



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO
AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS



**Comportamento físico-químico e biológico de antibióticos em um Latossolo
Vermelho-amarelo da região sul do Estado de Minas Gerais**

Luiz Gustavo Paulon Rezende

Itajubá (MG)

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO
AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

Luiz Gustavo Paulon Rezende

**Comportamento físico-químico e biológico de antibióticos em um Latossolo
Vermelho-amarelo da região sul do Estado de Minas Gerais**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de Concentração: Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Orientador: Prof.^a Dr.^a Márcia Matiko Kondo

Itajubá (MG)

2019



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
Criada pela Lei nº 10.435, de 24 de abril de 2002

ANEXO I
FOLHA DE JULGAMENTO DA BANCA EXAMINADORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

Título da Dissertação: "COMPORTAMENTO FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS EM UM LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO DA REGIÃO SUL DO ESTADO DE MINAS GERAIS"

Autor: Luiz Gustavo Paulon Rezende

JULGAMENTO

Examinadores(as)	Conceito		Rubrica
	A = Aprovado	R = Reprovado	
2º	A		
3ª	A		

Observações:

- (1) O trabalho será considerado Aprovado se todos os Examinadores atribuírem conceito A.
- (2) O trabalho será considerado Reprovado se for atribuído pelos menos 1 conceito R.
- (3) O trabalho será considerado Insuficiente (I) se for atribuído pelo menos um conceito R. Neste caso o candidato deverá apresentar novo trabalho. A banca deve definir como avaliar a nova versão da dissertação.

Resultado Final: A. Conceito: A, ou seja, APROVADO.

Observações: _____

Este documento terá a validade de 30 (trinta) dias a contar da data da defesa da dissertação.

Itajubá, 11 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Rogério Melloni
2º Examinador (Coorientador) – UNIFEI

Prof.ª Dr.ª Márcia Matiko Kondo
3ª Examinadora (Orientadora) - UNIFEI

A Deus, por estar sempre ao meu lado na caminhada,
me cobrir de bênçãos a todo instante
e deixar-se revelar em todas as coisas

OFEREÇO

À minha mãe Virgínia e ao meu pai José Roberto,
pelo apoio, acolhimento e presença constante em minha vida
Aos meus queridos avós Margarida, José, Conceição e Cícero (*in memoriam*)

DEDICO

AGRADEÇO

À minha orientadora professora **Dr.^a Márcia Matiko Kondo** pela confiança depositada, pelos ensinamentos técnicos, pessoais e por todo apoio; e que mesmo diante de um momento de diminuição de recursos voltados para a pesquisa em Minas e no país, permitiu que fosse possível eu dar continuidade aos meus trabalhos e concluir o presente projeto.

Ao professor **Dr. Rogério Melloni** por sua colaboração, pelo incentivo, aprendizado e por toda solidariedade demonstrada.

Às professoras **Dr.^a Eliane Guimarães Pereira Melloni** e **Dr.^a Maria Inês Nogueira Alvarenga** pelo apoio constante.

À professora **Dr.^a Maria Rita Raimundo e Almeida** pelas sugestões feitas na banca examinadora do exame de qualificação, que contribuíram para melhoria do presente trabalho.

À professora **Dr.^a Juliane Cristina Forti** pela sua generosidade, suas sugestões e participação na banca examinadora de defesa da dissertação.

À professora **Dr.^a Milady Renata Apolinário Silva** por disponibilizar, juntamente com minha orientadora, materiais e equipamentos tão importantes e essenciais para a conclusão da presente pesquisa.

Ao professor **Dr. Sandro José de Andrade** pelos conhecimentos adquiridos e por nossas boas conversas.

Às professoras **Dr.^a Ana Lúcia Fonseca** e **Dr.^a Vanessa Silveira Barreto Carvalho** por todo aprendizado.

Ao professor **Dr. Francisco José Martín Peinado** (Universidade de Granada, Espanha), por sua contribuição com as análises laboratoriais das amostras de solo e suas dicas valiosas, que muito fizeram somar ao presente trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Itajubá-UNIFEI, representada pela professora **Dr.^a Fabrina Bolzan Martins**, por todo auxílio a mim concedido e disposição em me ajudar sempre que precisei.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UNIFEI – **Prof. Dr. Cláudio Kirner, Leandra, Yascara** e **outros colaboradores** – pelo suporte prestado no decorrer desses dois anos.

Aos técnicos dos laboratórios **Aline, Glauber, Haroldo, Jô, Paulo, Rodrigo, Tarcísio** e **estagiários** pelos incontáveis momentos de ajuda e compreensão.

À **turma toda** do Centro de Estudos em Qualidade Ambiental-CEQUAM, do Laboratório de Análise da Qualidade da Água e Laboratório de Microbiologia do Solo pelo apoio dispensado e pelos momentos compartilhados. Gente do bem que eu ainda posso agradecer pessoalmente e, também, gente que já não está mais entre nós, para eu poder dar um abraço.

Aos que ingressaram junto comigo no MEMARH, **meus colegas de turma**, pela contribuição que cada um, de forma individual, deixou na minha formação. Agora ficaram pra trás os nossos momentos de angústia e nossos anseios.

Aos meus amigos de “Rep” e de Itajubá, **Felipe e Rafael**, pela convivência, otimismo e paciência.

Ao meu amigo **João Paulo**, pela sua disponibilidade durante todo este tempo de aprendizado intenso e em períodos que antecederam o meu ingresso no mestrado.

Ao meu irmão **André** que, de todas as maneiras, sempre me ajudou com o seu apoio e parceria.

À **FAPEMIG**, pela concessão da bolsa de estudos de março/2017 a fevereiro/2018, e a **CAPES**, pela concessão da bolsa de março/2018 a fevereiro/2019.

À **UNIFEI** por ter tornado possível, de forma inteiramente gratuita, o meu acesso à universidade pública e por fazer parte, a partir de agora, da minha busca por uma melhor qualificação profissional.

A todos, o meu muito obrigado!

"A ciência é uma tentativa, em grande parte bem-sucedida, de compreender o mundo, de controlar as coisas, de ter domínio sobre nós mesmos, de seguir um rumo seguro."

Carl Sagan
O Mundo Assombrado pelos Demônios
1996

RESUMO

A detecção de resíduos farmacêuticos em vários compartimentos ambientais é uma questão de crescente preocupação pela comunidade científica. O aumento da produção e o consumo cada vez mais acentuado de fármacos destinados a atender uma demanda impulsionada, principalmente, por práticas intensivas de produção animal e, indiretamente, pelo agronegócio, tem favorecido à identificação desses compostos nos mais variados tipos de matrizes ambientais e alimentos de consumo humano e animal. O destino de substâncias bioativas, especialmente os antibióticos, de uso concomitante pela medicina humana e veterinária, oferece sérios riscos ao meio ambiente e aos organismos, uma vez que pode afetar comunidades microbianas, plantas e, conseqüentemente, a saúde do homem. Fármacos são substâncias com alto potencial poluente, que não têm valores de exposição ambiental normatizados por entidades reguladoras e não são devidamente imobilizados ou degradados por métodos de tratamento de resíduos convencionais. São denominados contaminantes emergentes e pouco se sabe sobre os processos de retenção, transporte e transformação dessas substâncias no meio ambiente. Seus efeitos sobre a biota e informações sobre potencial ecotoxicológico também são escassos. Diante da necessidade de estudos relacionados à dinâmica desses elementos no solo, com ênfase em regiões de clima tropical e solos muito intemperizados, o presente trabalho avaliou o comportamento físico-químico e biológico de dois antibióticos de uso compartilhado pela terapia médica animal e humana, a amoxicilina (AMOX) e a doxicilina (DOX), em um latossolo vermelho-amarelo originário do sul do Estado de Minas Gerais. Construíram-se isotermas de adsorção e dessorção em diferentes condições de acidez, onde o modelo de Freundlich foi o que melhor se ajustou, detectando baixa retenção da AMOX, com K_F médio de 11,96 mg Kg⁻¹ na adsorção e 18,48 mg Kg⁻¹ na dessorção e elevada sorção da DOX, com K_F médio de 1.817,80 mg Kg⁻¹ na adsorção e de 2.537,59 mg Kg⁻¹ na dessorção. Em bioensaios se confirmou, de forma específica para cada antibiótico, perturbação à microbiota do solo exposta e, em ensaios fitotoxicológicos com o feijão-carioca (*Phaseolus vulgaris*), foi constatada influência negativa (desfavorável) de ambos os fármacos no desenvolvimento radicular e crescimento da parte aérea desta planta.

Palavras-chave: Sorção. Bioensaios. Fármacos. Antibióticos. Latossolos.

ABSTRACT

The detection of pharmaceutical residues in various environmental compartments is a matter of growing concern to the scientific community. The increase in production and the increasing consumption of drugs to meet a demand driven mainly by intensive animal production practices and, indirectly, by agribusiness, has favored the identification of these compounds in the most varied types of environmental matrices and food for human and animal consumption. The destination of bioactive substances, especially antibiotics, used concomitantly by human and veterinary medicine, offers serious risks to the environment and organisms, since it can affect natural microbial communities, plants and, consequently, human health. Drugs are substances with high polluting potential, which do not have environmental exposure values standardized by regulatory entities and are not properly immobilized or degraded by conventional waste treatment methods. They are called emerging contaminants and little is known about the processes of retention, transport and transformation of these substances in the environment. Their effects on biota and information on ecotoxicological potential are also scarce. Given the need for studies related to the dynamics of these elements in the soil, with emphasis on tropical climate regions and very weathered soils, the present study evaluated the physical-chemical and biological behavior of two antibiotics shared by animal and human medical therapy, amoxicillin (AMOX) and doxycillin (DOX), in a red-yellow latosol originating in the south of the State of Minas Gerais. Adsorption and desorption isotherms were constructed under different acidity conditions, where the Freundlich model was the best fit, detecting low AMOX retention, with mean K_F of 11.96 mg Kg⁻¹ in adsorption and 18.48 mg Kg⁻¹ in desorption and high DOX sorption, with mean K_F of 1,817.80 mg Kg⁻¹ in adsorption and 2,537.59 mg Kg⁻¹ in desorption. In bioassays, specific for each antibiotic, disturbance to the microbiota of the exposed soil was confirmed and, in phytotoxicological tests with beans (*Phaseolus vulgaris*), a negative (unfavorable) influence of both drugs on root development and growth of aerial part of this plant was found.

Keywords: Sorption. Bioassays. Drugs. Antibiotics. Latosols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representatividade de fármacos destinados ao mercado farmacêutico veterinário brasileiro	24
Figura 2 – Estrutura química da amoxicilina	27
Figura 3 – Estrutura química da doxiciclina	28
Figura 4 – Localização (vista aérea e frontal) do local de coleta das amostras de solo	39
Figura 5 – (A) Amostra de solo correspondente ao horizonte A; (B) Amostra de solo correspondente ao horizonte B	40
Figura 6 – Torrões que correspondem aos horizontes A e B, secos ao ar e em seguida umedecidos, respectivamente	41
Figura 7 – Uso das cartas de cor do solo de Munsell para identificação de cor do solo	42
Figura 8 – Etapas do método para verificação da estabilidade dos fármacos em relação aos tubos tipo falcon de polipropileno	46
Figura 9 – Etapas do método de verificação da razão solo/solução para os antibacterianos	47
Figura 10 – Estabilização de algumas das suspensões simulando o mesmo efeito promovido nos tubos quando submetidos à agitação	49
Figura 11 – Etapas do estudo para verificação do período máximo de adsorção dos fármacos	50
Figura 12 – Etapas da metodologia para o estudo dos processos de adsorção dos antibióticos	52
Figura 13 – Etapas da metodologia para o estudo dos processos de dessorção dos antibióticos	53
Figura 14 – Esquema apresentando as etapas do preparo das amostras não irradiadas para o ensaio de determinação de atividade e biomassa microbianas	54
Figura 15 – Esquema apresentando as etapas do preparo das amostras irradiadas para o ensaio de determinação de atividade e biomassa microbianas	56
Figura 16 – Frascos de vidro condicionados para encubação	57

Figura 17 – (A) Retirada da câmara de germinação e remoção dos béqueres do interior dos frascos; (B) Adição de BaCl ₂ aos béqueres contendo NaOH 1,0 mol L ⁻¹ ; (C) Posterior acréscimo de fenolftaleína; (D) Titulação com HCl 1,0 mol L ⁻¹	58
Figura 18 – Preparo das amostras de feijão usando como substrato papel de filtro	60
Figura 19 – Amostras condicionadas para germinação	61
Figura 20 – Preparo das amostras de feijão usando como substrato o solo	62
Figura 21 – Guia para agrupamento de classes de textura. Os pontos acompanhados das letras em vermelho correspondem à localização do horizonte A (A) e horizonte B (B) no diagrama triangular simplificado	67
Figura 22 – Difrátograma apresentando os picos referentes aos compostos caulinita e goethita, presentes na fração argila correspondente ao horizonte A	72
Figura 23 – Difrátograma apresentando os picos referentes aos compostos caulinita, goethita e gibbsita, presentes na fração argila correspondente ao horizonte B	72
Figura 24 – Espectros de absorvância da AMOX e da DOX na região de 200-800 nm do UV-VIS	75
Figura 25 – Espectros de absorvância da AMOX e da DOX na região de 200-800 nm do UV-Vis em relação aos horizontes A e B	76
Figura 26 – Curvas de calibração da AMOX e da DOX em CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹	77
Figura 27 – Gráfico de estabilidade da AMOX e da DOX nos tubos tipo falcon de polipropileno	79
Figura 28 – Gráficos para as diferentes razões solo/solução testadas para a AMOX e DOX	80
Figura 29 – Gráficos contendo as curvas de calibração da AMOX e da DOX obtidas nos diferentes horizontes e condições de acidez da solução extratora	82
Figura 30 – Gráfico da porcentagem de adsorção da AMOX, nos horizontes A e B, em cinco diferentes tempos	86
Figura 31 – Gráfico da porcentagem de adsorção da DOX, nos horizontes A e B, em cinco diferentes tempos	87
Figura 32 – Gráfico com as porcentagens de adsorção da AMOX no horizonte A no período de 12 meses	89

Figura 33 – Gráfico com as porcentagens de adsorção da DOX no horizonte A no período de 12 meses	89
Figura 34 – Isotermas de adsorção da AMOX, sem ajuste de pH, de acordo com os modelos linear (A), de Freundlich (B) e de Langmuir (C)	93
Figura 35 – Isotermas de dessorção da AMOX, sem ajuste de pH, de acordo com os modelos linear (A), de Freundlich (B) e de Langmuir (C)	94
Figura 36 – Isotermas de adsorção (A) e de dessorção (B) da AMOX com e sem ajuste de pH nos dois horizontes estudados	96
Figura 37 – Isotermas de adsorção da DOX, sem ajuste de pH, de acordo com os modelos linear (A), de Freundlich (B) e de Langmuir (C)	100
Figura 38 – Isotermas de dessorção da DOX, sem ajuste de pH, de acordo com os modelos linear (A), de Freundlich (B) e de Langmuir (C)	101
Figura 39 – Isotermas de adsorção (A) e de dessorção (B) da DOX com e sem ajuste de pH nos dois horizontes estudados	103
Figura 40 – Gráfico da atividade microbiana em mg CO ₂ /g de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico AMOX, no período de incubação de 10 dias a ± 28° C	107
Figura 41 – Gráfico da atividade microbiana em mg CO ₂ /g de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico DOX, no período de incubação de 10 dias a ± 28° C	108
Figura 42 – Gráfico do carbono estimado da biomassa microbiana, em µg C/g · g de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico AMOX, no período de incubação de 10 dias a ± 28° C	109
Figura 43 – Gráfico do carbono estimado da biomassa microbiana, em µg C/g · g de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico DOX, no período de incubação de 10 dias a ± 28° C	109
Figura 44 – Gráfico do quociente metabólico em relação a diferentes concentrações do antibiótico AMOX, no período de incubação de 10 dias a ± 28° C	113
Figura 45 – Gráfico do quociente metabólico em relação a diferentes concentrações do antibiótico DOX, no período de incubação de 10 dias a ± 28° C	114
Figura 46 – Imagem demonstrando o resultado do contato a diferentes dosagens de AMOX, as quais cinco sementes de feijão foram submetidas, em placas de Petri, tendo como substrato papel de filtro. Da esquerda para a direita: controle, 0,03 mg L ⁻¹ , 0,3 mg L ⁻¹ , 3,0 mg L ⁻¹ , 30,0 mg L ⁻¹ e 300,0 mg L ⁻¹	120

