícies organo-minerais ou aos poros da matriz do solo podem torná-las inacessíveis à biodegradação (THIELE-BRUHN, 2003); ii) alguns metabólitos também podem apresentar ação antimicrobiana, conforme verificado para diversos metabólitos das fluoroquinolonas; iii) a taxa de biodegradação em condições de campo pode ser bastante distinta daquela obtida em condições controladas de laboratório, devido à variabilidade, à complexidade e ao dinamismo das interações que ocorrem no campo (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

1.1.5 Impacto dos Antibióticos a Organismos Terrestres e Aquáticos

Thiele-Bruhn (2003) e Sarmah, Meyer e Boxall (2006) sintetizaram as principais referências sobre os efeitos de antibióticos farmacêuticos em organismos terrestres e aquáticos, e em diferentes espécies de plantas. De forma geral, a maioria dos dados de toxicidade disponível na literatura se refere a efeitos agudos decorrentes da exposição em curto prazo, por exemplo, a letalidade, sendo que estes ensaios foram conduzidos em condições de laboratório e, mais importante, em concentrações acima do que seria esperado em condições ambientais reais (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Portanto, pouco se sabe efetivamente sobre os problemas de ecotoxicidade em cenários mais realistas, como em casos de exposição prolongada a baixas dosagens de antibióticos e/ou a mistura de diversos resíduos, assim como se desconhecem os impactos causados pelos metabólitos, uma vez que os mesmos podem também apresentar ação biocida, conforme verificado para os produtos de degradação da enrofloxacin e da tetraciclina (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

Os testes de toxicidade aguda para espécies aquáticas foram conduzidos principalmente com crustáceos e peixes, sendo que as concentrações tóxicas agudas situam-se na faixa de mg L^{-1} (ppm), ou seja, em concentrações muito acima daquelas normalmente encontradas neste tipo de ambiente (ng ou $\mu\text{g L}^{-1}$) (LANZKY; HALLING-SØRENSEN,

1997; MIGLIORI et al., 1997). Para três espécies de algas, os antibióticos amoxicilina e sarafloxina apresentaram concentrações tóxicas (CE_{50}) inferiores a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que as da sulfadiazina, flumequina, ácido oxolínico e oxitetraciclina situaram-se entre $0,1$ a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (HOLTEN-LÜTZHØFT; HALLING-SØRENSEN; JØRGENSEN, 1999).

Wollenberger, Halling-Sørensen e Kusk (2000), avaliando a toxicidade aguda e crônica de nove antibióticos de uso veterinário (incluindo oxitetraciclina, tetraciclina, sulfodiazina e tilosina) em *Daphnia magna*, não observaram efeitos agudos em concentrações ambientalmente relevantes. Os compostos mais tóxicos foram ácido oxolínico e tiamulina, apresentando valores de toxicidade aguda (CE_{50} , 48 h) iguais a $4,6$ e 40 mg L^{-1} , respectivamente. Efeitos tóxicos à reprodução (toxicidade crônica) foram observados para oxitetraciclina, sulfadiazina, tetraciclina e tiamulina, mas apenas em altas concentrações (de 5 a 50 mg L^{-1}). Segundo esses autores, a eventual ocorrência de efeitos tóxicos de antibióticos a crustáceos, na natureza, poderia ser consequência da ação destes resíduos nos organismos que fazem parte da cadeia alimentar destes animais, uma vez que a toxicidade dos antibióticos a bactérias e microalgas é duas a três ordens de magnitude inferiores àquela encontrada em níveis tróficos superiores.

O impacto da exposição toxicológica aos agentes antimicrobianos não responde, necessariamente, a uma relação “dose-efeito” linear, sendo que a exposição de diversos organismos a baixas dosagens, em longo prazo (exposição crônica) pode atuar de maneira diferenciada da exposição aguda, ou seja, sem efeitos biológicos quantificáveis de imediato (COLLIER, 2007). Assim sendo, os testes de toxicidade aguda talvez não sejam os mais apropriados para determinar os efeitos dos antibióticos nos organismos, uma vez que, frequentemente, os impactos se tornam evidentes com a extensão do período de incubação (ALEXY et al., 2004; CARLSSON et al., 2006).

Alexy et al. (2004) avaliaram a toxicidade de diferentes antibióticos (tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, entre outros) à espécie *Vibrio harveyi*. Após breve período de incubação, quase nenhum efeito tóxico foi observado quando a bioluminescência foi utilizada como ponto final de avaliação (“endpoint”). No ensaio de longo prazo, entretanto, em que a reprodução foi utilizada como “endpoint”, observaram-se efeitos tóxicos para quase todos os compostos avaliados, em concentrações ambientalmente relevantes (ALEXY et al., 2004). Para diversos antibióticos, em estudos conduzidos em laboratório, houve inibição do crescimento microbiano em concentrações de antibióticos compatíveis àsquelas encontradas em efluentes de hospitais, ilustrando o potencial destes resíduos em impactar a estrutura da população microbiana do meio (ALEXY et al., 2004).

Antibióticos também podem ser absorvidos pelas plantas, eventualmente interferindo em seu desenvolvimento, além de poderem ser, dessa maneira, transferidos aos organismos que delas se alimentam. O efeito desses compostos sobre o desenvolvimento vegetal depende de vários fatores, tais como: natureza do composto, concentrações envolvidas, cinética de sorção e mobilidade do produto (JJEMBA, 2002). Por exemplo, Boxall et al. (2006) observaram que os compostos florfenicol, levamisole e trimetoprina foram encontrados em folhas de alface, enquanto que os compostos diazinon, enrofloxacin, trimetoprina e florfenicol foram detectados apenas nas raízes de cenoura. No entanto, todas as concentrações encontradas situaram-se abaixo dos valores de ingestão diária aceitável, representando baixo risco aos consumidores. Convém salientar que a maioria dos estudos relatando efeitos negativos no desenvolvimento vegetal foi realizada *in vitro*, em concentrações pouco prováveis em condições normais de campo (JJEMBA, 2002).

Em um estudo de absorção, as espécies vegetais *Panicum miliaceum* (painço), *Pisum sativum* (ervilha) e *Zea mays* (milho) acumularam grandes quantidades de sulfadimetoxina (até 2070 $\mu\text{g g}^{-1}$ de material vegetal), com expressivas diferenças entre as raízes e a parte aérea (concentrações 2 a 20 vezes maiores nas raízes) (MIGLIORE et al., 1995). Migliore, Cozollino e Fiori (2003) observaram, a partir de concentrações de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, efeitos tóxicos da enrofloxacin no desenvolvimento de raízes, cotilédones e folhas de várias espécies vegetais cultivadas, tais como feijão, pepino, alface e rabanete, sendo que as plantas foram capazes de converter parte da enrofloxacin absorvida em seu metabólito, a ciprofloxacina. Estes trabalhos enfatizam a importância de se monitorar a ocorrência de resíduos de antibióticos no ambiente terrestre (nos solos), pelo menos devido ao potencial de fitotoxicidade e de acumulação em plantas cultivadas.

Biasi (1995) avaliou o efeito dos antibióticos ácido nalidíxico, cloranfenicol e estreptomicina na cultura do abacateiro, *in vitro*. O cloranfenicol apresentou o maior efeito fitotóxico, sendo que houve redução da massa de calos a partir da concentração de 12,5 mg L^{-1} e na formação de calos a partir de 50 mg L^{-1} . Cascone, Formi e Migliore (2004) observaram efeitos negativos da flumequina, antibiótico largamente empregado na aquicultura, em raízes e folhas da planta aquática *Lemna minor*, em todas as concentrações testadas (50 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Entretanto, em razão da capacidade da planta de absorver grandes quantidades do composto em seus tecidos (0,72 a 13,93 $\mu\text{g g}^{-1}$, peso seco), esta espécie pode ser uma boa opção para a remediação de ambientes aquáticos contaminados com resíduos de antibióticos (CASCONI; FORMI; MIGLIORE, 2004).

Ainda existem diversas lacunas no conhecimento a respeito da relevância da absorção de antibióticos pelas plantas em áreas adubadas com esterco animal. Neste sentido, mais pesquisas são necessárias a fim de avaliar as quantidades de antibióticos absorvidas pelas diferentes culturas, as transformações destas moléculas nos tecidos vegetais, a possível influência desses compostos no desenvolvimento das plantas e, por fim, as reais implicações desta via de exposição à saúde humana (DOLLIVER; KUMAR; GUPTA, 2007).

Outro ponto bastante relevante é o possível desenvolvimento de linhagens de bactérias resistentes aos antibióticos, principalmente em razão da contínua pressão de seleção exercida pela administração de baixas concentrações de agentes antibióticos (CHANDER et al., 2007). Neste caso, o uso contínuo e prolongado de dosagens subletais de antibióticos e da subsequente disseminação do material fecal no solo, poderia ocasionar o compartilhamento de plasmídeos extra-cromossômicos resistentes com aqueles dos organismos não resistentes (THIELE-BRUHN, 2003; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Outra possibilidade é que as baixas concentrações de resíduos de antibióticos transferidas ao solo pela aplicação de esterco animal contaminado favoreçam a seleção de populações resistentes (SCHMITT et al., 2006). No entanto, a introdução direta de microrganismos resistentes, provenientes das fezes de animais tratados com antibióticos, parece ser mais importante para a resistência (THIELE-BRUHN, 2003) do que a indução em função da presença de resíduos de antibióticos no ambiente. Witte, Klare e Werner (1999) e Chander et al. (2007) detalharam os mecanismos envolvidos na disseminação da resistência decorrente do uso de antibióticos como promotores de crescimento animal. Adicionalmente, outro aspecto importante desta questão é que existe naturalmente no solo um reservatório de genes resistentes (SCHMITT et al., 2006). Não se sabe ao certo se isto é um fenômeno natural ou é uma consequência da disseminação global de genes resistentes após anos do uso massivo de antibióticos, mas, em qualquer dos casos, tal fato evidencia a importância que o próprio ambiente pode desempenhar na problemática da resistência bacteriana aos antibióticos (SCHMITT et al., 2006). Também se desconhece por quanto tempo os organismos são capazes de manter esta resistência adquirida na ausência de uma pressão de seleção continuada (KÜMMERER, 2008). Segundo este mesmo autor, o conhecimento atual sobre a ocorrência de concentrações sub-inibitórias de antibióticos no ambiente e seu efeito sobre as bactérias é escasso e contraditório, em especial no que diz respeito à resistência. Ele argumenta que a transferência e a combinação de genes de resistência ocorrem preferencialmente em compartimentos ambientais que apresentam elevada densidade bacteriana. Assim sendo, caso haja presença de resíduos de antibióticos no ambiente, dever-se-ia questionar se as concentrações e a densidade bacteriana seriam

suficientemente altas e a exposição suficientemente longa de modo a promover resistência ou, então, a selecionar bactérias resistentes? Estes vínculos ainda não foram devidamente estabelecidos (KÜMMERER, 2008).

A intensidade de exposição das bactérias aos agentes antibióticos influencia a amplitude de sua resistência, sendo que a intensidade de exposição normalmente depende da origem dos tratamentos aos quais as bactérias foram submetidas. Por exemplo, bactérias oriundas de reator de estação de tratamento de esgoto apresentaram resistência aos antibióticos ciprofloxacina, tetraciclina, ampicilina, trimetoprina, eritromicina e sulfametoxazole, enquanto que aquelas bactérias isoladas do curso d'água receptor do efluente mostraram resistência à eritromicina e ampicilina (COSTANZO; MURBY; BATES, 2005). Este mesmo trabalho mostrou que os antibióticos eritromicina, claritromicina e amoxicilina, na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, reduziram de maneira expressiva a taxa de denitrificação bacteriana, evidenciando o possível impacto negativo destes resíduos em bactérias de relevância ecológica. Em outro estudo realizado na Austrália, bactérias isoladas de amostras de água de tanque e de espécimes animais empregadas na aquicultura mostraram resistência generalizada aos antibióticos ampicilina, amoxicilina, cefalexina e eritromicina; resistência freqüente aos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, ácido nalidíxico e moléculas do grupo das sulfonamidas; e resistência pouco freqüente aos antibióticos cloranfenicol, florfenicol, ceftiofur, ácido oxolínico, gentamicina e trimetoprina, além de outros (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006). Isto confirma a ocorrência de resistência bacteriana em meios como a aquicultura, evidenciando os riscos de transferência de bactérias resistentes ao homem através do consumo de produtos provenientes desta fonte (AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006).

Evidências óbvias existem sobre a ocorrência de fenótipos resistentes em ambientes naturais, por todos os mecanismos conhecidos de transferência genética (SÉVENO et al., 2002). Esses autores preocupam-se com a questão do uso de antibióticos em larga escala na produção animal, uma vez que isso tem levado à seleção de bactérias resistentes no intestino destes animais e, posteriormente, com a utilização do esterco, ocorre a disseminação dos genes resistentes para a comunidade microbiana no solo. Ainda existem diversas incertezas sobre o assunto, tais como: quais as conseqüências ambientais e à saúde humana da presença de organismos resistentes no ambiente e como e com que intensidade as bactérias presentes nos resíduos de origem animal podem transferir seus genes à microbiota natural do solo (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Outros aspectos interessantes ilustram a

complexidade da questão e têm vindo à tona. Por exemplo, alguns compostos podem ser biodegradados na presença de bactérias resistentes, mas não na sua ausência do meio em questão (KÜMMERER, 2008). Outro aspecto interessante consiste no fato de que a resistência a um antibiótico não significa que o mesmo efeito ocorrerá quando o mesmo está presente numa mistura (DING; HE, 2010). Em termos práticos, a combinação de doxiciclina com ciprofloxacina diminuiu a seleção de mutantes resistentes em relação ao emprego da doxiciclina isoladamente (CHAIT; CRANEY; KISHONY, 2007). Assim sendo, em alguns casos, a coexistência de antibióticos no meio pode até mesmo diminuir a resistência global de uma comunidade bacteriana (DING; HE, 2010).

O conhecimento acumulado até o momento permite dizer que em primeiro lugar é fundamental atuar na prevenção da seleção de estirpes resistentes tanto na medicina humana quanto na veterinária. Para tal, o uso prudente de compostos antibióticos configura como a medida mais efetiva para a redução dos riscos ao homem e ao ambiente. Na prática, isso não se restringe a apenas limitar a duração da pressão seletiva através da redução na duração do tratamento e no uso continuado de doses subterapêuticas, mas também inclui controlar os compostos em uso e fazer monitoramento ativo da incidência de resistência (KÜMMERER, 2008).

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

A bioacumulação dos antibióticos é outra questão bastante interessante, sendo este processo governado principalmente pelo caráter lipofílico da molécula, o qual pode ser expresso através do coeficiente de partição n-octanol-água (K_{ow} , geralmente expresso na forma logarítmica). Moléculas orgânicas com valores de $\text{Log } K_{ow} > 4,0$ tendem a acumular nos tecidos lipídicos (LAVORENTI; PRATA; REGITANO, 2003). Com relação aos antibióticos, pode-se dizer que: i) poucas destas moléculas apresentam valores de $\text{Log } K_{ow} > 4,0$; ii) muitas delas comportam-se como ácidos e/ou base fracas, sofrendo ionização nas

condições de pH vigentes no ambiente; iii) muitos antibióticos são prontamente metabolizados a produtos mais polares, como os conjugados; iv) as concentrações encontradas no ambiente são baixas; v) inexistem observações práticas sugerindo sua bioacumulação em condições naturais (WEBB, 2004). Portanto, ao que tudo indica, o potencial de bioacumulação ou de bioconcentração de antibióticos no ambiente é mínimo (WEBB, 2004).

1.1.6 Necessidades e Perspectivas da Pesquisa nos Ambientes Tropicais

Os principais trabalhos desenvolvidos no Brasil a respeito do monitoramento de resíduos de fármacos foram compilados por Billa e Dezotti (2003), sendo que os dados disponíveis se restringem a determinações de antilipêmicos, hormônios, antiinflamatórios e alguns metabólitos em amostras de efluente de esgoto e/ou de cursos d'água (TERNES et al., 1999; STUMPF et al., 1999). Por outro lado, estudos sobre a ocorrência de antibióticos em amostras ambientais são praticamente inexistentes (FILHO et al., 2007). Mesmo no caso dos alimentos, ainda são poucos os trabalhos investigando a presença de resíduos de antibióticos (DENOBILE; NASCIMENTO, 2004; NERO et al., 2007). Assim sendo, o país carece amplamente de informações sobre a ocorrência, a dinâmica, os efeitos e os riscos associados ao uso antibióticos de uso veterinário.

Uma série de fatores interfere no comportamento destes compostos no ambiente, influenciando seu potencial de sorção e de degradação no solo e, portanto, seu potencial de disseminação aos corpos hídricos, entre outros. A quase totalidade dos trabalhos existentes foi desenvolvida em condições de clima temperado, sendo que expressivas diferenças de clima e solo são encontradas nos trópicos úmidos, tais como maior precipitação e temperatura; predominância de argilas de baixa atividade, com altos teores de óxidos de Fe e Al e menor porcentagem de material orgânico, sendo este último normalmente mais recalcitrante em nossos solos. Todas essas características sugerem que o comportamento dos antibióticos deva ser distinto nas condições locais.

Em território nacional, predominam solos muito intemperizados, ricos em argilominerais do tipo 1:1 (caulinita) e em óxidos e hidróxidos de Fe e Al (gibsitita, hematita e goetita), com baixa capacidade de troca de cátions e carga líquida dependente de pH (FONTES; ALLEONI, 2006). Por exemplo, os Latossolos correspondem a uma classe de solos intemperizados, com baixa fertilidade natural e que ocupam aproximadamente 38% do

território nacional. A predominância desses solos pode sugerir menor potencial de sorção para os antibióticos de uso veterinário, uma vez que o mecanismo de troca de cátions é importante na sorção dos mesmos, resultando numa maior disponibilidade do composto para ser degradado e, ou, transportado para recursos hídricos importantes ao homem. Por outro lado, é razoável esperar que as elevadas temperaturas e precipitações predominantes nos trópicos favoreçam a degradação destes resíduos, tanto no meio aquático quanto terrestre, o que ilustra a importância de investigações locais.

1.1.7 Considerações

Fármacos vêm sendo introduzidos no ambiente há décadas, entretanto, apenas recentemente (nos últimos 10 anos), a ocorrência e o potencial impacto destas moléculas no ambiente começaram a ser efetivamente investigados (BOXALL, 2004). Muito pouco ainda se sabe a respeito do comportamento e possíveis impactos ao ambiente e à saúde humana resultantes da presença de resíduos de antibióticos de uso veterinário, mesmo nos países de clima temperado (KEMPER, 2008).

No Brasil, pesquisas referentes ao comportamento de xenobióticos no ambiente são escassas. Mesmo para os pesticidas, cujo comportamento e impacto ambiental vêm sendo intensivamente estudados desde 1960, são poucos os estudos realizados em nossas condições, principalmente aqueles de monitoramento, em escala de campo (LAVORENTI; PRATA; REGITANO, 2003). Assim sendo, é fundamental que a pesquisa nacional se atente e enverede esforços a fim de investigar detalhadamente a presença (monitoramento), o comportamento e o possível impacto ao homem e ao ambiente destes compostos, já que seu uso na produção animal é grande e esta é uma das atividades de maior destaque no agronegócio brasileiro.

Em comparação a outros poluentes orgânicos, em especial os pesticidas, os antibióticos de uso veterinário apresentam uma série de particularidades: padrões de uso, ocorrência no ambiente em associação com material orgânico (lodo ou esterco animal), elevado peso molecular, presença de diferentes grupos funcionais ionizáveis etc.; o que torna o conhecimento já acumulado nos estudos com pesticidas nem sempre válidos ou aplicáveis para o entendimento do seu comportamento no ambiente (KAY; BLACKWELL; BOXALL, 2005b). Além disso, o Brasil apresenta particularidades de clima e solo bastante distintas das regiões temperadas. Assim sendo, é clara a necessidade de que a pesquisa brasileira se aventure por este campo que, apesar de ainda amplamente ignorado, é de extrema relevância

na busca pela qualidade e sustentabilidade da agricultura, pecuária e do meio ambiente, com reflexos na saúde humana.

REFERÊNCIAS

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 100, n. 4, p. 1103–1113, 2006.

ALEXY, R.; SCHÖLL, A.; KÜMPEL, T.; KÜMMERER, K. What do we know about antibiotics in the environment? In: KÜMMERER, K. (Ed). **Pharmaceuticals in the environment**. Berlin: Springer-Verlag, 2004. p. 209-221.

BIASI, L.A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura in vitro de abacateiro. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p. 251-256, 1995.

BILLA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BLACKWELL, P.A.; KAY, P.; BOXALL, A.B.A. The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 292-299, 2007.

BOXALL, A.B.A. The environmental side effects of medication. **Embo Reports**, Londres, v. 5, n. 12, p. 1110-1116, 2004.

BOXALL, A.B.A. Fate of veterinary medicines applied to soils. In: KÜMMERER, K. (Ed). **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**. 3. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2008. cap. 8, p. 103-119.

BOXALL, A.B.A.; FOGG, L.A.; BLACKWELL, P.A.; KAY, P.; PEMBERTON, E.J.; CROXFORD, A. Veterinary medicines in the environment. Bristol: Environment Agency, 2002. 251 p. (R&D Technical Report P6-012/8/TR).

BOXALL, A.B.A.; BLACKWELL, P.A.; CAVALLO, R.; KAY, P.; TOLLS, J. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. **Toxicology Letters**, Clare, v. 131, n. 1-2, p. 19-28, 2002b.

BOXALL, A.B.A.; KOLPIN, D.W.; HALLING-SØRENSEN, B.; TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 37, n. 15, p. 286A-294A, 2003.

BOXALL, A.B.A.; KAY, P.; BLACKWELL, P.A.; FOGG, L.A. Fate of veterinary medicines applied to soils. In: KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004. cap. 14, p. 165-180.

BOXALL, A.B.A.; FOGG, L.A.; BAIRD, D.J.; LEWIS, C.; TELFER, T.C.; KOLPIN, D.; GRAVELL, A.; PEMBERTON, E.; BOUCARD, T. **Targeted monitoring study for**

veterinary medicines in the environment. Bristol: Environmental Agency, 2005. 120 p. (Final Science Report to the United Kingdom Environmental Agency).

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**, Washington, DC, v. 54, n.6, p. 2288-2297, 2006.

CAMPAGNOLO, E.R.; JOHNSON, K.R.; KARPATI, A.; RUBIN, C.S.; KOLPIN, D.W.; MEYER, M.T.; ESTEBAN, J.E.; CURRIER, R.W.; SMITH, K.; THUG, K.M.; McGEEHIN, M. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 299, n. 1-3, p. 89-95, 2002.

CAPLETON, A.C.; COURAGE, C.; RUMSBY, P.; HOLMES, P.; STUTT, E.; BOXALL, A.B.A.; LEVY, L.S. Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. **Toxicology Letters**, Clare, v. 163, n. 3, p. 213-223, 2006.

CARLSSON, C.; JOHANSSON, A-K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KÜHLER, T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 364, n. 1-3, p. 67-87, 2006.

CASCONE, A.; FORNI, C.; MIGLIORE, L. Flumequine uptake and the aquatic duckweed, *LEMNA MINOR* L. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 156, n. 1-4, p. 241-249, 2004.

CHAIT, R.; CRANEY, A.; KISHONY, R. Antibiotic interactions that select for resistance. **Nature**, London, v. 446, p. 668,671, 2007.

CHANDER, Y.; GUPTA, S.C.; GOYAL, S.M.; KUMAR, K. Antibiotics: Has the magic gone? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 87, n. 5, p. 739-742, 2007.

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

COLLIER, A.C. Pharmaceutical contaminants in potable water: potential concerns for pregnant women and children. **EcoHealth**, New York, v. 4, n. 2, p. 164-171, 2007.

COSTANZO, S.D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 51, n. 1-4, p. 218-223, 2005.

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

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 107, n. 6, p. 907-938, 1999. Supplement.

DE LIGUORO, M.; POLTRONIERI, C.; CAPOLONGO, F.; MONTESISSA, C. Use of sulfadimethoxine in intensive calf farming: evaluation of transfer to stable manure and soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, n. 4, p. 671-676, 2007.

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

DÍAZ-CRUZ, M.S.; DE ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 340-351, 2003.

DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 637-646, 2007.

DOLLIVER, H.; KUMAR, K.; GUPTA, S. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 36, n. 4, p. 1224-1230, 2007.

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

FILHO, R.W.R.; BARREIRO, J.C.; VIEIRA, E.M. & CASS, Q.B. Fármacos, ETes e corpos hídricos. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 2, n. 3, p. 54-61, 2007.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Anualpec, 2011**: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Informa Economics FNP, 2011. 378 p.

FONTES, M.P.F.; ALLEONI, L.R.F. Electrochemical attributes and availability of nutrients, toxic elements, and heavy metals in tropical soils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 6, p. 589-608, 2006.

GIGER, W.; ALDER, A.C.; GOLET, E.M.; KOHLER, H-P. E.; McARDELL, C.S.; MOLNAR, E.; SIEGRIST, H.; SUTER, M. J-F. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. **Chimia**, Berna, v. 57, n. 9, p. 485-491, 2003.

GILBERSON, T.J.; HORNISH, R.E.; JAGLAN, P.S.; KOSHY, K.T.; NAPPIER, J.L.; STAHL, G.L.; CAZERS, A.R.; NAPPIER, J.M.; KUBICEK, M.F.; HOFFMAN, G.A.; HAMLOW, P.J. Environmental fate of ceftiofur sodium, a cephalosporin antibiotic – role of animal excreta in its decomposition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 38, n. 3, p. 890-894, 1990.

GOLET, E.M.; XIFRA, I.; SIEGRIST, H.; ALDER, A.C.; GIGER, W. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 37, n. 15, p. 3243–3249, 2003.

HALLEY, B.A.; VANDEN-HEUVEL, W.J.A.; WISLOCKI, P.G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 48, n. 1-4, p. 109-125, 1993.

HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, S.N.; LANZKY, P.F.; INGERSLEV, F.; LÜTZHOFT, H.C.H.; JØRGENSEN, S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals in the environment. A review. **Chemosphere**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 357–393, 1998.

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**, New York, v. 42, n. 3, p. 263–271, 2002.

HALLING-SØRENSEN, B.; SENGELØV, G.; INGERSLEV, F.; JENSEN, L.B. Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 44, n. 1, p. 7-16, 2003.

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

HAMSCHER, G.; PAWELZICK, H.T.; HOPER, H.; NAU, H. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Malden, v. 24, n. 4, p. 861-868, 2005.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, Clare, v. 131, n. 1-2, p. 5-17, 2002.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K-L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 109-118, 1999.

HOLTEN-LÜTZHØFT, H.C.; HALLING-SØRENSEN, B.; JØRGENSEN, S.E. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 36, n. 1, p. 1–6, 1999.

INGERSLEV, F.; HALLING-SØRENSEN, B. Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 48, n. 3, p. 311-320, 2001.

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**, Amsterdam, v. 93, n. 1-3, p. 267-278, 2002.

JØRGENSEN, S.E.; HALLING-SØRENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 691-699, 2000.

KAHLE, M.; STAMM, C. Sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to organic materials of different origin. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 41, n. 1, p. 132-138, 2007.

KARCI, A.; BALCIOĞLU, I.A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 16, p. 4652-4664, 2009.

KAY, P.; BLACKWELL, P.A.; BOXALL, A.B.A. Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. **Chemosphere**, Oxford, v. 59, n. 7, p. 951-959, 2005a.

KAY, P.; BLACKWELL, P.A.; BOXALL, A.B.A. A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 134, n. 2, p. 333-341, 2005b.

KAY, P.; BLACKWELL, P.A.; BOXALL, A.B.A. Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. **Chemosphere**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 497-507, 2005c.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.

KIM, S.D.; CHO, J.; KIM, I.S.; VANDERFORD, B.J.; SNYDER, S.A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 1013-1021, 2007.

KIM, Y.; JUNG, J.; KIM, M.; PARK, J.; BOXALL, A.B.A.; CHOI, K. Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 167-176, 2008.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, hormones and other waste water contaminants in US streams 1999-2000. A national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002.

KÜMMERER, K. Effects of antibiotics and virustatics in the environment. In: KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**. 3. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2008. cap. 14, p. 223-244.

KOOLS, S.A.E.; MOLTSMANN, J.F.; KNACKER, T. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 50, n. 1, p. 59-65, 2008.

LANZKY, P.F.; HALLING-SØRENSEN, B. The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. **Chemosphere**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 2553–2561, 1997.

LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B. Comportamento de pesticidas em solos - Fundamentos. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 3, p. 335-400, 2003.