Figura 47 – Imagem com o resultado da exposição de uma semente de feijão (à direita) em relação ao controle (à esquerda), submetida a uma dose de 300,0 mg L ⁻¹ de AMOX por um período de 168 h, em placa de Petri, tendo como substrato papel de filtro	121
Figura 48 – Imagem demonstrando o resultado do contato com diferentes dosagens de AMOX, as quais cinco sementes de feijão foram submetidas em cada um dos potes de plástico descartável, tendo como substrato amostras de solo. Da esquerda para a direita: controle, 0,03 mg L ⁻¹ , 0,3 mg L ⁻¹ , 3,0 mg L ⁻¹ , 30,0 mg L ⁻¹ e 300,0 mg L ⁻¹	125
Figura 49 – Imagem com o resultado da exposição de plântulas de feijão (à direita) em relação ao controle (à esquerda), submetidas a uma dose de 300,0 mg L ⁻¹ de AMOX por um período de 15 dias, em potes de plástico descartável, tendo como substrato amostras de solo	126
Figura 50 – Imagem mostrando o resultado do contato a diferentes dosagens de DOX, as quais cinco sementes de feijão foram submetidas, em placas de Petri, tendo como substrato papel de filtro. Da esquerda para a direita: controle, 0,03 mg L ⁻¹ , 0,3 mg L ⁻¹ , 3,0 mg L ⁻¹ , 30,0 mg L ⁻¹ e 300,0 mg L ⁻¹	129
Figura 51 – Imagem com o resultado da exposição de uma semente de feijão (à direita) em relação ao controle (à esquerda), submetida a uma dose de 300,0 mg L ⁻¹ de DOX por um período de 168 h, em placa de Petri, tendo como substrato papel de filtro	130
Figura 52 – Imagem mostrando o resultado do contato com diferentes dosagens de DOX, as quais cinco sementes de feijão foram submetidas em cada um dos potes de plástico descartável, tendo como substrato amostras de solo. Da esquerda para a direita: controle, 0,03 mg L ⁻¹ , 0,3 mg L ⁻¹ , 3,0 mg L ⁻¹ , 30,0 mg L ⁻¹ e 300,0 mg L ⁻¹	135
Figura 53 – Imagem com o resultado da exposição de plântulas de feijão (à direita) em relação ao controle (à esquerda), submetidas a uma dose de 300,0 mg L ⁻¹ de DOX por um período de 15 dias, em potes de plástico descartável, tendo como substrato amostras de solo	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características físico-químicas da AMOX	27
Tabela 2 – Principais propriedades físico-químicas da DOX	29
Tabela 3 – Faixas da Constante de Freundlich e suas respectivas capacidades de adsorção	32
Tabela 4 – Atributos físicos do solo utilizado	64
Tabela 5 – Atributos químicos do solo	65
Tabela 6 – Níveis de disponibilidade dos atributos químicos no latossolo avaliado	68
Tabela 7 – Valores obtidos para as curvas de calibração em CaCl_2 0,01 mol L ⁻¹	78
Tabela 8 – Valores obtidos para as curvas de calibração da AMOX em diferentes condições	83
Tabela 9 – Valores obtidos para as curvas de calibração da DOX em diferentes condições	83
Tabela 10 – Valores de concentração de AMOX fornecidos pela utilização de diferentes absorbâncias e equações reduzidas da reta	84
Tabela 11 – Valores de concentração de DOX fornecidos pela utilização de diferentes absorbâncias e equações reduzidas da reta	85
Tabela 12 – Valores de R ² obtidos pelas isotermas de adsorção e dessorção da AMOX nas três condições de acidez analisadas	95
Tabela 13 – Constantes e parâmetros obtidos para a AMOX a partir do ajuste das isotermas ao modelo de Freundlich	97
Tabela 14 – Valores de R ² obtidos pelas isotermas de adsorção e dessorção da DOX nas três condições de acidez analisadas	102
Tabela 15 – Constantes e parâmetros obtidos para a DOX a partir do ajuste das isotermas ao modelo de Freundlich	104
Tabela 16 – Taxas de germinação das sementes de feijão (%) em placas de Petri, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de AMOX em 4 tempos distintos	118
Tabela 17 – Crescimento das radículas de sementes de feijão (cm), avaliado após exposição a diferentes concentrações de AMOX em 4 tempos distintos	118

Tabela 18 – Taxas de germinação das sementes de feijão no solo, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de AMOX em 5 dias distintos	122
Tabela 19 – Crescimento de partes aéreas nas plântulas de feijão, avaliado após exposição a diferentes concentrações de AMOX em 5 dias distintos	122
Tabela 20 – Taxas de germinação das sementes de feijão (%) em placas de Petri, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de DOX em 4 tempos distintos	127
Tabela 21 – Crescimento das radículas de sementes de feijão (cm), avaliado após exposição a diferentes concentrações de DOX em 4 tempos distintos	128
Tabela 22 – Taxas de germinação das sementes de feijão no solo, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de DOX em 5 dias distintos	131
Tabela 23 – Crescimento de partes aéreas nas plântulas de feijão, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de DOX em 5 dias distintos	132

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
AD – Água Disponível
AMOX – Amoxicilina
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM – *American Society for Testing and Materials*
C-biomassa – Carbono da biomassa
CBM – Carbono da biomassa microbiana
CC – Capacidade de Campo
 C_{mic} – Biomassa microbiana
 C_s – Concentração do contaminante na fase sólida
CTC – Capacidade de Troca Catiônica
CV – Coeficiente de Variância
 C_w – Concentração no equilíbrio na fase aquosa
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
DOX – Doxiciclina
DRX – Difração de Raio X
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FDA – *Food and Drug Administration*
Kd – Constante de distribuição
 K_F – Constante de sorção/dessorção de Freundlich
 K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg CO₂ – Atividade microbiana
MO – Matéria Orgânica
MOAM – Matéria Orgânica Associada aos Minerais
MOD – Matéria Orgânica Dissolvida
MOP – Matéria Orgânica Particulada
MOS – Matéria Orgânica do Solo
MV – Medicamento Veterinário/Medicamento de uso veterinário

MVs – Medicamentos Veterinários/Medicamentos de uso veterinário

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*

PMP – Ponto de Murcha Permanente

P_{rem} – Fósforo remanescente

qCO₂ – Quociente metabólico

R² – Coeficiente de determinação ou correlação

SE – Erro Padrão

SiBCS – Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos

SINDAN – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal

USP 40 – *United States Pharmacopeia 40 (2017)*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivo Específico	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1 A produção, o consumo e o destino de medicamentos veterinários utilizados na agropecuária	22
3.2 A amoxicilina (AMOX)	26
3.3 A doxiciclina (DOX)	28
3.4 Estudos de sorção no solo	30
3.5 Bioindicadores de qualidade do solo: atividade, biomassa e quociente metabólico (qCO ₂) microbianos	33
3.6 Fitotoxicidade de medicamentos de uso humano e veterinário	35
4 PARTE EXPERIMENTAL	38
4.1 Preparo de soluções	38
4.2 Amostras de solo	38
4.3 Análise das propriedades físico-químicas do solo	40
4.3.1 Determinação da cor úmida	41
4.3.2 Umidade	42
4.3.3 Determinação textural	43
4.4 Metodologias analíticas	44
4.4.1 Obtenção das curvas analíticas	44
4.4.2 Estudos de estabilidade	45
4.4.3 Estudos da relação solo/solução	46
4.4.4 Estudos do efeito de componentes da matriz sobre os fármacos	48
4.4.5 Estudos de período máximo de adsorção	49
4.4.6 Estudos de reprodutibilidade na adsorção em relação ao tempo	50
4.4.7 Isotermas de adsorção e de dessorção	51
4.4.8 Estudos de atividade microbiana, biomassa e quociente metabólico (qCO ₂)	53

4.4.9 Estudos de fitotoxicidade	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 Caracterização do solo	64
5.2 Métodos analíticos	74
5.3 As curvas de calibração	77
5.4 Estudos de estabilidade	78
5.5 Estudos da relação solo/solução	79
5.6 Estudos do efeito de componentes da matriz sobre os fármacos	81
5.7 Estudos de período máximo de adsorção	86
5.8 Estudos de reprodutibilidade na adsorção em relação ao tempo	88
5.9 Isotermas de adsorção e de dessorção	92
5.9.1 Isotermas de adsorção e de dessorção da AMOX	93
5.9.2 Isotermas de adsorção e de dessorção da DOX	99
5.10 Estudos de atividade microbiana, biomassa e quociente metabólico (qCO ₂)	107
5.11 Estudos de fitotoxicidade	117
6 CONCLUSÕES	139
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	141
REFERÊNCIAS	142

1 INTRODUÇÃO

A agropecuária é uma das atividades mais importantes no cenário do comércio mundial. Entretanto, para manter os padrões atuais de produção e mercado, se faz necessária a utilização de uma demanda cada vez mais crescente de insumos agrícolas e medicamentos veterinários, visando a manutenção das lavouras e dos criadouros, sejam estes de pequeno, médio ou grande porte.

A utilização de fertilizantes naturais e fármacos de uso veterinário em larga escala pode ter implicações diretas sobre o meio ambiente e sobre os organismos, uma vez que estes compostos não são totalmente absorvidos, metabolizados ou degradados nos processos intrínsecos e de ciclagem de nutrientes pelos seres vivos.

Por esse motivo, um número cada vez mais crescente de matrizes ambientais tem sido afetado pela presença de compostos bioativos remanescentes de processos produtivos e da presença humana nos mais diversos lugares ao redor do mundo. Na grande maioria das vezes, estas substâncias não têm valores de exposição ambiental normatizados por entidades reguladoras e não são devidamente imobilizados ou degradados por métodos de tratamento de resíduos convencionais.

Nos últimos anos, essas substâncias, denominadas contaminantes emergentes, têm sido estudadas em um número variado de amostras provenientes de águas superficiais e subterrâneas, sedimentos, lodos de estações de tratamento, solos dos mais variados tipos e produtos destinados ao consumo humano e animal.

Os antibióticos correspondem a uma classe de fármacos muito utilizada pela medicina veterinária. Eles se enquadram na lista de compostos considerados emergentes, tendo sido identificados e quantificados nos mais variados tipos de matrizes, sendo um importante objeto de pesquisa devido à pouca informação que se possui sobre o impacto, a curto e longo prazos, que a exposição à estas substâncias acarreta ao meio ambiente e aos seres vivos, em especial ao ser humano.

O que se pretende com o presente trabalho é estudar o comportamento físico-químico e biológico de antibióticos no solo, mais especificamente dois antibacterianos de uso compartilhado na terapia médica humana e animal, a amoxicilina e a doxiciclina, fármacos muito utilizados pela medicina veterinária com finalidade terapêutica e, em alguns casos, profilática, como ocorre com a doxiciclina. Com isso, se busca compreender o modo como esses compostos tornam-se novamente disponíveis no solo, com seus mecanismos de ação ou propriedades químicas,

podendo atuar de forma negativa sobre os organismos que ali habitam, ou dele necessitam, para manutenção dos seus ciclos nutricionais, fisiológicos e/ou reprodutivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o comportamento físico-químico e biológico dos antibióticos antibacterianos amoxicilina e doxiciclina em um latossolo vermelho-amarelo, da região sul do Estado de Minas Gerais, com ênfase em processos de retenção (adsorção e dessorção) e bioensaios (microbiológicos e fitotoxicológicos).

2.2 Objetivos Específicos

- Construir as isotermas de adsorção e dessorção destes fármacos, em dois horizontes do perfil de solo (A e B) submetidos a diferentes condições de acidez.
- Determinar atividade, biomassa e quociente metabólico (qCO_2) nas amostras de solo do horizonte A tratadas com os antibióticos.
- Analisar o impacto que estes compostos acarretam na germinação e desenvolvimento vegetativo, por meio de bioensaios, com o feijão-carioca.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Serão apresentados, nesta breve revisão bibliográfica, alguns tópicos relacionados a produção, consumo e destino de medicamentos veterinários utilizados pela prática da agropecuária, dando notoriedade aos antibióticos antibacterianos, em especial à amoxicilina e à doxiciclina, devido ao alto consumo e à identificação desses fármacos nos mais variados tipos de matrizes ambientais e produtos de origem animal. Também serão mostradas algumas informações relevantes, referências, modelos e bioensaios usados para descrever o comportamento e o impacto que substâncias orgânicas bioativas, como os antibacterianos, acarretam ao solo e aos organismos que nele habitam e dele dependem.

3.1 A produção, consumo e destino de medicamentos veterinários utilizados na agropecuária

O agronegócio é uma das atividades mais expressivas da economia brasileira. A agropecuária é um fator que impulsiona esse negócio e que movimenta o país produzindo renda, gerando empregos e colocando o Brasil em lugar de destaque na produção de alimentos no mundo (MAPA, 2018).

Visando assegurar a competitividade, a produção e o abastecimento do setor, a pecuária acaba sendo um fator motriz para a produção de medicamentos de uso veterinário (MVs), pois seria impossível, dentro de um contexto atual, não fazer uso de fármacos com a finalidade de tratar ou prevenir doenças, tendo como objetivo garantir a saúde e a produtividade nos criadouros (STOTZER *et al.*, 2014).

A pecuária, incluindo desde a criação de organismos aquáticos até os animais de grande porte, pelos métodos atuais de reprodução e desenvolvimento animal, requer inevitavelmente a utilização de MVs, como medida profilática e terapêutica na manutenção desse tipo especial de mecanismo produtivo (DINH *et al.*, 2017). A utilização de fármacos como antiparasitários, antibacterianos, antifúngicos, promotores de crescimento, hormônios, anti-inflamatórios, anestésicos, medicamentos para eutanásia, dentre outros, se faz integrante da rotina moderna dos criadouros no Brasil e no mundo (BOXALL *et al.*, 2003).

Dentre os medicamentos empregados, os antibióticos correspondem a uma boa parcela das prescrições, atuando de forma preventiva, como

indutores/promotores de crescimento e terapêutica, no tratamento de doenças. Antiparasitários, antibacterianos e antifúngicos são medicamentos de uso corrente na produção de bovinos, suínos, aves, caprinos, peixes e no tratamento de animais domésticos (KIM *et al.*, 2008; TAKAHASHI; LUCAS, 2008; TAKAHASHI; MELHEM, 2009; LEAL, 2012; STUHLÍKOVÁ *et al.*, 2016).

No Brasil, de uma forma geral, não há dados detalhados a respeito da quantidade de antibióticos destinada à produção animal (LEAL, 2012). Dentre os poucos materiais existentes, o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), entidade que, atualmente, reúne mais de 80 laboratórios responsáveis por mais de 90% da produção e comercialização desses produtos no país, disponibilizou algumas informações, indicando que o mercado farmacêutico veterinário brasileiro apresentou um crescimento de 5,34 bilhões de reais em 2017, sendo 80% desses produtos comercializados, destinados a animais de produção (ruminantes, aves e suínos). Neste último levantamento, em relação ao seguimento de negócios, os fármacos representaram cerca de 64,5% do mercado de produtos para saúde animal, seguidos pelos produtos biológicos com 23,3% e suplementos com 12,2% (SINDAN, 2018a). Não há dados atuais sobre a representatividade dos antibióticos no mercado brasileiro, mas em um levantamento realizado em 2017 pelo mesmo sindicato, os medicamentos pertencentes à classe dos antimicrobianos (possivelmente antibacterianos, antifúngicos ou mesmo antivirais) representavam 15,2% deste mercado, como pode ser observado na Figura 1.

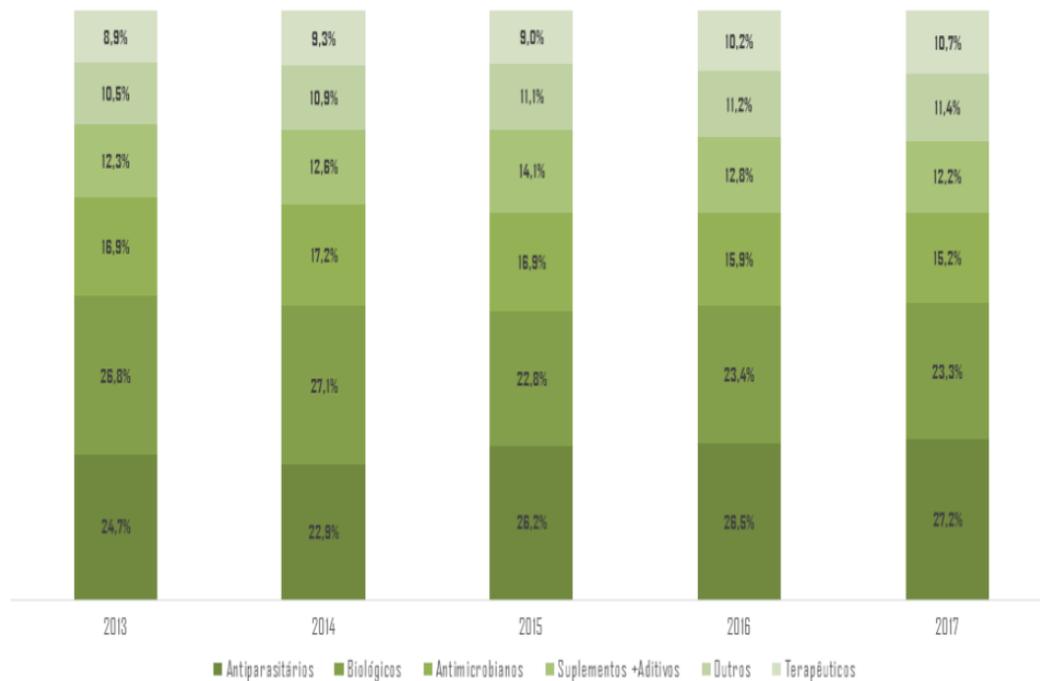


Figura 1 – Representatividade de fármacos destinados ao mercado farmacêutico veterinário brasileiro.
Fonte: SINDAN (2018b).