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**, Washington, DC, v. 73, n. 19, p. 4640-4646, 2001.

LOKE, M.L.; INGERSLEV, F.; HALLING-SØRENSEN, B.; TJØRNELUND, J. Stability of tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. **Chemosphere**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 759-765, 2000.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; BARREIRO-GONZÁLEZ, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 148, n. 2, p. 570-579, 2007.

MIGLIORI, L.; BRAMBILLA, G.; COZZOLINO, S.; GAUDIO, L. Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 52, n. 2-3, p. 103-110, 1995.

MIGLIORE, L.; CIVITAREALE, C.; BRAMBILLA, G.; DOJMI, D. G Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. **Water Research**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 1801–1806, 1997.

MIGLIORE, L.; COZZOLINO, S.; FIORI, M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, n. 7, p. 1233–1244, 2003.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FRANCO, B.D.G.M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

PALERMO-NETO. Resíduos de medicamentos veterinários em carne de frango e ovos. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOZA, H.S.; GÓRNIK, S.L. (Ed.). **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: ROCA, 2005. cap. 19, p. 287-302.

PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOZA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 13, p.641-658.

PALERMO-NETO, J. O problema do uso inadequado de antibióticos na produção de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, p. s199-s208, 2007.

PARK, S.; CHOI, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 17, n. 6, p. 526-538, 2008.

PAWELZICK, H.T.; HÖPER, H.; NAU, H.; HAMSCHER, G. A survey of the occurrence of various tetracyclines and sulfamethazine in sandy soils in northwestern Germany fertilized with liquid manure. In: SETAC EURO MEETING, 14., 2004, Prague. **Anais...** Prague: SETAC, 2004. p. 18-22.

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**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.

SASSMAN, S.A.; LEE, L.S. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 39, n. 19, p. 7452-7459, 2005.

SCHMITT, H.; STOOB, K.; HAMSCHER, G.; SMIT, E.; SEINEN, W. Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, n. 3, p. 267-276, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ - SESA. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte no estado do Paraná**. Curitiba: SESA/ISEP, 2005. 25 p.

SEVENO, N.A.; KALLIFIDAS, D.; SMALLA, K.; VAN ELSAS, J.D.; COLLARD, J.M.; KARAGOUNI, A.D.; WELLINGTON, E.M.H. Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. **Reviews in Medical Microbiology**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 15-27, 2002.

STUMPF, M.; TERNES, T.A.; WIELKEN, R-D.; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 135-141, 1999.

SUKUL, P.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, n. 8, p. 1344-1350, 2008.

TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R-D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 81-90, 1999.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Malden, v. 166, n. 2, p. 145-167, 2003.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 35, n. 17, p. 3397-3406, 2001.

UNION OF CONCERNED SCIENTISTS - UCS. **Hogging it**: Estimates of antimicrobial abuse in livestock. Cambridge: UCS, 2004. Disponível em: <<http://www.ucsusa.org/publications/>>. Acesso em: 20 fev. 2008.

WATKINSON, A.J.; MURBY, E.J.; COSTANZO, S.D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. **Water Research**, Oxford, v. 41, n. 18, p. 4164-4176, 2007.

WEBB, S.F. A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II – Aquatic risk characterization. In: KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004. cap. 25, p. 345-361.

WITTE, W.; KLARE, I.; WERNER, G. Selective pressure by antibiotics as feed additives. **Infection**, Heidelberg, v. 27, p. 35-38, 1999. Supplement 1.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 723-730, 2000.

ZHANG, J-Q.; DONG, Y-H. Effect of low-molecular-weight organic acids on the adsorption of norfloxacin in typical variable charges soils of China. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, n. 2-3, p. 833-839, 2008.

ZHAO, L.; DONG, Y.H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 5, p. 1069-1075, 2010.

YANG, J-F.; YING, G-G.; ZHAO, J.L.; TAO, R.; SU, H-C.; CHEN, F. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl River using RRLC-MS/MS. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 16, p. 3424-3432, 2010.

2 ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS DE SOLO E CAMA DE FRANGO

Resumo

As fluoroquinolonas são uma classe de antibióticos muito utilizados na medicina veterinária em todo o mundo, entretanto, pouco ainda se sabe sobre a ocorrência, o comportamento e os possíveis impactos negativos que a presença destes resíduos no ambiente pode ocasionar. Este trabalho objetivou a adaptação e a validação de metodologia analítica para a determinação simultânea de quatro fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina e enrofloxacina) nas matrizes solo e cama de frango. Para tal, foram testados diferentes métodos disponíveis na literatura, sendo que o de maior recuperação foi utilizado para fins de validação. As análises foram feitas através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência, otimizando-se as condições cromatográficas. Os parâmetros avaliados na validação foram: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. O método adaptado de Turiel, Martín-Esteban e Tadeo (2006), que tem por base a capacidade das fluoroquinolonas em formarem complexos estáveis com íons metálicos, propiciou a maior recuperação dos analitos para ambas as matrizes, com valores $\geq 63\%$. O método foi validado com sucesso e os limites de quantificação estiveram na faixa dos 3,35-27,38 ng g⁻¹ para o solo e de 78,12 a 208,10 ng g⁻¹ para cama de frango, valores estes compatíveis com os limites obtidos em trabalhos similares na literatura e, além disso, com os níveis ambientais normalmente reportados para estas moléculas nestas matrizes. O método se mostrou útil à análise dessa classe de compostos nas matrizes estudadas, apresentando diversas vantagens, tais como: simplicidade, rapidez, baixo custo, eficiência de extração e minimização do consumo de solventes orgânicos.

Palavras-chave: Antibióticos. Cromatografia líquida. Contaminação Ambiental. Poluentes emergentes.

Abstract

Fluoroquinolones are a class of antibiotics commonly used in veterinary medicine all over the world, however, little is still known about their occurrence, behavior and the possible negative impacts they may cause in the environment. This work aimed to adapt and validate an analytical method for the simultaneous determination of four fluoroquinolone compounds (norfloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin and enrofloxacin) in soils and poultry litter samples. Several methods were tested and the one with the highest recovery was finally used for validation purposes. All analyses were done by high performance liquid chromatography (HPLC) using fluorescence detection. For validation purposes, the parameters evaluated were: selectivity, linear working range, linearity, sensitivity, precision, accuracy, detection and quantification limit. The method adapted from Turiel, Martín-Esteban e Tadeo (2006), which is based on the ability of fluoroquinolones to form stable complexes with metal ions, provided the higher recoveries for both matrices, $\geq 63\%$. The method was successfully validated and the quantification limits were in the range of 3.35 to 27.38 ng g⁻¹ for soil and from 78.12 to 208.10 ng g⁻¹ for poultry litter samples, values comparable to the limits obtained in similar published studies and, also, with the environmental relevant levels typically reported for these molecules in these matrices. The method was useful for the analysis of this class of compounds in both matrices, presenting several advantages such as simplicity, agility, low cost and high extraction efficiency, and also minimizing the consumption of organic solvents.

Key-words: Antibiotics. Liquid chromatography. Animal production. Emerging pollutants.

2.1 Introdução

As fluoroquinolonas são uma classe de antibióticos de uso veterinário muito utilizadas em todo o mundo (PICÓ; ANDREU, 2007). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre a ocorrência e o comportamento destes compostos no ambiente (PICÓ; ANDREU, 2007), especialmente em condições tropicais. Ainda que o Brasil seja um dos maiores produtores mundiais de alimentos de origem animal, usando diariamente quantidades massivas de antibióticos nas criações locais, até o presente momento não existem trabalhos no assunto (REGITANO; LEAL, 2010).

As fluoroquinolonas administradas aos animais de criação (gado, frango e suínos) são apenas parcialmente metabolizadas no organismo animal (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006), estando presentes em altas concentrações (mg kg^{-1}) no esterco animal (ZHAO; DONG; WANG, 2010), atingindo posteriormente o solo através da aplicação do mesmo como fonte de nutrientes e matéria orgânica (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007). A ocorrência destes compostos no ambiente pode impactar negativamente organismos terrestres (toxicidade aguda ou crônica), interferir em processos ecológicos mediados por microorganismos (como ciclagem de C e N), além de exercer possível influência no aumento da resistência de microorganismos aos agentes antibióticos (KEMPER, 2008).

Uma das principais dificuldades na análise de fluoroquinolonas no ambiente é a carência de métodos analíticos confiáveis e sensíveis para análise desta classe de compostos em matrizes sólidas complexas como solo e esterco animal, sendo que de fato a literatura apresenta poucos métodos em comparação a outras matrizes mais comumente estudadas, como água e alimentos (USLU et al., 2008). No geral, esses métodos fazem uso de solventes orgânicos em diferentes valores de pH, agitação, mistura, ultra-sonicação e, por fim, limpeza dos extratos (clean-up) via extração em fase sólida (SPE) (PICÓ; ANDREU, 2007).

Atualmente, a extração assistida por ultra-som, seguida de filtração ou centrifugação dos extratos, é o procedimento mais utilizado (SPELTINI et al., 2011). Entretanto, devido ao alto potencial de sorção das fluoroquinolonas em matrizes sólidas (solos, sedimentos e esterco animais), têm-se, mais recentemente, lançado mão de técnicas de extração mais sofisticadas, como, por exemplos, a extração líquida pressurizada (PLE) e a extração assistida por microondas (MAE). Bons resultados também têm sido obtidos com a extração por microondas (MAE), promovendo benefícios através da melhoria na recuperação analítica e menor dependência da matriz (SPELTINI et al., 2011). Estas técnicas de extração atendem as

tendências mais recentes de menor consumo de solventes, possibilidade de automação, maior reprodutibilidade, entre outras (DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2007). Ainda assim, devido aos custos envolvidos, ainda não estão disponíveis em muitos laboratórios.

Já a quantificação desta classe de compostos tem sido comumente realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em especial com detector de fluorescência (FLD), que é mais sensível e seletivo do que o de arranjo de diodos (PICÓ; ANDREU, 2007). Ainda que a detecção por fluorescência não seja tão poderosa quanto a obtida por espectrometria de massa, ela ainda é extensivamente utilizada haja vista que as fluoroquinolonas são compostos polares que apresentam fluorescência intrínseca (SPELTINI et al., 2011).

Considerando a ausência de trabalhos voltados as condições tropicais, o objetivo deste trabalho foi o de testar e adaptar os principais métodos disponíveis na literatura para a extração simultânea de quatro antibióticos da classe das fluoroquinolonas (norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP), danofloxacina (DAN) e enrofloxacina (ENR) em amostras de solo e de esterco animal (cama de frango). Além disso, o método com maior recuperação foi validado, de modo a poder ser utilizado no monitoramento de resíduos destas moléculas em amostras de solo e de cama de frango coletadas regionalmente.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Descrição dos métodos testados

Resultados satisfatórios para a extração de fluoroquinolonas em solos foram obtidos tanto com soluções básicas (TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006) quanto ácidas (GOLET et al., 2002; PICÓ; ANDREU, 2007), extraindo-se predominantemente as espécies iônicas (aniônicas ou catiônicas) das moléculas, o que é coerente com o fato destas moléculas serem compostos polares com múltiplos grupos ionizáveis a valores de pH ambientalmente relevantes (Figura 2.1).

Turiel, Martín-Esteban e Tadeo (2006), frente às dificuldades de extração simultânea de quinolonas (cinoxacina, ácido oxolínico, ácido nalidíxico e flumequina) e fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina, enoxacina, e enrofloxacina) com solventes, lançaram mão de procedimento distinto, explorando a capacidade destes compostos formarem complexos com cátions metálicos em solução (PICÓ; ANDREU, 2007). As recuperações

obtidas foram altas, entre 84 e 102% (fortificação = $1 \mu\text{g g}^{-1}$). Karci e Balcioğlu (2009) utilizaram o mesmo procedimento para a extração de enrofloxacin (ENR) e ciprofloxacin (CIP) em amostras de solo e esterco de frango na Turquia, obtendo percentuais de recuperação sensivelmente inferiores, aproximadamente 60% para solo e 40% para esterco de frango. Entretanto, estes autores não apresentaram em seu trabalho quaisquer dados quanto à validação do método analítico para a análise dessas matrizes.

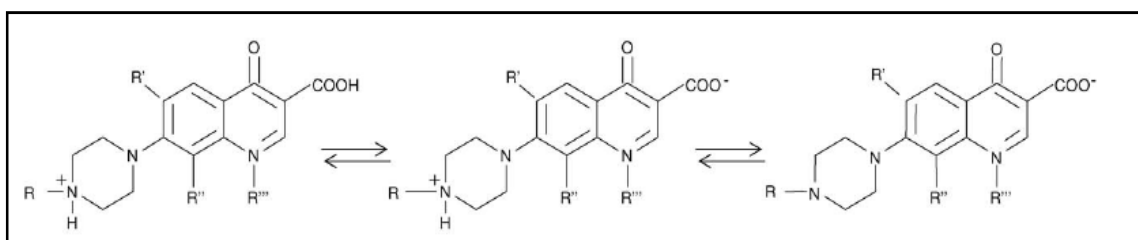


Figura 2.1 - Equilíbrio ácido-base das fluoroquinolonas (TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006), com valores de $\text{pK}_a \sim 6$ e 8. As moléculas estão positivamente carregadas em meio ácido (esquerda), enquanto que a pH neutro apresentam simultaneamente cargas positivas e negativas (centro). Em pH básico, predominam cargas negativas (direita) (USLU et al., 2008)

Uslu et al. (2008) propuseram a extração de fluoroquinolonas em matrizes de solo em meio ácido, condição em que os sítios reativos dos analitos (antibióticos) e do solo estão protonados (carregados positivamente), aumentando a repulsão eletrostática entre ambos e, consequentemente, a solubilidade do analito na solução extratora. O método envolve a adição da solução extratora (0.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 5 mL de tampão pH3: acetonitrila (1:1)), agitação (vortex), ultrasonicação e centrifugação. A composição do tampão pH 3.0 é 27.2 g de KH_2PO_4 e 1.35 mL de H_3PO_4 por litro de água. Após quatro ciclos, os extratos foram diluídos com água ultra-pura (200 mL), extraídos em fase sólida (cartucho OASIS HLB) e lidos através de cromatografia líquida, com detecção por fluorescência.

Martínez-Carballo et al. (2007) quantificaram resíduos de fluoroquinolonas (enrofloxacin e ciprofloxacin) em amostras de solo e esterco de frango coletadas em diversas unidades produtoras na Áustria. O procedimento de extração resumiu-se à ultrasonicação (20 minutos) com solução de acetonitrila acidificada com 2% de ácido fórmico, limpeza com n-hexano e quantificação por LC-MS. No presente trabalho, este método foi testado com modificações, em particular o clean-up, que foi feito através do uso de

extração em fase sólida (cartuchos OASIS HLB) ao invés de partição líquida com n-hexano, além da quantificação que foi realizada por HPLC-FLD ao invés de LC-MS-MS.

Xiang-Gang, Qi-Xing e Lin (2008) desenvolveram método analítico para a determinação multi-residual de 13 antibióticos (5 sulfonamidas, 4 tetraciclinas, 2 quinolonas, mais furazolidone e cloranfenicol) em amostras de esterco de frango na China. Neste método, utilizou-se tampão 0,1 M de EDTA-McIlvaine, ultrasonicação (15 minutos), centrifugação e limpeza em fase sólida (cartucho OASIS HLB), repetindo-se duas vezes o procedimento de extração. As recuperações obtidas foram elevadas (76 e 87% para as duas quinolonas estudadas, ciprofloxacina e pefloxacina, respectivamente).

Zhao, Dong e Wang (2010) avaliaram a ocorrência de resíduos de diversos antibióticos de uso veterinário (entre eles a norfloxacina, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, fleroxacina, lomefloxacina e difloxacina) em amostras de esterco animal (bovino, suíno e de frango) de oito províncias da China. As mostras foram extraídas com acetonitrila acidificada (3% de ácido acético), ultrasonicadas (três ciclos de 30 minutos), centrifugadas (10 minutos, 4000 rpm) e quantificadas por HPLC, com detector de fluorescência. As porcentagens recuperadas variaram de 74 a 102%.

2.2.2 Escolha dos compostos em estudo

A avicultura é uma atividade bastante expressiva no agronegócio brasileiro. Devido à escala industrial da atividade e o elevado confinamento das criações, a utilização de medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia é bastante comum. Devido ao seu largo espectro de ação, as fluoroquinolonas são amplamente utilizadas no tratamento de um grande número de doenças infecciosas na avicultura moderna. Dentre estas, a norfloxacina, a enrofloxacina e a ciprofloxacina são as fluoroquinolonas mais comumente empregadas (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2006). Esta informação é endossada pelo levantamento da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná a respeito dos medicamentos veterinários mais empregados na avicultura de corte paranaense (SESA, 2004), onde a utilização das mesmas foi relatada e, também, por um levantamento informal realizado em algumas agropecuárias da região de Piracicaba e Holambra. Além disso, estudos anteriores relataram a ocorrência de resíduos dessa classe de compostos em amostras de esterco animal coletadas em diferentes

países (Turquia, Áustria e China), demonstrando seu uso bastante difundido e seu potencial de disseminação no ambiente (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007, KARCI; BALCIOĞLU, 2009; ZHAO; DONG; WANG, 2010).

2.2.3 Reagentes e Padrões Analíticos

Os padrões analíticos (NOR, CIP, DAN e ENR) com pureza > 98% foram adquiridos da SIGMA-ALDRICH. As soluções estoque (1 mg mL^{-1}) foram preparadas em metanol (1% de ácido acético), armazenadas em freezer (-18°C) e utilizadas em até 90 dias. Soluções de trabalho, na concentração de $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e abaixo desta, foram diariamente preparadas, através de diluição das soluções estoques em solução aquosa. Água ultrapura foi usada na preparação de todas as soluções aquosas. Os solventes orgânicos empregados (metanol e acetonitrila) foram de grau HPLC. Os reagentes nitrato de magnésio hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de amônio (NH_4OH , 25%), fosfato dibásico de sódio (NaH_2PO_4), dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), Na_2EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido fórmico (CH_2O_2), ácido acético (CH_3COOH), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) e ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram todos de grau analítico.

2.2.4 Fortificação das Amostras de Solo e Cama de Frango

Amostra controle de solo foi utilizada para os testes iniciais de recuperação, sendo este representativo da realidade agrícola brasileira e proveniente de área sem histórico de uso de antibióticos (Latossolo Vermelho Distroférrico argiloso, $\text{pH-CaCl}_2 = 4,9$, $\text{CTC} = 102,6 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$, matéria orgânica = 45 mg dm^{-3} , areia = 43%, silte = 9% e argila = 48%). As amostras controle de cama de frango (isentas de contaminação) foram coletadas em um aviário da empresa Korin, localizado em Ipeúna-SP, onde não se utilizam antibióticos no sistema de criação de frangos de corte.

As amostras de solo e de cama de frango (1 g) foram pesadas em tubos de Teflon (50 mL) e fortificadas com 0,5 mL de uma solução de NOR, CIP, DAN e ENR ($2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), em metanol, obtendo-se concentração nominal de fortificação de $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Essas amostras permaneceram em repouso, no escuro, por uma noite, o que permitiu a evaporação do solvente e o estabelecimento de condição de equilíbrio entre os compostos e o solo ou cama de frango antes da execução dos procedimentos de extração.

2.2.5 Análises por cromatografia líquida (HPLC-FLD)

Para a determinação das fluoroquinolonas em todos os métodos testados, fez-se use de um equipamento HPLC 1200 da Agilent, equipado com bomba quaternária, injetor automático, degaseificador e detectores de arranjo de diodos (DAD) e de fluorescência (FLD). A aquisição de dados foi realizada através do software ChemStation da Agilent. A separação foi efetuada através de coluna C18 (ACE, 250 x 4,6 mm, 5 μ m), mantida a 25°C e com volume de injeção de 50 μ L. A eluição foi isocrática, sendo a fase móvel composta por 72% de uma solução aquosa de ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹ e pH 4,0, solvente A) e 28% de metanol (solvente B). O fluxo foi de 1 mL min⁻¹ e o detector de fluorescência foi empregado com comprimentos de onda fixados em 280 e 450 nm para excitação e emissão, respectivamente.

2.2.6 Otimização das condições cromatográficas

As condições iniciais de trabalho tiveram por base o trabalho de Paschoal (2007), com algumas modificações. Em especial, alterou-se a fase móvel empregada, substituindo-se a acetonitrila (ACN) por metanol (MeOH), principalmente porque os testes foram iniciados num momento em que a disponibilidade de acetonitrila no mercado era restrita. As condições iniciais de trabalho foram:

- Fase estacionária: coluna analítica C₁₈ de fase reversa;
- Fase móvel: Fase aquosa – Ácido Oxálico 0,010 mol L⁻¹, pH = 4,0, Fase orgânica – Metanol;
- Vazão: 1,0 mL min⁻¹.

Foram testadas diferentes colunas cromatográficas C18, todas de fase reversa:

- Coluna analítica a base de sílica ACE (250 x 4,6 mm, 5 μ m – ACT, Escócia);
- Coluna analítica a base de sílica Kromasil (250 x 4,6 mm, 5 μ m – AkzoNobel, Suécia);
- Coluna analítica de fase estacionária de sílica híbrida XTerra (150 x 2,1 mm, 3,5 μ m – Waters, EUA);
- Coluna analítica de fase estacionária de sílica híbrida XBridge (250 x 4,6 mm, 5 μ m – Waters, EUA).

Todos os testes envolvendo as diferentes colunas acima mencionadas fizeram uso de coluna de guarda XTerra C18, 20 x 3,9 mm, 5 μm (Waters, EUA) ou ACE C18 20 x 4,0 mm, 5 μm (ACT, Escócia).

Diferentes proporções de fase móvel foram testadas: Ácido Oxálico 0,010 mol L⁻¹ (pH = 4,0): Metanol, nas seguintes proporções: (65:35); (70:30); (72:28); (75:25); (80:20) e (85:15).

A coluna ACE, associada à fase móvel composta por ácido oxálico 0,010 mol L⁻¹ (pH = 4,0) - metanol (72:28), foi a condição que permitiu o menor tempo de corrida e a melhor separação dos analitos de interesse (dados não apresentados). As condições de separação da corrida cromatográfica foram avaliadas a partir dos parâmetros de conformidade do sistema, preconizando-se a faixa de valores apresentadas por PASCHOAL (2007), Tabela 2.1. Estes valores foram sempre calculados para um determinado pico cromatográfico em relação ao pico adjacente de tempo de retenção maior. Os resultados indicam que as condições obtidas foram adequadas para os objetivos propostos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Faixa de valores preconizados como adequados para os parâmetros cromatográficos

PARÂMETROS	CONDIÇÃO ADEQUADA	CONDIÇÃO OBTIDA
Fator de Retenção (k)	$1 < k < 10$	3,2 a 5,20
Fator de Separação (α)	$\alpha > 1,1$	1,14 a 1,24
Resolução (Rs)	$R_s > 1,25$	5,03 a 8,82
Número de Pratos (N)	$N > 2000$	9570 a 12784

A Figura 2.2 representa um cromatograma de separação característico para uma solução aquosa contendo um mix das fluoroquinolonas estudadas em baixa concentração (10 ng mL⁻¹).

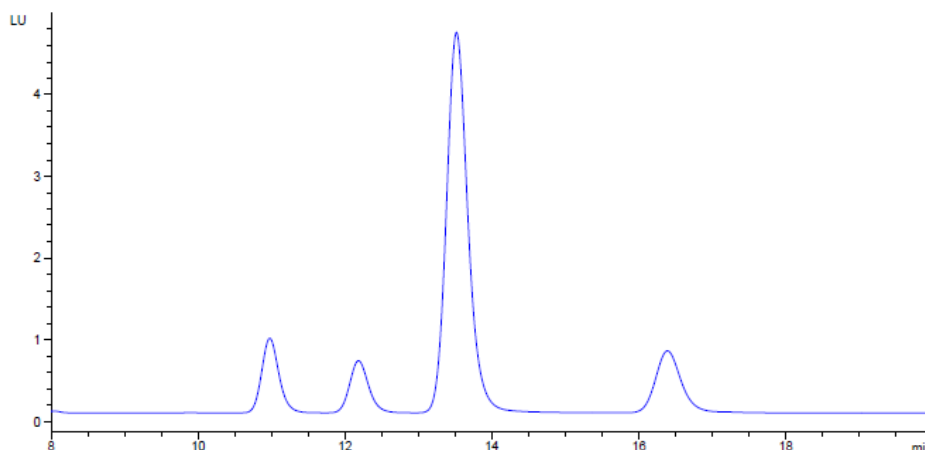


Figura 2.2 - Cromatograma de separação de fluoroquinolonas em água (10 ng mL^{-1}): NOR ($\text{Tr} = 10.97 \text{ min}$), CIP ($\text{Tr} = 12.18 \text{ min}$), DAN ($\text{Tr} = 13.51$) e ENR ($\text{Tr} = 16.36 \text{ min}$) (10 ng mL^{-1}), detectadas por fluorescência ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$: 280/450nm). Eluição isocrática: 72% solução aquosa 0,01 M Ac Oxálico pH 4,0: 28% Metanol. Vazão de 1 mL min^{-1} e volume de injeção de $50 \mu\text{L}$

2.2.7 Validação da metodologia analítica

O método que proporcionou a maior recuperação para ambas as matrizes (solo e cama de frango) foi submetido aos procedimentos de validação analítica, tomando por base trabalhos similares (TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006; ZHAO; DONG; WANG, 2010), além de documentos orientativos sobre validação de métodos cromatográficos (PASCHOAL et al., 2008; INMETRO, 2007). Para tal, os parâmetros avaliados foram seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Recuperação obtida nos métodos testados

O método desenvolvido por Uslu et al. (2008) permitiu recuperação razoável para as amostras de solo (43 a 60%), mas não houve êxito para as amostras de cama de frango (Tabela 2.2). Tanto este método quanto o de Turiel, Martín-Esteban e Tadeo (2006) foram originalmente desenvolvidos para a matriz solo, sendo que o método de Turiel, Martín-

Esteban e Tadeo (2006) também foi usado com sucesso em amostras de esterco de frango na Turquia (KARCI; BALCIOĞLU, 2009). Contudo, estes autores não apresentaram quaisquer dados a respeito da validação do método, o que confirmaria a validade do mesmo naquelas condições locais.

Tabela 2.2 - Porcentagens de fluoroquinolonas recuperadas de amostras de solo e cama de frango pelos diferentes métodos testados

Matriz	Procedimento	% Recuperação*			
		NOR	CIP	DAN	ENR
Solo	Turiel; Martín-Esteban; Tadeo (2006)	77,5	78,1	67,7	76,2
	Uslu et al. (2008)	43,2	50,0	47,7	60,0
	Martínez-Carballo et al. (2007)	-	-	-	-
	Xiang-Gang; Qi-Xing; Lin (2008)	-	-	-	-
	Zhao; Dong; Wang (2010)	-	-	-	-
Cama de frango	Turiel; Martín-Esteban; Tadeo (2006)	63,0	70,0	68,0	65,2
	Martínez-Carballo et al. (2007)	-	-	-	-
	Xiang-Gang; Qi-Xing; Lin (2008)	-	-	-	-
	Zhao; Dong; Wang (2010)	-	-	-	-

O procedimento baseado no método desenvolvido por Turiel, Martín-Esteban e Tadeo (2006), fundamentado na capacidade das fluoroquinolonas formarem complexos estáveis com íons metálicos, foi o único que permitiu recuperação satisfatória para ambas as matrizes (de 68 a 78% para amostras de solo e de 63 a 70 % para amostras de cama de frango) (Tabela 2.2).

Comparado ao método original, a principal diferença correspondeu à adição da etapa de centrifugação (3560 g rpm, 10 min) após um ciclo único de ultra-sonicação (30 min). Ainda, ao invés de em colunas, a extração foi feita diretamente em tubos de Teflon de 50 mL, empregando-se 1 g de solo para 8 mL da solução extratora (solução aquosa contendo

50% p/v de nitrato de magnésio hexahidratado com 4 % de amônia). As condições cromatográficas para a quantificação dos analitos de interesse também foram diferentes, uma vez que a detecção foi feita por fluorescência e a fase móvel composta por solução aquosa tamponada (ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹ e pH 4,0) e metanol, na proporção de 72:28 (v/v). No método original, a detecção foi feita por ultravioleta e a fase móvel era composta por solução aquosa tamponada (ácido fórmico 3,16 mmol L⁻¹ e pH, 2,5) e acetonitrila, na proporção de 96:4 (v/v).

As fluoroquinolonas são compostos anfóteros, com dois grupos funcionais ionizáveis de relevância ambiental, o grupo carboxílico (pK_a ~ 6) e um grupo amina (pK_a ~ 8) (PICÓ; ANDREÚ, 2007). Em função da utilização de 4% de amônia na solução extratora, o pH final da mesma está em torno de 8,3, valor onde há um predomínio de espécies aniônicas de fluoroquinolonas (Tabela 2.1), que sofrem repulsão eletrostática pelo complexo de troca do solo ou da cama de frango carregado negativamente, possibilitando então a formação de complexos estáveis entre a forma aniônica das fluoroquinolonas solubilizadas e os íons metálicos de Mg abundantes na solução extratora (VASUDEVAN et al., 2009).

Extração quantitativa de fluoroquinolonas (total de 8 compostos, incluindo NOR, CIP, DAN e ENR, com recuperações entre 69-110%) também foi obtida através do uso de microondas (1 ciclo de 20 minutos a 80° C) com solução aquosa contendo 20% de Mg(NO₃)₂ em condições alcalinas, demonstrando a eficiência do uso de agentes complexantes na desorção de fluoroquinolonas em amostras complexas como o solo (STURINI et al., 2010). Além disso, a ausência de solvente orgânico apresenta a vantagem adicional de minimizar a co-extração de matéria orgânica, reduzindo com isso os problemas com interferentes da matriz nas análises cromatográficas (SPELTINI et al., 2011).

2.3.2 Validação de metodologia analítica

2.3.2.1 Seletividade

A seletividade tem por objetivo garantir que o pico cromatográfico obtida na separação seja proveniente do composto em questão e não de algum interferente que esteja presente na amostra e eluindo no mesmo tempo de retenção do analito de interesse (PASCHOAL et al., 2008). No presente caso a mesma foi analisada através da comparação

entre cromatogramas de amostras branco e de amostras branco fortificadas com os analitos de interesse.

Não foram observados interferentes que pudessem prejudicar a quantificação das fluoroquinolonas de interesse tanto na amostra de solo como de cama de frango (Figuras 2.3 a 2.6). O solo mostrou-se uma matriz de manuseio mais fácil, com extrato mais limpo e mais facilmente filtrado, com menos interferentes presentes.

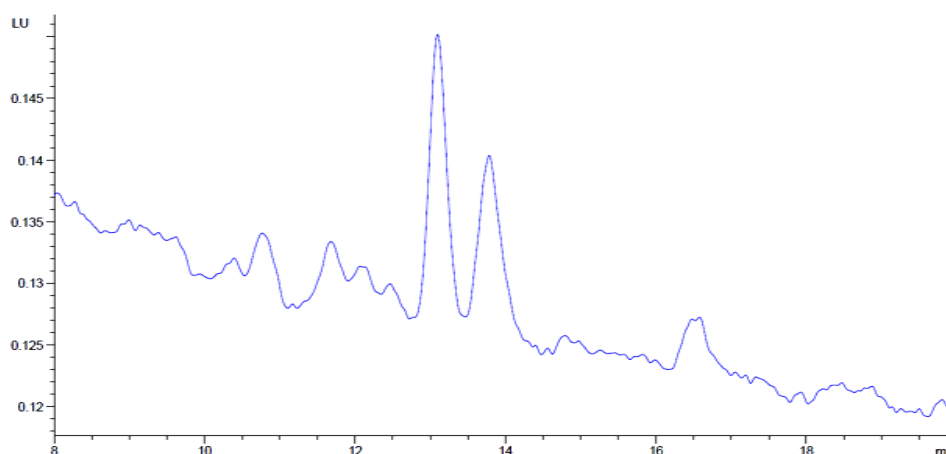


Figura 2.3 - Cromatograma de amostra de solo (branco). Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 280/450\text{nm}$), eluição isocrática (72% solução aquosa de ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹ e pH 4,0) e 28% metanol), vazão = 1 mL min⁻¹ e volume de injeção = 50 μL

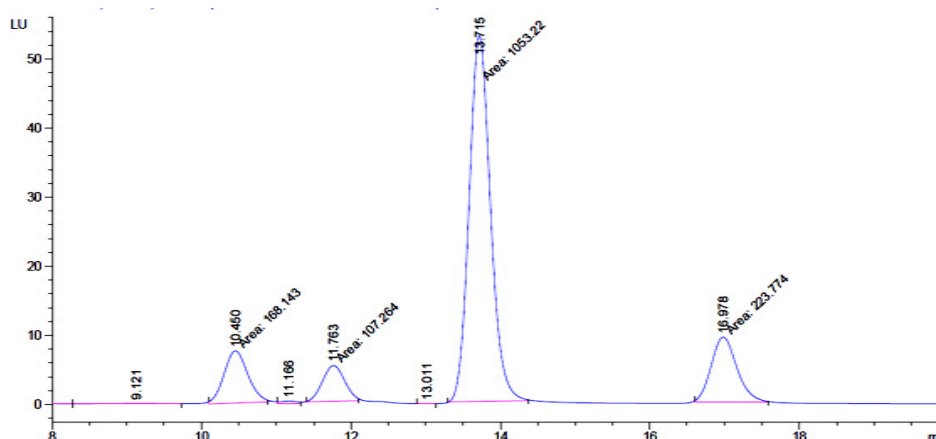


Figura 2.4 - Cromatograma de amostra de solo fortificada (1 $\mu\text{g g}^{-1}$). Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 280/450\text{nm}$), eluição isocrática (72% solução aquosa de ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹ e pH 4,0) e 28% metanol), vazão = 1 mL min⁻¹ e volume de injeção = 50 μL

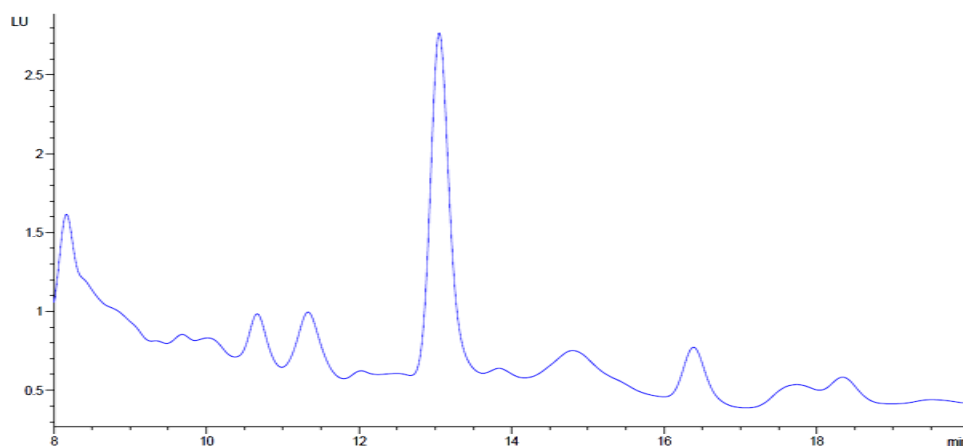


Figura 2.5 - Cromatograma de amostra de cama de frango (branco). Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 280/450\text{nm}$), eluição isocrática (72% solução aquosa de ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹ e pH 4,0) e 28% metanol), vazão = 1 mL min⁻¹ e volume de injeção = 50 μL

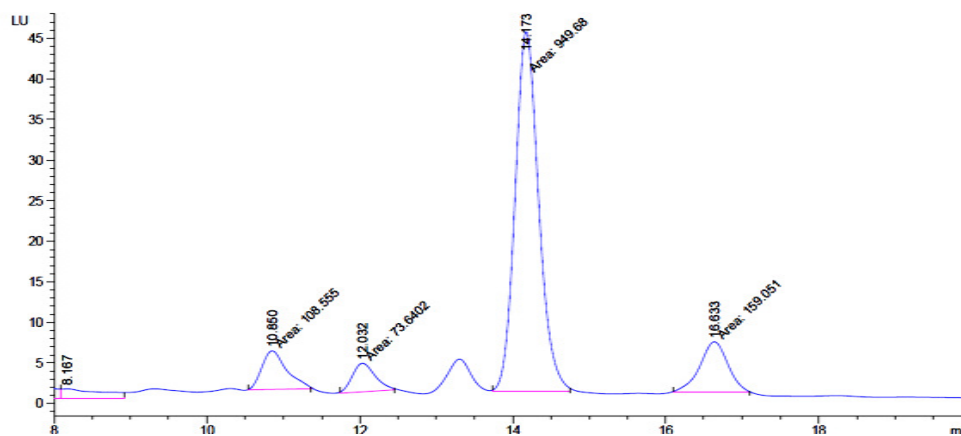


Figura 2.6 - Cromatograma de amostra de cama de frango fortificada (1 $\mu\text{g g}^{-1}$). Detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 280/450\text{nm}$), eluição isocrática (72% solução aquosa de ácido oxálico (0,01 mol L⁻¹ e pH 4,0) e 28% metanol), vazão = 1 mL min⁻¹ e volume de injeção = 50 μL

2.3.2.2 Curva Analítica, linearidade e sensibilidade

As curvas analíticas foram efetuadas através da fortificação das amostras controle de solo nas concentrações: 10, 50, 150, 500, 1000, 2000 e 4000 ng g⁻¹. Para as amostras de cama de frango excluiu-se a concentração de 10 ng g⁻¹. Todas as determinações foram feitas em triplicata. A linearidade foi expressa pelos valores dos coeficientes de correlação e a sensibilidade pelos valores dos coeficientes angulares da equação de regressão. Os coeficientes de correlação linear estiverem dentro da faixa considera adequada ($r^2 > 0,99$) (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Curva analítica para as quatro moléculas de fluoroquinolonas

	Solo			Cama de Frango		
	Equação	r^2	t_r	Equação	r^2	t_r
NOR	$y = 0,1698x - 3,331$	0,9998	10,4	$y = 0,1029x + 5,943$	0,9982	10,8
CIP	$y = 0,1163x - 2,388$	0,9996	11,8	$y = 0,0697x - 0,211$	0,9972	12,0
DAN	$y = 1,0109x + 27,115$	0,9964	13,7	$y = 0,8944x + 10,891$	0,9995	14,2
ENR	$y = 0,2303x - 0,648$	0,9997	17,0	$y = 0,1364x + 6,678$	0,9977	16,6

t_r = tempo de retenção

2.3.2.3 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

A obtenção dos limites de detecção e quantificação do método analítico seguiu as recomendações do documento do INMETRO (INMETRO, 2007), analisando-se sete repetições das matrizes em branco (isenta dos analitos de interesse), conforme as equações abaixo:

$$LOD = X + T^*s$$

$$LOQ = X + 10*s$$

em que: X = média dos valores dos brancos da amostra;

T = abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança (= 3,143 para sete repetições);

s = desvio padrão dos brancos da amostra.

Os valores dos limites de quantificação do método podem ser considerados satisfatórios (Tabela 2.4), sendo compatíveis com as concentrações residuais encontradas em amostras ambientais sólidas reportadas na literatura (TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006; ZHAO; DONG; WANG, 2010). Os valores obtidos são cerca de 10 vezes inferiores ao método original (TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006), o que é esperado em função da maior sensibilidade do detector de fluorescência em comparação ao detector de ultravioleta utilizado na referência original (TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006).

Tabela 2.4 - Limites de detecção e quantificação para amostras de solo e cama de Frango

Composto	Solo (ng g ⁻¹)		Cama de Frango (ng g ⁻¹)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
NOR	20,47	20,61	65,65	78,12
CIP	21,67	21,79	190,47	208,10
DAN	26,76	27,38	96,88	114,75
ENR	3,32	3,35	89,58	93,73

2.3.2.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada no mesmo dia (intra-dia) e em três dias diferentes (entre-dias), mediante fortificação das amostras controle de solo e cama de frango em dois níveis de fortificação (300 e 4000 ng g⁻¹), analisadas em quintuplicatas (n = 5) (Tabelas 2.5 e 2.6). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e os resultados expressos pelos valores dos coeficientes de variação. A variabilidade foi maior para as amostras de cama de frango (Tabela 2.6). Entretanto, para ambas as matrizes, a variabilidade esteve dentro da faixa considerada aceitável (CV < 20%).

Tabela 2.5 - Precisão intra-dia e inter-dias para as amostras de solo

Compostos	Coeficientes de Variação (%)			
	<i>Intra-dia</i>		<i>Inter-dias</i>	
	300 ng g ⁻¹	4000 ng g ⁻¹	300 ng g ⁻¹	4000 ng g ⁻¹
NOR	3,2	2,0	6,5	6,8
CIP	2,0	1,8	10,5	11,8
DAN	4,7	1,2	6,5	4,6
ENR	5,1	1,9	8,2	6,1

Tabela 2.6 - Precisão intra-dia e inter-dias para amostras de cama de frango

Compostos	Coeficientes de Variação (%)			
	<i>Intra-dia</i>		<i>Inter-dias</i>	
	300 ng g ⁻¹	4000 ng g ⁻¹	300 ng g ⁻¹	4000 ng g ⁻¹
NOR	7,6	10,4	13,1	12,6
CIP	5,1	8,0	19,5	19,0
DAN	3,1	12,9	6,5	7,6
ENR	14,0	11,0	16,8	12,2

2.3.2.5 Exatidão

A exatidão obtida foi avaliada mediante testes de recuperação. Para tal, amostras controles (branco) de solo e de cama de frango foram fortificadas (500, 1000 e 4000 ng g⁻¹) com os analitos de interesse, em quintuplicatas, sendo os resultados expressos em porcentagens das quantidades aplicadas. Os valores de recuperação foram satisfatórios para ambas as matrizes (variaram de 86 a 109%, exceto para a enrofloxacin) (Tabelas 2.7 e 2.8), principalmente considerando a vantagem de utilização de um mesmo método para essas matrizes. Além disso, o método de extração é prático, simples e barato em relação aos métodos mais tradicionais, que adotam sistemas exaustivos de preparo de amostras através de extração em fase sólida.

Tabela 2.7 - Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação para amostras de solo

Compostos	Concentrações					
	500 ng g ⁻¹		1000 ng g ⁻¹		4000 ng g ⁻¹	
	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)
NOR	107,6	3,3	89,5	5,2	103,3	2,0
CIP	108,6	2,0	86,3	5,0	108,6	1,8
DAN	96,8	4,7	107,4	4,3	95,1	1,2
ENR	102,7	5,1	68,6	6,6	100,2	1,9

Rec = percentagem recuperada

Tabela 2.8 - Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação para amostras de cama de frango

Compostos	Concentrações					
	500 ng g ⁻¹		1000 ng g ⁻¹		4000 ng g ⁻¹	
	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)
NOR	93,6	7,6	93,0	11,3	93,7	10,4
CIP	95,2	5,1	99,2	11,4	94,4	8,0
DAN	98,1	3,1	87,4	9,4	91,4	12,9
ENR	67,4	5,5	77,3	14,7	92,8	11,0

Rec = percentagem recuperada

2.4 Conclusões

A disponibilidade de métodos desenvolvidos para a extração e quantificação de antibióticos em amostras sólidas, tais como solo e esterco animal, ainda é pequena em comparação a outras matrizes mais estudadas, tais como água e alimentos. O método adaptado de Turiel, Martín-Esteban e Tadeo (2006) foi o único que permitiu recuperação satisfatória para a determinação simultânea das quatro fluoroquinolonas estudadas (NOR, CIP, DAN e ENR) em ambas as matrizes (solo e cama de frango), validando o mecanismo de formação de complexos estáveis com cátions metálicos como uma forma simples e eficiente

de se extrair fluoroquinolonas em amostras sólidas complexas como solo e cama de frango. Este método apresenta outras importantes vantagens, como economia no uso de solventes, rapidez, baixo custo, diminuição da co-extração de material orgânico e consequente presença de interferentes na análise cromatográfica, sendo, portanto uma ótima alternativa aos procedimentos rotineiros que fazem uso de etapas exaustivas de extração. A validação do método proporcionou valores de recuperação e de limites de quantificação satisfatórios, permitindo que um mesmo método seja aplicado para o monitoramento de fluoroquinolonas em concentrações ambientalmente relevantes, tanto em amostras de solo quanto em cama de frango.

Referências

DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 637-646, 2007.

GOLET, E.M.; STREHLER, A.; ALDER, A.C.; GIGER, W. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 74, n. 21, p. 5455-5462, 2002.

PASCHOAL, J.A.R.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R.; RATH, S. Validação de Métodos Cromatográficos para Determinação de Resíduos de Contaminantes em Alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2007.

KARCI, A.; BALCIOĞLU, I.A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 16, p. 4652-4664, 2009.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; BARREIRO-GONZÁLEZ, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 148, n. 2, p. 570-579, 2007.

PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOZA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 13, p. 641-658.

PASCHOAL, J.A.R. **Resíduos de antimicrobianos em peixe: depleção residual e desenvolvimento de métodos analíticos**. 2007. 161 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2007.

PICÓ, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil – risks and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, n. 4, p. 1287-1299, 2007.

REGITANO, J.; LEAL, R.M.P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 601-616, 2010.

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**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ - SESA. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte no estado do Paraná**. Curitiba: SESA/ISEP, 2005. 25 p.

SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; ALBINI, A. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 1337-1350, 2011.

STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F.; RIVAGLI, E.; PROFUMO, A. Solvent-free microwave-assisted extraction of fluoroquinolones from soil and liquid chromatography-fluorescence determination. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 47, p. 7316-7322, 2010.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; TADEO, J.L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 562, n. 1, p. 30-35, 2006.

USLU, M.Ö.; YEDILER, A.; BALCIOĞLU, I.A.; SCHULTE-HOSTEDE, S. Analysis and sorption behavior of fluoroquinolones in solid matrices. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 190, n. 1-4, p. 55-63, 2008.

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**, Amsterdam, v. 151, n. 3-4, p. 68-76, 2009.

XIANG-GANG, H.; QI-XING, Z.; LIN, X. Determination of thirteen antibiotics residues in manure by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 36, n. 9, p. 1162-1166, 2008.

ZHAO, L.; DONG, Y.H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 5, p. 1069-1075, 2010.

3 OCORRÊNCIA E SORÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS DE CAMA DE FRANGO E SOLO

Resumo

A produção animal é um dos setores mais expressivos do agronegócio brasileiro. Embora antibióticos sejam usados rotineiramente nesta atividade como parte do processo produtivo, a ocorrência destes resíduos em esterco animal, seu destino e possíveis impactos negativos ao ambiente são ainda desconhecidos. Este trabalho objetivou avaliar a sorção-dessorção e a ocorrência de quatro fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina e enrofloxacina) em amostras de cama de frango e de solo coletadas no Estado de São Paulo, Brasil. Os estudos de sorção-dessorção envolveram técnicas de equilíbrio (método batch), conforme preconizado pela OECD para ensaios com pesticidas. Todos os compostos foram analisados por HPLC, utilizando detector de fluorescência. O potencial de sorção das fluoroquinolonas as amostras de cama de frango ($K_d \leq 65 \text{ L kg}^{-1}$) foi inferior ao solo ($K_d \sim 40.000 \text{ L kg}^{-1}$), mas ainda assim elevado ($\geq 69\%$ de quantidade aplicada). Obteve-se claramente uma maior especificidade de interação das fluoroquinolonas com o solo. A adição de cama de frango (5%) ao solo não afetou a sorção e nem a dessorção destes compostos. A dessorção foi negligível para o solo ($\leq 0,5\%$ da quantidade sorvida), mas não para a cama de frango (até 42% do valor sorvido). As concentrações médias de fluoroquinolonas encontradas na cama de frango ($1,37\text{-}6,68 \text{ mg kg}^{-1}$) e no solo ($22,9 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) foram compatíveis com os valores encontrados em outros países (Áustria, China e Turquia). A enrofloxacina foi o composto mais frequentemente detectado (30% das amostras de cama de frango e 27% das amostras de solo), nas maiores concentrações médias ($6,68 \text{ mg kg}^{-1}$ em cama de frango e $22,9 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para amostras de solo). Os resultados demonstraram que antibióticos do grupo das fluoroquinolonas são usados rotineiramente na produção de aves, representando uma fonte potencial de poluição ao meio ambiente que tem sido largamente ignorado e deve ser melhor investigada no Brasil.

Palavras-chave: Antibióticos veterinários. Dessorção. Solos tropicais. Esterco animal.

Abstract

Animal production is one of the most expressive sectors of Brazilian agro-economy. Although antibiotics are routinely used in this activity as part of the production process, the occurrence of these residues in animal manure, as well as their fate and potential negative impacts to our local environment are largely unknown. This research evaluated sorption-desorption and occurrence of four commonly used fluoroquinolones (norfloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, and enrofloxacin) in poultry litter and soil samples from São Paulo state, Brazil. The sorption/desorption studies involved batch equilibration technique and followed OECD guideline for testing pesticides. All compounds were analyzed by HPLC, using fluorescence detector. Fluoroquinolones sorption potential to the poultry litters ($K_d \leq 65 \text{ L kg}^{-1}$) was lower than to the soil ($K_d \sim 40,000 \text{ L kg}^{-1}$), but always high ($\geq 69\%$ of applied amount). A higher specificity of fluoroquinolones with soil was obtained. The addition of poultry litter (5%) to the soil had not affected sorption or desorption of these compounds. Desorption was negligible in the soil ($\leq 0.5\%$ of sorbed amount), but not in the poultry litters (up to 42% of sorbed amount). Fluoroquinolone mean concentrations found in the poultry litter (1.37 to 6.68 mg kg^{-1}) and soil (22.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$) samples were compatible to those found elsewhere (Austria, China, and Turkey). The enrofloxacin was the most often detected compound (30% of poultry litter and 27% of soil samples), at the highest mean concentrations (6.68 mg kg^{-1} for poultry litter and 22.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for soil samples). These results show that antibiotics are routinely used in poultry production and might represent one potential source of pollution to the environment that has been largely ignored and should be further investigated in Brazil.

Key words: Veterinary antibiotics. Desorption. Tropical soil. Animal manure.

3.1 Introdução

O Brasil é líder mundial na produção e exportação de produtos de origem animal, como carne de aves e bovina (USDA, 2010). Grandes quantidades de agentes antibióticos são usados nas unidades locais de produção animal, entretanto, não existem estatísticas oficiais sobre os montantes comercializados no país. Diversos estudos conduzidos no exterior relataram a ocorrência de resíduos de antibióticos de uso veterinário em amostras de esterco animais (geralmente em mg kg^{-1}) (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007; XIAN-GANG et al., 2008; ZHAO; DONG; WANG, 2010), e também em solos agrícolas fertilizados com esterco animal (normalmente em $\mu\text{g kg}^{-1}$) (KARCI; BALCIOĞLU, 2009; USLU et al., 2008). Estes resíduos podem afetar negativamente o meio ambiente através de efeitos tóxicos (especialmente crônicos) aos organismos terrestres e/ou devido à controversa, mas preocupante potencial influência na disseminação de resistência aos microrganismos do ambiente (KEMPER, 2009).

As fluoroquinolonas são uma classe de compostos antibióticos de uso veterinário muito utilizadas em todo o mundo (PICÓ; ANDREU, 2007), apresentando apenas um limitado grau de metabolismo no organismo animal (20-80%) (BOXALL et al., 2004). Uma vez no ambiente estes resíduos são fortemente sorvidos ao solo ($K_d = 260$ a 5.012 L kg^{-1} , SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006), possuindo uma degradação lenta (meia-vida > 60 dias) (BOXALL et al., 2004). A fertilização do solo com esterco animal contaminado acarreta uma contínua acumulação desses resíduos no solo (PICÓ; ANDREU, 2007). Concentrações tão altas quanto 225 e 1420 mg kg^{-1} de norfloxacin e enrofloxacin foram encontradas em amostras de esterco de frango na China, respectivamente (ZHAO; DONG; WANG, 2010). Na Turquia, 50 e $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de enrofloxacin foram relatados em dois solos amostrados sete meses depois de terem sido adubados com esterco contaminado (KARCI; BALCIOĞLU, 2009).

As fluoroquinolonas são compostos anfóteros, com dois grupos funcionais ionizáveis de relevância ambiental, o grupo 3-carboxila ($\text{pK}_a \sim 6$) e o grupo N- no substituinte piperazina ($\text{pK}_a \sim 8$), tornando a sorção destes compostos um processo dependente do pH do meio (PICÓ; ANDREU, 2007). A sorção a matrizes sólidas (solo, lodo de esgoto e sedimento) é um dos principais mecanismos de dissipação de fluoroquinolonas no meio ambiente, sendo que concentrações da ordem de 2 mg kg^{-1} de norfloxacin e ciprofloxacina em lodo de esgoto in natura (GOLET et al., 2003), e de $1,56 \text{ mg kg}^{-1}$ de ofloxacin em sedimentos fluviais (YANG et al., 2010) foram relatados. A natureza polar das fluoroquinolonas, associada aos

elevados coeficientes de sorção para matrizes sólidas, sugerem que outros mecanismos que não a partição hidrofóbica desempenha um papel importante na sua sorção (USLU et al., 2008).

O conhecimento das concentrações de antibióticos presentes no ambiente, bem como dos principais mecanismos responsáveis pela sua retenção, são aspectos cruciais para uma adequada avaliação da exposição microbiana e de todos os riscos que estes contaminantes podem representar para outros organismos terrestres e também para a saúde humana (VASUDEVAN et al., 2009). Quase todos os dados atualmente disponíveis foram adquiridos sob condições de clima temperado, enquanto muito pouco se sabe sobre a dinâmica e os impactos dos principais antibióticos veterinários usados em ambientes tropicais, como é o caso do Brasil, onde as condições climáticas e os tipos de solo são bastante distintos, além de outras particularidades relacionadas às práticas de produção e utilização de resíduos na agricultura.

Este trabalho avaliou o potencial de sorção-dessorção de três fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin) em duas amostras de cama de frango com diferentes substratos (palha de arroz e pó de Pinus), bem como o efeito da adição de cama de frango (palha de arroz, 5%, p/p) na sorção-dessorção destes compostos em um solo brasileiro. Além disso, efetuou-se um levantamento das concentrações ambientais naturais de norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacin e enrofloxacin encontradas em amostras de cama de frango e de solo coletadas em diferentes áreas de produção do Estado de São Paulo, Brasil.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Reagentes e padrões analíticos

Padrões analíticos dos compostos estudados (norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacin, e enrofloxacin) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, apresentando pureza superior a 98%. As soluções estoque ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foram preparadas em metanol contendo 1% de ácido acético, sendo armazenadas a -18°C , no escuro, e usadas no prazo máximo de 90 dias. Água ultra-pura foi utilizada no preparo de todas as soluções aquosas. Nitrato de magnésio hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de amônio (NH_4OH), cloreto de cálcio (CaCl_2), e ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram todos de grau analítico. Os solventes orgânicos utilizados (metanol e acetonitrila) foram de grau HPLC.

Tabela 3.1 - Caracterização das amostras de cama de frango e solo

Amostra	pH	CTC	Areia	Argila	Silte	CO	NT	P	K	Ca	Mg
	CaCl ₂	mmol _c dm ³		g kg ⁻¹		%			g kg ⁻¹		
Cama de Frango											
Palha Arroz	7,4	-	-	-	-	39,90	4,19	32,40	32,90	31,90	4,60
Pó de Pinus	7,1	-	-	-	-	37,09	4,50	20,30	23,90	21,40	3,80
Solo	5,9	127,80	122	754	116	1,62	-	0,02	0,12	0,56	0,32

3.2.2 Amostras de solo e de cama de frango

Duas amostras de cama de frango com diferentes substratos (palha de arroz e pó de Pinus) e um solo brasileiro típico (Latosolo Vermelho Amarelo Distroférrico) foram empregados nos ensaios de sorção-dessorção. As principais características físico-químicas dessas amostras são apresentadas na Tabela 3.1.

A fim de se determinar as concentrações ambientais das fluoroquinolonas, 46 amostras de cama de frango e 11 de solo (0-20 cm) foram coletadas em municípios da região com importante atividade avícola: Capela do Alto, Capivari, Laranjal Paulista, Pereiras, Piracicaba, Santa Maria da Serra, São Pedro e Torrinhas. Todos os solos coletados apresentaram histórico de aplicação de cama de frango.

Cada amostra (cama de frango ou solo) foi composta de 12 subamostras coletadas aleatoriamente dentro da granja ou do talhão no campo, respectivamente. Após a coleta, as amostras foram colocadas em sacos plásticos e transportadas sob condições refrigeradas ao laboratório no mesmo dia. As amostras foram homogeneizadas, peneiradas, e liofilizadas dentro de 48 h. As análises foram efetuadas em no máximo 7 dias após a data de coleta (armazenadas a -18 °C até extração e análise).