Entretanto, nem todo MV, incluindo antibióticos, utilizado durante esses processos produtivos é totalmente absorvido pelo organismo dos animais, sendo que uma boa parte destes compostos e/ou seus metabólitos acaba sendo eliminada pelas fezes e urina, tendo como destino final o solo ou mesmo os corpos hídricos (KEMPER, 2008; KÜMMERER, 2009a; KÜMMERER, 2009b; KÜMMERER, 2010; REGITANO; LEAL, 2010; LEAL, 2012; KUPPUSAMY *et al.*, 2018).

Com o uso cada vez mais intensivo de MVs e fertilizantes naturais pela agropecuária, uma demanda maior de resíduos bioativos, sejam eles fármacos ou os seus metabólitos, têm sido detectados em alimentos de consumo humano e animal, além dos mais diversos tipos de matrizes ambientais (LEAL, 2012; CASELANI, 2014).

Nos últimos anos, têm se buscado maiores informações no sentido de avaliar a dinâmica, ocorrência e os efeitos promovidos pelos antimicrobianos nos mais variados tipos de solo, sedimentos, lodos, corpos hídricos e produtos de origem animal. Já se constatou a presença de MVs em produtos de origem animal como leite (KORB *et al.*, 2011; MARTIN, 2011), ovos (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014), fígado (SAINI *et al.*, 2012) e carne (VRAGOVIĆ *et al.*, 2012). Também esses compostos já foram detectados em matrizes ambientais como água potável, águas

superficiais e subterrâneas, residuais brutas e tratadas (DEO; HALDEN, 2013), bacias hidrográficas urbanas (WATKINSON *et al.*, 2009; VERLICCHI; AL AUKIDY; ZAMBELLO, 2012), e rurais (DINH *et al.*, 2017), estações de tratamento de esgoto (SILVA *et al.*, 2016), lodo (BITTENCOURT *et al.*, 2016) e no meio ambiente aquático em geral (KÜMMERER, 2009a; KÜMMERER, 2009b; CARVALHO; SANTOS, 2016; BU *et al.*, 2016; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). Também já foi constatada a presença de antibióticos em sedimentos de rios (YAN *et al.*, 2013), do mar e lacustres (LIU *et al.*, 2016) e no solo (LI, 2014; PEREIRA *et al.*, 2012).

A ocorrência desses resíduos, principalmente antibióticos, têm um impacto extremamente negativo para o ser humano e para o meio ambiente, pois favorece o surgimento de cepas de organismos cada vez mais resistentes, gera vários problemas relacionados à exposição a esses fármacos, seja de aspecto toxicológico ou mutagênico, e interfere nos ciclos que envolvem a ação de microrganismos (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; SCHREIBER; SZEWZYK, 2008; KORB *et al.*, 2011; HORVAT *et al.*, 2012; SHORE *et al.*, 2014; PUCKOWSKI *et al.*, 2016; GRENNI; ANCONA; CARACCILO, 2017; ANTHONY A; ADEKUNLE C; THOR A, 2018).

Os antimicrobianos estão incluídos em uma categoria de substâncias denominada compostos emergentes, que é formada por medicamentos e outros compostos orgânicos que não fazem parte das análises de rotina no monitoramento de risco ambiental, não são devidamente imobilizados ou degradados por métodos de tratamento de resíduos convencionais e que pouco se sabe sobre o seu destino e impacto, em curto e longo prazos, sobre o meio ambiente e os organismos (RIVERA-UTRILLA *et al.*, 2013).

Leal (2012) descreve que a utilização de determinadas substâncias, em especial antimicrobianos, em animais produtores de alimentos para consumo humano e animal requer de maiores estudos farmacológicos, de decaimento, perda de elementos fundamentais e estabelecimento de valores limitativos, visando que o uso de tais compostos não ofereça riscos à saúde do homem ou de outros organismos.

Na medicina veterinária, várias classes de antibióticos são empregadas no tratamento e prevenção de doenças. Algumas têm sua utilização exclusiva na saúde animal, sob as mais variadas condições, e outras, entretanto, têm seu uso compartilhado com a medicina humana. De acordo com o documento “*2017 Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals*”

(Sumário de Antimicrobianos Vendidos ou Distribuídos para Uso em Animais de Produção de 2017), publicado pela *Food and Drug Administration* (FDA), antibióticos empregados apenas na terapia animal, como os ionóforos – que são a grande maioria, com 40% do consumo anual –, são considerados fármacos medicamente não importantes, enquanto que tetraciclinas, β -lactâmicos, macrolídeos e quinolonas são medicamente importantes, pois tratam-se de compostos amplamente utilizados na terapia médica humana. Antibacterianos como as tetraciclinas e β -lactâmicos são os mais prescritos, com porcentagens de consumo anual total de 32% para as tetraciclinas e 6% para as penicilinas – um dentre os grupos que compõem a classe dos β -lactâmicos (FDA, 2018).

A partir desses dados, apesar de não corresponderem à realidade do mercado farmacêutico veterinário brasileiro, no que diz respeito ao consumo de antibióticos, optaram-se em escolher dois antibacterianos que correspondessem a fármacos pertencentes as duas classes de antibióticos mais prescritos, de acordo com a FDA, sendo estes a amoxicilina (uma penicilina) e a doxiciclina (uma tetraciclina). Como não há informações detalhadas a respeito da quantidade de antibióticos destinada à produção animal no Brasil, seguiu-se a tendência do mercado norte americano, que apesar de apresentar suas particularidades, deve influenciar, de alguma forma, a produção e o consumo em outros mercados, incluindo os da América Latina.

3.2 A amoxicilina

A amoxicilina (AMOX) (Figura 2) é um antibiótico antibacteriano, bactericida, semissintético, β -lactâmico do grupo das penicilinas, denominado aminopenicilinas. Sua única diferença em relação às penicilinas G e V é que possui uma atividade antimicrobiana mais ampla, incluindo determinados microrganismos Gram-negativos no seu espectro de ação. Frequentemente, é administrada com um inibidor de β -lactamase, como clavulanato ou sulbactam, para impedir a hidrólise por β -lactamases de amplo espectro produzidas por microrganismos. Tem baixa absorção pelo organismo (cerca de 20%) e tem a maior parte de uma dose excretada na sua forma ativa pela urina (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

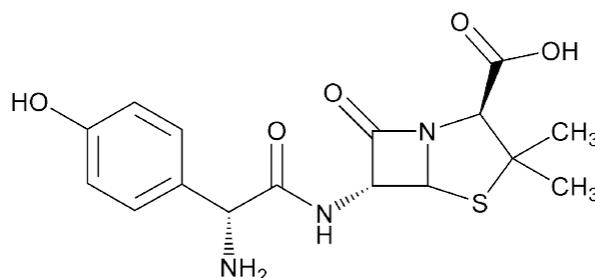


Figura 2 – Estrutura química da amoxicilina.
 Fonte: Adaptado de Xu *et al.* (2011) e *United States Pharmacopeia* (USP 40) (2017).

A AMOX, à temperatura ambiente, é um sólido cristalino estável que demonstra forte odor adocicado. Quando em solução, tem uma taxa de degradação de 30-40% em duas semanas (SIMON; HANCU; GYERESI, 2014). Algumas de suas principais propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais características físico-químicas da AMOX

Número CAS	26787-78-0
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S
Massa molar (g mol L ⁻¹)	365,4
Ponto de fusão (0°C, 1 atm)	194
Solubilidade em água (g L ⁻¹)	3,43
Constantes de dissociação (pK _a)	pK _{a1} : 2,4
	pK _{a2} : 7,4
	pK _{a3} : 9,6

Fonte: adaptado de De Franco *et al.* (2017).

A presença de três valores de pK_a indica que a AMOX apresenta três grupos ionizáveis para formar sítios de ligação com outras moléculas ou íons. Este comportamento anfótero é comum em fármacos e isso a permite reagir ora como um ácido, ora como uma base. A AMOX é estável em meio ácido, tanto que foi desenvolvida para uso oral, e é totalmente absorvida pelo trato gastrointestinal, mas pode ter valores de pK_a alterados com variação de temperatura (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; BEZERRA, 2016).

A AMOX é produzida com finalidade comercial na forma de amoxicilina anidra (C₁₆H₁₉N₃O₅S), amoxicilina trihidratada (C₁₆H₁₉N₃O₅S · 3H₂O) e amoxicilina sódica

($C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot Na$) (MORETTO; MASTELARO, 2013). Normalmente é prescrita para uso humano no tratamento de infecções das vias respiratórias superiores, infecções do trato urinário, meningite e infecções por *Salmonella* (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Quanto à sua utilização na medicina veterinária, é empregada na pecuária e no tratamento de animais domésticos acometidos por infecções provocadas por microrganismos sensíveis à AMOX (FAO, 2012; GASTALHO; RAMOS, 2014).

Por ser um antibiótico muito utilizado, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, a AMOX tem sido objeto de vários estudos visando sua identificação, quantificação, eliminação e a sua ecotoxicidade em matrizes aquáticas e terrestres (MIGUEL; ORLANDO; SIMIONATO, 2013; NETO, 2014; HRYSYK; TIBURTIUS; FUJIWARA, 2017).

3.3 A doxiciclina

A doxiciclina (DOX) (Figura 3) é um antibiótico com atividade antibacteriana bacteriostática pertencente à família das tetraciclina, que possui um amplo espectro de ação no combate a bactérias de vários filos distintos e que também pode ser usada como um antiparasitário alternativo, sendo por estas aplicações, muito utilizada pela medicina humana e veterinária (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

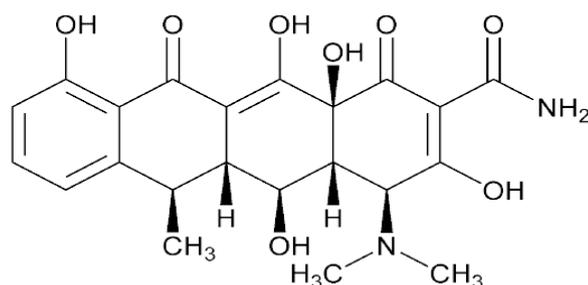


Figura 3 – Estrutura química da doxiciclina.
Fonte: Adaptado de Legendre *et al.* (2012) e *United States Pharmacopeia* (USP 40) (2017).

Segundo Cruz (2016), quando comparada a outros fármacos pertencentes à mesma família, é o princípio ativo que apresenta o mecanismo de ação mais satisfatório. Por possuir uma maior lipofilicidade, a DOX se distribui de forma mais eficiente para os tecidos corporais e acarreta uma maior capacidade de ligação nas

proteínas plasmáticas, o que acaba promovendo um acréscimo na sua meia-vida (15 a 22 horas) e lhe garante propriedades antimicrobianas melhores. Wittenau *et al.* (1962 *apud* BORGHI, 2013) descreveram que esse fármaco, perante outras tetraciclinas, é o que possui a maior estabilidade molecular. A Tabela 2 descreve algumas das principais características físico-químicas da DOX.

Tabela 2 – Principais propriedades físico-químicas da DOX

Número CAS	564-25-0
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈
Massa molar (g mol L ⁻¹)	444,44
Ponto de fusão (0°C, 1 atm)	201
Solubilidade em água (g L ⁻¹)	6,30 10 ⁻¹
Constantes de dissociação (pK _a)	pK _{a1} : 3,4
	pK _{a2} : 7,7
	pK _{a3} : 9,7

Fonte: adaptado de Cruz (2016).

Assim como todas as tetraciclinas, a DOX é uma molécula anfótera, gerando sais hidrossolúveis com ácidos e bases fortes, devido à presença de 3 sítios de ligação ou grupos ionizáveis em sua estrutura molecular (BORGHI, 2013). A Tabela 2 apresenta os valores de pK_a desses três grupos ionizáveis.

A DOX é comercializada na forma de cloridrato (C₂₂H₂₄N₂O₈ · HCl) e na forma de hclato (C₂₂H₂₄N₂O₈ · HCl · ½ H₂O · C₂H₆O), sendo esta última melhor absorvida pelo organismo (CRUZ, 2016). As duas formas se apresentam como pó cristalino de coloração amarela, inodoro e de sabor amargo. É solúvel em água e soluções de hidróxidos e carbonatos alcalinos, levemente solúvel em álcool etílico e praticamente insolúvel em éter e clorofórmio (HARVEY, 1990).

Para uso humano, é indicada no tratamento de infecções aéreas, diretas, indiretas, endógenas e exógenas que acometem praticamente todos os sistemas do organismo. Em animais tem seu uso empregado no tratamento de doenças respiratórias, entéricas e outras infecções desencadeadas por microrganismos sensíveis à DOX. Também tem seu emprego pela medicina veterinária como indutor de crescimento. Na pecuária, é utilizada em aves produtoras ou não de ovos, suínos e bovinos, principalmente bezerros. Em animais domésticos é empregada,

principalmente, em infecções causadas pelo carrapato (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; CRUZ, 2016; LEGENDRE *et al.*, 2016).

Por conta de sua alta utilização, já foi constatada a presença da DOX em efluentes industriais, domésticos e rurais (BORGHI, 2013). Também já foi estudada a presença desse composto em diferentes matrizes como águas superficiais (DENG *et al.*, 2016), lodo (PAMREDDY *et al.*, 2013) e solo (WEI *et al.*, 2016). Entretanto, não existem muitos estudos que avaliam os efeitos que o seu uso, em grande escala, acarreta ao meio ambiente – com enfoque na enorme demanda de matrizes aquáticas e terrestres existentes –, nos organismos e na saúde humana.

3.4 Estudos de sorção no solo

Pesquisas desenvolvidas nos últimos anos, cada vez mais têm alertado sobre a necessidade de se conhecer o comportamento de substâncias com potencial contaminante no solo. Metais pesados, pesticidas, disruptores endócrinos, toxinas e fármacos estão entre os temas mais discutidos e os resultados obtidos, na grande maioria das vezes, são controversos no que diz respeito ao impacto que esses poluentes exercem sobre o meio ambiente e sobre os organismos (GAVRILESCU *et al.*, 2015; SARMA *et al.*, 2016; OLIVEIRA NETO, 2017).

Diferentes trabalhos têm sido realizados com a finalidade de se conhecer melhor o comportamento e o impacto negativo que alguns elementos poluidores de natureza orgânica e inorgânica acarretam ao solo (KIM *et al.*, 2012; PETTER *et al.*, 2016; SARMA *et al.*, 2016; OLIVEIRA NETO, 2017); ou a outras matrizes ambientais encontradas na forma de suspensões, como lamas, lodos e sedimentos (DÍAZ-CRUZ; ALDA; BARCELÓ, 2003; YAN *et al.*, 2013; BITTENCOURT *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016).

Da mesma maneira que tem acontecido com diferentes compostos orgânicos, enfatizando aqui apenas os fármacos, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de entender a dinâmica no solo de antimicrobianos das mais variadas classes e grupos, incluindo β -lactâmicos, como a AMOX (KIM *et al.*, 2012; BRASCHI *et al.*, 2013), e tetraciclina, como a DOX (TEIXIDÓ *et al.*, 2012; ALBERO *et al.*, 2018).

Segundo Regitano e Leal (2015), moléculas de antibióticos contêm vários grupos funcionais ionizáveis, básicos e ácidos, com diferentes valores de pK_a . Logo, suas moléculas podem ser neutras, catiônicas, aniônicas ou zeuteriônicas,

dependendo do pH do meio, o que as fazem se comportar de maneira bastante complexa no meio ambiente. Além disso, são compostos que evidenciam massas molares muito variáveis apresentando baixos potenciais de volatilização e pressão de vapor. Estes mesmos autores, ao comparar esses fármacos aos pesticidas, descrevem que os antibióticos demonstram maior solubilidade em água e menor coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$), provavelmente devido à presença de vários grupos funcionais ionizáveis, o que sugere que suas estruturas químicas apresentam menor potencial de bioacumulação.

Estudos de adsorção e dessorção dessas e de outras moléculas orgânicas nos mais variados tipos de solos são de suma importância na avaliação do impacto ambiental desses compostos, uma vez que fornecem informações relevantes sobre seus movimentos e/ou imobilizações nos mais variados tipos de matrizes (PERUCHI, 2015). Propriedades morfológicas, estruturais e químicas dos solos também necessitam ser consideradas, para um melhor entendimento sobre suas trajetórias e seus mecanismos; e assim se compreender de forma mais contundente e esclarecedora o comportamento dessas substâncias (DORETTO; PERUCHI; RATH, 2014).