3.2.3 Procedimentos de Extração

A extração das fluoroquinolonas das amostras de solo e cama de frango baseou-se no método proposto por Turriel, Martín-Esteban e Tadeo (2006). No entanto, uma etapa de centrifugação (10 min, 3560 g) foi adicionada após o banho de ultra-som, tal como proposto por Karci e Balcioglu (2009). Resumidamente, 1 g de cama de frango ou solo e 8 mL de uma

solução aquosa de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (29%, p/v), ajustada para pH ~8,1 (com 4% de amônia), foram colocados em tubos de Teflon (50 mL), homogeneizados em vortex por 60 s, seguindo-se de banho de ultra-som durante 30 min, à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (10 min, 3560 g) e os sobrenadantes filtrados (filtro de seringa de 0,45 ou 0,22 μm) antes da análise por HPLC. As amostras de campo foram todas analisadas em duplicata.

3.2.4 Análises por cromatografia líquida (HPLC-FLD)

Para a determinação das fluoroquinolonas, fez-se uso de um cromatógrafo líquido (Agilent, série 1200) equipado com bomba quaternária, injetor automático, degaseificador e detectores de arranjo de diodos (DAD) e de fluorescência (FLD). A coluna (ACE C18, 250 x 4,6 mm, 5 mm) foi mantida a 25 °C, sendo o volume de injeção de 50 μL . Utilizou-se uma eluição isocrática, sendo a fase móvel composta por 72% de ácido oxálico (0,01 mol L^{-1} , ajustado a pH 4,0, solvente A) e 28% de metanol (solvente B). O fluxo foi de 1,0 ml min^{-1} e os comprimentos de onda do detector de fluorescência foram fixados em 280 e 450 nm para a excitação e emissão, respectivamente.

Para construir as curvas de calibração e validar o método analítico, triplicatas de amostras controle de cama de frango e solo isentas dos analitos de interesse foram fortificadas com diferentes concentrações de fluoroquinolonas (50, 150, 500, 1.000, 2.000 e 4.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), sendo mantidas no escuro por uma noite, à temperatura ambiente, até secagem do solvente e obtenção de equilíbrio antes da extração. Os coeficientes de correlação obtidos foram $\geq 0,99$. Os limites de quantificação para todos os compostos variaram de 3,35-27,38 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o solo e 78,12-208,10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a cama de frango, sendo obtidos com base em sete repetições do branco da matriz (INMETRO, 2007). Os testes de recuperação foram realizados em três níveis de fortificação (500, 1000 e 4000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e cinco repetições, variando de 68,6-108,6% (desvio padrão $\leq 7\%$) para o solo e 67,4-99,2% (desvio padrão $\leq 15\%$) para a cama de frango.

3.2.5 Sorção e Desorção

Os ensaios de sorção-dessorção seguiram o documento orientativo da OECD para pesticidas (OECD, 2000). Pré-testes foram efetuados para definir as condições experimentais finais, avaliando-se a relação sólido: solução (2 g: 30 mL), o período de equilíbrio (24 h), a estabilidade dos compostos, e a possível sorção as paredes dos tubos de centrífuga empregados nos ensaios. As perdas obtidas foram inferiores a 5% (dados não mostrados). Triplicatas de 2 g de amostras (cama de frango ou solo) e 30 mL de soluções aquosas ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2) individuais de fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin), em diferentes concentrações (170; 340; 680; 1.360 e $2.720 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram adicionados a tubos de teflon (50 mL), horizontalmente agitados (200 rpm, 24 h), e centrifugados (3.560 g, 10 min). Os sobrenadantes foram filtrados (0,22 ou 0,45 μm), sendo a concentração de equilíbrio (C_e) na solução final determinada por HPLC (fluxo = $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, fase móvel = 78% de solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico e 22% de acetonitrila). A quantidade de antibiótico adsorvida a fase sólida (S) foi calculada pela diferença entre as concentrações iniciais aplicadas (C_i) e em equilíbrio C_e), levando-se em conta a relação sólido: solução empregada. Os dados foram ajustados pela equação de Freundlich ($S = K_f \cdot C_e^N$) e pela sua forma linear ($S = K_d \cdot C_e$), a fim de se estimar os coeficientes de partição médios ($K_d^{\text{médio}} = \text{média dos valores de } K_d \text{ obtidos nas concentrações individuais}$).

A dessorção foi avaliada em duas concentrações (680 e $2720 \mu\text{g mL}^{-1}$), em 4 etapas de 24 h (totalizando 96 h). Para cada etapa, uma alíquota de 20 mL do sobrenadante foi descartada e substituída por uma nova solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 , seguindo-se de agitação (200 rpm, 24 h) e centrifugação (3.560 g, 10 min). As concentrações em equilíbrio no sobrenadante foram determinadas como descrito anteriormente. Todas as amostras foram previamente testadas para garantir que não estavam contaminadas com fluoroquinolonas.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Sorção e dessorção

O potencial de sorção das fluoroquinolonas para as amostras de cama de frango (K_d de 34 a 65 L kg⁻¹) foi muito inferior ao solo (K_d variando entre 40.656 a 40.783 kg L⁻¹), mas ainda elevado, com pelo menos 69% da quantidade aplicada sorvida (Tabela 3.2). Além disso, o substrato da cama de frango (palha de arroz ou pó de Pinus) pouco afetou o potencial de sorção das fluoroquinolonas, sendo que a ciprofloxacina apresentou a menor sorção enquanto que a maior foi obtida para a norfloxacin (K_d = 36 e 34 L kg⁻¹ para a ciprofloxacina e 53 a 65 L kg⁻¹ para a norfloxacin nas camas com substrato de palha de arroz e pó de Pinus, respectivamente) (Tabela 3.2). Obteve-se histerese pronunciada para todas as fluoroquinolonas em ambas as amostras de camas de frango (Figuras 3.1, 3.2 e 3.3), o que sugere um baixo potencial de dessorção (< 26% da quantidade sorvida, Tabela 3.2), exceto para norfloxacin e ciprofloxacina na amostra de cama com substrato de palha de arroz na concentração mais elevada (2720 µg mL⁻¹), em que, respectivamente, 40 e 42% dos montantes sorvidos foram dessorvidos (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Valores do coeficiente de sorção médio (K_d -médio), coeficiente de sorção de Freundlich (K_f), coeficiente exponencial (N) e porcentagens sorvidas e desorvidas de norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin em amostras de cama de frango (palha de arroz e pó de pinus), solo (Latossolo Amarelo) e solo tratado com cama (palha de arroz, 5%, p/v)

Parâmetros	Norfloxacin	Ciprofloxacina	Enrofloxacin
Cama de Frango – Substrato Palha de Arroz			
K_d -médio (L kg ⁻¹)	52,6 ± 15,4	36,3 ± 3,2	49,0 ± 4,1
Sorção (% do aplicado)	76,9 ± 5,0	70,7 ± 1,8	76,5 ± 1,6
K_f (g ^{1-N} L ^N kg ⁻¹)	150	43	33
N	0,79	0,97	1,08
ΣDessorção-C3 (% do sorvido)	25,0	25,1	24,3
ΣDessorção-C5 (% do sorvido)	40,1	42,3	25,9
Cama de Frango – Substrato Pó de Pinus			
K_d -médio (L kg ⁻¹)	65,1 ± 26,5	34,1 ± 3,4	38,0 ± 7,8
Sorção (% do aplicado)	79,7 ± 6,3	69,3 ± 2,0	71,1 ± 5,0
K_f (g ^{1-N} L ^N kg ⁻¹)	239	44	16
N	0,72	0,95	1,16
ΣDessorção-C3 (% do sorvido)	9,6	18,7	20,5
ΣDessorção-C5 (% do sorvido)	19,7	27,7	20,1
Latossolo Amarelo			
K_d -C5 (L kg ⁻¹)	40.772	40.783	40.656
Sorção-C5 (% do aplicado)	99,9	100,0	99,6
ΣDessorção-C5 (% do sorvido)	n.d*	0,22	n.d
Latossolo Amarelo + Cama de Frango (5%, p/p)			
K_d -C5 (L kg ⁻¹)	40.716	40.728	40.595
Sorção-C5 (% do aplicado)	99,8	99,8	99,5
ΣDessorção-C5 (% do sorvido)	0,05	0,04	0,46

* N.d = não detectado

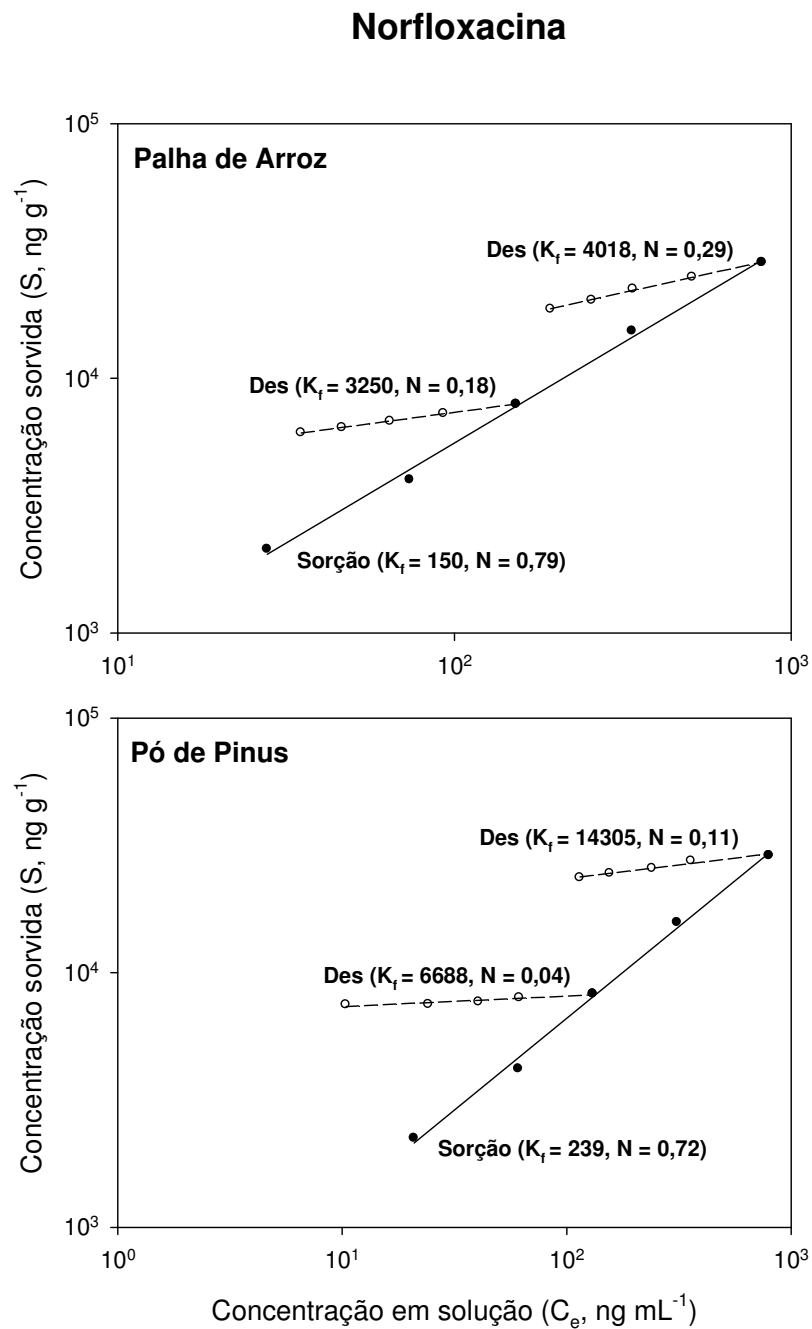


Figura 3.1 - Sorção, dessorção e respectivos coeficientes de sorção de Freundlich (K_f) e exponencial (N) para a norfloxacin em camas de frango com palha de arroz e pó de pinus

Ciprofloxacina

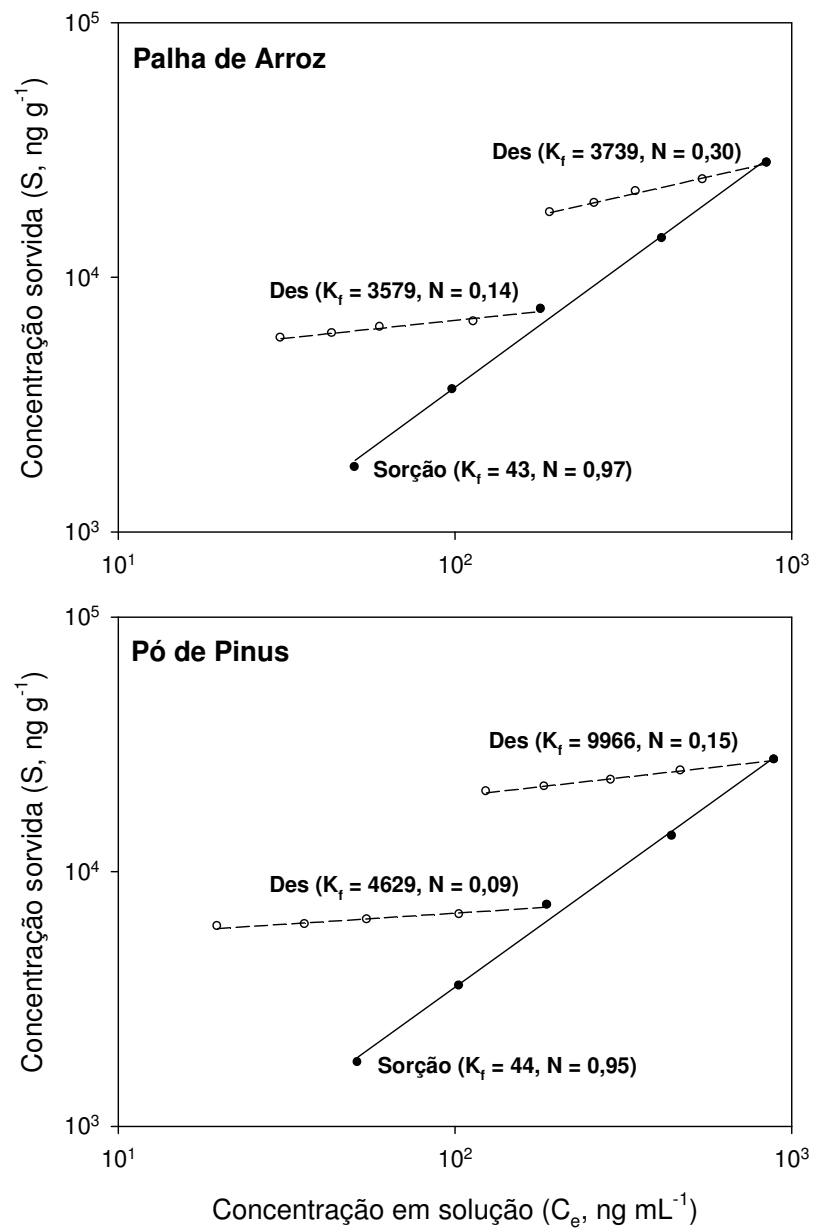


Figura 3.2 - Sorção, dessorção e respectivos coeficientes de sorção de Freundlich (K_f) e exponencial (N) para a ciprofloxacina em camas de frango com palha de arroz e pó de pinus

Enrofloxacin

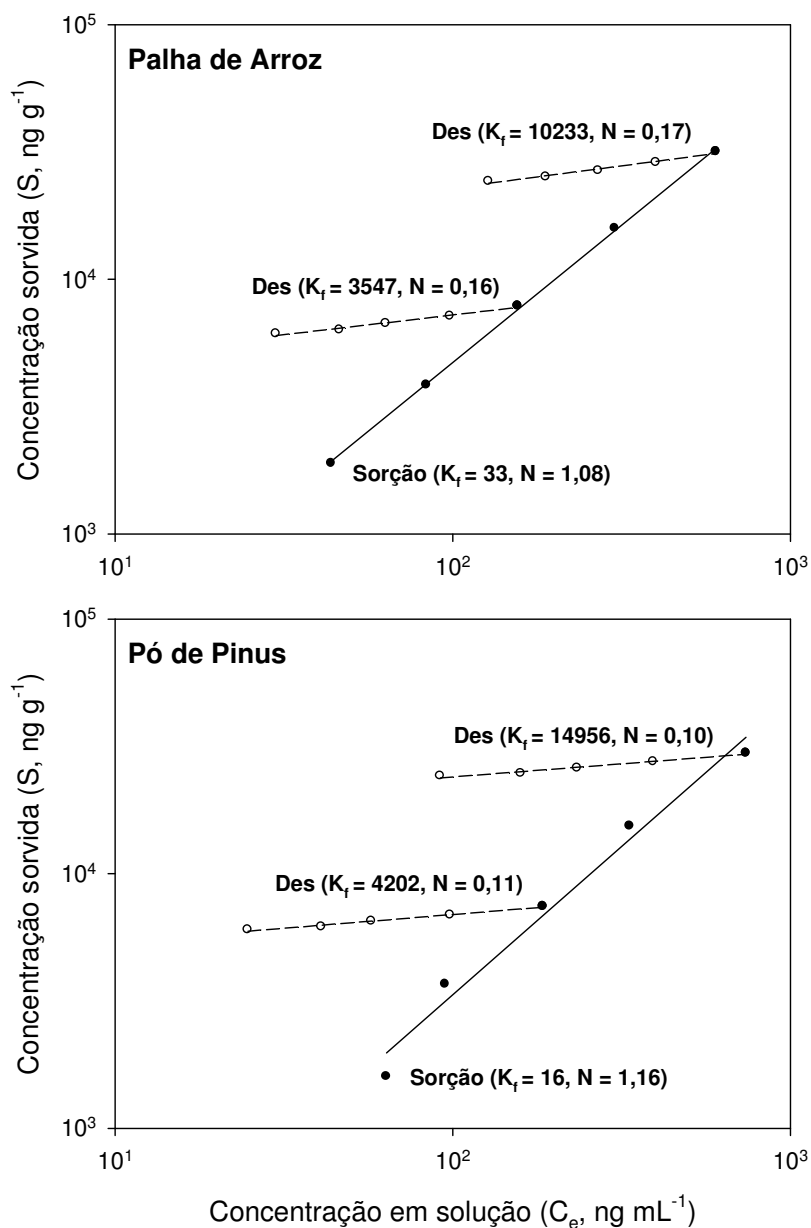


Figura 3.3 - Sorção, dessorção e respectivos coeficientes de sorção de Freundlich (K_f) e exponencial (N) para a enrofloxacin em camas de frango com palha de arroz e pó de pinus

A menor afinidade das fluoroquinolonas com a cama de frango quando comparada ao solo pode estar relacionada com a menor quantidade de sítios de sorção disponíveis naquela, assim como aos seus valores de pH ligeiramente alcalinos (Tabela 3.1). Apesar dos conteúdos mais elevados de carbono orgânico nas amostras de cama (Tabela 3.1), a reatividade dos seus grupos funcionais deve ser limitada, oferecendo assim menos sítios de troca para a sorção.

Além disso, a sorção das fluoroquinolonas tende a ser inferior a valores de pH mais elevados, devido ao seu comportamento de sorção dependente do pH, havendo um domínio de espécies neutras ou aniônicas a estes valores de pH, resultando em repulsão eletrostática entre as mesmas e as superfícies de troca negativamente carregadas (VASUDEVAN et al., 2009). No entanto, a sorção de antibióticos do grupo das sulfonamidas em uma amostra de esterco líquido de porco ácido (pH de 4,8) foi maior do que para o solo, onde os sítios carboxílicos e fenólicos do material particulado do esterco provavelmente forneceram os sítios de troca responsáveis pelo aumento da sorção (THIELE-BRUHN; AUST, 2004).

A sorção de todos os compostos para o solo foi muito elevada (K_d variou de 40.656 a 40.783 kg L^{-1}), com quase 100% da quantidade aplicada sorvida, enquanto que a dessorção foi negligenciável (sempre $< 0,5\%$ da quantidade sorvida) (Tabela 3.2), sugerindo uma forte interação específica entre as fluoroquinolonas e as partículas do solo. Esta afirmação também é reforçada pelo fato de que a quantificação da sorção no caso do solo só foi possível para a maior concentração testada ($2720 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Uma pesquisa anterior mostrou que a sorção de norfloxacin, ciprofloxacina e ofloxacina foi rápida (menos de 24 horas) e elevada (K_f variou de 7,943 a $12,309 \mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$) em um solo usado como receptor de águas residuárias, sendo que a maior parte do que foi aplicado permaneceu sorvido (CONKLE et al., 2010). Os autores consideraram a sorção como sendo o principal mecanismo responsável pela remoção destes antibióticos de águas residuárias (CONKLE et al., 2010).

Vasudevan et al. (2009) mostraram que a capacidade de troca de cátions do solo foi o atributo principal afetando a sorção da ciprofloxacina aos solos, com os teores de óxidos de metal (Fe e Al) desempenhando um papel também importante, ainda que secundário, particularmente em valores de pH mais elevados ($\geq 5,5$) (VASUDEVAN et al., 2009). A contribuição do teor de carbono orgânico do solo para a sorção não ficou claro, enquanto que os mecanismos de troca catiônica, ponte de cátions e complexação de superfície contribuíram diretamente para a sorção da ciprofloxacina aos solos estudados (VASUDEVAN et al., 2009).

Thiele-Bruhn et al. (2004) utilizaram-se de diversas técnicas analíticas a fim de demonstrar os principais fatores influenciando a sorção de antibióticos do grupo das sulfonamidas aos solos, sendo estes: a estrutura molecular e as propriedades físico-químicas dos compostos; a presença de grupos funcionais acessíveis nas superfícies organominerais e, por fim; a acessibilidade dos espaços vazios e cavidades na estrutura tridimensional da

matéria orgânica do solo e sua combinação com a matriz mineral formando complexos organominerais (THIELE-BRUHN et al., 2004).

As fluoroquinolonas se ligam aos minerais de argila através de vários mecanismos, tais como pontes de cátions, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (SPELTINI et al., 2011), enquanto que para as substâncias húmicas, elas se ligam principalmente através de múltiplas pontes de hidrogênio via grupos polares (ARISTILDE; SPOSITO, 2010). O solo empregado neste trabalho é bastante intemperizado, rico em argilas de baixa atividade (caulinita) e óxidos de Fe e Al (gibbsita, hematita e goethita), com baixo teor de matéria orgânica, baixa CTC e cargas dependentes do pH (Tabela 3.1 e FONTES; ALLEONI, 2006), ocupando áreas expressivas do território brasileiro (até 38%, REGITANO; LEAL, 2010). Portanto, parece razoável supor que a complexação de superfície com os óxidos do solo, principalmente Fe e Al, desempenhou um papel importante como mecanismo de adsorção das fluoroquinolonas ao solo neste caso. Fortes interações foram também observadas entre ciprofloxacina e óxidos hidratados de Fe e Al, em particular com óxidos de Fe ($K_d = 2.072 \text{ L kg}^{-1}$, a pH 6,5) (GU; KARTHIKEYAN, 2005). Neste valor de pH, que é próximo ao pH do solo empregado neste trabalho (pH = 5,9), a ciprofloxacina na forma zeuteriônica (molécula com carga positiva e negativa simultaneamente) é predominante, sendo a sorção atribuída principalmente à formação de um complexo mononuclear bidentado entre os átomos de Fe e o grupo carboxila da ciprofloxacina (GU; KARTHIKEYAN, 2005).

A adição de cama de frango ao solo (5%, p/p) teve pouco efeito sobre a sorção de todas as fluoroquinolonas estudadas. Os valores de K_d variaram de 40.595 a 40.783 kg L^{-1} (Tabela 3.2). No entanto, a adição de esterco aos solos pode afetar a sorção devido às alterações provocadas no pH do sistema solo-esterco e/ ou através da natureza qualitativa da matéria orgânica adicionada e da fração dissolvida presente (BOXALL, 2008). Por exemplo, a sorção da sulfadiazina foi maior e a dessorção menor quando o solo foi adubado com 4% de esterco líquido de porco alcalino (pH de 7,6) (SUKUL et al., 2008), enquanto que, por outro lado, a sorção da sulfacloropiridazina foi menor após a adição de um esterco líquido de porco alcalino (BOXALL et al., 2002). Thiele-Bruhn e Aust (2004) também encontraram menores coeficientes de sorção de sulfonamidas após a adição de dejetos de suínos ao solo, tendo sido esse efeito ocasionado pela adsorção competitiva entre a matéria orgânica dissolvida e as moléculas de sulfonamidas e /ou a ligação da matéria orgânica com os minerais do solo (THIELE-BRUHN; AUST, 2004).

3.3.2 Concentrações ambientais de fluoroquinolonas

Três das quatro fluoroquinolonas estudadas (norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin) foram detectadas na matriz cama de frango, enquanto que no caso do solo apenas a enrofloxacin foi encontrada. As concentrações ambientais destes resíduos estiveram na faixa dos mg kg^{-1} para as amostras de cama de frango e na faixa de $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os solos (Tabela 3.3), sendo os valores medianos comparáveis aos encontrados em outros levantamentos a nível internacional (Tabela 3.4). No entanto, as concentrações máximas na cama de frango (4,55, 2,13 e 30,97 mg kg^{-1} para norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin, respectivamente) foram muito menores do que os relatados para amostras de diferentes províncias da China (255,5, 45,6 e 1420,8 mg kg^{-1} para as mesmas moléculas, respectivamente) (ZHAO; DONG; WANG, 2010). A danofloxacin não foi encontrada em nenhuma amostra, o que possivelmente indica que a mesma não está em uso na região avaliada.

Tabela 3.3 - Ocorrência de fluoroquinolonas em amostras de cama de frango e solo

Composto	Número de Amostras	Frequência	Concentração				
			Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão
		 %.....	mg kg ¹				
Cama de Frango							
Norfloxacina	46	6,5	0,80	4,55	2,55	2,30	1,89
Ciprofloxacina	46	4,3	0,65	2,13	1,37	1,37	1,08
Danofloxacina	46	0,0	-	-	-	-	-
Enrofloxacina	46	30,4	0,39	30,97	6,68	4,33	8,25
Solo							
		%....	µg kg ¹				
Norfloxacina	11	0	-	-	-	-	-
Ciprofloxacina	11	0	-	-	-	-	-
Danofloxacina	11	0	-	-	-	-	-
Enrofloxacina	11	27	17,4	26,7	22,93	24,7	4,89

Tabela 3.4 - Concentrações de fluoroquinolonas em amostras de cama de frango e de solo encontradas na literatura

Matriz	Autor	País	Concentrações (mg kg ⁻¹)			
			NOR	CIP	DAN	ENR
Cama de Frango	MARTÍNEZ-CARBALLO et al., (2007)	Áustria	n.a. ¹	n.d. ²	n.a.	até 2,8
	XIANG-GANG; QI-XING; LIN, (2008)	China	n.a.	0,3 – 3,0	n.a.	n.a.
	KARCI & BALCIOĞLU, (2009)	Turquia	n.a.	n.d.	n.a.	0,06
	ZHAO; DONG; WANG, (2010)	China	até 225,5 (4,68) ³	até 45,6 (3,78)	até 2,5 (0,72)	até 1420,8 (4,65)
Solo	MARTÍNEZ-CARBALLO et al., (2007)		n.a.	-	n.a.	0,37
	USLU et al., (2008)	Áustria	n.a.	0,053	n.a.	0,013-0,204
	KARCI & BALCIOĞLU, (2009)	Turquia	n.a.	n.d.	n.a.	0,05

¹ n.a. = não analisado; ² n.d. = não detectado; ³ os valores entre parênteses correspondem a concentrações medianas

Dentre os antibióticos estudados, a enrofloxacin foi encontrada nas concentrações mais elevadas (média = 6,68 mg kg⁻¹ para a cama de frango e = 26,7 µg kg⁻¹ para o solo), sendo também a molécula mais frequentemente detectada (30 e 27% das amostras de cama de frango e solo, respectivamente) (Tabela 3.3). Na Áustria, a enrofloxacin foi encontrada em 17% das 30 amostras de solos aráveis adubadas com esterco animal, em concentrações de até 370 µg kg⁻¹ (mais de 10 vezes maior do a aqui obtida), e em 25% das amostras de esterco de frango e 38% das de esterco de peru, em concentrações de até 2,8 e 8,3 mg kg⁻¹, respectivamente (aproximadamente o mesmo que os valores aqui descritos) (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007). A contaminação do solo com fluoroquinolonas, juntamente com as tetraciclins, foi descrita como um resultado crítico, exigindo novas investigações com foco principalmente voltado a ecotoxicidade destes compostos (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007).