Para se realizar estudos de sorção de contaminantes no solo, é necessário que estes estejam em concordância com o *Guideline for the testing of chemicals 106* (OECD) (2000) e para a avaliação dos processos de sorção que ocorrem nesse tipo de matriz, utiliza-se o coeficiente de sorção (K_d), que relaciona a concentração do contaminante na fase sólida (C_s) e a concentração no equilíbrio na fase aquosa (C_w). Com a utilização de várias concentrações do contaminante é possível construir isotermas de sorção e avaliar o comportamento ambiental do analito em questão (OLIVEIRA NETO, 2015).

Para a investigação de processos que descrevem a sorção no solo nos mais variados tipos de matrizes, existem alguns modelos matemáticos que visam a obtenção de um K_d . Dentre eles, os mais conhecidos são os modelos de Freundlich e Langmuir.

No modelo de Freundlich, considera-se a adsorção como heterogênea e essa ocorre em multicamadas, em vários sítios de adsorção que apresentam diferentes energias; desconsiderando uma superfície uniforme, e descrevendo bem a adsorção dentro de um limite de concentração entre materiais porosos e o meio líquido, assim como a adsorção iônica. As Equações 1 e 2 descrevem o modelo em sua forma

exponencial e linearizada (logarítmica), respectivamente, (MELLO *et al.*, 2011; CHATTERJEE; RAI; SAR, 2014).

$$q = K_F C_e^{1/n} \quad (1)$$

$$\log q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (2)$$

Onde:

q → concentração do adsorvato no solo (mg kg⁻¹)

K_F → constante de Freundlich

C_e → concentração do adsorvato no equilíbrio (mg L⁻¹)

n → constante experimental

Como é apresentado na Tabela 3, a constante de Freundlich (K_F) está relacionada com a capacidade de adsorção do adsorvente do substrato em questão.

Tabela 3 – Faixas da Constante de Freundlich e suas respectivas capacidades de adsorção

Constante de Freundlich (mg kg⁻¹)	Capacidade de adsorção
0 a 24	Baixa
25 a 49	Média
50 a 149	Grande
Superior a 150	Elevada

Fonte: Adaptado de Oliveira Jr. e Regitano (2016).

O valor n demonstra a intensidade de adsorção e se a adsorção é favorável ou desfavorável. Os valores de n no intervalo $1 < n < 10$ indicam adsorção favorável (OLIVEIRA Jr.; REGITANO, 2016).

No modelo de Langmuir, a adsorção é considerada como homogênea e acontece em monocamadas, porém com sítios considerados como de mesma energia (CHATTERJEE; RAI; SAR, 2014). Este modelo também presume uma adsorção em uma superfície uniforme e considerando um número de sítios adsorventes limitado, onde a adsorção é restrita independentemente da concentração do material adsorvido

(SPARKS, 2003; MELLO *et al.*, 2011). Trata-se de um modelo que, desde 1957, vem sendo empregado para determinar o comportamento de contaminantes no solo (SPARKS, 2003). As Equações 3 e 4 descrevem o modelo de Langmuir e seu modelo linearizado, respectivamente.

$$q = \frac{bC_e q_{max}}{1 + bC_e} \quad (3)$$

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{b} + \frac{1}{bq_{max}C_e} \quad (4)$$

Em que,

q → quantidade adsorvida por massa de adsorvente (mg kg^{-1})

b → valor máximo de adsorbato sobre a superfície sólida (mg kg^{-1})

C_e → concentração no equilíbrio (mg L^{-1})

q_{max} ou K_L → constante de Langmuir (L kg^{-1})

De acordo com Sparks (2003), uma das principais desvantagens do modelo de Freundlich se deve ao fato dele não poder prever a concentração máxima de adsorção, o que não acontece com a utilização do modelo de Langmuir, que fornece esse parâmetro.

3.5 Bioindicadores de qualidade do solo: atividade, biomassa e quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) microbianos

A fauna e a flora do solo são componentes indispensáveis ao funcionamento ecológico dos solos. Apesar de sua fração viva (biomassa total) compreender de 1 a 5% da sua matéria orgânica total, ela é responsável por uma quantidade significativa de efeitos benéficos que no solo ocorrem, dentre os seus inúmeros processos biogeoquímicos. O controle de funções essenciais como a decomposição de matéria orgânica, a mineralização de compostos orgânicos, transformações inorgânicas de N, S e P, produção de metabólitos diversos e degradação de compostos xenobióticos

são alguns dos principais processos bioquímicos desempenhados pela microbiota do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Todos os principais grupos de microrganismos – bactérias, fungos, algas e protistas, como também os vírus – compõem a microbiota e estão presentes no solo, porém as bactérias são os organismos mais abundantes (BLACK, 2002). Por sofrerem acentuada influência do ambiente e devido ao seu envolvimento nos processos vitais do ecossistema edáfico, isso explica a essencialidade da microbiota na determinação da qualidade do solo e, conseqüentemente, na produção agrícola e saúde ambiental (SIQUEIRA *et al.*, 1994; CHILDS, 2007).

Powlson *et al.* (1987) e Hofman (2003 *apud* CHILDS, 2007) descrevem que mudanças nos parâmetros microbianos constituem um alerta antecipado da perda de qualidade de solo e que, a partir dos mesmos, é possível fazer, além das avaliações retrospectivas, a implementação prospectiva do manejo sustentável para os fatores com impacto potencial, uma vez gerada a informação específica.

De acordo com Livingstone (1993), bioindicadores são definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental ao nível individual, medidos no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do *status* normal que não pode ser detectado no organismo intacto. Ou seja, são medidas de fluidos corporais, células, tecidos ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam, em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, compartimentais ou energéticos, a presença de substâncias contaminantes ou a magnitude da resposta do organismo alvo. Existem bioindicadores moleculares, celulares e ao nível do animal/vegetal completo. As duas características mais importantes dos bioindicadores são: a) permitem identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos; b) possibilitam a mensuração de efeitos sub-letais. Esta última característica permite pôr em prática ações remediadoras ou, melhor ainda, ações preventivas. Daí a importância e o interesse atual de incorporação da análise de bioindicadores em programas de avaliação da contaminação ambiental (ARIAS *et al.*, 2007).

Levando em conta que os microrganismos constituem um excelente indicador das condições biológicas de determinado tipo de matriz ambiental, principalmente solos, o emprego da atividade (mg CO_2) e o carbono da biomassa (C_{mic}) microbianas – com ou sem cálculo de quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) – como bioindicadores para efeitos diretos e de curto prazo da qualidade do solo, há algum tempo, têm sido usados

em trabalhos para avaliar o impacto promovido por compostos xenobióticos à microbiota (BASTIDA *et al.* 2008).

Contaminantes como herbicidas (REIS *et al.*, 2008; GOMEZ *et al.*, 2009; TIRONI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010; ABBAS *et al.*, 2014), corantes e compostos fenólicos (PEROVANO FILHO; SILVA; LÓPEZ, 2011), metais pesados (LIAO *et al.*, 2010; QUADRO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013; MUHLBACHOVA *et al.*, 2015), pesticidas (DAS; PAL; CHOWDHURY, 2007; CHOWDHURY *et al.*, 2008; IMFELD; VUILLEUMIER, 2012; PORTILHO *et al.*, 2015; LV *et al.*, 2017), petróleo e seus derivados (PEÑA *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2012) e fármacos, com ênfase aos antibióticos (GAO *et al.*, 2013; CUI *et al.*, 2014; REICHEL *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2016; WAISER *et al.*, 2016; MOLAEI *et al.*, 2017) são exemplos de substâncias consideradas estranhas à microbiota do solo que foram estudadas em trabalhos realizados nos últimos quinze anos.

Algumas pesquisas desenvolvidas mais recentemente, empregando esses bioindicadores, também têm comprovado alterações significativas tanto na biomassa e atividade microbiana quanto no qCO₂ dos solos, por efeito de práticas de manejo associadas à intensificação da agropecuária (LIU *et al.*, 2016; BELMONTE *et al.*, 2018; QIN *et al.* 2018), adição de adubos (XU *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018a; WANG *et al.*, 2018b) e utilização de agrotóxicos (MUKHERJEE *et al.*, 2016; LV *et al.*, 2017; SAM; ASUMING-BREMPONG; NARTEY, 2017).

Entretanto, apesar de terem sido realizados diferentes trabalhos com o objetivo de se compreender o impacto que compostos xenobióticos exercem, em curto e longo prazos, sobre a microbiota do solo, em regiões de clima tropical e em solos muito intemperizados essas pesquisas, em sua grande maioria, ainda são escassas; havendo, dessa forma, a necessidade de se compreender o comportamento ambiental de substâncias bioativas, como os antibióticos.

3.6 Fitotoxicidade de medicamentos de uso humano e veterinário

A contaminação do solo por compostos farmacêuticos ativos tem diferentes implicações sobre os vegetais (HAMMAD *et al.*, 2018). Em uma ampla escala, fármacos, dentre eles os antibióticos de uso veterinário, como antibacterianos, antiparasitários e antifúngicos, são introduzidos no ambiente e podem afetar as plantas (BÁRTÍKOVA; PODLIPNÁ; SKÁLOVÁ, 2016).

Os antibióticos usados pela medicina veterinária são poluentes emergentes que são liberados no meio ambiente através de águas residuais e esterco ou efluentes de criadouros. Em comparação com a vasta literatura disponível sobre o desenvolvimento de novas drogas, sua ação sobre microrganismos – principalmente bactérias – e sobre os seus efeitos adversos promovidos em animais e seres humanos, os seus impactos sobre as plantas são menos investigados (BELLINO *et al.*, 2018).

A influência significativa de muitos antibióticos nos processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas tem sido comprovada (BÁRTÍKOVA; PODLIPNÁ; SKÁLOVÁ, 2016). Porém, a maioria desses fármacos que teve a confirmação do seu efeito fitotóxico foi testada *in vitro* e não diretamente no solo. Além disso, na maioria dos casos, os experimentos *in vitro* parecem ter sido realizados em concentrações que provavelmente não são muito altas no solo (JJEMBA, 2002).

A fitotoxicidade dos antibióticos de uso veterinário em plantas varia de acordo com as espécies vegetais e o composto antibiótico. De acordo com Carvalho *et al.* (2014), esses compostos produzem efeitos indiretos no crescimento das plantas, alterando a disponibilidade de nutrientes, o crescimento e o desenvolvimento radicular. Logo, isso acaba por impactar na germinação, no crescimento e no desenvolvimento da planta como um todo.

Nas últimas décadas, alguns trabalhos têm confirmado alterações morfológicas e funcionais em plantas de diversas espécies vegetais, preferencialmente, hortaliças e leguminosas, desencadeadas pela ação de diferentes grupos de antibióticos e sob influência das mais variadas concentrações destes contaminantes. Estes resultados são apresentados em revisões feitas por Jjemba (2002), Sarmah *et al.* (2006), Du e Liu (2012), Kumar, Lee e Cho (2012), Bártíkova, Podlipná e Skálová (2016), Minden *et al.* (2017) e Pan e Chu (2017).

Mais recentemente, estudos avaliando outros compostos farmacêuticos bioativos, além dos antibióticos de uso humano e veterinário, têm sido realizados, também com a finalidade de verificar o efeito fitotóxico promovido por essas substâncias (PINO *et al.*, 2016; HAMMAD *et al.*, 2018); Pesquisas buscando encontrar plantas tolerantes à presença de fármacos, capazes de absorvê-los ou de imobilizá-los vem sendo feitas, objetivando, principalmente, práticas de biorremediação de áreas contaminadas (CARVALHO *et al.*, 2014; TOMASSONI *et al.*, 2014; FRANCISCO; QUEIROZ, 2018); e a utilização de espécies vegetais com alta

sensibilidade a compostos farmacêuticos bioativos, para se obter bons indicadores de contaminação por medicamentos de uso humano e animal, são um bom exemplo da aplicação de técnicas empregadas em análises de fitotoxicidade em plantas, visando ajudar a prever a influência de compostos bioativos, como antibióticos, na biodiversidade e melhorar as estratégias de fitorremediação (BÁRTÍKOVA; PODLIPNÁ; SKÁLOVÁ, 2016; PAN; CHU, 2016; CHEN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

Devido à uma demanda cada vez mais crescente no consumo de antibióticos, principalmente de uso veterinário, suas formas de eliminação, contaminação, permanência e identificação nos mais variados tipos de matrizes ambientais, além dos efeitos tóxicos ou acumulativos que poderiam acarretar nas plantas, ou mesmo em outros seres vivos, é motivo de preocupação à exposição subsequente de animais e de seres humanos à essas substâncias, uma vez que uma das vias de entrada desses compostos no organismo pode ser pelo simples fato de se consumir alimentos de origem vegetal (JJEMBA, 2002; KEMPER, 2008; DU; LIU, 2012).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Preparo de soluções

Os padrões analíticos da amoxicilina trihidratada (AMOX), (teor 97,1% da base anidra – Facron) e do hclato de doxiciclina (DOX), (teor de pureza 98,9% da substância anidra – Galena Química Farmacêutica Ltda.) utilizados nos experimentos, na verdade, correspondem a matérias-primas empregadas na manipulação de medicamentos em estabelecimentos que produzem e dispensam esse tipo de produto. Por se tratarem de antimicrobianos antibacterianos, esses fármacos têm dispensação controlada pela ANVISA (RDC Nº 20/2011) e, mesmo esses compostos tendo sido destinados à pesquisa, para suas referidas aquisições, coube à apresentação de prescrição concedida por profissional competente para suas dispensações (ANVISA, 2018a).

As soluções padrão de concentração de 1.000,0 mg L⁻¹ dos dois antibióticos utilizados foram preparadas pesando 0,0574 g (equivalente a 0,050 g da base anidra) de amoxicilina trihidratada e 0,0578 g de hclato de doxiciclina (equivalente a 0,050 g da substância anidra), de forma discriminada, em balança analítica de alta precisão Shimadzu modelo ATX224 (Japão) e avolumadas em balão volumétrico de 50,0 mL com CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ (solução extratora). Em seguida, os balões contendo as soluções recém-preparadas permaneceram por um período mínimo de 10 minutos em um banho ultrassônico Tecnal modelo TE-0581 (Brasil) para dissolução completa dos fármacos. Essas soluções eram preparadas para uso imediato e, por esse motivo, não havia necessidade de armazenamento para uso posterior.

4.2 Amostras de solo

As amostras de solo utilizadas neste estudo tiveram origem de um latossolo vermelho-amarelo com características físicas e morfológicas típicas. Esse material foi coletado nas seguintes coordenadas: latitude 22°41'38.0" S e longitude 45°43'67.9" W, altitude 897 metros, em mediações do perímetro urbano da cidade de Itajubá-MG, como pode ser observado em localização obtida pelo Google Maps® e escavação presente no mesmo local, demonstradas na Figura 4.



Figura 4 – Localização (vista aérea e frontal) do local de coleta das amostras de solo.
Fonte: Google Maps® e o autor (2018).

Após a coleta, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ com a finalidade de conservação e manutenção de suas propriedades, principalmente se tratando da umidade, permanecendo, assim, por um período máximo de 20 dias. Após decorrido esse tempo, eram descartadas com o objetivo de padronização dos ensaios que se seguiram. Entretanto, quando foi necessária a realização dos ensaios físicos e químicos, secou-se esse material à temperatura ambiente por um período de 7 dias para posterior tamisação (Figura 5A) e (Figura 5B), visando se obter partículas inferiores a 2,0 mm. Em seguida, as amostras de solo peneiradas ou eram imediatamente utilizadas, ou devidamente armazenadas e condicionadas, dando seguimento aos ensaios seguintes.



Figura 5 – (A) Amostra de solo correspondente ao horizonte A; (B) Amostra de solo correspondente ao horizonte B.

Fonte: o autor (2018).

4.3 Análise das propriedades físico-químicas do solo

Realizaram-se as análises físicas e químicas de caracterização das amostras de solo em três momentos: inicialmente, foram feitos testes físicos (determinação da cor úmida, umidade e textura do solo) no Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal de Itajubá-UNIFEI; em seguida, para realização dos testes químicos, amostras do mesmo material foram encaminhadas para o Laboratório de Análises de Solo da Universidade Federal de Lavras-UFLA; e finalizando essas análises, visando se obter a identificação dos tipos de argilas e/ou óxidos presentes neste solo, amostras foram enviadas para o *Departamento de Edafología y Química Agrícola da Facultad de Ciencias da Universidad de Granada* (Espanha).

As análises que tiveram como objetivo a identificação dos constituintes mineralógicos dos horizontes desse solo foram realizadas no *Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada* (Espanha), em um equipamento Bruker D8 Advance com radiação $\text{CuK}\alpha$. O estudo mineralógico por difração de raios X (DRX) foi realizado seguindo as metodologias descritas por Azaroff e Buerger (1958) e Moore e Reynolds (1989). Para interpretação qualitativa e semi-quantitativa dos difratogramas de raios X, utilizou-se o programa de identificação mineral X Powder® versão 2004.04.

Essas análises se fizeram necessárias, pois a partir dos dados delas obtidos, foi possível compreender, com um melhor critério e entendimento, o que poderia contribuir nos processos de adsorção e dessorção dos fármacos nos dois horizontes analisados.

4.3.1 Determinação da cor úmida

Para a determinação da cor úmida dos dois horizontes (A e B), utilizou-se um fragmento (torrão de solo) seco ao ar, posteriormente umedecido com uma pequena porção de água (Figura 6).

Horizonte A



Horizonte B



Figura 6 – Torrões que correspondem aos horizontes A e B, secos ao ar e em seguida umedecidos, respectivamente.
Fonte: o autor (2018).

Em seguida, buscou-se identificar, de forma isolada, a cor do solo correspondente a cada um dos dois horizontes estudados, por meio do uso de cartas de cor do solo de Munsell, como a apresentado na Figura 7.

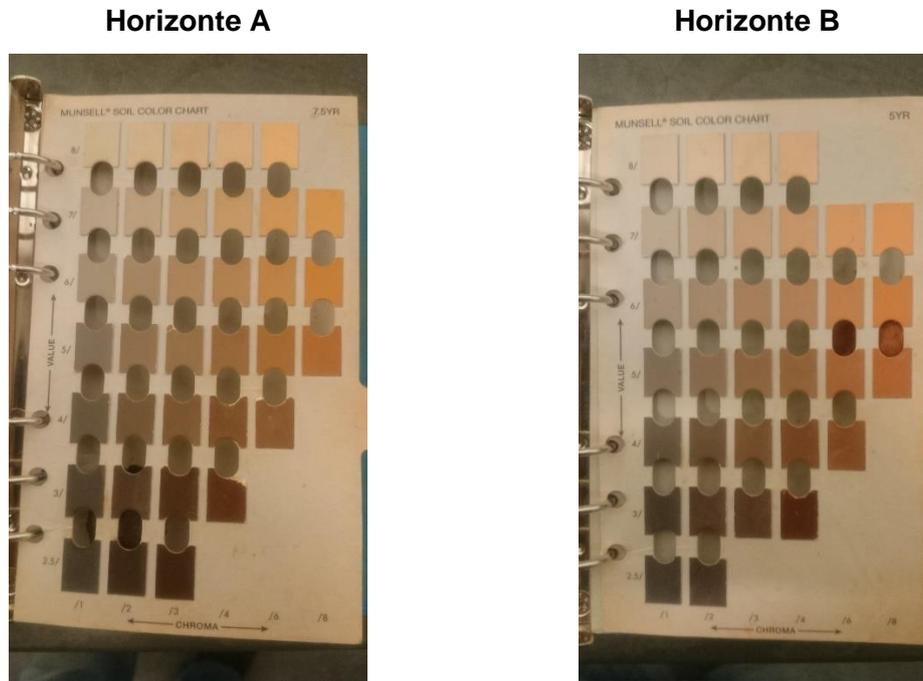


Figura 7 – Uso das cartas de cor do solo de Munsell para identificação de cor do solo.

Fonte: o autor (2018).

4.3.2 Umidade

Com o intuito de estabilizar os recipientes utilizados no decorrer desta análise, três cápsulas metálicas foram, a princípio, mantidas em uma estufa Fanem modelo A-HT (Brasil) a 110°C por um período de duas horas, para em seguida, serem armazenadas em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente e terem seus respectivos pesos anotados (M_3). Dando seguimento, pesaram-se 30,0 g de amostra de solo em cada uma das cápsulas (M_1) utilizando uma balança analítica de alta precisão Marte/Shimadzu modelo AY220 (Brasil/Japão), para depois submetê-las a uma temperatura de 105°C por um período de 24 horas. Decorrido esse tempo, essas placas foram transferidas para um dessecador até novamente atingirem a temperatura ambiente e depois terem os seus pesos finais anotados (M_2) (ABNT, 1986).

A umidade foi obtida utilizando a Equação 5.

$$\text{Teor de umidade (h) (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_2 - M_3} \times 100 \quad (5)$$

4.3.3 Determinação textural

Visando analisar as frações granulométricas dos dois horizontes estudados, a metodologia escolhida e empregada foi o método da pipeta (EMBRAPA, 2017). Esse método consiste, primeiramente, na secagem da amostra de solo à temperatura ambiente, seguindo por tamisação com peneira com malha de 2,0 mm e dessecação a 105°C por um período de 24 horas, com a finalidade de deixar a amostra condicionada para posterior utilização.

Seguindo com as análises, pesaram-se aproximadamente 10,0 g de amostra de solo de cada um dos dois horizontes utilizando uma balança analítica de alta precisão Marte/Shimadzu modelo AY220 (Brasil/Japão), transferindo, em seguida, esse material para um copo metálico de um agitador, juntamente com 150,0 mL de água destilada e 10,0 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Essa suspensão foi deixada em repouso por 15 minutos e, após esse tempo, submetida à agitação em um dispersor de solo elétrico Marconi/Skymesen modelo BMS-3 (Brasil) por um período de 20 minutos.

Após sua dispersão, a suspensão foi transferida quantitativamente para uma proveta de 1000,0 mL e completando o seu volume com água destilada. Com a utilização de um termômetro, foi possível verificar a temperatura do líquido em suspensão e calcular o tempo em que este deveria permanecer em repouso para sedimentação das partículas; este tempo foi de 3h36'.

Passado esse intervalo, pipetou-se uma alíquota de 10,0 mL da parte superior da suspensão em uma cápsula metálica previamente pesada, deixando este conjunto em uma estufa Fanem modelo A-HT (Brasil) a 105°C por um período de 24 horas. Essa parte do procedimento teve como finalidade a obtenção da fração argila da amostra.

O restante da suspensão contida na proveta foi devidamente peneirado e lavado em malha de 0,053 mm para a eliminação da fração argila e silte e, após a lavagem, esse conjunto também foi mantido em estufa a 105°C por um período de 24

horas. Já essa parte do procedimento visou a obtenção da fração de areia da amostra. O procedimento foi submetido em triplicata para cada um dos horizontes avaliados.

A partir das massas obtidas após a pesagem das cápsulas de alumínio com o material residual, calculou-se a porcentagem de argila, areia e silte, de acordo com as Equações 6, 7 e 8:

$$\% \text{ de argila} = 1000 \times (\text{peso da argila} - 0,004) \quad (6)$$

$$\% \text{ de areia} = 1000 \times \text{peso da areia} \quad (7)$$

$$\% \text{ de silte} = 100 - (\% \text{ areia} + \% \text{ argila}) \quad (8)$$

4.4 Metodologias analíticas

No que diz respeito à definição dos parâmetros mais adequados para a montagem das isotermas de adsorção e dessorção dos dois fármacos avaliados, a metodologia utilizada foi adaptada de trabalhos desenvolvidos anteriormente por Oliveira Neto (2015) e Oliveira Neto *et al.* (2017).

Quanto aos ensaios microbiológicos, a metodologia empregada também foi adaptada do trabalho de Ferreira, Camargo e Vidor (1999).

E finalizando, os ensaios fitotoxicológicos foram realizados de acordo com o *Guideline for Testing of Chemicals 208*, da *Organisation for Economic Co-operation and Development* – OECD e o *Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests – E1963 – 09*, da *American Society for Testing and Materials* – ASTM (OECD, 2003; ASTM, 2014).

4.4.1 Obtenção das curvas analíticas

A quantificação dos fármacos foi executada empregando-se a técnica da espectrometria por absorção molecular, no espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 (EUA), primeiramente realizando uma varredura entre 200-800 nm a fim de se verificar, de forma isolada, o comprimento de maior absorção da AMOX e da DOX no espectro.

As curvas de calibração para os analitos foram construídas entre as concentrações de 0,3 mg L⁻¹ e 30,0 mg L⁻¹, em solução de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, a partir da utilização das soluções estoque previamente preparadas (**item 4.1**). As curvas analíticas foram elaboradas por meio de 8 pontos buscando se obter um R² maior ou igual a 0,990.

Validando esse método, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir da análise de 10 brancos. Para as duas curvas, o limite de detecção (*LD*) e o limite de quantificação (*LQ*) foram calculados a partir das Equações 9 e 10, respectivamente (RIBANI *et al.*, 2004).

$$LD = \frac{3,3s}{S} \quad (9)$$

$$LQ = \frac{10s}{S} \quad (10)$$

Onde:

s – é o desvio padrão da análise de 10 brancos

S – trata-se do coeficiente angular da curva analítica

Enquanto o LD é a menor concentração do analito que o equipamento consegue detectar com confiabilidade pelo método analítico, o LQ é a menor concentração que pode ser quantificada pela curva de calibração.

4.4.2 Estudos de estabilidade

Com o objetivo de avaliar se ocorreria alguma sorção nas paredes internas dos tubos empregados nos ensaios – tubos cônicos tipo falcon de polipropileno (50,0 mL Sarstedt (Alemanha) –, foi realizado um estudo controle, de forma isolada, para cada um dos fármacos, utilizando 25,0 mL de cada um destes compostos na concentração de 15,0 mg L⁻¹. Esses foram submetidos à agitação em um agitador orbital Agimaxx modelo OS-200 (China) por um período de 3 dias a 120 rpm, onde alíquotas foram coletadas em tubos separados (volume fixo) nos intervalos de 24, 48 e 72 horas; e

posteriormente filtrados em um sistema composto por suporte de filtro e membrana de éster de celulose 0,45 μm MFS (EUA) para posterior leitura no espectrofotômetro UV-Vis. As etapas desse procedimento são demonstradas de forma esquemática na Figura 8.

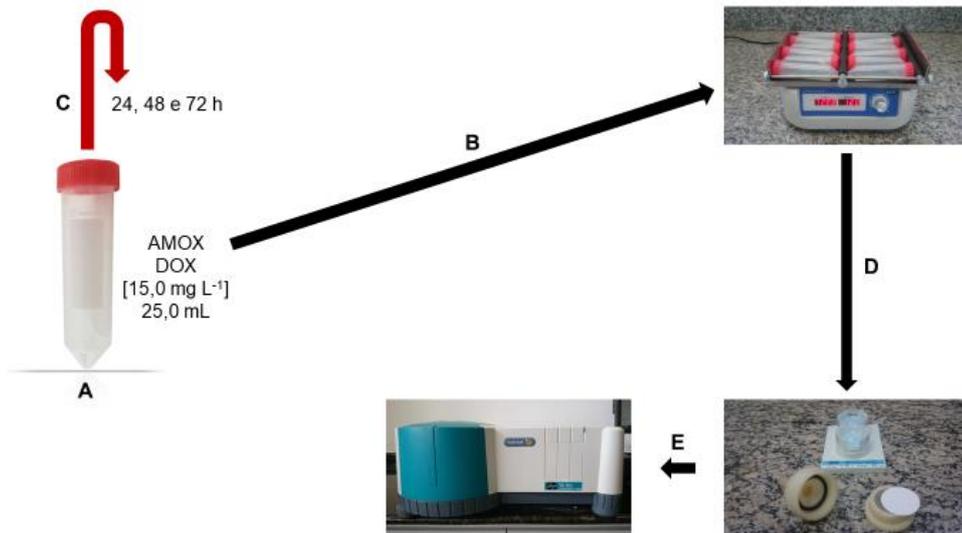


Figura 8 – Etapas do método para verificação da estabilidade dos fármacos em relação aos tubos tipo falcon de polipropileno: (A) Tubo contendo 25,0 mL dos fármacos na concentração de 15,0 mg L⁻¹; (B) Agitação por um período total de 72 h; (C) Retirada das alíquotas nos intervalos determinados; (D) Filtragem das amostras; (E) Leitura dos filtrados no espectrofotômetro UV-Vis. Fonte: o autor (2018).

Com o propósito de se evitar a degradação dos fármacos por possíveis processos de fotólise, os tubos permaneceram durante todo ensaio protegidos da luz. Realizou-se todo o procedimento deste estudo – cada intervalo avaliado – em triplicata.

4.4.3 Estudos da relação solo/solução

Visando à realização deste estudo, inicialmente, um volume de 25,0 mL de uma solução de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ foi transferido para um tubo cônico tipo falcon de polipropileno contendo uma porção conhecida de amostra de solo, com a finalidade de avaliar a adsorção dos fármacos em diferentes razões solo/solução. As razões escolhidas para o estudo com a AMOX foram 1/250, 1/100, 1/50, 1/25, 1/10, 1/5 e 1/2,5 (m/v), enquanto que as razões escolhidas para o estudo com a DOX foram

1/2500, 1/1000, 1/500, 1/250, 1/100, 1/50 e 1/25. Os tubos foram deixados sob agitação por um período de 24 horas a 120 rpm protegidos da luz, primeiramente com o objetivo que as suspensões estabilizassem, entrando em equilíbrio físico-químico. Em seguida, os mesmos tiveram seus conteúdos contaminados, separadamente, com 375,0 μL de uma solução estoque de 1000,0 mg L^{-1} contendo os antibacterianos, passando, então, a corresponder a uma suspensão de 15,0 mg L^{-1} destes fármacos, sendo novamente submetidas à agitação por mais um período de 24 h. Separou-se um branco. Após essa etapa, as suspensões foram centrifugadas em uma centrífuga Quimis modelo Q222T (Brasil) e filtradas em um sistema composto por suporte de filtro e membrana de éster de celulose 0,45 μm , para posterior leitura no espectrofotômetro UV-Vis. As etapas desse ensaio são mostradas, de forma esquemática, na Figura 9.

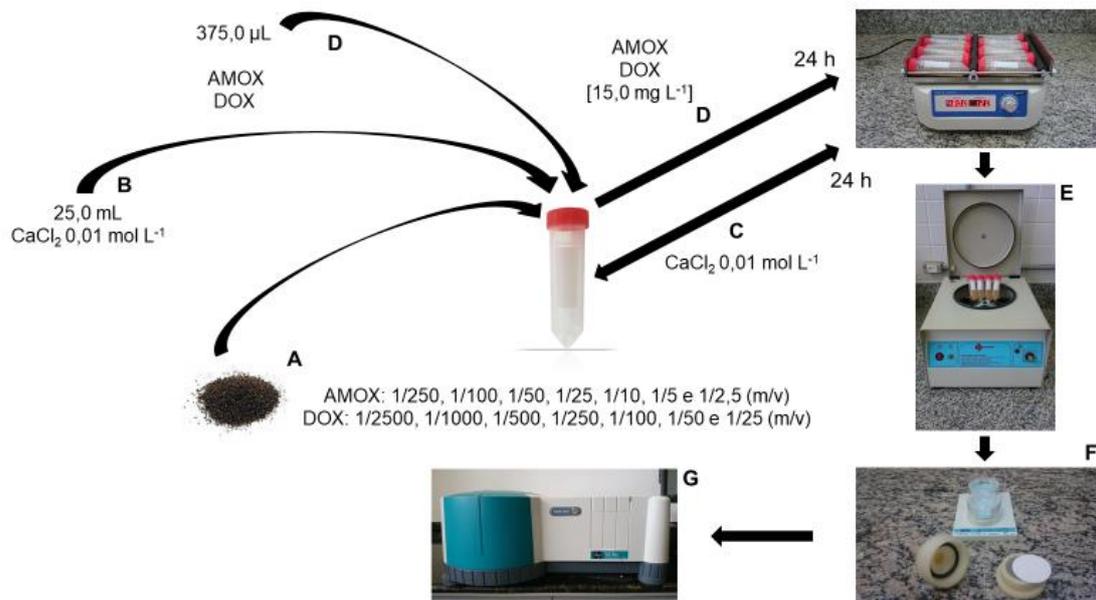


Figura 9 – Etapas do método de verificação da razão solo/solução para os antibacterianos: (A) Pesagem e transferência das porções de amostra de solo; (B) Adição de 25,0 mL de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} aos tubos; (C) Agitação por 24 h dos recipientes contendo as suspensões; (D) Contaminação com os fármacos do material suspenso e agitação dos tubos com estas suspensões enriquecidas por mais 24 h; (E) Centrifugação dos tubos para separação dos sobrenadantes; (F) Coleta e filtração dos sobrenadantes; (G) Leitura dos filtrados contendo os fármacos recém-recuperados no espectrofotômetro UV-Vis.

Fonte: o autor (2018).

4.4.4 Estudos do efeito de componentes da matriz sobre os fármacos

Para a avaliação do possível efeito interferente dos componentes da matriz, seguiram-se os mesmos parâmetros utilizados quando foram construídas as curvas analíticas (**item 4.4.1**), diferindo apenas na inserção das amostras de solo à solução extratora na construção destas curvas.

Ao todo, foram construídas 12 curvas analíticas para cada antibiótico, que reproduziram todas as condições ou parâmetros utilizados no decorrer do presente trabalho. Para a análise da AMOX, as suspensões foram preparadas na razão 1/5 (m/v) e, para a DOX, as mesmas foram preparadas na razão 1/250, em concordância com os resultados obtidos anteriormente nos estudos de relação solo/solução. As medidas de pH escolhidas foram 3,0, 4,8, 6,5 e \pm 7,5, sendo esta última, correspondente ao pH da solução extratora sem ajuste e sem adição de amostra de solo.