Ao que tudo indica, a enrofloxacin é provavelmente a fluoroquinolona mais utilizada em áreas de produção de aves de São Paulo, ao menos na região estudada. No entanto, as baixas concentrações ou a ausência de fluoroquinolonas em solos devem-se, provavelmente, ao fator de diluição após a fertilização do solo com esterco animal, mas também pode estar relacionada à maior capacidade de dissipação destes resíduos em ambientes tropicais com

altas temperaturas (REGITANO; LEAL, 2010) e /ou à alta sorção potencial destes compostos em solos tropicais (TOLLS, 2001; USLU et al., 2008).

Com relação às amostras positivas para enrofloxacin em cama de frango, não foi possível se estabelecer relações entre as concentrações ambientais e informações técnicas obtidas sobre as granjas amostradas, tais como tipo de substrato, número de animais, granjadas e tempo de exposição (Tabela 3.5), o que já era esperado uma vez que a administração de compostos antibióticos as criações baseia-se diretamente na constatação da necessidade de uso. É interessante mencionar a alta concentração de enrofloxacin encontrada na amostra número 3 (Tabela 3.5), uma vez que a mesma foi coletada após um ano de repouso do material na granja, sendo este mais um indício da elevada persistência no ambiente desta classe de compostos (PICÓ; ANDREU, 2007).

Tabela 3.5 - Informações gerais sobre as amostras de cama contaminadas com enrofloxacin

Número	Procedência	Substrato	Nº Animais	Granjadas	Tempo de Exposição*	Concentração (mg kg ⁻¹)
1	Pereiras	Palha de Arroz	15000	4	160	0,39
2	Pereiras	Palha de Arroz	19000	7	640	2,2
3	Pereiras	Palha de Arroz	10500	2	80	16,1
4	Charqueada	Pó de Pinus	12000	2	80	1,2
5	Piracicaba	Palha de Arroz	14000	2	80	5,1
6	Capivari	Pó de Pinus	17500	2	80	5,8
7	Capivari	Pó de Pinus	18000	1	40	5,8
8	Capivari	Palha de Arroz	20000	3	120	11,1
9	Capivari	Palha de Arroz	21000	1	40	7,0
10	Capivari	Palha de Arroz	20000	2	80	31,0
11	Santa Maria da Serra	Casca de Amendoim	18000	2	80	1,8
12	Capela do Alto	Pó de Pinus	20000	2	80	1,5
13	Capela do Alto	Pó de Pinus	30000	2	80	3,5
14	Capela do Alto	Pó de Pinus	13000	3	120	0,76

*Tempo de Exposição = estimativa considerando lotes de produção equivalentes a 40 dias.

3.4 Conclusões

A sorção potencial das fluoroquinolonas foi muito elevada nas matrizes estudadas, especialmente no solo. O potencial de sorção das fluoroquinolonas não foi influenciado por diferenças na composição do substrato da cama de frango, e nem pela adição de cama de frango ao solo. Para o solo a dessorção das fluoroquinolonas foi negligível, enquanto que para a cama de frango não, obtendo-se até 42% de dessorção. As concentrações medianas de fluoroquinolonas foram compatíveis com os valores encontrados em pesquisas anteriores a nível internacional. A enrofloxacin foi o composto mais frequentemente detectado, nas concentrações mais elevadas, sendo o único encontrado nas amostras de solos.

Este trabalho representou uma primeira investigação sobre a ocorrência de uma importante classe de antibióticos utilizados no Brasil, devendo servir de base para estudos posteriores. No entanto, ele demonstrou claramente que antibióticos (fluoroquinolonas) são rotineiramente utilizados na produção local de aves, representando uma fonte potencial de poluição ambiental que tem sido largamente ignorado no país, necessitando de uma maior atenção tendo em vista a importância da produção animal para a economia do país.

Referências

- ARISTILDE, L.; SPOSITO, G. Binding of ciprofloxacin by humic substances: a molecular dynamics study. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Malden, v. 29, n. 1, p. 90-98, 2010
- BOXALL, A.B.A.; BLACKWELL, P.A.; CAVALLO, R.; KAY, P.; TOLLS, J. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. **Toxicology Letters**, Clare, v. 131, n. 1-2, p.19-28, 2002.
- BOXALL, A.B.A.; KAY, P.; BLACKWELL, P.A.; FOGG, L.A. Fate of veterinary medicines applied to soils. In: KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004. p. 165-180.
- BOXALL, A.B.A. Fate of veterinary medicines applied to soils. In: KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**. 3. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2008. p. 103-119.
- CONKLE, J.L.; LATTAO, C.; WHITE, J.R.; COOK, R.L. Competitive sorption and desorption behavior for three fluoroquinolone antibiotics in a wastewater treatment wetland soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 80, n. 11, p. 1353-1359, 2010.

FONTES, M.P.F.; ALLEONI, L.R.F. Eletrochemical attributes and availability of nutrients, toxic elements, and heavy metals in tropical soils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 6, p. 589-608, 2006.

GOLET, E.M.; XIFRA, I.; SIEGRIST, H.; ALDE, A.C.; GIGER, W. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 37, n. 15, p. 3243–3249, 2003.

GU, C.; KARTHIKEYAN, K.G. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminium and iron hydrous oxides. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 39, n. 23, p. 9166-9173, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2007.

KARCI, A.; BALCIOĞLU, I.A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 16, p. 4652-4664, 2009.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; BARREIRO-GONZÁLEZ, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 148, n. 2, p. 570-579, 2007.

OECD. **OECD guidelines for testing of chemicals**. Test guideline 106: Adsorption/desorption using a batch equilibrium method. Paris, 2000.

PICÓ, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil – risks and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, n. 4, p. 1287-1299, 2007.

REGITANO, J.B.; LEAL, R.M.P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 601-616, 2010.

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**, Oxford, v. 65, n. 5 p. 725-759, 2006.

SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; ALBINI, A. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 1337-1350, 2011.

SUKUL, P.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, n. 8, p. 1344-1350, 2008.

THIELE-BRUHN, S.; AUST, M-O. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 47, n. 1, p. 31-39, 2004.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 35, n. 17, p. 3397-3406, 2001.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; TADEO, J.L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 562, n. 1, p. 30-35, 2006.

USDA. Foreign Agricultural Service. Country information. Western hemisphere – Brazil. Washington, DC, 2010. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/country/Brazil/Brazil.asp>. Acesso em: 01 dez. 2011.

USLU, M.Ö.; YEDILER, A.; BALCIOĞLU, I.A.; SCHULTE-HOSTEDE, S. Analysis and sorption behavior of fluoroquinolones in solid matrices. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 190, n. 1-4, p. 55-63, 2008.

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**, Amsterdam, v. 151, n. 3-4, p. 68-76, 2009.

XIANG-GANG, H.; QI-XING, Z.; LIN, X. Determination of thirteen antibiotics residues in manure by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 36, n. 9, p. 1162-1166, 2008.

ZHAO, L.; DONG, Y.H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 5, p. 1069-1075, 2010.

YANG, J-F.; YING, G-G.; ZHAO, J.L.; TAO, R.; SU, H-C.; CHEN, F. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl River using RRLC-MS/MS. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 16, p. 3424-3432, 2010.

4 ATRIBUTOS DO SOLO E A SORÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS E SULFONAMIDAS EM SOLOS BRASILEIROS

Resumo

A ocorrência, comportamento e potenciais impactos negativos dos antibióticos em solos brasileiros são ainda informações largamente desconhecidas, embora a produção animal no país seja expressiva e, conseqüentemente, o uso de compostos antibióticos. Este trabalho avaliou o comportamento sortivo de quatro compostos do grupo farmacológico das fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina e enrofloxacina) e cinco do grupo das sulfonamidas (sulfadiazina, sulfacloropiridazina, sulfamethoxazole, sulfadimidina e sulfathiazole) em treze solos tropicais com diferentes características físicas, químicas e mineralógicas. A sorção foi conduzida em concentração única, utilizando-se técnica de equilíbrio em batelada. Todos os compostos foram analisados por cromatografia líquida. A sorção foi altamente variável, até 1750 vezes para fluoroquinolonas (ciprofloxacina) e 100 vezes para as sulfonamidas (sulfacloropiridazina). Os valores medianos foram muito altos para todas as fluoroquinolonas (K_d a partir de 11.952 até 20.927 L kg⁻¹) e baixos para as sulfonamidas (K_d 3,2-8,8 L kg⁻¹), valores compatíveis com os valores relatados na literatura. A textura do solo foi o atributo do solo que mais influenciou a sorção de ambas as classes de compostos. A capacidade de troca catiônica efetiva também desempenhou um papel importante na sorção, demonstrando a importância dos processos de troca iônica na sorção desses compostos em solos tropicais. Os óxidos desempenharam um papel inexpressivo na sorção, enquanto que um efeito claro do pH do solo e da matéria orgânica sobre o potencial de sorção foi evidente apenas para as sulfonamidas, embora a sorção das fluoroquinolonas seja também um processo dependente do pH. Os resultados têm um significado prático importante, uma vez que não se espera lixiviação de fluoroquinolonas mesmo em um cenário de pior caso, enquanto que os atributos do solo tiveram uma influência decisiva sobre a classificação dos compostos do grupo das sulfonamidas como tendo um risco de lixiviação alto ou baixo.

Palavras-chave: Solos Tropicais. Antibióticos Veterinários. Potencial de Sorção. Atributos do Solo.

Abstract

The occurrence, behavior and potential negative impacts of antibiotics in Brazilian soils are still largely ignored although animal production is expressive in the country and so the use of antibiotic compounds. This work evaluated the sorption behavior of four fluoroquinolone compounds (norfloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin and enrofloxacin) and five sulfonamides (sulfadiazine, sulfachloropyridazine, sulfamethoxazole, sulfadimidine and sulfathiazole) in thirteen tropical soils with contrasting physical, chemical and mineralogical properties. Sorption was done in a single concentration, using a batch equilibrium technique. All compounds were analyzed by HPLC. Sorption to soils was highly variable, ranging as much as 1750 times for fluoroquinolones and 100 times for sulfonamides. Median sorption was very high for all fluoroquinolone (K_d from 11,952 to 20,927 L kg⁻¹) compounds and much lower for sulfonamides (K_d from 3.2 to 8.8 L kg⁻¹), consistent with literature reports. Soil texture was the single soil factor that mostly influenced sorption of both classes of compounds. Effective cation exchange capacity also played a major role in sorption, evidencing the importance of ionic exchange processes in the sorption of these compounds in tropical soils. Oxides played an inexpressive role in sorption and a clear effect of soil pH and organic matter content on the sorption potential was only evident for sulfonamides, although fluoroquinolones sorption is also a pH-dependent process. The results have practical significance once fluoroquinolones are not expected to leach even in a worst-case scenario, while soil attributes had a decisive influence on the classification of sulfonamides compounds as having a high or low leaching risk.

Key-words: Tropical soils. Veterinary Antibiotics. Sorption Potential. Soil Attributes.

4.1 Introdução

Fluoroquinolonas e sulfonamidas são duas das mais importantes classes de compostos antibióticos comumente utilizados para fins veterinários em todo o mundo (KARCI; BALCIOĞLU, 2009). Uma série de estudos recentes avaliou sua ocorrência, destino e riscos ambientais (PICÓ; ANDREU, 2007; ZHAO; DONG; WANG, 2010; BARAN et al., 2011). Em solos agrícolas, concentrações de até 0,40 (sulfonamidas) e 0,37 (fluoroquinolonas) mg kg⁻¹ foram relatadas, enquanto que concentrações muito mais elevadas são comumente encontradas em amostras de esterco animal (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007; KARCI; BALCIOĞLU, 2009; ZHAO; DONG; WANG, 2010). Além disso, o armazenamento do esterco contribuiu muito pouco para a degradação da sulfadiazina e difloxacina durante 150 dias (LAMSHÖFT et al., 2010).

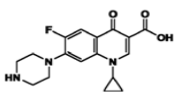
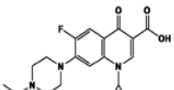
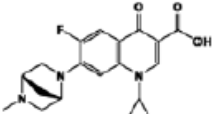
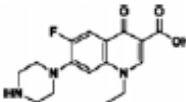
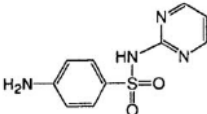
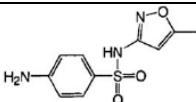
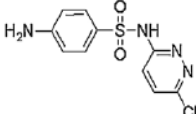
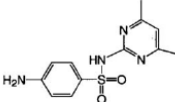
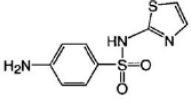
Nos solos, as fluoroquinolonas degradam-se lentamente (meia-vida > 60 dias) (GOLET et al., 2003; BOXALL et al., 2006), enquanto que a degradação das sulfonamidas ocorre mais rapidamente (meia-vida de 18,6 e 21,3 dias para sulfamethazina e sulfacloropiridazina, ACCINELLI et al., 2007). A formação de resíduos ligados (não extraíveis) é um processo importante que regula a dissipação da sulfadiazina em solos, com concentrações residuais persistindo no longo prazo (KREUZIG; HÖLTGE, 2005; ROSENDAHL et al., 2011).

Ambos os grupos de antibióticos consistem de compostos polares com grupos ionizáveis em valores de pH encontrados no ambiente (Tabela 4.1), onde a importância de outros mecanismos que não a partição hidrofóbica explicam mais adequadamente os seus potenciais de sorção (SUKUL et al., 2008; VASUDEVAN et al., 2009), embora apresentem comportamentos sortivos distintos. As fluoroquinolonas apresentam alto potencial de sorção aos solos ($K_d = 260$ a 5.012 L kg⁻¹, SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; PICÓ; ANDREU, 2007), tendendo a se acumular não só nestes, mas também em outras matrizes sólidas, como lodos de esgoto (até 2 mg kg⁻¹ de norfloxacin e enrofloxacin, GOLET et al., 2003) e sedimentos fluviais (até 1,56 mg kg⁻¹ de ofloxacin, YANG et al., 2010). Já as sulfonamidas apresentam alto potencial de lixiviação devido ao seu baixo potencial de sorção aos solos ($K_d = 0,6$ - $7,4$ L kg⁻¹, SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Consoante este fato, resíduos de sulfonamidas foram encontrados em amostras de água subterrânea (concentrações de até 0,47 mg L⁻¹, HIRSCH et al., 1999), enquanto que nenhuma ocorrência de fluoroquinolonas foi relatada nesta matriz até o presente momento.

Vários mecanismos de sorção, tais como a complexação de superfície, ligações de hidrogênio e troca iônica influenciam a sorção de antibióticos no meio ambiente (TOLLS, 2001). Em consequência, o coeficiente de sorção de um composto será grandemente afetado pelas propriedades físico-químicas do solo, especialmente o pH e a quantidade e qualidade da matéria orgânica e dos minerais de argila presentes (THIELE-BRUHN, 2003), o que afeta diretamente a capacidade de troca de cátions do solo. Exemplificando, os coeficientes de sorção para enrofloxacin em solos variaram em até 30 vezes em razão da variação nos atributos de solo (BOXALL et al., 2004).

Estudos de sorção desempenham um papel importante para a compreensão do destino e comportamento de contaminantes no meio ambiente (SUKUL et al., 2008). Isto parece ser particularmente importante no caso do Brasil, onde a produção animal é substancial e, paralelamente, a utilização de antibióticos. No entanto, apesar de ser um dos maiores produtores e exportadores mundiais de produtos de origem animal, o país carece de investigações sobre a ocorrência, o comportamento e o destino destes contaminantes em nosso ambiente (REGITANO; LEAL, 2010).

Tabela 4.1 – Principais características físico-químicas das fluoroquinolonas e sulfonamidas

Composto	Estrutura	Peso Molecular	pK _a 1*	pK _a 2*
Ciprofloxacina		331,35	5,9	8,89
Enrofloxacin		359,4	6,27	8,3
Danofloxacin		357,37	6,07-6,32	8,56-8,73
Norfloxacin		319,33	6,23	8,55
Sulfadiazina		250,28	2,0	6,40
Sulfamethoxazole		253,28	1,60	5,70
Sulfaclopiridazina		284,72	2,0	5,90
Sulfadimidina		278,33	2,60	8,00
Sulfathiazole		255,319	2,2	7,2

Os valores de pK_a das sulfonamidas são de IKEHATA; NAGHASHKAR;EL-DIN (2006); das fluoroquinolonas de SPELTINI et al., (2011).

A fim de cumprir parte dessa lacuna, foi investigado o coeficiente de sorção de quatro fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina e enrofloxacina) e cinco sulfonamidas (sulfadiazina, sulfamethoxazole, sulfaclopiridazina, sulfadimidina e sulfathiazole) em 13 solos brasileiros apresentando uma grande variabilidade em seus atributos químicos, físicos e mineralógicos. Análises estatísticas (componentes principais, análise de variância, regressão stepwise e liner simples) foram traçadas a fim de explorar em maiores detalhes a influência dos atributos do solo na sorção destes compostos.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Solos

Um conjunto de 13 solos (0-20 cm) da região sudeste do Brasil (Estado de São Paulo) foi coletado em locais com um mínimo de perturbação antrópica (florestas nativas e fragmentos florestais), onde a contaminação com antibióticos é inesperada. Estes solos foram selecionados de um conjunto de 30 solos utilizados por Soares e Alleoni (2008). A seleção foi feita de modo a assegurar uma grande variabilidade nos atributos físicos e químicos dos diferentes solos (Tabela 4.2). Os principais atributos do solo avaliados foram: pH em solução de CaCl_2 , capacidade de troca catiônica efetiva (CTCe), capacidade de troca catiônica total (CTCt), teor de carbono orgânico (CO), textura (teor de areia, silte e argila), cátions trocáveis (Ca, Mg, K e Al), óxidos de ferro livres (FeDCB, extraído com ditionito-citrato-bicarbonato), ferro amorfo e alumínio amorfo (FeOX e AlOX, óxidos de ferro e de alumínio mal cristalizados, extraídos com solução ácida de oxalato de amônio). Informações detalhadas sobre os procedimentos de amostragem e caracterização estão disponíveis no trabalho de Soares (2004) e de Soares e Alleoni (2008), tendo sido utilizadas técnicas convencionais de ciência do solo atualmente em uso no Brasil.

Tabela 4.2 - Principais atributos dos solos estudados

Solo	Classificação	pH CaCl_2	PCZ ²	C.O	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	CTCe ³	CTCt ⁴	FeOX ⁵	AlOX ⁵	FeDCB ⁶	Argila	Silte	Areia	Mineralogia ⁷
				g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	mmolc dm ⁻³									g kg ⁻¹				
LVA1	Latossolo Vermelho-Amarelo	3.7	3.3	12.4	2.0	0.5	1.3	0.7	9.8	14.4	35.7	16.9	1.72	0.81	19.3	181	40	779	Kt
LVec	Latossolo Vermelho Eutroférico	6.9	6.6	95.6	49.2	5.2	28.8	25.2	1.2	3	52.2	62.2	14.87	8.61	185.2	684	207	109	Kt, Gb
PVA1	Argissolo Vermelho-Amarelo	5.1	3.9	6.7	1.8	0.3	2.6	0.9	1.1	3.2	32.0	7.0	0.23	0.2	3.5	60	100	840	Kt
PVA5	Argissolo Vermelho-Amarelo	5.7	4.7	41.0	22.5	3.6	50.3	14	0.8	14.2	217.5	82.1	3.64	2.31	45.7	366	448	186	Kt, Il, HIV
RQ	Neossolo Quartzarênico	3.8	3.5	9.6	1.1	0.4	2.2	0.9	4.2	9.2	27.6	12.6	0.33	0.22	3.0	80	40	880	Kt
RL	Neossolo Litólico	4.8	4.1	26.2	6.7	1.0	22.9	8.1	1.0	10.6	153.2	42.6	0.78	0.43	7.5	142	346	512	Il, HIV
NX	Nitossolo Háplico	5.1	4.8	54.3	9.4	1.6	45.9	18.2	1.3	22.2	125.2	87.9	8.25	5.49	84.5	345	182	473	Kt, Gb
NVec	Nitossolo Vermelho Eutroférico	5.2	3.9	65.6	10.3	4.5	41	14.3	1.3	36.4	107.2	96.2	15.3	9.92	192.2	658	267	75	Kt, Gb
GM	Gleissolo Melânico	3.9	3.0	213.4	14.8	1.2	5.1	3.1	41.0	124.2	109.9	133.6	0.33	0.79	4.9	476	380	144	Kt
CX	Cambissolo Háplico	3.7	4.6	29.2	4.6	1.2	3.3	2.0	16.2	28.3	56.9	34.8	1.63	0.79	19.3	243	101	656	Kt
SX	Planossolo Háplico	4.8	3.0	21.6	3.0	1.3	13.4	7.8	1.5	12.1	100	34.6	2.25	1.82	18.6	204	347	449	Kt
TC	Luvissolo Crômico	4.5	3.3	9.8	1.6	1.1	3.5	1.4	1.3	5.7	39.2	11.7	0.61	0.43	8.2	40	240	720	Kt, Il, HIV
MT	Chernossolo Argilúvico	5.4	3.7	57.8	19.2	2.4	82.1	20.1	1.1	33.3	207.8	137.8	7.19	5.09	113.3	543	251	206	Kt

(1) Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (Embrapa, 1999); (2) PCZ = ponto de carga zero; (3) CTCe = capacidade de troca catiônica efetiva obtida pelo método da troca compulsiva; (4) capacidade de troca catiônica total obtida pela soma de cátions trocáveis (Ca, Mg, K and Na) mais H+Al; (5) teores de óxidos de ferro e alumínio extraídos com solução ácida de oxalato de amônio; (6) conteúdo de Fe extraído por solução de ditionito-citrato-bicarbonato de sódio; (7) Kt = caolinita; Gb=gibbsita; Il=ilita; HIV = vermiculita com hidroxí entrecamadas.

4.2.2 Reagentes e padrões analíticos

Norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), danofloxacin (DAN) e enrofloxacin (ENR), sulfadiazin (SDZ), sulfamethoxazole (SMX), sulfaclopiridazin (SCP), sulfadimidin (SDI) e sulfathiazole (STZ) foram de grau HPLC, com pureza > 98%. As soluções estoque de fluoroquinolonas (1 mg mL^{-1}) foram preparadas em metanol contendo 1% de ácido acético, armazenadas a -18°C no escuro e usadas dentro de 90 dias. As soluções estoque de sulfonamidas ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) foram também preparadas em metanol e mantidas de maneira semelhante às fluoroquinolonas. Água ultra-pura foi utilizada na preparação de todas as soluções aquosas e todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau HPLC. Cloreto de cálcio (CaCl_2) e ácido fórmico (CH_2O_2) foram todos de grau analítico.

4.2.3 Experimentos de sorção

Os ensaios de sorção para as quatro fluoroquinolonas (NOR, CIP, DAN e ENR) e cinco sulfonamidas (SDZ, SMX, SCP, SDI e STZ) foram realizados para 13 solos com diferentes atributos químicos, físicos e mineralógicos (Tabela 4.2). Testes preliminares foram realizados para avaliar a estabilidade dos compostos, a possível sorção às paredes dos tubos, bem como para estabelecer o tempo de equilíbrio e a razão solo:solução adequada. Não houve perdas significativas (< 5%, dados não mostrados). A razão solo:solução final foi de 1:15 (2 g de solo e 30 mL de 0,01 M de CaCl_2 solução) para as fluoroquinolonas e de 1:2 (2,5 g de solo e 5 mL de 0,01 M de CaCl_2 solução) para as sulfonamidas.

O potencial de sorção foi avaliado em uma concentração única: 6 e 1 mg L^{-1} (preparados em solução 0,01 mol L^{-1} de CaCl_2) para as fluoroquinolonas e sulfonamidas, respectivamente. Todos os testes foram feitos em triplicata. Foi utilizada uma única concentração nos ensaios de sorção uma vez que o objetivo foi associar o potencial de sorção com as características do solo contrastantes, e não o de se obter as isotermas completas de sorção. O “guideline” da OECD para experimentos de sorção com pesticidas foi seguido (OECD, 2000). Após a adição da solução contendo antibiótico, os tubos foram agitados horizontalmente (200 rpm, 24 h), centrifugados (2620 g, 10 min) e o sobrenadante filtrado ($0,45 \mu\text{m}$, em seringa). Posteriormente, determinaram-se as concentrações de equilíbrio na solução final (C_e) através da utilização de cromatografia líquida (HPLC). As quantidades de antibióticos sorvidas (S) foram calculadas pela diferença entre as concentrações iniciais (C_i) e

em equilíbrio (C_e), levando-se em consideração a relação solo:solução empregada. Os dados foram então ajustados à forma linear da equação de Freundlich ($S = K_d * C_e$), a fim de se estimar os coeficientes de partição (K_d).

4.2.4 Análises por cromatografia líquida

Para a determinação das concentrações de fluoroquinolonas e sulfonamidas utilizou-se cromatografia líquida (Agilent, série 1200). O instrumento estava equipado com bomba quaternária, injetor automático, degaseificador e detectores de arranjo de diodos (DAD) e de fluorescência (FLD). As separações analíticas foram realizadas em coluna ACE C18 (250 x 4,6 mm, 5 mm), mantida a 25 °C, sendo o volume de injeção de 50 µL. As fluoroquinolonas foram quantificadas com eluição isocrática, sendo a fase móvel composta por 72% de solução aquosa de ácido fórmico (0,1%, solvente A) e 28% de acetonitrila (solvente B) e fluxo de 1 mL min⁻¹. Os sinais de fluorescência foram fixados em 280 e 450 nm para os comprimentos de onda de excitação e de emissão, respectivamente. As sulfonamidas também foram quantificadas com eluição isocrática, sendo a fase móvel composta de 60% de solução aquosa de ácido fórmico (0,1%, solvente A) e 40% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (solvente B) e fluxo de 0,5 mL min⁻¹. As leituras foram feitas com detector de arranjo de diodos, sendo o comprimento de onda fixado em 265 nm.

4.2.5 Análises estatísticas

O software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) foi utilizado para realizar uma série de análises estatísticas sobre as relações entre os atributos do solo e os coeficientes de sorção obtidos. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar a significância das diferenças nos valores de K_d de todos os antibióticos entre os diferentes solos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A transformação logarítmica foi necessária para todos os valores de K_d , de modo a atender os pressupostos da ANOVA de distribuição normal dos dados.

Análise de componentes principais (ACP) foi usada para o entendimento das interações entre os principais atributos do solo e os valores de log K_d . Um composto representante do grupo das fluoroquinolonas (enrofloxacina) e um das sulfonamidas

(sulfadiazina) foram empregados na análise de ACP, juntamente com dez outros atributos selecionados: areia, carbono orgânico (CO), cálcio trocável (Catc), magnésio trocável (Mgtc), potássio trocável (Ktc), capacidade efetiva de troca catiônica (CTCe), ferro livre (FeDCB), óxidos de alumínio e ferro amorfos (AlOX e FeOX) e pH-CaCl₂. Silte e argila (g kg⁻¹) não foram incluídos na análise de ACP devido à sua falta de independência e colinearidade com o conteúdo de areia. Além disso, o teor de areia apresentou maior variação do que o de argila e, por isso, foi preferido na análise de ACP. Esses atributos foram selecionados por poder influenciar importantes processos de sorção, por exemplos a troca e a ponte de cátions (CTCe), a complexação em superfície (FeDCB) e a partição hidrofóbica (CO). Regressão múltipla stepwise (MSR) foi usada para complementar a análise de componentes principais (ACP). Os dados de K_d foram transformados logaritmicamente, tal como exigido pela análise MSR. Regressão linear simples também foi usada para explorar os coeficientes de correlação de Pearson para todas as variáveis disponíveis (p < 0,05).

4.3 Resultados

4.3.1 Sorção de fluoroquinolonas e sulfonamidas

O potencial de sorção de todas as fluoroquinolonas foi bastante elevado (K_d ≥ 999,9 L kg⁻¹ para norfloxacin, ≥ 726,8 L kg⁻¹ para a ciprofloxacina, ≥ 847,7 L kg⁻¹ para danofloxacina e ≥ 544,2 L kg⁻¹ para a enrofloxacina) (Tabela 4.3), representando a retenção de pelo menos 84% das quantidades aplicadas. Os valores medianos (K_d = 11.952 a 20.927,5 L kg⁻¹, Tabela 4.3) foram em geral maiores do que os valores previamente relatados (260 a 5.612 L kg⁻¹, SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Já os valores de K_d para as sulfonamidas variaram bastante (0,7-67,1 L kg⁻¹), mas foram relativamente baixos para a maioria dos solos estudados (Tabela 4.3). Os valores medianos de sorção (K_d = 3,2 a 8,8 L kg⁻¹) estiveram dentro da faixa de valores geralmente relatados em outros trabalhos (0,6 a 7,4 L kg⁻¹, SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

Tabela 4.3 - Comparações de médias pelo teste de Tukey para os valores de K_d de fluoroquinolonas e sulfonamidas nos solos estudados

Solo	NOR	CIP	DAN	ENR	SDZ	SMX	SCP	SDI	STZ
K_d (L kg ⁻¹)									
LVA1	5.852,3 H*	2.878,8 F	2.834,5 I	2.127,7 H	1,2 H	1,1 G	1,6 H	1,3 KL	1,6 G
LVef	16.860,8 F	11.387,9 DE	17.194,1 F	9.904,5 F	5,7 D	3,8 E	6,1 EF	13,2 E	25,7 C
PVA1	999,9 J	726,8 H	847,7 K	544,2 I	0,8 J	0,7 H	0,7 J	1,0 L	1,0 I
PVA5	36.209,1 D	40.608,0 C	50.860,3 C	53.654,0 C	10,9 C	8,2 C	5,3 GF	22,1 C	67,1 A
RQ	1.499,1 I	1.102,7 G	1.249,6 J	779,7 I	1,1 HI	1,0 G	1,1 I	1,4 K	1,3 H
RL	34.865,4 D	41.125,8 C	30.097,6 DE	37.184,5 C	3,2 E	3,7 E	7,0 DE	4,7 H	8,8 E
NX	10.418,6 G	9.658,4 E	9.929,8 G	12.324,3 EF	4,6 D	5,4 E	8,2 D	7,7 F	19,4 D
Nvef	156.926,9 B	26.1147,1 B	127.466,3 B	124.880,6 B	14,3 A	14,6 B	41,9 B	32,0 A	62,5 AB
GM	48.867,5 C	45.443,2 C	31.717,2 D	24.806,0 D	12,7 A	28,5 A	70,1 A	26,4 B	55,5 B
CX	26.088,8 E	11.952,1 DE	10.826,0 G	12.511,7 EF	1,3 G	2,7 F	4,6 G	2,6 I	4,3 F
SX	20.927,5 EF	16.019,8 D	23.584,4 E	14.490,1 E	3,1 F	3,8 E	6,7 E	5,9 G	7,7 E
TC	9.035,2 G	3.515,1 F	4.947,4 H	4.160,0 G	0,9 IJ	1,1 G	1,3 I	1,8 J	1,3 H
MT	335.633,6 A	1.277.873,9 A	255.643,7 A	251.430,0 A	7,8 B	7,4 D	13,3 C	16,3 D	28,1 C
MÉDIA	54.168,1	132.572,3	43.630,7	42.215,2	5,2	6,3	12,9	10,5	21,9
MEDIANA	20.927,5	11.952,1	17.194,1	12.511,7	3,2	3,8	6,1	5,9	8,8
FAIXA VARIAÇÃO	336	1.758	302	462	18	41	100	32	67

* Médias seguidas por letras maiúsculas na mesma coluna (diferentes solos) não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ($p = 0,05$)

4.3.2 Interações entre atributos do solo e sorção

Os primeiros dois componentes principais (eixo) foram responsáveis por 77,6% da variação na análise de componentes principais envolvendo os atributos do solo e os valores de $\log K_d$ para a enrofloxacina e a sulfadiazina (Figura 4.1). Os valores de $\log K_d$ da enrofloxacina foram altamente correlacionados com os valores $\log K_d$ de outras fluoroquinolonas ($r^2 = 0,97$ a $0,99$) (Tabela 4.4), assim como os valores de $\log K_d$ para a sulfadiazina na comparação com as demais sulfonamidas ($r^2 = 0,93$ a $0,97$) (Tabela 4.4). Assim sendo, assumiu-se que os resultados da ACP para enrofloxacina e sulfadiazina são extensivos a todos os demais compostos.

Interessantemente, ambos os compostos ocuparam uma posição próxima no espaço de ordenação, mostrando uma forte correlação entre si (Figura 4.1), o que também foi confirmado pela análise do coeficiente de correlação entre as mesmas ($r^2 = 0,87$, $p < 0,01$) (Tabela 4.4). A sorção das fluoroquinolonas e sulfonamidas foi fortemente afetada pelos descritores de textura do solo (posicionamento negativo do teor de areia) e capacidade de troca catiônica efetiva (posicionamento positivo) (Figura 4.1). O teor de carbono orgânico também se correlacionou positivamente com as variações nos valores de $\log K_d$ (Figura 4.1) de ambos os grupos, mas a ACP assim como a análise do coeficiente de correlação linear mostrou uma associação mais forte do carbono orgânico com as sulfonamidas, ao invés das fluoroquinolonas (Tabela 4.4). Descritores dos conteúdos de ferro e de óxidos de alumínio posicionaram-se quase ortogonalmente com os valores de $\log K_d$ para ambos os compostos, mostrando uma fraca correlação com os valores de sorção (Figura 4.1), o que é coerente com o fato dos conteúdos de óxido de ferro e alumínio estarem ausentes na maioria das equações obtidas com a regressão múltipla, enquanto a textura (teor de areia) esteve presente em todas as equações e a capacidade de troca catiônica efetiva na maioria (Tabela 4.5). O pH esteve muitas vezes presente na equação das sulfonamidas apresentando um parâmetro linear negativo. Os atributos do solo explicaram entre 68% e 99% da variabilidade dos valores $\log K_d$ de fluoroquinolonas e sulfonamidas como determinado pela regressão stepwise (Tabela 4.5).

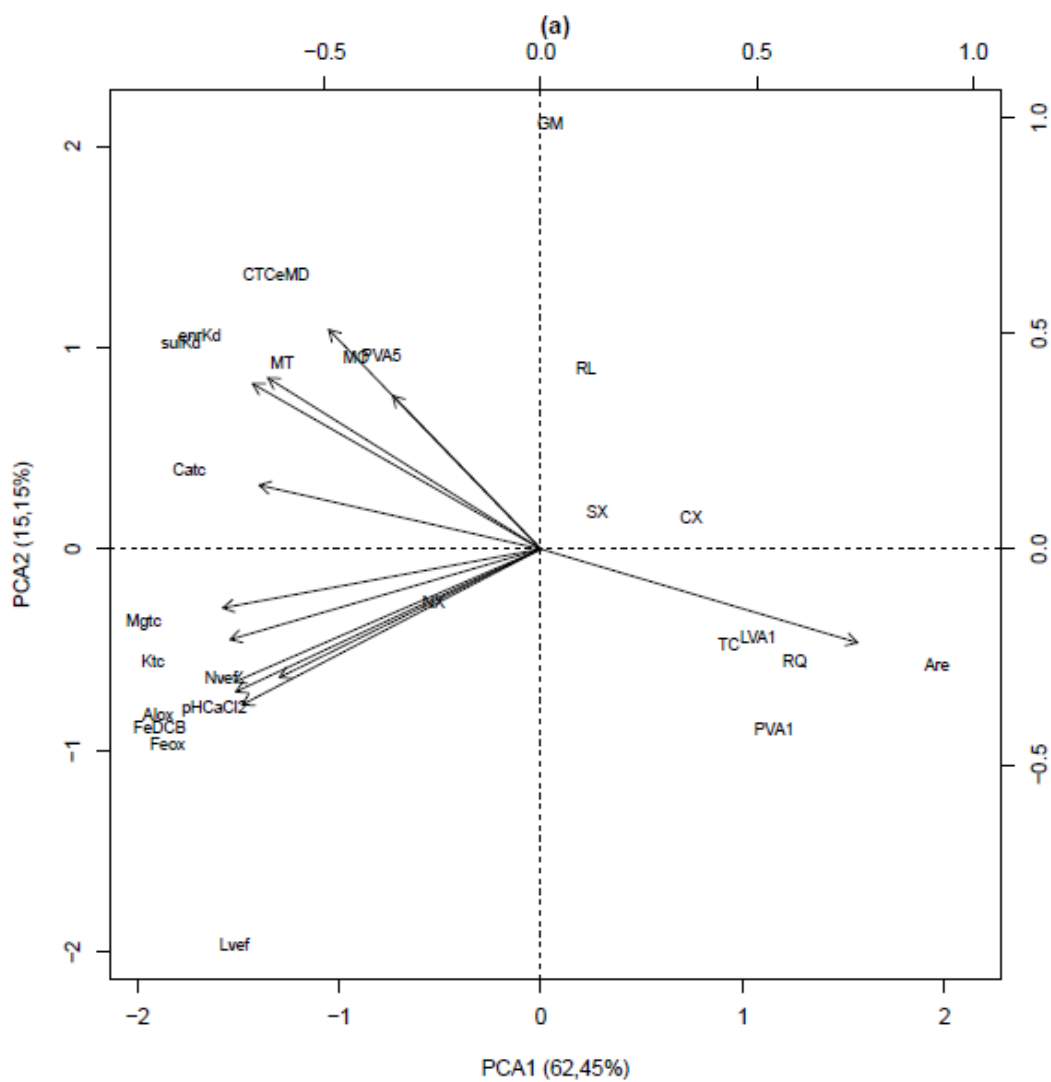


Figura 4.1 - Análise de componentes principais dos atributos de solo e valores de $\log K_d$ para a enrofloxacin e sulfadiazina – eixo 1 vs. eixo 2

Tabela 4.4 - Matriz de correlação entre os atributos de solo e os valores de logK_d de fluoroquinolonas e sulfonamidas

	pHCaCl2	Catc	Mgtc	Ktc	Altc	H + Al	CO	Areia	Argila	CTCe	CTCt	FeDCB	FeOX	AlOX	norKd	cipKd	danKd	enrKd	sdzKd	smxKd	scpKd	sdiKd
pHCaCl2																						
Catc	0.61 NS																					
Mgtc	0.85**	0.82**																				
Ktc	0.79**	0.58*	0.81**																			
Altc	-0.54 NS	-0.37 NS	-0.37 NS	-0.24 NS																		
H + Al	0.33 NS	0.01 NS	0.10 NS	0.03 NS	0.89**																	
CO	0.08 NS	0.12 NS	0.25 NS	0.31 NS	0.76**	0.88**																
Areia	-0.59*	-0.65*	-0.75**	-0.82**	-0.14 NS	0.45 NS	-0.68*															
Argila	0.57*	0.62*	0.78**	0.85**	0.12 NS	0.38 NS	0.64*	-0.91**														
CTCe	0.36 NS	0.82**	0.54 NS	0.35 NS	-0.10 NS	0.21 NS	0.22 NS	-0.64*	0.41 NS													
CTCt	0.29 NS	0.72**	0.60*	0.48 NS	0.34 NS	0.67*	0.74**	0.84**	0.79**	0.71**												
FeDCB	0.71**	0.62 *	0.83**	0.89**	- 0.31 NS	0.06 NS	0.24 NS	-0.696**	0.86**	0.22 NS	0.49 NS											
FeOX	0.711**	0.58*	0.83**	0.88**	-0.32 NS	0.08 NS	0.23NS	-0.67*	0.84**	0.18 NS	0.45 NS	0.99**										
AlOX	0.69**	0.62*	0.83**	0.87**	-0.30 NS	0.02 NS	0.26 NS	-0.71**	0.86**	0.23 NS	0.51 NS	0.99**	0.99**									
norKd	0.26 NS	0.69**	0.54 NS	0.55 NS	0.12 NS	0.42 NS	0.44 NS	-0.80**	0.70**	0.72**	0.79**	0.51 NS	0.46 NS	0.51 NS								
cipKd	0.31 NS	0.78**	0.59*	0.53 NS	0.05 NS	0.39 NS	0.41 NS	-0.80**	0.71**	0.79**	0.84**	0.53 NS	0.47 NS	0.53 NS	0.98**							
danKd	0.39 NS	0.76**	0.64*	0.62*	0.02 NS	0.36 NS	0.43 NS	-0.86**	0.73**	0.80**	0.81**	0.55*	0.507 NS	0.56*	0.98**	0.98**						
enrKd	0.35 NS	0.77**	0.61*	0.58*	0.02 NS	0.35 NS	0.39 NS	-0.83**	0.69**	0.83**	0.80**	0.52 NS	0.47 NS	0.52 NS	0.98**	0.97**	0.99**					
sdzKd	0.36 NS	0.66*	0.62*	0.64*	0.19 NS	0.53 NS	0.71**	-0.94**	0.84**	0.72**	0.89**	0.57*	0.55 NS	0.60*	0.84**	0.86**	0.88**	0.871**				
smxKd	0.23 NS	0.52 NS	0.50 NS	0.53 NS	0.42 NS	0.72 **	0.78**	-0.89**	0.76**	0.67*	0.90**	0.44 NS	0.427 NS	0.48 NS	0.81**	0.80**	0.83**	0.82**	0.97**			
scpKd	0.15 NS	0.45 NS	0.45 NS	0.48 NS	0.45 NS	0.74 **	0.78**	-0.85**	0.76**	0.55 NS	0.87**	0.46 NS	0.46 NS	0.51 NS	0.82**	0.80**	0.82**	0.81**	0.94**	0.97**		
sdiKd	0.49 NS	0.67*	0.69**	0.74**	0.19 NS	0.52 NS	0.68**	-0.98**	0.86**	0.70**	0.89**	0.62*	0.61*	0.65*	0.81**	0.82**	0.88**	0.85**	0.98**	0.95**	0.89**	
stzKd	0.49 NS	0.68*	0.71**	0.73**	0.19 NS	0.49 NS	0.67*	-0.96**	0.85**	0.74**	0.88**	0.60*	0.59*	0.63*	0.79**	0.80**	0.85**	0.84**	0.97**	0.95**	0.88**	0.99**

*nível de significância do teste t de Student a 5%, ** nível de significância a 1% e NS = não significativo. Os valores de K_d estão na forma logarítmica

Tabela 4.5 - Regressões múltiplas stepwise para todos os compostos

Composto	Equação	R ²
Norfloxacin	$\log K_d = 8.0672 - 0.0030 \cdot \text{areia} - 0.493 \cdot \text{pH} - 0.005 \cdot \text{CO} + 0.0089 \cdot \text{Catc}$	0.68
Ciprofloxacin	$\log K_d = 4.2797 - 0.0015 \cdot \text{areia} + 0.0065 \cdot \text{CTCe}$	0.79
Danofloxacin	$\log K_d = 4.3791 - 0.0015 \cdot \text{areia} + 0.0047 \cdot \text{CTCe}$	0.99
Enrofloxacin	$\log K_d = 4.1069 + 0.0062 \cdot \text{CTCe} - 0.0013 \cdot \text{areia}$	0.99
Sulfadiazina	$\log K_d = 2.2919 - 0.0017 \cdot \text{areia} - 0.2053 \cdot \text{pH} + 0.0048 \cdot \text{Catc}$	0.81
Sulfamethoxazole	$\log K_d = 2.5649 - 0.0022 \cdot \text{areia} - 0.1716 \cdot \text{pH} - 0.0904 \cdot \text{Ktc}$	0.83
Sulfaclopiridazina	$\log K_d = 3.5288 - 0.0024 \cdot \text{areia} - 0.3528 \cdot \text{pH}$	0.99
Sulfadimidina	$\log K_d = 1.8390 - 0.0018 \cdot \text{areia} - 0.0756 \cdot \text{pH} + 0.0011 \cdot \text{CTCe}$	0.94
Sulfathiazole	$\log K_d = 1.6287 - 0.0019 \cdot \text{areia} + 0.0022 \cdot \text{CTCe}$	0.79

A análise de variância (ANOVA) mostrou diferenças expressivas entre os valores de $\log K_d$ de todos os compostos nos solos (Tabela 4.3). Consistente com os resultados da ACP, a análise do coeficiente de correlação de Pearson mostrou que a textura (representada pelo teor de areia) foi o fator que melhor se correlacionou com a sorção das fluoroquinolonas aos solos ($r^2 = -0,80$ a $-0,86$), seguida pela capacidade efetiva de troca catiônica ($r^2 = 0,72$ a $0,82$) e teor de cálcio ($r^2 = 0,68$ a $0,78$), todos indicando a importância da interação eletrostática para a sorção das fluoroquinolonas em solos (Tabela 4.4). O carbono orgânico do solo não apresentou correlação com a sorção das fluoroquinolonas ($r^2 = 0,38$ - $0,43$, não significativo), (Tabela 4.4). No caso das sulfonamidas, a textura (teor de areia) foi igualmente o fator isolado mais fortemente correlacionado com a sorção ($r^2 = -0,85$ a $-0,97$) (Tabela 4.4). Diferentemente das fluoroquinolonas, o teor de matéria orgânica mostrou uma boa correlação com os valores de sorção das sulfonamidas ($r^2 = 0,66$ a $0,78$), juntamente com a capacidade de troca catiônica efetiva ($r^2 = 0,54$ a $0,73$) (Tabela 4.4).

Os valores de pH não se correlacionaram com a sorção dos compostos antibióticos estudados. No entanto, quando plotado graficamente, um efeito claro do pH sobre a sorção das sulfonamidas foi evidente (Figura 4.2). O mesmo não foi observado para as fluoroquinolonas (dados não mostrados).

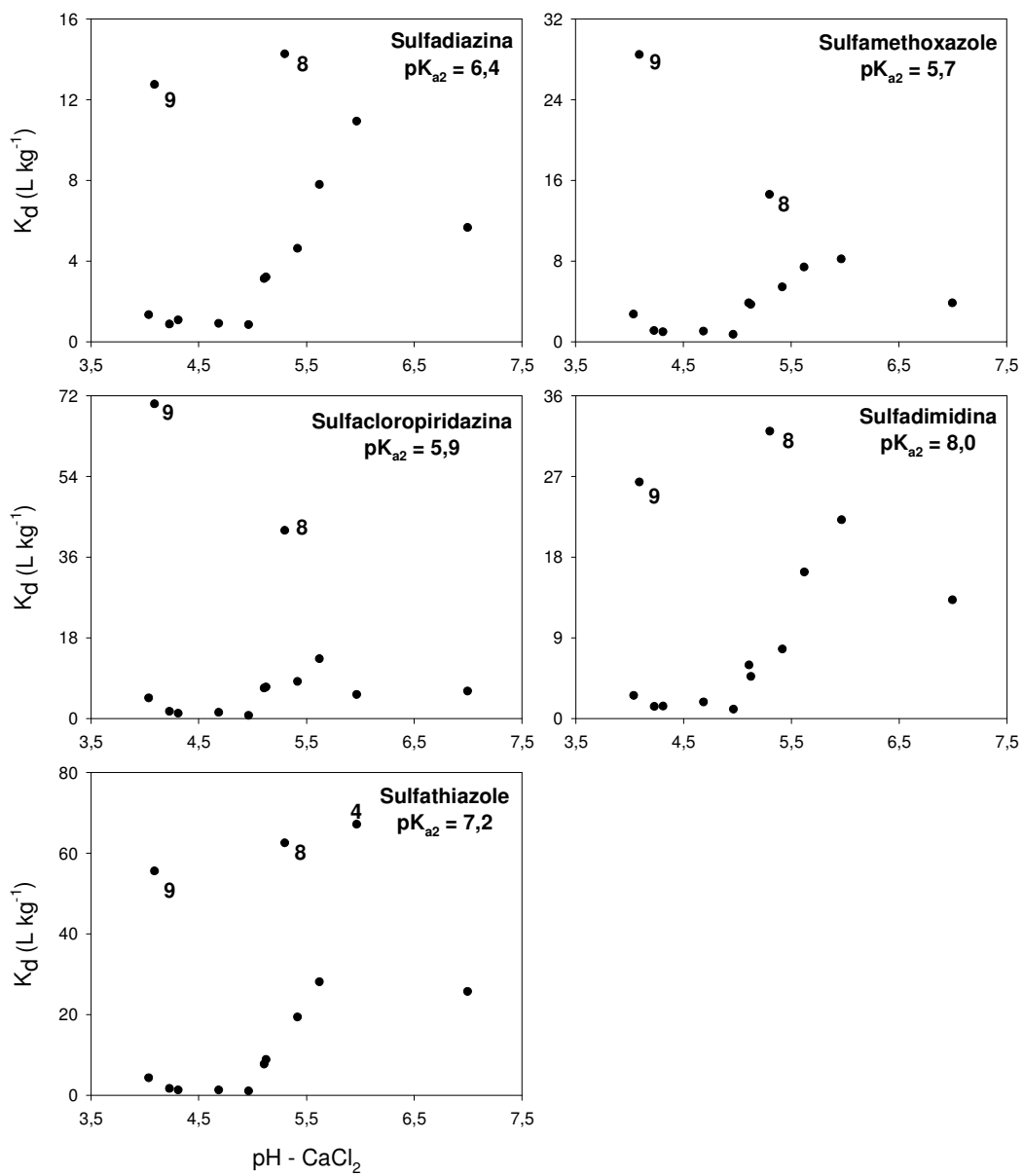


Figura 4.2 - Sorção das sulfonamidas em relação a variação natural de pH dos solos

4.4 Discussão

4.4.1 Atributos de solo influenciando a sorção das fluoroquinolonas

Os resultados indicaram forte afinidade das fluoroquinolonas aos solos, mostrando seu baixo potencial de transporte vertical (lixiviação), mesmo no pior cenário; ou seja, no solo (PVA1) com alto teor de areia (840 g kg^{-1}) e baixo teor de carbono orgânico ($6,6 \text{ g kg}^{-1}$). No entanto, estes contaminantes podem também atingir o ambiente aquático mediante o arraste de partículas de solo por processos erosivos, situação comum durante períodos de intensa pluviosidade. As fluoroquinolonas tendem a se acumular nas matrizes sólidas em longo prazo (PICÓ; ANDREU, 2007), indicando que baixas concentrações destes compostos podem persistir no ambiente e causar riscos aos organismos aquáticos (TANTAM et al., 2011). Tamtam et al. (2011) detectaram baixas concentrações de flumequina, ácido nalidíxico e oxolínico (até $32 \mu\text{g kg}^{-1}$) em sedimentos do rio Sena (França), coletados em profundidades maiores que 80 cm e datados da década de 1960.

As fluoroquinolonas são compostos zeuteriônicos, com dois grupos funcionais ionizáveis de maior relevância, o grupo 3-carboxila ($\text{pK}_a \sim 6$) e o grupo N-4 do substituinte piperazina ($\text{pK}_a \sim 8$) (Tabela 4.1) (PICÓ; ANDREU, 2007). Em valores de pH inferiores a 6, espécies catiônicas são predominantes, e a ligação iônica entre o grupo amina positivamente carregado das fluoroquinolonas e os sítios de troca do solo carregados negativamente é tido como o principal processo regulando a sorção (VASUDEVAN et al., 2009). Em valores de pH mais elevados (6-8), as espécies zeuteriônicas predominam, e embora apresentem um potencial de troca catiônica menor que quando na forma catiônica (VASUDEVAN et al., 2009), o processo de pontes de cátions através do grupo carboxila (negativo) do zeuterion pode atuar na retenção de fluoroquinolonas, o que é coerente com a alta e significativa correlação existente entre os valores de $\log K_d$ e os teores de Ca ($r^2 = 0,68$ a $0,78$, $p < 0,01$, Tabela 4.4) e com a capacidade destes compostos em formarem complexos estáveis com cátions metálicos (TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN; TADEO, 2006). No entanto, fica claro que a troca iônica foi o mecanismo dominante no processo de sorção, uma vez que nenhuma correlação foi encontrada entre a sorção das fluoroquinolonas e os conteúdos de carbono orgânico e de óxidos metálicos no solo (Tabela 4.4), excluindo a importância das reações de complexação em superfície e a partição hidrofóbica. De qualquer forma, a importância do teor

de carbono orgânico não pode ser descartada devida a sua correlação positiva e significativa com a capacidade de troca de cátions total dos solos ($r^2 = 0,74$, $p < 0,01$, Tabela 4.4). A matéria orgânica pode ser responsável por até 95% da CTC de solos tropicais, principalmente nos Latossolos, devido às baixas reatividades dos minerais da fração argila destes solos (SOARES; ALLEONI, 2008).

Outros trabalhos já evidenciaram que sorção das fluoroquinolonas foi influenciada principalmente pela capacidade de troca catiônica do solo, com pouco efeito de óxidos ou do carbono orgânico do solo (FIGUEROA-DIVA; VASUDEVAN; MACKAY, 2010. VASUDEVAN et al. (2009) verificaram que a troca catiônica foi o processo dominante explicando a sorção da ciprofloxacina em solos. De maneira análoga, os autores também não encontraram evidências sobre a influência dos teores de carbono orgânico na sorção da mesma (VASUDEVAN et al., 2009), concluindo que outros mecanismos, que não a partição hidrofóbica, desempenham papel importante na sorção de compostos ionizáveis, tal como é o caso das fluoroquinolonas (VASUDEVAN et al., 2009). No entanto, os autores observaram a influência dos teores de óxidos metálicos na sorção de ciprofloxacina, especialmente em valores de pH mais elevados ($> 5,5$), em que as superfícies positivamente carregadas dos óxidos pode interagir fortemente com o grupo carboxila das fluoroquinolonas (GU; KARTHIKEYAN, 2005; VASUDEVAN et al., 2009).

Conkle et al. (2010) também observaram que a sorção de fluoroquinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina e ofloxacina) em um solo receptor de águas residuárias foi rápida (menos de 24 horas) e elevada ($K_f = 7,943$ a $12,309 \mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n} g^{-1}$), com a maioria das quantidades aplicadas sendo sorvidas.

4.3.2 Atributos de solo influenciando a sorção das sulfonamidas

Diferentemente das fluoroquinolonas, as variações nos coeficientes de sorção das sulfonamidas foram relevantes (Tabela 4.3), uma vez que as variações nos atributos dos solos proporcionaram mudanças de classificação quanto ao risco de lixiviação (se persistentes, moléculas com $K_d < 5 L kg^{-1}$ tendem a lixiviar). Alto potencial de lixiviação foi obtido para todas as sulfonamidas nos solos LVA-1, PVA-1, RQ e TC (todos com mais de 72% de areia e menos de $15 g kg^{-1}$ de carbono orgânico) e para a maioria dos compostos nos solos RL, CX e SX (solos com 45 a 66% de areia e 15 a $30 g kg^{-1}$ de carbono orgânico), destacando o potencial de lixiviação das mesmas em solos mais arenosos e com baixos teores de carbono orgânico. Valores altos de K_d foram encontrados nos solos LVef, PVA-5, NX, NVef,

GM e MT, solos com maiores conteúdos de CO ($> 40 \text{ g kg}^{-1}$) e maiores valores de CTC ($> 60 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$), nos quais o potencial de lixiviação das sulfonamidas é bastante reduzido.

Os valores de pH dos solos (3,7 a 5,7, exceto pelo L_{Vef}) estão abaixo do pK_{a2} , das moléculas, mas consideravelmente acima dos valores de pK_{a1} , (Tabela 4.1), havendo assim predomínio em grande parte de espécies neutras ($\geq 83\%$ para SDZ, $\geq 50\%$ para SMX; $\geq 61\%$ para SCL, $\geq 92\%$ para SDI e $\geq 96\%$ para STI), cuja sorção normalmente é insensível a variações de pH, sendo governada pelo mecanismo de partição hidrofóbica à fração orgânica dos solos (SUKUL et al., 2008). Nesta faixa de pH os solos apresentam carga líquida negativa, conforme evidenciado pelos valores de ponto de carga zero destes solos, exceto o solo CX (Tabela 4.2). Em acordo com esta hipótese, obteve-se uma correlação positiva e significativa entre os valores de K_d das sulfonamidas e os teores de CO dos solos ($r^2 = 0,67$ a $0,78$), o que por sua vez não foi observado para as fluoroquinolonas.

Aparentemente, a sorção ligeiramente aumentou abaixo de pH 5 (Figura 4.2), o que provavelmente se deveu ao aumento do número de espécies catiônicas de sulfonamidas sendo sorvidas mediante troca iônica (GAO; PEDERSEN, 2005), uma vez que neste valor de pH o solo ainda apresenta carga líquida negativa (Tabela 4.2). Espécies catiônicas de sulfamethazina ($\text{pK}_{a1} = 2,3$ e $\text{pK}_{a2} = 7,4$) dominaram a sorção ao mineral montmorilonita até valores de pH de 4,6, valor este onde a espécie catiônica representou tão somente 0,45% das espécies de sulfamethazina em solução (GAO; PEDERSEN, 2005).