As suspensões também foram submetidas a um período de estabilização de 24 horas sob agitação (Figura 10), para depois ser filtradas e utilizadas. Logo, as soluções obtidas reproduziram as mesmas condições as quais permaneceram, em todos os ensaios em que foram avaliadas.

Amoxicilina (Horizontes A e B)



Doxiciclina (Horizontes A e B)



Figura 10 – Estabilização de algumas das suspensões simulando o mesmo efeito promovido nos tubos quando submetidos à agitação. Foi mantida a velocidade de rotação de 120 rpm.
Fonte: o autor (2018).

4.4.5 Estudo de período máximo de adsorção

Com a finalidade de se obter o período máximo de adsorção dos antimicrobianos avaliados, para o preparo das amostras com a AMOX, foram adicionados em tubos cônicos tipo falcon de polipropileno 5,0 g de amostra de solo e 25,0 mL de amoxicilina em solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; e para o preparo das amostras com a DOX, empregando o mesmo tipo de tubo, foram adicionados 0,1 g de amostra de solo e 25,0 mL de doxiciclina em solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, em ambos os casos, equivalendo a $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ de analito.

Ao todo, realizaram-se dois ensaios: (a) fixo (com volume variável), em que alíquotas de 5,0 mL das suspensões eram retiradas após a centrifugação, nos tempos

2, 4, 6, 24 e 27 h do mesmo tubo e (b) isolado (com volume fixo), em que um único tubo correspondia a cada tempo analisado (Figura 11). Ao final, os resultados foram comparados com o intuito de verificar se o volume de solução extratora afeta a porcentagem de adsorção, se houve diferenças significativas no que diz respeito à adsorção entre um tipo de horizonte e outro, além de poder constatar o tempo em que ocorreu a adsorção máxima de cada fármaco em cada condição estudada.

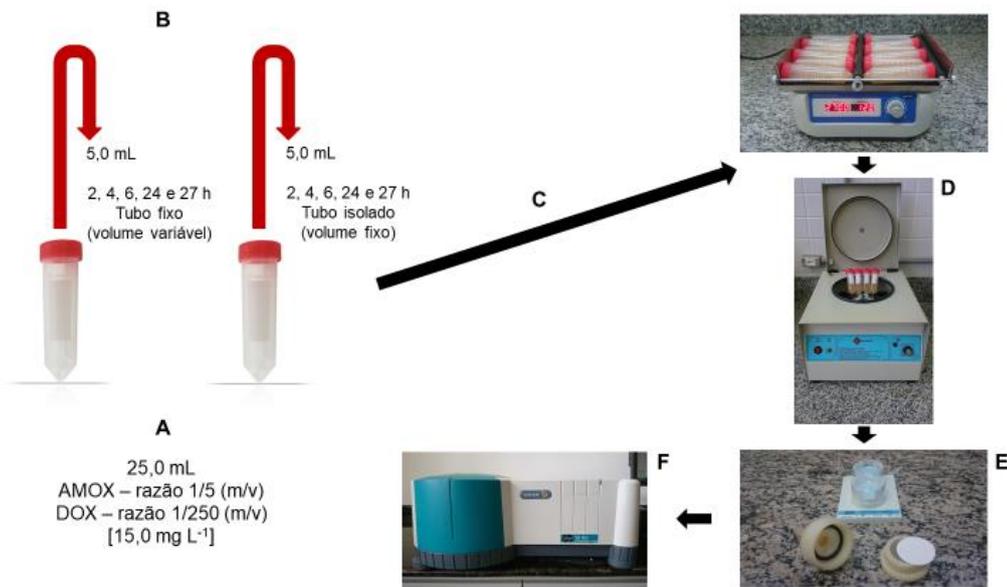


Figura 11 – Etapas do estudo para verificação do período máximo de adsorção dos fármacos: (A) Tubo contendo 25,0 mL dos antibióticos na concentração de 15,0 mg L⁻¹ e nas razões solo/solução correspondentes; (B) Retirada das alíquotas nos intervalos pré-determinados; (C) Agitação por um período total de 27 h; (D) Centrifugação dos tubos para separação dos sobrenadantes; (E) Coleta e filtragem dos sobrenadantes; (F) Leitura dos filtrados contendo os analitos recém-recuperados no espectrofotômetro UV-Vis.
Fonte: o autor (2018).

4.4.6 Estudo de reprodutibilidade na adsorção em relação ao tempo

Esse ensaio teve como objetivo verificar se as condições de adsorção, no que diz respeito à composição da matriz estudada, se mantinham no decorrer do tempo, sem a preservação das amostras de solo por refrigeração a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz. Esse material, inicialmente utilizado, foi novamente testado após 12 meses do início do experimento, porém não permanecendo no decorrer desse período, refrigerado e/ou protegido por material opaco. Para realização desse estudo, seguiu-se a mesma metodologia usada nos ensaios que avaliaram a relação solo/solução (**item 4.4.3**), tanto para a AMOX quanto para a DOX.

4.4.7 Isotermas de adsorção e de dessorção

Todos os ensaios aqui relacionados foram realizados à temperatura ambiente (25°C) sob diferentes condições de pH, utilizando um pHmetro Micronal modelo B474 (Brasil) e empregando-se soluções de HCl 1,0 mol L⁻¹ e NaOH 1,0 mol L⁻¹ para os ajustes de pH da solução de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹.

As isotermas de adsorção e de dessorção foram estudadas nas concentrações de 7,0, 9,0, 11,0, 13,0, 17,0, 21,0, 25,0 e 27,0 mg L⁻¹ em cada um dos fármacos, ou seja, separadamente. Para a AMOX, as suspensões foram preparadas com 5,0 g de amostra de solo, (1/5) razão (m/v), nos horizontes A e B e, para a DOX, 0,1 g (1/250) para os mesmos horizontes; tendo como base os ensaios de razão solo/solução anteriormente realizados.

Nos estudos de adsorção, as suspensões foram agitadas a 120 rpm por um período de 24 horas para a suspensão primeiramente entrar em equilíbrio e, em seguida, por mais 24 horas para a adsorção dos analitos. Após esse período estas foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado em membrana de éster de celulose 0,45 µm (Figura 12).

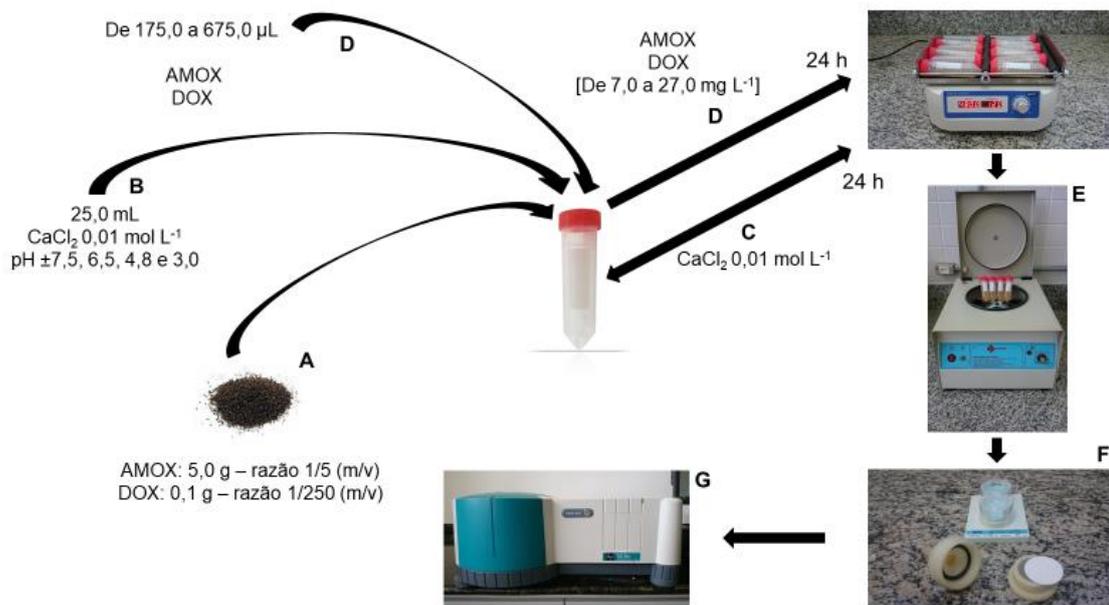


Figura 12 – Etapas da metodologia para o estudo dos processos de adsorção dos antibióticos: (A) Pesagem e transferência das porções de amostra de solo; (B) Adição de 25,0 mL de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} , com pH corrigido ou não, aos tubos; (C) Agitação por 24 h dos recipientes contendo as suspensões; (D) Contaminação do material suspenso com os fármacos e agitação dos tubos com estas suspensões enriquecidas por mais 24 h; (E) Centrifugação dos tubos para separação do sobrenadante; (F) Coleta e filtragem dos sobrenadantes; (G) Leitura dos filtrados contendo os fármacos recém-recuperados no espectrofotômetro UV-Vis.

Fonte: o autor (2018).

Para os estudos de dessorção, as amostras de solo remanescentes nos tubos cônicos tipo falcon de polipropileno foram ressuspensas com 25,0 mL de solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} e mantidas apenas sob agitação por 48 horas. Em seguida, eram centrifugadas e filtradas, seguindo o mesmo procedimento realizado na adsorção, para posterior leitura dos analitos no espectrofotômetro UV-Vis (Figura 13).

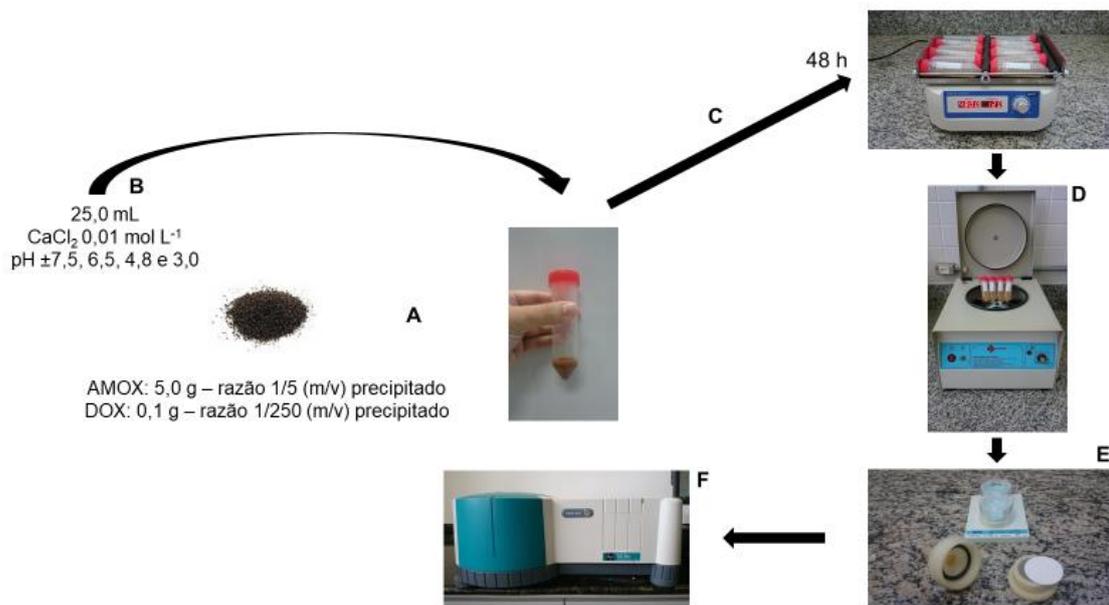


Figura 13 – Etapas da metodologia para o estudo dos processos de desorção dos antibióticos: (A) Preparo das amostras de solo remanescentes dos ensaios de adsorção; (B) Ressuspensão do material subsequente pela adição de 25,0 mL de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, com pH corrigido ou não aos tubos; (C) Agitação dos recipientes contendo as suspensões por 48 h; (D) Centrifugação dos tubos para separação do sobrenadante; (E) Coleta e filtragem dos sobrenadantes; (F) Leitura dos filtrados contendo os fármacos recém-recuperados no espectrofotômetro UV-Vis. Fonte: o autor (2018).

4.4.8 Estudo de atividade microbiana, biomassa e coeficiente metabólico

Inicialmente, coletou-se amostras de solo de um latossolo vermelho-amarelo, matriz-objeto do presente trabalho, a uma profundidade entre 0-10,0 cm, logo abaixo da camada de gramíneas que compunha o local da coleta. Em seguida, esse material foi peneirado em partículas de tamanho inferior a 2,0 mm e submetido à refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) para a manutenção da umidade correspondente ao momento da coleta; isto até o momento de sua utilização. É importante ressaltar que foi necessário processar essa amostra de solo recém-coletado imediatamente, para fins de determinação de umidade e posterior conservação a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Este ensaio consistiu em duas etapas, conforme metodologia proposta por Ferreira, Camargo e Vidor (1999): uma onde as amostras de solo não foram submetidas à irradiação por micro-ondas e outra, quando estas foram irradiadas. Para as amostras não irradiadas, pesaram-se diretamente 40,0 g deste material usando uma balança semi analítica Marte/Shimadzu modelo AS200C (Brasil/Japão) em frascos de vidro com capacidade para 1,0 L (Figura 14A), sendo três repetições para cada concentração, onde estas soluções correspondiam a 0,03, 0,3, 3,0, 30,0 e 300,0

mg L⁻¹ dos fármacos a que foram expostas. Um conjunto de três amostras de solo, além das que eram enriquecidas com os antibióticos, não foram contaminadas com os antimicrobianos, pois se tratavam da concentração 0,0 mg L⁻¹. Um controle também foi preparado em triplicata e o que o diferia das outras amostras é que os seus respectivos frascos de vidro não apresentavam as amostras de solo em seu interior.

Para cada concentração empregada, foram adicionados diretamente na amostra de solo presente no interior dos frascos 1,0 mL da solução que continha os antibióticos, salvo para a que correspondia a 0,0 mg L⁻¹, na qual se adicionava 1,0 mL de água deionizada, visando assim, manter as mesmas condições de umidade para todas as amostras não irradiadas (Figura 14B). Em seguida, um béquer de 50,0 mL de plástico (polipropileno) foi introduzido nos frascos de vidro e, no interior destes béqueres, foram adicionados 10,0 mL de uma solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ (Figura 14C), visando a captação do CO₂ liberado pela biomassa presente nas amostras de solo. A partir daí esses frascos foram fechados e lacrados usando fita adesiva transparente (Figura 14D).

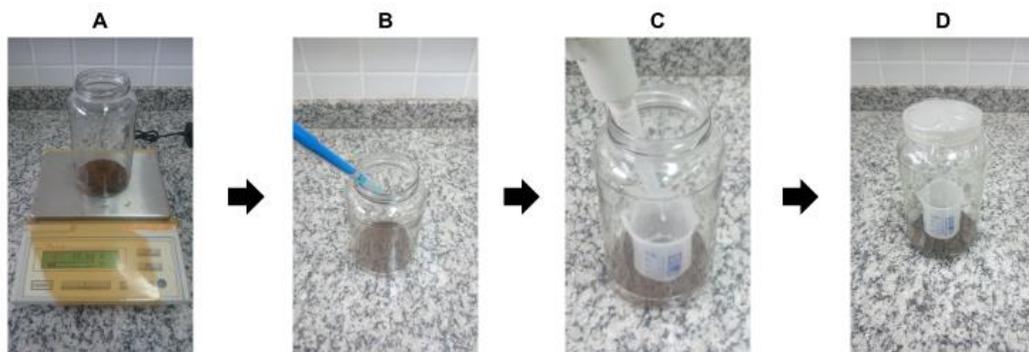


Figura 14 – Esquema apresentando as etapas do preparo das amostras não irradiadas para o ensaio de determinação de atividade e biomassa microbianas: (A) Pesagem das amostras de solo; (B) Adição dos líquidos (água deionizada ou solução com os antimicrobianos) no interior dos recipientes; (C) Preenchimento dos béqueres com NaOH 1,0 mol L⁻¹, (D) Vedação seguida de selagem dos frascos de vidro.

Fonte: o autor (2018).

Já para o preparo das amostras irradiadas, pesaram-se, primeiramente, na mesma balança, 40,0 g deste material em uma placa de Petri de massa conhecida (P_1) (Figura 15A) para, em seguida, submetê-la à radiação infravermelha máxima (2450 MHz) no interior de um micro-ondas LG intellowave modelo MS-115 ML (Brasil) por um período de 2 minutos (Figura 15B). Após esse procedimento, aguardava-se esse material chegar à temperatura ambiente para ser novamente pesado (P_2), visando assim, se obter o valor, em massa de água, que as amostras de solo perdiam com o processo de irradiação por micro-ondas (P_3). A partir desses resultados, foi possível calcular, por meio da Equação 11, de forma isolada, quanto em massa de água deveria novamente ser reintroduzido em cada amostra de solo, padronizando, assim, a umidade relativa de todas as amostras (irradiadas ou não) ao conduzir o ensaio.

$$P_1 + P_2 = P_3 \quad (11)$$

Onde:

P_1 – é o peso da placa de Petri (P_0) somado ao peso da amostra de solo (P_A)

P_2 – é o peso da placa de Petri com a amostra de solo após a fumigação

P_3 – é o peso de H_2O estimado, em gramas, que a amostra de solo perdeu

Como a densidade da água é $1,0 \text{ g/cm}^3$ a 25°C , a partir deste dado foi possível converter P_3 em volume e verificar aproximadamente quanto de água deveria ser adicionado em cada uma das amostras.

Após fazer o ajuste da umidade nos frascos de vidro (Figura 15C), foi necessário adicionar novamente aos mesmos 2,0 g de amostra de solo (Figura 15D), agora com a finalidade de inocular esse material que, teoricamente, deveria estar livre de organismos após a irradiação. A partir daí, foram seguidos os mesmos procedimentos aplicados anteriormente nas amostras não irradiadas quanto ao número de repetições, emprego de soluções de mesma concentração cujos fármacos estavam dissolvidos, utilização de três amostras não enriquecidas, à colocação dos béqueres no interior dos frascos de vidro, adição de $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ aos béqueres, à vedação dos recipientes e ao uso de três controles.

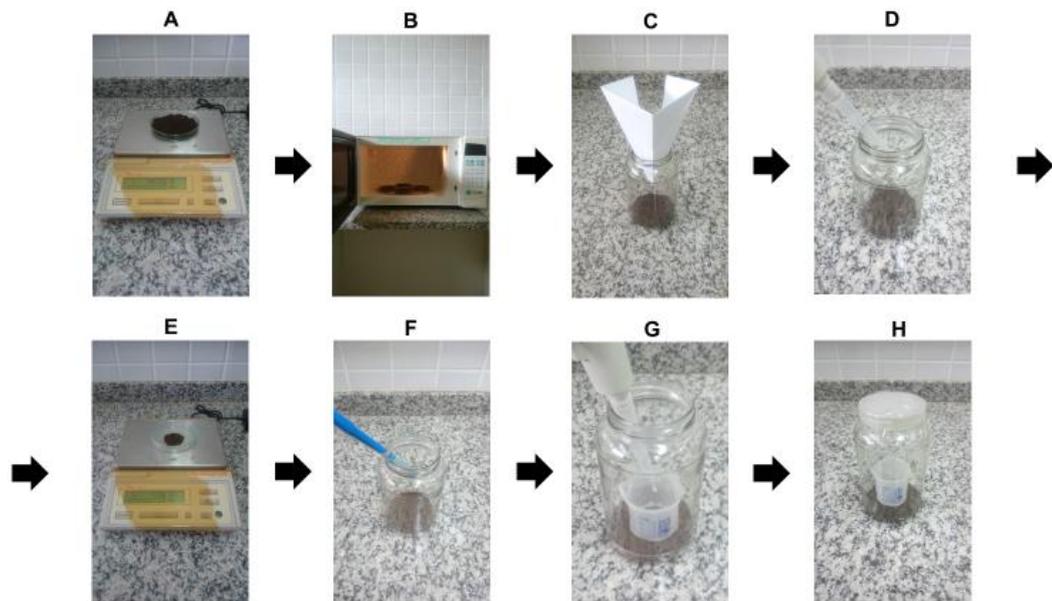


Figura 15 – Esquema apresentando as etapas do preparo das amostras irradiadas para o ensaio de determinação de atividade e biomassa microbianas: (A) Pesagem das amostras de solo; (B) Irradiação das amostras; (C) Transferência para os frascos de vidro; (D) Adição de água deionizada para correção do teor de umidade; (E) Pesagem para posterior inoculação das amostras de solo; (F) Adição dos líquidos (água deionizada ou solução com os antimicrobianos) no interior dos recipientes; (G) Preenchimento dos béqueres com NaOH 1,0 mol L⁻¹, (H) Vedação seguida de selagem dos frascos de vidro.

Fonte: o autor (2018).

Estando todos os frascos de vidro devidamente vedados (amostras de solo não irradiada, irradiada e controles), os mesmos foram levados a uma câmara incubadora Fanen modelo 347 CDG (Brasil), onde permaneceram, na ausência da luz, por um período de 10 dias a 28°C (Figura 16).



Figura 16 – Frascos de vidro condicionados para encubação.
Fonte: o autor (2018).

Passado esse intervalo para encubação, retiraram-se os recipientes e, em seguida, os seus respectivos béqueres (Figura 17A), anteriormente preenchidos com uma solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹; esses receberam 5,0 mL de uma solução de BaCl₂ 1,0 mol L⁻¹ (Figura 17B), com o objetivo de estabilizar o titulado e, ao final, adicionou-se uma gota de solução alcóolica de fenolftaleína 1% (Figura 17C), como indicador. A titulação foi realizada sob agitação, com o uso de um agitador magnético sem aquecimento Fisatom modelo 572 (Brasil) e utilizando uma bureta graduada de 10,0 mL preenchida com uma solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ padronizada (Figura 17D).

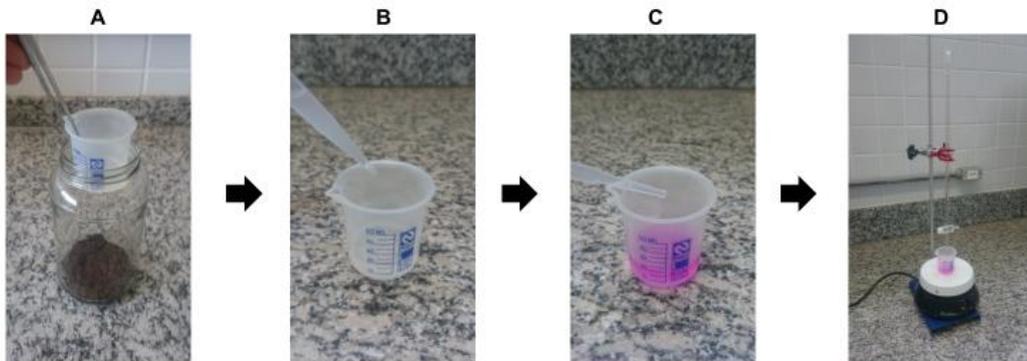


Figura 17 – (A) Retirada da câmara de germinação e remoção dos béqueres do interior dos frascos; (B) Adição de BaCl_2 aos béqueres contendo NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; (C) Posterior acréscimo de fenolftaleína; (D) Titulação com HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.
Fonte: o autor (2018).

A liberação de CO_2 retida na solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi calculada pela Equação 12 (STOTZKY, 1965), visando assim, determinar a atividade microbiana (que corresponde à respiração basal nas amostras não irradiadas e irradiadas).

$$mg \text{ CO}_2 = (B - V) \times M \times E \quad (12)$$

Onde:

B = o volume de HCl necessário para titular o excedente de NaOH da prova em branco;

V = o volume de HCl necessário para titular o excedente da amostra;

M = a molaridade do HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$;

E = o peso equivalente do carbono.

Chegou-se aos valores do carbono (C) presente na biomassa microbiana por meio da Equação 13, sendo que o C foi determinado após à relação C/CO_2 .

$$C_{mic} = \frac{C_I - C_{NI}}{K_C} = \mu g \text{ g}^{-1} \text{ de C no solo} \quad (13)$$

Onde:

C_{mic} = carbono presente na biomassa microbiana do solo;

C_I = carbono presente na amostra fumigada ou irradiada;

C_{NI} = carbono presente na amostra não fumigada ou não irradiada;

K_c = fator de conversão de 0,45 (DE-POLLI; GERRA, 1996).

E, finalizando os cálculos, o quociente metabólico (qCO_2) foi obtido por meio da Equação 14.

$$qCO_2 = \frac{mg\ CO_2}{C_{mic}} \quad (14)$$

Onde:

$mg\ CO_2$ = atividade microbiana;

C_{mic} = carbono da biomassa microbiana (FERREIRA; CAMARGO; VIDOR, 1999).

O delineamento experimental se deu, inicialmente, com os dados obtidos sendo submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) (SHAPIRO; WILK, 1965). Após essa avaliação, compararam-se as dosagens, para depois, seguir com a análise de regressão linear utilizando o *software* Past3® (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

4.4.9 Estudo de fitotoxicidade

Para a realização do estudo de fitotoxicidade, os experimentos foram conduzidos de duas formas: uma empregando como substrato o papel de filtro e outra utilizando amostras do mesmo latossolo vermelho-amarelo avaliado no decorrer de todo este estudo.

No primeiro ensaio, foram colocadas 25 sementes de feijão, discriminadamente, em placas de Petri de 90,0 mm com tampa, contendo em sua base uma folha de papel de filtro de mesmo tamanho (Figura 18A). Em seguida, adicionaram-se a essas placas 5,0 mL de cada solução que continha os antibióticos (Figura 18B), apresentando as seguintes concentrações para estes compostos: 0,03,

0,3, 3,0, 30,0 e 300,0 mg L⁻¹. Preparou-se, também, seguindo o mesmo procedimento, uma placa que correspondia ao controle negativo, porém para esta condição, desta vez as sementes não foram submetidas à contaminação com os fármacos, e sim, embebidas com 5,0 mL de água deionizada. Após a adição dos líquidos às placas, colocou-se uma nova folha de papel de filtro sobre as sementes (Figura 18C), antes de fechá-las para posterior germinação das mesmas (Figura 18D).

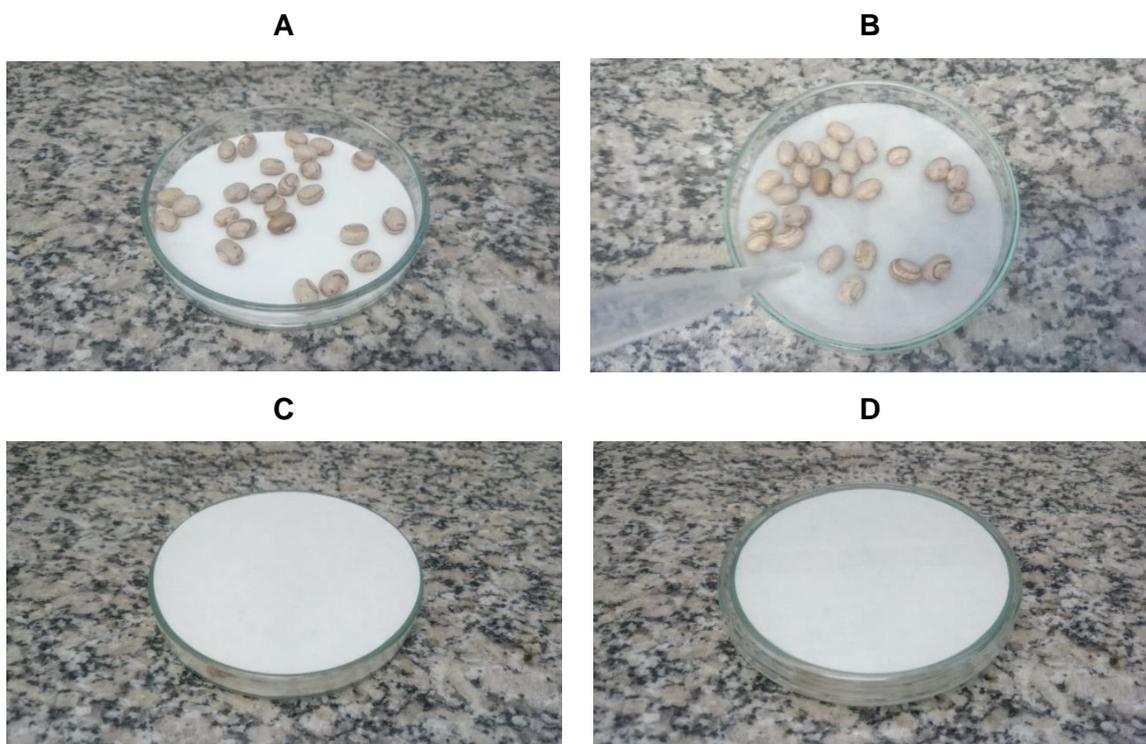


Figura 18 – Preparo das amostras de feijão usando como substrato papel de filtro: (A) Adição dos grãos de feijão à placa contendo o substrato; (B) Amostra sendo embebida com os líquidos (água deionizada ou solução contendo os fármacos); (C) Cobertura das sementes com o substrato; (D) Fechamento das placas para posterior germinação. Fonte: o autor (2018).

Feito isso, as placas foram mantidas em uma estufa tipo D.B.O. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) EletroLab modelo 101M/3 (Brasil) a 25°C ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) na ausência de luz, por um período de 168 h (equivalente a 7 dias) (Figura 19).



Figura 19 – Amostras condicionadas para germinação.
Fonte: o autor (2018).

Realizou-se o ensaio com 4 repetições para cada concentração, gerando um total de 100 sementes; além do controle negativo. No decorrer do experimento, devido à absorção/evaporação do líquido do substrato das placas, viu-se necessária à adição de pequenas porções de água deionizada (cerca de 2,5 mL) em intervalos de 24 h, visando a não interrupção do processo de germinação das sementes.

A porcentagem de germinação foi avaliada em períodos pré-determinados (48, 72, 96 e 168 h), onde se contou o número de sementes germinadas em cada parcela experimental, se mensurou o comprimento da radícula e se verificou alguns aspectos qualitativos, geralmente observados em um número significativo de sementes. Verificou-se que, após dois dias do início do experimento, a germinação ocorreu nas sementes para a espécie avaliada.

Inicialmente, submeteram-se as variáveis obtidas no teste de germinação ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) (SHAPIRO; WILK, 1965); já a análise de variância foi realizada com o uso do *software* SISVAR® 5.6 (FERREIRA, 2011). A comparação das médias pelo teste de Scott-Knott, a 95,0% do nível de confiança, foi utilizada para verificar a diferença entre os tratamentos para as características testadas. O delineamento (DIC) foi inteiramente casualizado (SCOTT; KNOTT, 1974).

No ensaio seguinte, houve a necessidade de realização das atividades em um ambiente externo, fora do Laboratório de Qualidade da Água da UNIFEI, onde as análises anteriormente descritas foram realizadas. Sendo assim, o local escolhido foi a Casa de Vegetação dessa mesma Universidade, pois esse recinto apresentava as

condições necessárias para dar seguimento aos experimentos de forma adequada e segura.

Ao todo, 5 sementes de feijão-carioca foram depositadas separadamente em potes de plástico retangulares (descartáveis), com dimensões 21,2 x 15,0 x 5,0 cm, contendo amostras de solo provenientes do horizonte A devidamente peneirado em partículas de tamanho inferior a 2,0 mm (Figura 20A). Prepararam-se 4 repetições, totalizando 20 sementes por tratamento e um controle negativo, sob as mesmas condições; adicionando-se 25,0 mL das soluções que continham os antimicrobianos nos potes correspondentes as repetições e apenas água deionizada no controle (Figura 20B). As concentrações empregadas foram mantidas equivalendo as diluições das soluções utilizadas nos ensaios com as placas de Petri, que se utilizou o papel de filtro como substrato, detalhadamente descritas no ensaio anterior. Em seguida, recobriram-se as sementes com o substrato (Figura 20C) e acomodaram-se os potes em bancadas metálicas de tela ondulada, próprias para esse tipo de ensaio, onde foram irrigados a cada 24 h para manter o solo sempre úmido e adequado para a germinação e crescimento das plantas. (Figura 20D).

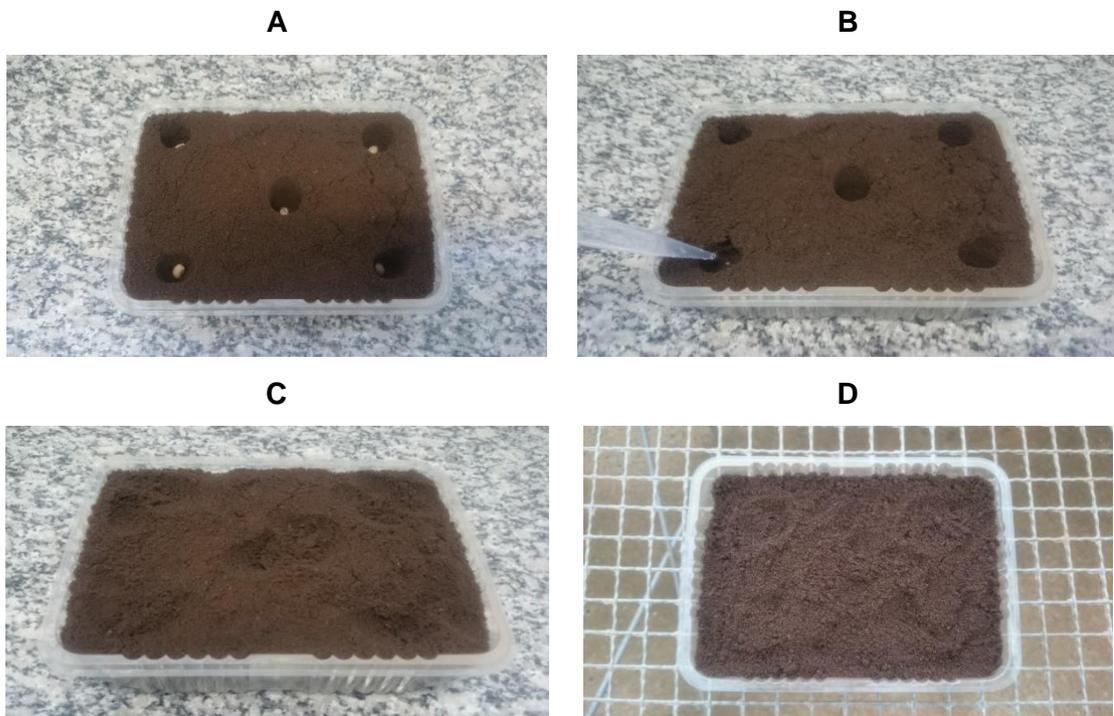


Figura 20 – Preparo das amostras de feijão usando como substrato o solo: (A) Adição dos grãos de feijão aos potes previamente preenchidos com solo; (B) Amostra sendo embebida com os líquidos (água deionizada ou solução contendo os fármacos); (C) Cobertura das sementes com o solo; (D) Acomodação dos potes nas bancadas metálicas de tela ondulada. Fonte: o autor (2018).