Para valores de pH entre 5 e próximo dos valores de pK_{a2} de cada composto, em que predominam espécies neutras, conforme mencionado anteriormente, um aumento da sorção foi também observado (Figura 4.2). Este aumento na sorção está possivelmente relacionado a um aumento gradual no número de espécies aniônicas que foram então retidas através do mecanismo de ponte de cátions (LERTPAITONPAN et al., 2009), já que as espécies neutras são insensíveis as variações no pH. Essa hipótese parece ser possível, estando amparada pela correlação positiva encontrada entre os coeficientes de sorção da maioria das sulfonamidas com os cátions trocáveis (Ca, Mg e K) e com a CTC, e pela inexistência de correlação com os valores de pH do solo (Tabela 4.4). Acredita-se que acima desta faixa ocorreria novamente uma redução nos valores de sorção, uma vez que espécies aniônicas passariam a predominar no sistema, havendo então repulsão eletrostática entre as mesmas e os sítios de troca negativos dos solos (LERTPAITONPAN et al., 2009; SUKUL et al., 2008).

Lertpaitoonpan et al. (2009) também mostraram que o carbono orgânico foi o principal atributo do solo influenciador da sorção da sulfametazina, sendo que o pH exerceu papel

secundário, com menores valores de K_d para maiores valores de pH (faixa estudada de 5,5-9,0). Kahle e Stamm (2004) relataram que a sorção da sulfatiazole foi uma ordem de magnitude superior em materiais orgânicos do que inorgânicos, como os minerais de argila, apontando que fração orgânica do solo desempenha papel chave na sorção de sulfonamidas em solos e sedimentos.

Thiele-Bruhn et al. (2004) combinaram diferentes métodos para elucidar os sítios e mecanismos de sorção das sulfonamidas em solos. Eles concluíram que a sorção das sulfonamidas foi influenciada pela estrutura molecular e as propriedades físico-químicas dos compostos, condição esta diretamente influenciada pelo pH do meio; pela presença de grupos funcionais acessíveis nas superfícies orgânicominerais e pela acessibilidade de espaços vazios e cavidades na estrutura tridimensional da matéria orgânica do solo e da sua combinação com a matriz mineral formando complexos organominerais, condição esta diretamente relacionada com a quantidade e qualidade da matéria orgânica do solo.

4.5 Conclusões

A sorção das fluoroquinolonas e sulfonamidas foi substancialmente afetada pelos atributos do solo. O potencial de sorção das fluoroquinolonas foi alto nos solos estudados, enquanto que o potencial de sorção das sulfonamidas variou entre baixo a alto, dependendo dos atributos do solo, mas apresentou potencial de lixiviação na maioria dos cenários estudados.

A textura e a capacidade de troca de cátions do solo foram os fatores que mais influenciaram a sorção de ambas as classes de compostos, evidenciando a importância do processo de troca iônica para a sorção de ambas as classes de compostos em solos tropicais, principalmente para as fluoroquinolonas. O papel do carbono orgânico do solo e do pH não ficou evidenciado para as fluoroquinolonas, mas afetou claramente a sorção das sulfonamidas. Apesar de óxidos poderem desempenhar papel importante na adsorção de contaminantes nos solos tropicais, eles pouco influenciaram a sorção das moléculas estudadas.

Referências

- ACCINELLI, C.; KOSKINEN, W.C.; BECKER, J.M.; SADOWSKY, M.J.. Environmental fate of two sulfonamide antimicrobial agents in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 2677-2682, 2007.
- BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIAŃSKA, J.; SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 196, p. 1-15, 2011.
- BOXALL, ABA.; KAY, P.; BLACKWELL, P.A.; FOGG, L.A. Fate of veterinary medicines applied to soils. In: KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**. Berlin: Springer-Verlag, 2004. p. 165-180.
- BOXALL, A.B.A.; JOHNSON, P.; SMITH, E.J.; SINCLAIR, C.J.; STUTT, E.; LEVY, L.S. 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 2288-2297, 2006.
- CONKLE, J.L.; LATTAO, C.; WHITE, J.R.; COOK, R.L. Competitive sorption and desorption behavior for three fluoroquinolone antibiotics in a wastewater treatment wetland soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 80, p. 1353-1359, 2010.
- FIGUEROA-DIVA, M.; VASUDEVAN, D.; MACKAY, A.A. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. **Chemosphere**, Oxford, v. 79, p. 786-793, 2010.
- GAO, J.; PEDERSEN, J.A. Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 39, p. 9509-9516, 2005.
- GOLET, E.M.; XIFRA, I.; SIEGRIST, H.; ALDER, A.C.; GIGER, W. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 37, p. 3243-3249, 2003.
- GU, C.; KARTHIKEYAN, K.G. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminium and iron hydrous oxides. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 39, p. 9166-9173, 2005.
- HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K-L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 225, p. 109-118, 1999.
- IKEHATA, K.; NAGHASHKAR, N.J.; EL-DIN, M.G. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review. **Ozone- Science & Engineering**, Philadelphia, v. 28, p. 353-414, 2006.
- KAHLE, M.; STAMM, C. Time and pH-dependent sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to clay minerals and ferrihydrite. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, p. 1224-1231, 2007.

KARCI, A.; BALCIOĞLU, I.A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, p. 4652-4664, 2009.

KREUZIG, R.; HÖLTGE, S. Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: Laboratory experiments and test plot studies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Malden, v. 24, p. 771-776, 2005.

OECD. **OECD guidelines for testing of chemicals**, test guideline 106: Adsorption/desorption using a batch equilibrium method. Paris, 2000.

LAMSHÖFT, M.; SUKUL, P.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. Behavior of ^{14}C -sulfadiazine and ^{14}C -difloxacin during manure storage. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, p. 1563-1568. 2010.

LERTPAITONPAN, W.; ONG, S.K.; MOORMAN, T.B. Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. **Chemosphere**, Oxford, v. 76, p. 558-564, 2009.

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

PICÓ, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil – risks and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, p. 1287-1299, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Wien, Austria: R Foundation for Statistical Computing, s.d. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

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

ROSENDAHL, I.; SIEMENS, J.; GROENEWEG, J.; LINZBACH, E.; LAABS, V.; HERRMANN, C.; VERECKEN, H.; AMELUNG, W. Dissipation and sequestration of the veterinary antibiotic sulfadiazine and its metabolites under field conditions. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 45, p. 5216-5222, 2011.

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**, Oxford, v. 65, p. 725-759, 2006.

SOARES, M.R. **Coeficiente de distribuição (K_d) de metais pesados em solos do Estado de São Paulo**. 2004. 202 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SOARES, M.R.; ALLEONI, L.R.F. Contribution of soil organic carbon to the ion exchange capacity of the tropical soils. **Journal of Sustainable Agriculture**, Binghamton, v. 32, p. 439-462, 2008.

SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; ALBINI, A. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 30, p. 1337-1350, 2011.

SUKUL, P.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, p. 1344-1350, 2008.

TAMTAM, F.; BOT, B.L.; DINH, T.; MOMPELAT, S.; EURIN, J.; CHEVREUIL, M.; BONTÉ, P.; MOUCHEL, J.-M.; AYRAULT, S. A 50-year record of quinolone and sulphonamide antimicrobial agents in Seine river sediments. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 11, p. 852-859, 2011.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Malden, v. 166, p. 145-167, 2003.

THIELE-BRUHN, S.; SEIBICKE, T.; SCHULTEN, H.-R.; LEINWEBER, P. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 1331-1342, 2004.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 35, p. 3397-3406, 2001.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; TADEO, J.L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 562, n. 1, p. 30-35, 2006.

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**, Amsterdam, v. 151, p. 68-76, 2009.

ZHAO, L.; DONG, Y.H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, p. 1069-1075, 2010.

YANG, J.-F.; YING, G.-G.; ZHAO, J.L.; TAO, R.; SU, H.-C.; CHEN, F. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl River using RRLC-MS/MS. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, p. 3424-3432, 2010.

5 DISSIPAÇÃO E SORÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS EM SOLOS DA NOVA ZELÂNDIA

Resumo

Pouco ainda se sabe sobre a ocorrência e o destino ambiental de antibióticos de uso veterinário na Nova Zelândia, embora a produção animal seja expressiva no país. Ensaio laboratoriais foram realizados para avaliar a dissipação e a sorção de duas fluoroquinolonas (ciprofloxacina e enrofloxacin) em três solos da Nova Zelândia, com e sem adição de cama de frango nas doses de 1 e 5% (p/p). Os solos foram incubados em condições aeróbicas controladas, monitorando-se também a atividade da enzima desidrogenase como indicativo de atividade biológica do solo. A sorção foi avaliada utilizando uma técnica de equilíbrio do tipo batelada. As fluoroquinolonas foram quantificadas através do uso de HPLC, com detecção por fluorescência. Ambas as fluoroquinolonas apresentaram elevado potencial de sorção aos solos, sendo os valores consistentes com trabalhos anteriores e indicando alta interação específica entre esses compostos e as partículas de solo. A adição de cama de frango (5%, p/p) diminuiu o potencial de sorção das moléculas aos solos, o que pode ter relação com os aumentos nos valores de pH dos solos provocados pela adição de cama de frango e/ou com a competição pelos sítios de sorção do solo. Os valores de 50% de dissipação (DT₅₀) variaram de 15 a mais de 70 dias, sendo a dissipação mais rápida nas amostras sub-superficiais (30-40 cm), apesar de estas apresentarem menor atividade biológica. A adição de cama de frango (dose de 5%) aumentou a velocidade de dissipação das moléculas estudadas, provavelmente devido ao aumento na atividade biológica do solo e ao aumento da disponibilidade das moléculas na solução do solo.

Palavras-chave: Antibióticos de Uso Veterinário. Destino Ambiental. Produção Animal. Contaminação Ambiental.

Abstract

Little is still known about veterinary antibiotics occurrence and fate in New Zealand environment although animal production is expressive in the country. Laboratory experiments were carried out to evaluate the dissipation and sorption of two fluoroquinolone compounds (ciprofloxacin and enrofloxacin) in three New Zealand soils with and without poultry litter addition (1 and 5%, w/w). Soils were incubated under aerobic conditions, and dehydrogenase activity was monitored as an indicative of soil biological activity. Sorption was evaluated using a batch equilibrium technique. Fluoroquinolones were quantified through the use of HPLC with fluorescence detection. Both fluoroquinolones showed a high sorption potential to soils, with values consistent with previous work, indicating a high specific interaction between these compounds and soil particles. The addition of poultry litter (5%, w /w) decreased the sorption potential of the molecules to the soil, which may be related to the increase in the soil pH caused by litter addition and/or the competition for soil sorption sites. The 50% dissipation values (DT_{50}) values ranged from 15 to 70 days, with a faster dissipation in the sub-soil samples (30-40 cm), although they had a lower biological activity. The addition of poultry litter (5% dose) increased the dissipation rate of the studied molecules, probably due to increased soil biological activity and an increase in compound availability in the soil solution.

Key-words: Veterinary Antibiotics. Environmental Fate. Animal Production. Environmental Contamination.

5.1 Introdução

As fluoroquinolonas são um dos grupos mais importantes de compostos antimicrobianos utilizados na medicina veterinária em todo o mundo (PICÓ; ANDREU, 2007). Embora resíduos destes compostos sejam comumente detectados em uma grande variedade de matrizes ambientais, pouco ainda se sabe sobre seu destino no ambiente e seus potenciais efeitos negativos a saúde humana e organismos terrestres (KEMPER, 2008).

As fluoroquinolonas são compostos anfóteros com dois grupos funcionais ionizáveis de maior relevância, o grupo 3-carboxila ($pK_a \sim 6$) e o grupo N-4 do substituinte piperazina ($pK_a \sim 8$) (Tabela 5.1), o que torna a sorção destes compostos um processo dependente do pH do meio (PICÓ; ANDREU, 2007), em que a partição hidrofóbica desempenha um papel secundário na sorção (USLU et al., 2008). A sorção em matrizes sólidas é um dos principais mecanismos de dissipação de fluoroquinolonas no ambiente, sendo que altas concentrações destes resíduos são normalmente encontradas em amostras sólidas como esterco animal (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007, ZHAO; DONG; WANG, 2010), lodos de esgoto (GOLET et al., 2003), bem como em sedimentos fluviais (YANG et al., 2010).

Em solos, embora as concentrações sejam geralmente baixas (na faixa dos $\mu g\ kg^{-1}$, USLU et al., 2008), as fluoroquinolonas são altamente sorvidas (K_d de 260-5012 $L\ kg^{-1}$) (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006), sendo normalmente persistentes (meia-vida acima de 60 dias, BOXALL et al., 2004). A persistência está associada às interações mais específicas entre as fluoroquinolonas e o solo através do tempo, o que por sua vez diminui a disponibilidade do contaminante para a degradação pelos microrganismos do solo (GOLET et al., 2003). Na Turquia, Karci e Balcioğlu (2009) deram um bom exemplo da persistência de resíduos de fluoroquinolonas no ambiente do solo, relatando concentrações residuais de enrofloxacin de 0,05 e 0,02 $mg\ kg^{-1}$ em dois solos avaliados sete meses depois de terem sido fertilizados com esterco de aves ou de gado contaminado. No entanto, a degradação de fármacos no meio ambiente continua sendo uma questão complexa, necessitando de mais pesquisas em condições de solos diversos, com atributos contrastantes, a fim de que melhor se possa entender os fatores influenciando o destino destes resíduos no solo (MONTEIRO; BOXALL, 2009).

Na Nova Zelândia, pouco ainda se sabe sobre a ocorrência e o destino de antibióticos de uso veterinário no ambiente, embora a indústria animal (criações de suínos e aves e gado leiteiro) use quantidades expressivas dos mesmos. Em 2008/09, um total de 55.809 kg de

ingredientes ativos foi usado, com a bacitracina representando quase 40% deste total. O uso de fluoroquinolonas é baixo, no entanto, aumentou 50% desde 2004/05 a 2008/09. Em 2008/09, um total de 41 kg de ingredientes ativos de fluoroquinolonas foi utilizado (AUSTRALIA, 2010).

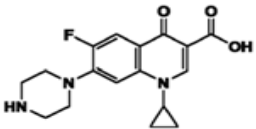
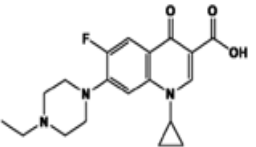
Ensaio de laboratório foram conduzidos a fim de se avaliar a dissipação de duas fluoroquinolonas (ciprofloxacina e enrofloxacin) em amostras superficiais (0-5 cm) e sub-superficiais (30-40 cm) de dois solos da Nova Zelândia (Hamilton Clay e Horotiu). Para um destes solos (Horotiu), o efeito da adição de cama de frango (1 e 5%, p/p) sobre o comportamento de dissipação das duas fluoroquinolonas também foi avaliado. A atividade da enzima desidrogenase foi medida em todos os ensaios de dissipação, servindo como uma medida da atividade biológica. Avaliou-se também o potencial de sorção de ambos os compostos em três solos neozelandeses (Hamilton Clay, Horotiu e Matawhero) com e sem adição de cama de frango (1 e 5%, p/p).

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Reagentes e padrões analíticos

Ciprofloxacina (CIP) e enrofloxacin (ENR) foram adquiridas da Sigma-Aldrich, com grau HPLC (pureza > 98%). As soluções estoque ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) foram preparados em metanol contendo 1% de ácido acético, armazenadas a -18°C , no escuro, e usadas no período máximo de um mês. Água ultra-pura foi utilizada para a preparação de todas as soluções aquosas, e todos os solventes orgânicos (acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano) usados foram de grau HPLC. Nitrato de magnésio hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de amônio (NH_4OH , 25%) e ácido trifluoroacético ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) foram todos de grau analítico.

Tabela 5.1 – Principais propriedades físico-químicas da ciprofloxacina e enrofloxacina

Composto	Estrutura	Peso Molecular	Solubilidade em Água (g L ⁻¹)	Log K _{ow}	pK _a ¹
Ciprofloxacina		331.35	30	0.4	5.9; 8.89
Enrofloxacin		359.4	130	1.1-0.7	6.27; 8.3

¹ valores de pK_a baseados em PICÓ; ANDREU, (2007).

5.2.2 Amostras de Solo e Cama de Frango

A caracterização básica das amostras de solo e cama de frango é apresentada na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Caracterização físico-química das amostras de solo e cama de frango estudadas

Solo	pH CaCl ₂	CO (%)	CTC (mmol kg ⁻¹ c)	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)
Matawhero (0-5 cm)	6.1	2.1	154	11	62	27
Matawhero (30-40 cm)	-	2.0	-	22	51	27
Horotiu (0-5 cm)	5.4	8.2	282	34	48	18
Horotiu (30-40 cm)	6.0	1.7	-	47	24	29
Hamilton Clay (0-5 cm)	5.1	4	172	19	51	30
Hamilton Clay (30-40 cm)	4.1	0.8	-	13.4	40.3	46.2
Cama de Frango	8.1	-	-	-	-	-

5.2.3 Experimentos de Sorção

Estudos de sorção de ciprofloxacina e enrofloxacin foram realizados para amostras superficiais (0-5 cm) de três solos da Nova Zelândia (Hamilton Clay, Horotiu e Matawhero), com e sem a adição de cama de frango em dois níveis (1 e 5%, p/p).

A relação solo-solução final empregada foi de 2 g: 30 mL de uma solução 0,01 M de CaCl_2). Realizou-se a cinética de sorção destes compostos para os solos locais, sendo que 24 h foi um tempo adequado para obtenção de condições de equilíbrio entre as fases (Figura 5.1). Perdas significativas (> 5%) referentes à possível degradação abiótica e/ou sorção dos compostos as paredes do tubo não ocorreram. As isotermas de sorção foram obtidas em seis concentrações (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 mg L^{-1}), correspondentes a concentrações nominais no solo de 7,5, 15, 22,5, 30, 45 e 60 mg kg^{-1} . Todas as análises foram feitas em duplicata.

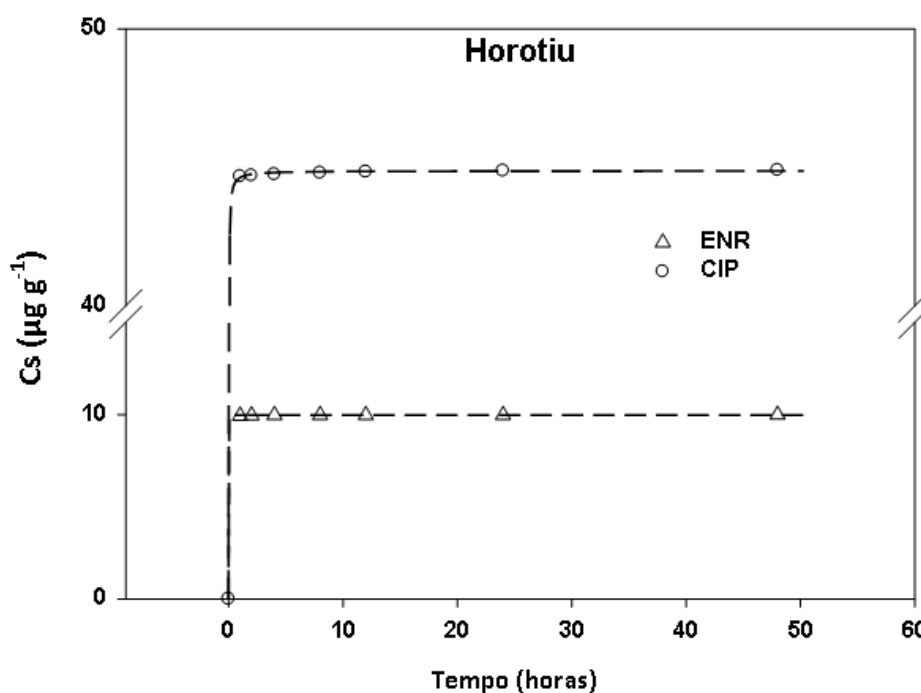


Figura 5.1 - Cinética de sorção para enrofloxacin e ciprofloxacina no solo Horotiu

As amostras foram agitadas num agitador vertical, seguido de centrifugação (778 g, 15 min). Em seguida, uma alíquota do sobrenadante foi filtrada (filtro de 0,45 μm) para a análise das concentrações em equilíbrio na solução através do uso de cromatografia líquida.

A quantidade de antibiótico adsorvida (S) ao solo foi calculada pela diferença entre as concentrações iniciais (C_i) e em equilíbrio, tendo em conta a relação sólido: solução utilizada. Os dados foram, em seguida, ajustados a equação de Freundlich ($S = K_f \cdot C_e^N$) e à sua forma linear ($S = K_d \cdot C_e$), em que S = quantidade sorvida, N = coeficiente exponencial da equação de Freundlich e C_e = concentração de equilíbrio na solução.

5.2.4 Experimentos de Dissipação

A dissipação dos antibióticos avaliados foi estudada apenas em condições aeróbias. Dois ensaios de dissipação foram conduzidos. No primeiro, a dissipação de CIP e ENR foi avaliada em amostras de solo superficial (0-5 cm) e subsuperficial (30-40 cm) dos solos Hamilton Clay e Horotiu. As amostras de solo foram pré-incubadas em sacos plásticos tipo zip (105 g por saco, peso seco) durante 4 dias a 20 °C, simulando as condições finais de incubação. Posteriormente, os antibióticos foram dissolvidos na solução de água deionizada utilizada para ajustar o conteúdo de água no solo a 60% da capacidade máxima de retenção, obtendo-se uma concentração nominal igual a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para cada composto, em cada tratamento. As amostras foram então incubadas no escuro, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Em dias alternados as amostras foram pesadas, repondo-se qualquer conteúdo de água perdido a fim de se manter a umidade constante (60%). Nos dias 0, 1, 7, 14, 21, 45 e 71, 2 g de solo foram retirados de cada saco de plástico e imediatamente analisados para quantificação das concentrações de fluoroquinolonas. A atividade da enzima desidrogenase (DHA) foi medida nos mesmos intervalos de tempo, com exceção do dia 1, onde nenhuma medida foi feita. Todas as análises foram feitas em duplicata.

No segundo ensaio de dissipação, o efeito da adição de cama de frango na dissipação da CIP e da ENR foi avaliada para o solo Horotiu. Dois níveis de fertilização foram empregados, 1% e 5% (p /p). A condução do ensaio foi semelhante ao descrito anteriormente, sendo a única diferença relevante o fato da dissipação ter sido avaliada dois dias após o início do experimento e não no dia um como no ensaio anterior , o que também se aplicou as análises de DHA.

Utilizou-se o modelo biexponencial para modelagem dos dados de dissipação. Este modelo foi usado com sucesso por Sarmah e Rohan (2011) para a modelagem da dissipação aeróbica de 4-nonilfenol e bisfenol A em amostras de lodo de água subterrânea (groundwater-aquifer material slurry). Detalhes sobre as equações utilizadas neste modelo para os cálculos

de 50% de dissipação (DT_{50}) , assim como das características específicas do mesmo, estão disponíveis na citação original (SARMAH; ROHAN, 2011).

5.2.5 Atividade da enzima desidrogenase (DHA)

A atividade da enzima desidrogenase (DHA), enzima esta que é exclusiva de organismos vivos foi utilizada como uma medida da atividade biológica dos solos empregados neste estudo. Este parâmetro também foi usado por Monteiro e Boxall (2009) como indicador de atividade biológica na avaliação da degradação de três fármacos (naproxeno, carbamazepina e fluoxetina) em solos agrícolas. A essência da técnica consiste na capacidade da enzima desidrogenase de reduzir sais de tetrazólio, incolores no estado oxidado, passando a apresentar uma coloração avermelhada no estado reduzido, sendo a intensidade da cor vermelha medida por espectrofotometria.

Resumidamente, 3 g de amostra (solo ou solo + cama de frango) foram colocados em tubos plásticos de centrífuga de 30 mL, onde se adicionou 2 mL de uma solução recém preparada de 2,3,5-trifeniltetrazólio (1,5%) em tampão Tris. As amostras foram homogeneizadas durante 30 segundos e incubadas a 25 °C durante aproximadamente 24 horas. Após a incubação, 20 mL de metanol foi adicionado a cada tubo, procedendo-se a agitação dos mesmos durante 30 minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 498 g durante 5 minutos e a intensidade da cor vermelha no sobrenadante foi medida num espectrofotômetro Shimadzu com comprimento de onda fixado em 481 nm. A atividade da enzima desidrogenase, expressa em $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de TPF (1,3,5-trifenilformazan) foi calculada com base numa curva de calibração previamente feita com padrões de TPF. Todas as análises foram feitas em duplicata.

5.2.6 Extração e análises cromatográficas

A extração das fluoroquinolonas foi baseada no método proposto por Turiel, Martín-Esteban e Tadeo (2006). Resumidamente, 2 g de amostra (solo ou solo + cama de frango) foram pesados em tubos de centrífuga de vidro (50 mL) e misturados com 16 mL de uma solução aquosa de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (29%, p/v) ajustada a pH 8,1 com 4% de amônia. As amostras foram agitadas durante aproximadamente 50 minutos, seguindo-se um banho único de ultra-

som (30 min) à temperatura ambiente. Finalmente, as amostras foram centrifugadas (498 g, 15 minutos) e o sobrenadante filtrado (0,45 µm) antes da injeção no sistema cromatográfico.

Para a determinação das concentrações de fluoroquinolonas nos extratos finais, um cromatógrafo líquido da Dionex foi usado. O instrumento estava equipado com uma bomba quaternária, detectores de arranjo de diodos e fluorescência, além de um sistema de injeção automatizado. As separações analíticas foram efetuadas numa coluna LUNA C18 (150 x 4,6 mm, 5 mm) da Phenomenex, mantida a 25 °C, com um volume de injeção de 20 µL. Empregou-se uma eluição isocrática, sendo a fase móvel composta por 78% de uma solução aquosa contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (solvente A), 18% de acetonitrila (solvente B) e 4% de tetra-hidrofurano (solvente C). O fluxo empregado foi de 1 mL min⁻¹. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram fixados em 280 e 450 nm, respectivamente. Os tempos de retenção obtidos foram: 5,03 min para ENR e 4,60 min para CIP. As curvas de calibração foram preparadas em duplicata, em cinco concentrações (0,01, 0,05, 0,2, 0,5 e 1 mg L⁻¹ de ciprofloxacina ou enrofloxacina), sendo que os coeficientes de correlação obtidos foram ≥ 0,99. As taxas de recuperação foram de 52 a 78,6% para enrofloxacina, e de 72 a 108% para a ciprofloxacina. O limite de quantificação do método foi considerado como sendo o limite inferior da curva de calibração empregada, equivalendo à concentração no solo de 80 µg kg⁻¹.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Sorção

A enrofloxacina e a ciprofloxacina apresentaram elevado potencial de sorção aos solos estudados (Tabelas 5.3 e 5.4). A adição de cama de frango resultou em diminuição nos coeficientes de sorção, especialmente na maior dose (5%) (Tabelas 5.3 e 5.4). As isotermas de Freundlich se ajustaram bem aos dados experimentais para ambos os compostos ($r^2 \geq 0,96$) (Tabelas 5.3 e 5.4, Figura 5.2).

Tabela 5.3 - Valores de K_d e K_f para ciprofloxacina em três solos neozelandeses com e sem adição de cama de frango

	pH	K_d (L kg ⁻¹)	r^2	K_f (g ^{1-N} L ^N kg ⁻¹)	r^2	N
Horotiu	4,79	5.293	0,95	3.594	0,96	0,91
Horotiu + 1% CF*	5,03	4.154	0,94	1.285	0,99	0,74
Horotiu + 5% CF	5,74	3.566	0,90	1.103	0,99	0,72
Hamiton Clay	4,50	17.080	0,84	4.472	0,96	0,76
Hamilton Clay + 1% CF	4,92	8.239	0,74	810	0,98	0,54
Hamilton Clay + 5% CF	5,68	4.422	0,92	2.297	0,98	0,84
Matawhero	4,23	6.136	0,92	3.301	0,97	0,86
Matawhero + 1% CF	4,58	1.483	0,57	561	0,92	0,67
Matawhero + 5% CF	5,57	615	0,97	480	0,97	0,90

CF = cama de frango

Tabela 5.4 - Valores de K_d e K_f para enrofloxacin em três solos neozelandeses com e sem adição de cama de frango

	pH	K_d (L kg ⁻¹)	r^2	K_f (g ^{1-N} L ^N kg ⁻¹)	r^2	N
Horotiu	4,78	4.955	0,89	11.855	0,95	1,19
Horotiu + 1% CF*	5,14	4.154	0,96	2.562	0,97	0,90
Horotiu + 5% CF	5,84	3.470	0,9	1.118	0,96	0,74
Hamiton Clay	4,84	19.351	0,9	1.317	0,97	0,56
Hamilton Clay + 1% CF	5,37	14.904	0,66	1.484	0,98	0,58
Hamilton Clay + 5% CF	6,08	8.386	0,84	1.212	0,97	0,62
Matawhero	4,45	9.416	0,96	4.225	0,98	0,84
Matawhero + 1% CF	4,70	4.144	0,97	5.324	0,98	1,04

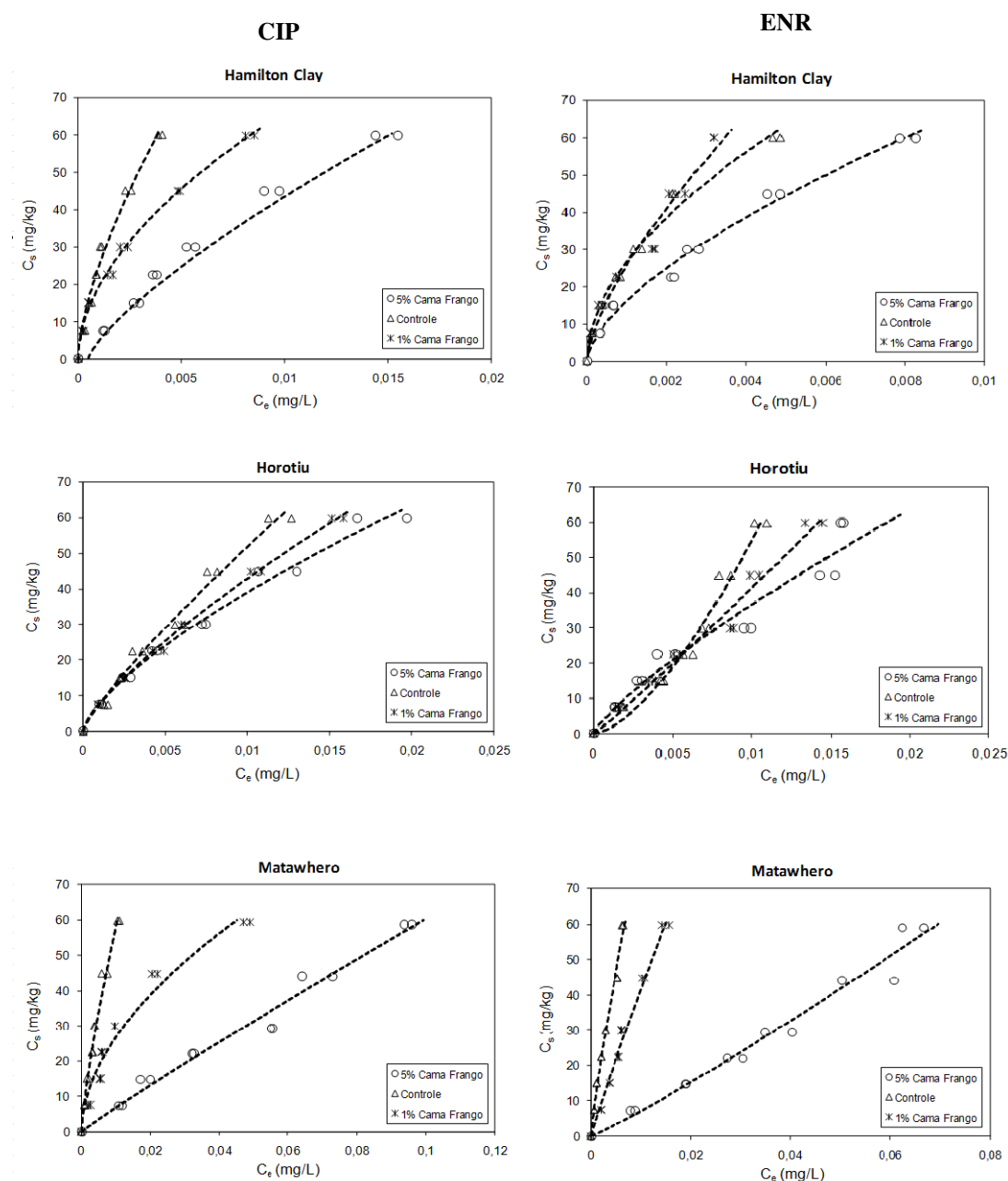


Figura 5.2 - Isothermas de sorção para CIP e ENR em três solos neozelandês com e sem adição de cama de frango. Símbolos representam os dados reais enquanto que as linhas tracejadas representam o ajuste obtido pela equação de Freundlich

Os valores dos coeficientes de sorção encontrados são consistentes com os trabalhos anteriores, mas inferiores àqueles encontrados em solos brasileiros, mostrando a forte interação específica entre esta classe de compostos e as partículas dos solos, assim como também para outras matrizes sólidas como lodo de esgoto e sedimentos, apresentando sempre baixa mobilidade no ambiente (TOLLS, 2001; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Um

estudo recente mostrou que a sorção de norfloxacin, ciprofloxacina e ofloxacina em solo foi rápida (menos de 24 horas) e elevada (K_f variou de 7.943 a 12.309 $\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$) (CONKLE et al., 2010).

As fluoroquinolonas se ligam aos minerais de argila através de vários mecanismos, tais como ponte de cátions, interações eletrostáticas, e ligações de hidrogênio (SPELTINI et al., 2011), enquanto que se ligam às substâncias húmicas principalmente através de ligações de hidrogênio entre grupos polares (ARISTILDE; SPOSITO, 2010). A capacidade de troca de cátions mostrou ser o principal fator influenciando a sorção da ciprofloxacina aos solos, com teores de óxido de metal desempenhando um papel secundário, mas também importante, particularmente em valores de pH mais elevados ($\geq 5,5$) (VASUDEVAN et al., 2009).

No presente caso, os valores de pH das soluções em equilíbrio variaram de 4,23 a 6,1 (Tabelas 5.3 e 5.4), faixa de pH em que há um predomínio de espécies catiônicas de fluoroquinolonas (VASUDEVAN et al., 2009). Considerando-se a elevada capacidade tampão destes solos, ilustrada pelos altos valores de capacidade de troca catiônica das camadas superficiais (Tabela 5.2), acredita-se que a troca catiônica foi o principal mecanismo explicando a elevada sorção das fluoroquinolonas, o que é condizente com outros trabalhos mostrando claramente a importância da interação eletrostática na sorção das espécies catiônicas de fluoroquinolonas em solos (VASUDEVAN et al., 2009; FIGUEROA-DIVA; VASUDEVAN; MACKAY, 2010).

A adição de uma nova fonte de matéria orgânica aos solos, como a fertilização do solo com esterco animal, pode interferir no potencial de sorção-dessorção de um composto e, em última análise, influenciar o seu destino e comportamento no ambiente (SUKUL et al., 2008). Por exemplo, o potencial de sorção de sulfadiazina foi aumentado após a adição de esterco de suíno (SUKUL et al., 2008). Estas alterações são relacionadas às mudanças provocadas através da adição de esterco no pH do solo e /ou na natureza da matéria orgânica e da sua fração dissolvida no sistema solo-esterco (BOXALL, 2008).

A diminuição nos coeficientes de sorção com adição de cama de frango, especialmente na dose de 5%, pode ter relação com o incremento de pH no sistema solo-cama em comparação ao solo sem adição (Tabelas 5.3 e 5.4), diminuindo a disponibilidade das fluoroquinolonas na forma catiônica para ligação com os sítios de troca negativamente carregados do solo (VASUDEVAN et al., 2009). Além disso, a associação entre o substrato orgânico e as superfícies minerais da fração argila do solo pode diminuir a disponibilidade de sítios ativos para sorção, reduzindo a retenção dos mesmos (SUKUL et al., 2008). Em

condições brasileiras, a adição de cama de frango (5%, p/p) ao solo não afetou a sorção ou a dessorção de fluoroquinolonas, sendo que a sorção na cama de frango foi muito inferior ($K_d \leq 65 \text{ L kg}^{-1}$) à no solo ($K_d \sim 40,000 \text{ L kg}^{-1}$), indicando maior especificidade da interação com o solo. Apesar de um conteúdo muito mais elevado de carbono orgânico nas amostras de cama de frango, a menor afinidade de sorção foi associada à provável menor reatividade dos grupos funcionais ali existentes, oferecendo assim menos sítios ativos para a sorção (LEAL et al., 2012)¹.

5.3.2 Dissipação

Apesar de sua simplicidade, o modelo biexponencial descreveu de forma adequada a cinética de dissipação de CIP e ENR em todos os tratamentos empregados, com um valor de r^2 elevado ($r^2 \geq 0,84$).

Os valores de dissipação de 50% das concentrações iniciais aplicadas, (DT_{50}), variaram consideravelmente entre os tratamentos empregados, entre 15 a mais de 70 dias (Tabela 5.5, Figura 5.3). Interessantemente, a dissipação foi sempre mais rápida no subsolo quando comparado os mesmos tratamentos na camada superficial (Tabela 5.5 e Figura 5.3). A adição de cama de frango apenas afetou a dissipação ao nível de 5%, onde a DT_{50} foi maior do que em todos os demais tratamentos (Tabela 5.5). Embora o solo Horotiu seja mais rico do que o Hamilton Clay no que se refere ao teor de carbono orgânico, a dissipação de ambos os compostos foi mais lenta no mesmo (Tabela 5.5). Em todos os casos a dissipação foi mais lenta nas camadas superficiais, bem como no solo Horotiu quando comparado com o solo Hamilton Clay, o que pode estar associado com uma maior interação dos compostos com as camadas superficiais mais ricas em carbono orgânico (Tabela 5.2), o que por sua vez teria diminuído a sua biodisponibilidade para a degradação pelos microrganismos do solo (RODRÍGUEZ-CRUZ; JONES; BENDING, 2006). Embora a atividade microbiana no subsolo tenha sido muito menor do que na camada superficial, como demonstrado pelas medições de desidrogenase (Figura 5.4), uma outra razão para uma dissipação mais rápida no

¹ LEAL, R.M.P.; FIGUEIRA, R.F.; TORNISIELO, V.L.; REGITANO, J.B. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litter and soil samples from São Paulo State, Brazil. (Enviado para publicação). 2012.

subsolo pode estar relacionada com a existência de espécies microbianas mais especializadas na degradação destes compostos no subsolo (DI; AYLMORE; KOOKANA, 1998).

No caso de pesticidas, geralmente ocorre uma diminuição nas taxas de biodegradação dos mesmos com o aumento da profundidade, o que se deve principalmente à redução da atividade microbiana nas camadas sub-superficiais do solo, (RODRÍGUEZ-CRUZ; JONES; BENDING, 2006). No entanto, em alguns casos, o oposto também é possível de ocorrer, sendo que maiores taxas de degradação em sub-superfície estão diretamente associadas com a diminuição da sorção em paralelo a redução nos teores de matéria orgânica em profundidade, o que por sua vez ocasiona uma maior disponibilidade do contaminante para a biodegradação (DI; AYLMORE; KOOKANA, 1998). Por exemplo, quatro (clorpirifos, clortal de dimetilo, linuron e propizamida) de oito pesticidas estudados apresentaram taxas de degradação mais rápidas em amostras de subsolo (25-50 cm) (DI; AYLMORE; KOOKANA, 1998). Estes compostos cuja degradação foi mais rápida em profundidade foram os que apresentaram os maiores coeficientes de sorção dentre os oito estudados, e os autores apontaram que a diminuição da sorção em profundidade compensou o efeito negativo na degradação proveniente da menor biomassa microbiana, em última análise promovendo um efeito líquido de maior degradação. Acredita-se que o mesmo ocorreu no presente caso, uma vez que as fluoroquinolonas são também compostos que apresentam uma elevada afinidade sorbiva com as amostras superficiais (Tabelas 5.3 e 5.4).

Tabela 5.5 - Dissipação (DT₅₀) de CIP e ENR em amostras de dois solos Neozelandeses

Tratamento	DT ₅₀ (dias)		Coeficiente Determinação (r ²)	
	CIP	ENR	CIP	ENR
Hamilton Clay (0-5cm)	23.8	45.1	0.99	0.84
Hamilton Clay I (30-40 cm)	15.8	27.9	0.98	0.94
Horotiu (0-5 cm)	>70	> 70	0.92	0.97
Horotiu + 1% Cama Frango	>70	> 70	0.91	0.93
Horotiu + 5% Cama Frango	23.1	30.7	0.96	0.96
Horotiu (30-40 cm)	61.2	50.2	0.98	0.95

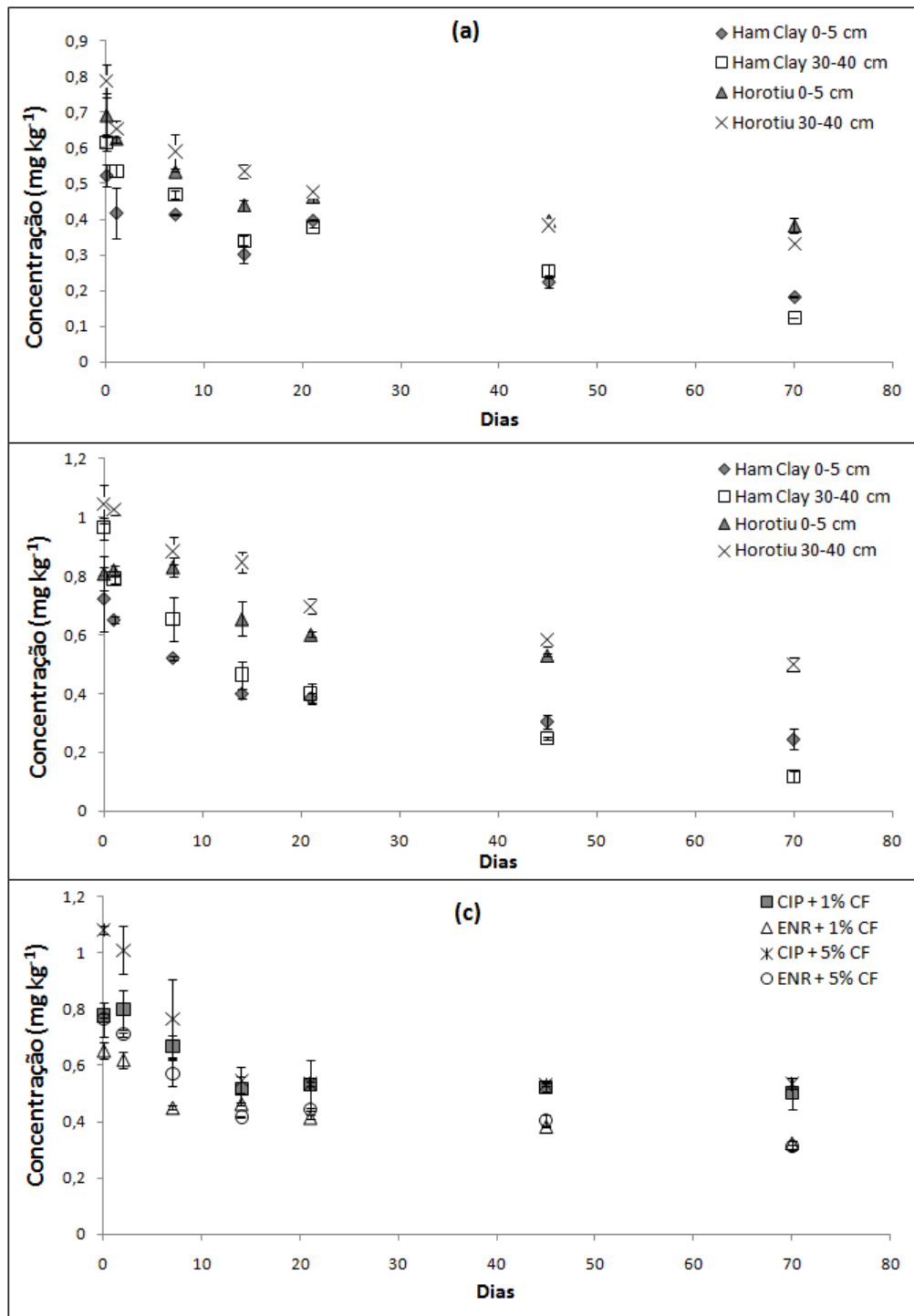


Figura 5.3 - Cinética de degradação para (a) ENR e (b) CIP nos solos Hamilton Clay e Horotiu e; (c) para Horotiu com adição de cama de frango (1 e 5%, p/p)

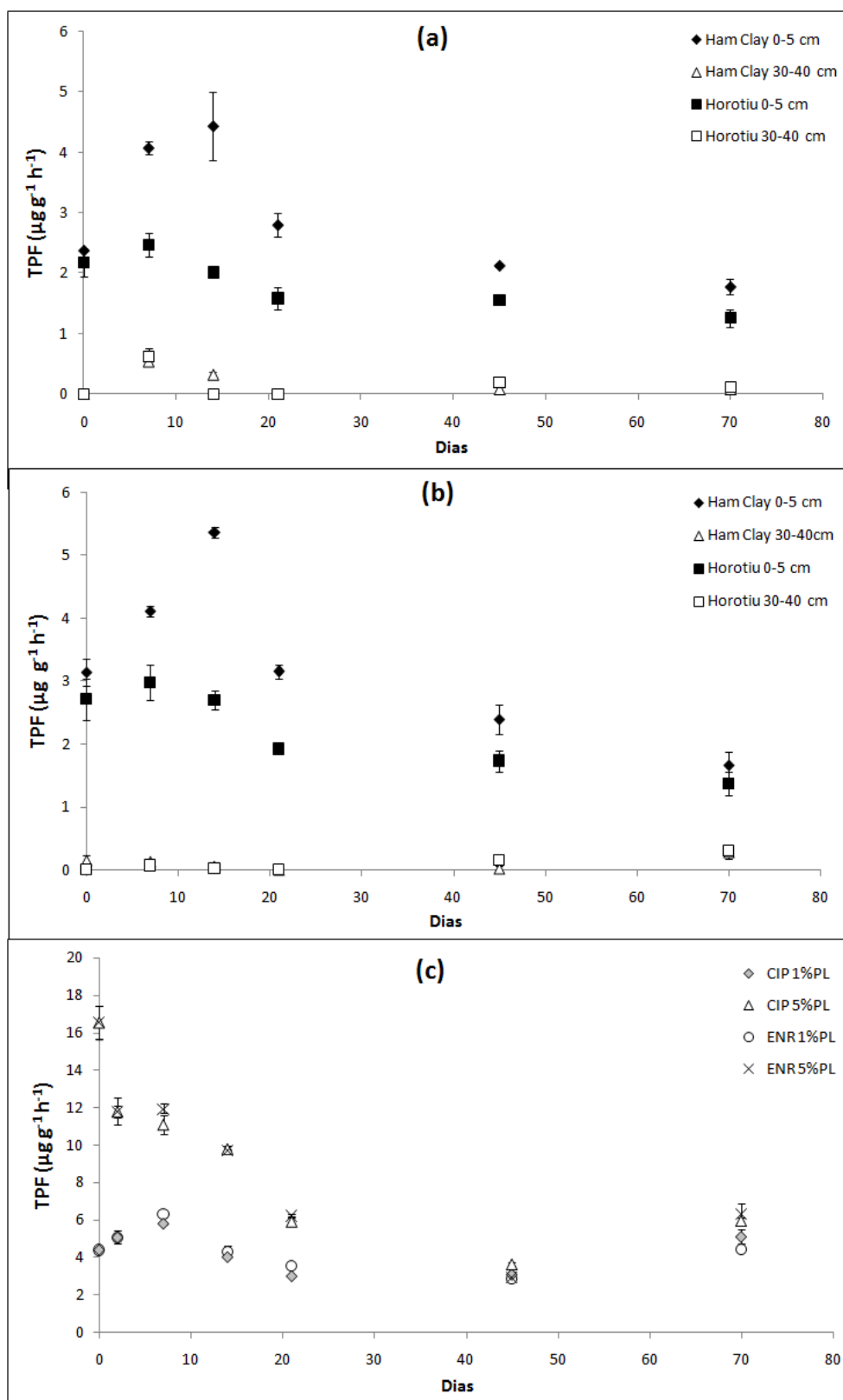


Figura 5.4 - Atividade de desidrogenase para (a) ENR e (b) CIP nos solos Hamilton Clay e Horotiu e; (c) para Horotiu com adição de cama de frango (1 e 5%, p/p)

Diferenças nos atributos de solo (teor de umidade, carbono orgânico, pH, e atividade biológica do solo), condições climáticas (temperatura), assim como nas propriedades físico-químicas dos antibióticos (grau de dissociação e lipofilia) afetam diretamente o comportamento de degradação de antibióticos em solos (MONTEIRO; BOXALL, 2009).

Embora os valores de dissipação (DT_{50}) situaram-se na maioria dos casos dentro do período compreendido no estudo (70 dias), os dados obtidos neste trabalho indicam claramente que concentrações residuais de fluoroquinolonas tendem a persistir no longo prazo, o que concorda com relatos anteriores que demonstraram que a fertilização continuada do solo contaminado com esterco contaminado ocasiona acúmulo de fluoroquinolonas no ambiente (GOLET et al., 2003; KARCI; BALCIOĞLU, 2009). Consistente com esta observação, Tamtam et al. (2011) detectou compostos de quinolona (flumequina, ácido nalidíxico e oxolínico) em baixas concentrações (até $32 \mu\text{g kg}^{-1}$, flumequina) em sedimentos do rio Sena, que remontam aos anos 1960, evidenciando a longa persistência de baixas concentrações desses compostos no ambiente aquático. Na Suíça, resíduos de fluoroquinolonas (até $0,30 \text{ mg kg}^{-1}$) foram encontrados no solo após 21 meses de aplicação de lodo de esgoto contaminado (GOLET et al., 2003).

A adição de cama de frango aumentou expressivamente a DHA no solo Horotiu, especialmente ao nível de 5% (Figura 5.4). Para o nível de adição de 1%, a DHA aumentou ligeiramente na primeira semana, seguindo então uma tendência similar para o nível de adição de 5% (Figura 5.4). Já as atividades da DHA nos subsolos foram muito inferiores aos das amostras superficiais (Figura 5.4). Nos tratamentos sem cama de frango, houve aumento da DHA aos 7 (Hamilton Clay) ou 14 dias (Horotiu), posteriormente diminuindo lentamente até o fim do período experimental (70 dias) (Figura 5.4).

A maior DHA no tratamento com cama de frango a 5% é consistente com a dissipação mais rápida obtida nestes tratamentos, indicando claramente o envolvimento da comunidade microbiana na dissipação destes compostos em solos. É interessante pontuar que na ausência de cama de frango, a dissipação foi mais lenta no solo Horotiu do que no solo Hamilton Clay, sendo que a adição de 5% de substrato orgânico diminuiu consideravelmente seu tempo de dissipação no ambiente (Tabela 5.5). Para a ^{14}C -difloxacina, a degradação totalizou apenas 7% de perda durante o período de armazenamento do esterco de porco (150 dias) (LAMSHÖFT et al., 2010). No entanto, a diluição do esterco contaminado com esterco fresco (10 e 20 vezes), aumentou a sua dissipação para 20%. Este efeito está possivelmente associado ao estímulo à atividade microbiana em razão da adição de esterco fresco (LAMSHÖFT et al., 2010).

A sulfapiridina e a oxitetraciclina não afetaram a DHA, mesmo em concentrações de até $1000 \mu\text{g g}^{-1}$, valores muito maiores do que aqueles tipicamente encontrados em amostras ambientais reais (THIELE-BRUHN; BECK, 2005). Esta falta de efeito foi associada com uma possível falta de sensibilidade analítica do método ou, então, em razão de efeitos daqueles compostos sobre microrganismos específicos que foram possivelmente compensados pela comunidade microbiana total (THIELE-BRUHN; BECK, 2005). Além disso, salientou-se que estes antibióticos têm um efeito biostático ao invés de um efeito biotóxico, onde microrganismos latentes não serão afetados a menos que uma ativação da comunidade microbiana do solo ocorra, por exemplo, como acontece através da adição de substrato fresco rico em nutrientes (THIELE-BRUHN; BECK, 2005). Este parece ser o caso do solo Horotiu, onde a adição de cama de frango ao nível de 5% influenciou grandemente o comportamento de dissipação, bem como a DHA.

5.4 Conclusões

Isotermas de Freundlich ajustaram-se adequadamente aos dados experimentais de sorção. A sorção aos solos foi elevada, o que é consistente com trabalhos anteriores mostrando uma elevada interação específica de fluoroquinolonas com solos, especialmente através de troca catiônica. A adição de cama de frango ao nível de 5% diminuiu o potencial de sorção de ambos os compostos, um efeito possivelmente relacionado com as mudanças no pH do solo ou a competição direta entre a cama de frango e os antibióticos pelos sítios de troca do solo.

A dissipação das fluoroquinolonas estudadas variou consideravelmente, sendo os valores de DT_{50} de 15 a mais de 70 dias. No entanto, em todos os casos, a dissipação foi mais rápida nas amostras do subsolo e também quando houve adição de cama de frango (5%). Nas amostras de subsolo, as taxas de dissipação aumentaram, o que foi associado a uma menor sorção e maior biodisponibilidade dos compostos para a biodegradação em profundidade, fator que compensou a menor atividade biológica nestas camadas, como mostrado pelo monitoramento da atividade da enzima desidrogenase.

Referências

- ARISTILDE, L.; SPOSITO, G. Binding of ciprofloxacin by humic substances: a molecular dynamics study. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Malden, v. 29, n. 1, p. 90-98, 2010.
- AUSTRALIA. Ministry of Agriculture and Forestry. **Antibiotics sales and use overview 2004-2009**. Wellington: MAF, 2010. 22 p.
- BOXALL, A.B.A.; KAY, P.; BLACKWELL, P.A.; FOGG, L.A. Fate of veterinary medicines applied to soils. In: KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004. p. 165-180.
- BOXALL, A.B.A. Fate of veterinary medicines applied to soils. In: KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**. 3. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2008. p. 103-119.
- FIGUEROA-DIVA, M.; VASUDEVAN, D.; MACKAY, A.A. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. **Chemosphere**, Oxford, n. 8, v. 79, p. 786-793, 2010.
- GOLET, E.M.; XIFRA, I.; SIEGRIST, H.; ALDE, A.C.; GIGER, W. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 37, n. 15, p. 3243-3249, 2003.
- KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.
- LAMSHÖFT, M.; SUKUL, P.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. Behavior of ^{14}C -sulfadiazine and ^{14}C -difloxacin during manure storage. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 7, p. 1563-1568, 2010.
- DI, H.J.; AYLMOORE, L.A.G.; KOOKANA, R.S. Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. **Soil Science**, New Brunswick, v. 163, n. 5, p. 404-411, 1998.
- KARCI, A.; BALCIOĞLU, I.A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 16, p. 4652-4664, 2009.
- MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; BARREIRO-GONZÁLEZ, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 148, n. 2, p. 570-579, 2007.
- MONTEIRO, S.C.; BOXALL, A.B.A. Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Malden, v. 28, n. 12, p. 2546-2554, 2009.

PICÓ, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil – risks and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, n. 4, p. 1287-1299, 2007.

RODRÍGUEZ-CRUZ, M.S.; JONES, J.E.; BENDING, G.D. Field-scale study of the variability in pesticide biodegradation with soil depth and its relationship with soil characteristics. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 9, p. 2910-2918, 2006.

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**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.

SARMAH, A.K.; ROHAN, M. Evaluation of four mathematical models to describe dissipation kinetics of 4-n-nonylphenol and bisphenol-A in groundwater-aquifer material slurry. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 157-166, 2011.

SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; ALBINI, A. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 1337-1350, 2011.

SUKUL, P.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, n. 8, p. 1344-1350, 2008.

TAMTAM, F.; BOT, B.L.; DINH, T.; MOMPELAT, S.; EURIN, J.; CHEVREUIL, M.; BONTÉ, P.; MOUCHEL, J-M.; AYRAULT, S. A 50-year record of quinolone and sulphonamide antimicrobial agents in Seine river sediments. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 11, n. 5, p. 852-859, 2011.

THIELE-BRUHN, S.; AUST, M-O. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 47, n. 1, p. 31-39, 2004.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 35, n. 17, p. 3397-3406, 2001.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; TADEO, J.L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.562, n. 1, p. 30-35, 2006.

USLU, M.Ö.; YEDILER, A.; BALCIOĞLU, I.A.; SCHULTE-HOSTEDE, S. Analysis and sorption behavior of fluoroquinolones in solid matrices. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 190, n. 1-4, p. 55-63, 2008.

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**, Amsterdam, v. 151, n. 3-4, p. 68-76, 2009.

ZHAO, L.; DONG, Y.H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 5, p. 1069-1075, 2010.

YANG, J-F.; YING, G-G.; ZHAO, J.L.; TAO, R.; SU, H-C.; CHEN, F. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl River using RRLC-MS/MS. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 16, p. 3424-3432, 2010.