Esse experimento teve como objetivo verificar os estágios de crescimento e desenvolvimento posteriores à germinação das sementes. Por esse motivo, além de se verificar a porcentagem de germinação, a altura do caule, o número de folhas e a largura das mesmas também foram avaliadas. Tomou-se nota de alguns outros aspectos qualitativos, quando observados em um número significativo de plantas. Avaliaram-se todos os parâmetros em cinco dias diferentes, 7º, 8º, 10º, 13º e 15º dia, sendo que este ensaio teve duração total de 20 dias.

Como empregado anteriormente no tratamento estatístico da análise anterior, os dados obtidos foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Seguiu-se com a análise de variância com o uso do *software* SISVAR® 5.6 (FERREIRA, 2011) e, a fim de se verificar a diferença entre os tratamentos para as características testadas, foi realizada a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott a 95,0% do nível de confiança.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do solo

As amostras de solo utilizadas neste estudo são provenientes da sub-bacia hidrográfica do Ribeirão José Pereira, na cidade de Itajubá, Estado de Minas Gerais. Esse material foi coletado em uma área que, anteriormente, era utilizada como pasto, composto basicamente por gramíneas e pequenos arbustos, mas que, nos últimos meses, vinha sendo utilizada como área de empréstimo, estando muito escavada, com vários pontos apresentando solo exposto, compactado e erodido. Devido à constante retirada e movimentação de material, além do deslocamento de veículos pesados, era um local que vinha sendo constantemente modificado. Por esse motivo, houve critério na escolha da melhor localização para a amostragem, tendo o cuidado para selecionar uma região que não foi tão afetada pelas modificações constantes que a paisagem local recentemente havia sofrendo.

A Tabela 4 apresenta os resultados das análises físicas, enquanto que na Tabela 5, são apresentados os valores de sua caracterização química.

Tabela 4 – Atributos físicos do solo utilizado

Horizonte	Cor úmida	Umidade (%)	Textura (%)		
			Argila	Areia	Silte
A	7.5YR 2.5/2	25,0 ± 0,2	54,0 ± 0,9	34,6 ± 0,4	11,4 ± 1,1
B	5YR 5/8	23,4 ± 0,1	43,4 ± 0,8	31,6 ± 0,9	25,0 ± 1,0

Fonte: o autor (2018).

Tabela 5 – Atributos químicos do solo

Atributos	Teor no solo	
	Horizonte A	Horizonte B
pH (KCl)	3,94	5,24
pH	4,50	5,20
K (mg/dm ³)	7,23	4,77
P (mg/dm ³)	1,07	1,01
Ca (cmolc/dm ³)	0,17	0,17
Mg (cmolc/dm ³)	0,10	0,10
Al (cmolc/dm ³)	1,77	0,06
H + Al (cmolc/dm ³)	12,01	1,59
Soma de Bases Trocáveis (cmolc/dm ³)	0,29	0,28
Capacidade de Troca Catiônica Efetiva (cmolc/dm ³)	2,06	0,34
Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0 (cmolc/dm ³)	12,30	1,87
Índice de Saturação de Bases (%)	2,35	15,09
Índice de Saturação de Alumínio (%)	85,92	17,65
Matéria Orgânica (dag/kg)	2,14	0,08
Fósforo Remanescente (mg/L)	14,38	17,06
Argilas/Óxidos (valores aproximados) (%)*	Caulinita:	Caulinita:
	≈ 98,00%	≈ 95,00%
	Goethita:	Goethita:
	≈ 2,00%	≈ 3,00%
	Gibbsita:	≈ 2,00%

Fonte: o autor e adaptado dos laboratórios da Universidade Federal de Lavras e do Departamento de Edafología y Química Agrícola da Facultad de Ciencias da Universidad de Granada (Espanha)* (2018).

Analisando os resultados descritos na Tabela 4, referentes às análises físicas das amostras de solo, de acordo com o diagrama do nome de cor do solo, presente na carta de Munsell e utilizada para a análise de cor úmida das amostras, o horizonte A corresponde a uma amostra de coloração bruno muito escura (7.5YR 2.5/2) e o horizonte B trata-se de uma amostra de coloração vermelho-amarelada (5YR 5/8) (SANTOS *et al.*, 2005).

Tomando como base o horizonte B, que é o tipo de horizonte diagnóstico subsuperficial que caracteriza e classifica os solos latossólicos, esse latossolo vermelho-amarelo apresenta cor de matiz 5YR, valor 5 e croma 8. Esses componentes

(o matiz, presente em solos vermelhos ou amarelos, o valor, definição de tonalidade – claro ou escuro – e o croma, indicador de intensidade ou brilho) estão relacionados indiretamente à presença de determinados compostos, orgânicos e inorgânicos, resultantes de processos pedogenéticos ou propriedades importantes, do ponto de vista pedológico e agrônômico, além de ser a forma como um observador enxerga a cor de uma amostra de solo. Partindo dessas informações, o material refere-se a um solo de coloração variante, por uma mistura ou combinação de cores entre o vermelho e o amarelo, é relativamente claro e apresenta intensidade ou brilho elevados (KER *et al.*, 2015).

Os latossolos são os solos de maior representação geográfica no Brasil, ocupando cerca de 300 milhões de hectares, o que corresponde a cerca de um quarto dos latossolos do mundo. No Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos (SiBCS), eles estão divididos em quatro subordens: latossolo bruno, amarelo, vermelho-amarelo e vermelho. Os latossolos vermelho-amarelos são encontrados em muitas áreas antes ocupadas pela Mata Atlântica, bioma brasileiro que abrange geograficamente a região Sul do Estado de Minas Gerais, condizente à localização correspondente à área onde as amostras do solo estudado foram coletadas (LEPSCH, 2011; COELHO; ROSSI; MATTOS, 2017).

Com relação à umidade encontrada nos dois horizontes, os valores estão muito próximos, 25% para o horizonte A e 23,4% para o horizonte B; com variação menor que 2%. Brady e Weil (2013) descreveram que para que ocorra uma ótima condição de crescimento para a maioria das plantas, o espaço poroso do solo – local onde ar e água circulam, as raízes crescem e os serem microscópicos vivem – uma proporção quase igual de ar e água geralmente é a ideal, variando entre 20-30% para ambos, levando em conta que as proporções desses dois componentes diversifiquem, a medida em que um solo se torna mais úmido ou seco. Analisando pela ótica desses autores, é um solo que apresenta boas condições de umidade, entretanto outros fatores como capacidade de campo (CC), ponto de murcha permanente (PMP) e água disponível (AD), parâmetros importantes quando se pretende avaliar as melhores condições para o crescimento de plantas, aqui se estendem e, por esse motivo, não serão discutidos.

A determinação da classe textural das amostras de solo que correspondem aos horizontes A e B foi feita considerando o diagrama triangular generalizado ou simplificado (Figura 21) (EMBRAPA, 2018a). Levando em conta as porcentagens de

areia, silte e argila, tanto o horizonte A quanto o horizonte B deste latossolo representam, por meio deste diagrama, a horizontes de um solo de textura argilosa.

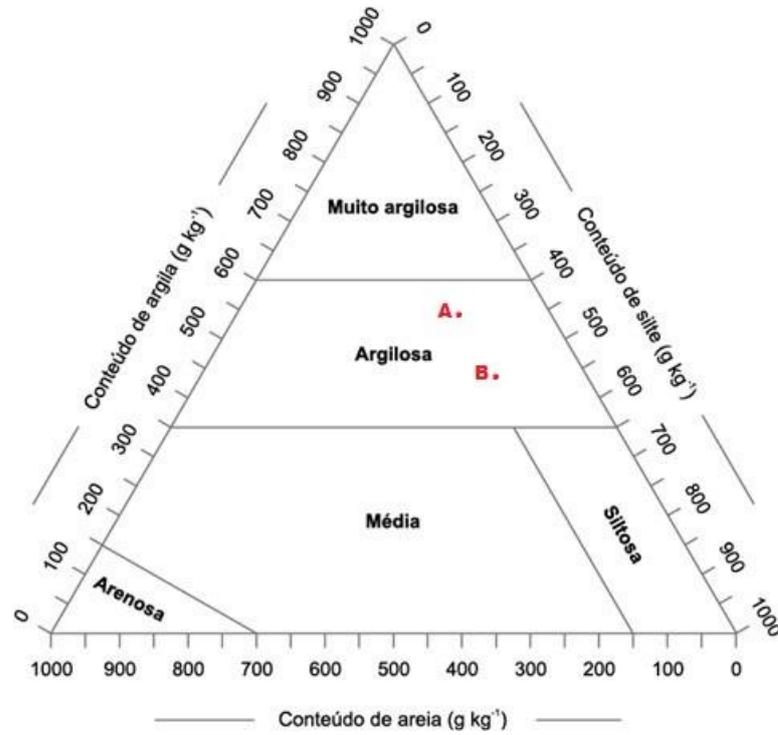


Figura 21 – Guia para agrupamento de classes de textura. Os pontos acompanhados das letras em vermelho correspondem à localização do horizonte A (A) e horizonte B (B) no diagrama triangular simplificado. A notação (g kg^{-1}) neste diagrama são equivalentes, após transformação, às porcentagens (%) das frações areia, argila e silte das amostras de solo. Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2018a).

Para discussão das informações adquiridas, por meio das análises laboratoriais dos atributos químicos relacionados às condições de fertilidade, no que diz respeito aos dois horizontes desse solo, utilizou-se como referência os dados fornecidos pelo Manual Internacional de Fertilidade do Solo da Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (1998), onde foi possível verificar as condições de fertilidade para interpretação de análise de solos em uso nos laboratórios situados no Estado de Minas Gerais. Os níveis em que esses atributos estão disponíveis são demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Níveis de disponibilidade dos atributos químicos no latossolo avaliado

Atributos	Teor no solo	
	Horizonte A	Horizonte B
pH (KCl)	Fortemente ácido	Moderadamente ácido
pH	Fortemente ácido	Moderadamente ácido
K Disponível	Baixo	Baixo
P Disponível (Solo Argiloso)	Baixo	Baixo
Ca Trocável	Baixo	Baixo
Mg Trocável	Baixo	Baixo
Al Trocável (Acidez Trocável)	Alto	Baixo
H + Al (Acidez Potencial)	Alto	Baixo
Soma de Bases Trocáveis	Baixo	Baixo
Capacidade de Troca Catiônica Efetiva	Baixo	Baixo
Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0	Alto	Baixo
Índice de Saturação de Bases	Muito baixo	Muito baixo
Índice de Saturação de Alumínio	Muito alto	Baixo
Matéria Orgânica	Médio	Baixo

Fonte: o autor e adaptado do Manual Internacional de Fertilidade do Solo da Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (1998).

A partir dos dados obtidos por meio das análises químicas, é possível verificar que o latossolo em questão apresenta um pH baixo, de condição fortemente ácida nos dois horizontes avaliados. Levando em conta aspectos agronômicos de classificação quanto à acidez, é um pH inadequado para uma boa parcela de culturas, sendo passível de correções ou ajustes para faixas mais altas quando for empregado para práticas agrícolas (EMBRAPA, 2000).

Quanto à concentração de macronutrientes essenciais ao crescimento de plantas, as amostras demonstraram baixos níveis de disponibilidade para estes atributos. Isso é uma característica comum dos latossolos pois, por se tratarem de solos muito intemperizados, podem apresentar pequena disponibilidade de nutrientes essenciais para as plantas. São solos que, normalmente, possuem grandes problemas de fertilidade (EMBRAPA, 2018b).

Com relação aos níveis de alumínio trocável (acidez trocável), o horizonte A apresenta alta quantidade, provavelmente por conta da presença de matéria orgânica que tende a reter sua forma presente no solo, o sexidróxido de alumínio – um composto formado por um átomo de alumínio cercado por seis hidroxilas –, enquanto

que no horizonte B a baixa quantidade de matéria orgânica desfavorece a sua retenção nesta camada, implicando em níveis mais baixos de alumínio trocável. O sexidróxido de alumínio, ao sofrer hidrólise, tende a baixar o pH do solo, pois libera íons Al^{3+} , que são altamente reativos, principalmente, separando moléculas de H_2O em H^+ e OH^- . Esse íon alumínio tende a se combinar, novamente, com o OH^- liberando H^+ , podendo elevar ainda mais a acidez não trocável; e o Al^{3+} , a espécie tóxica do alumínio, que é um cátion trocável nesta forma, para efeito de fertilidade do solo, é conveniente apresentar valores muito baixos, próximos de zero (EMBRAPA, 2010a; BRADY; WEIL, 2013; EMBRAPA, 2017).

A acidez potencial ($\text{H} + \text{Al}$) tem relação direta com os níveis de alumínio trocável, uma vez que se trata do próprio potencial que este elemento tem de acidificar os solos durante a sua hidrólise. Ela é caracterizada pela soma da acidez trocável (referente aos íons H^+ e Al^{3+} que estão retidos na superfície coloidal por forças eletrostáticas) com a acidez não trocável, que corresponde àquela acidez neutralizada até um certo valor de pH. A acidez não trocável é representada pelo hidrogênio de ligação covalente, que está associado aos coloides com carga negativa variável e aos compostos de alumínio. A acidez potencial caracteriza o poder tampão de acidez do solo e sua estimativa é muito importante para se fazer uma estimativa da capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (CTC). Como esse solo tem um nível alto de alumínio no horizonte A, conseqüentemente terá uma alta acidez potencial, o contrário acontecendo com o horizonte B, que não possui níveis elevados de alumínio trocável, implicando, assim, em uma baixa acidez potencial (EMBRAPA, 2010a; EMBRAPA, 2017).

Os latossolos, por se tratarem de solos que passaram por um acentuado processo de intemperismo, tendem a possuir baixos níveis de sílica (SiO_2) e bases trocáveis (em particular Ca, Mg e K) devido à remoção por lixiviação, fazendo que a soma dessas bases, no geral, seja baixa (EMBRAPA, 2018b).

A principal característica química dos solos altamente intemperizados é a baixa retenção de cátions. A capacidade dos solos de reter íons por atração eletrostática depende das cargas na superfície das argilas e da matéria orgânica. Este complexo traz na sua superfície cargas positivas e negativas, permanentes ou não, evidenciadas pela sua capacidade de retenção de ânions e cátions, respectivamente (ALLEONI *et al.*, 2016). A CTC ou capacidade de troca de cátions de um solo, de uma argila ou do húmus é um parâmetro que representa a quantidade total de cátions retidos à

superfície desses materiais em condição permutável ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^+ + \text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$) (EMBRAPA, 2010b). Devido à fração argila desse solo ser composta, basicamente, por um argilomineral de baixa atividade, como a caulinita, e óxidos de ferro (goethita) e alumínio (gibbsita), isso reflete na sua CTC total e efetiva, que acaba seguindo a mesma tendência, apresentando o mesmo comportamento químico.

De acordo com Ker *et al.* (2015), sendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e Na^+ nutrientes e Al^{3+} um elemento tóxico para as plantas, o percentual de saturação por bases pode ser usado como um indicador genérico da fertilidade do solo. Levando em conta a classificação do Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2006) e o Índice de Saturação por Bases, fornecido pela análise laboratorial desse material estar indicando que o nível deste atributo está muito baixo, poderia se afirmar que o solo estudado trata-se de um latossolo distrófico, ou seja, devido a sua baixa fertilidade, é um solo que recomenda a avaliação de uma provável necessidade de adubação visando o uso agrícola (EMBRAPA, 2018c).

O alumínio na forma Al^{3+} é o elemento tóxico que predomina em solos ácidos e sua concentração na solução do solo é tamponada pelo alumínio trocável. Por esse motivo, o percentual de saturação por alumínio é um índice válido quando se pretende estimar a toxidez por este íon para as plantas (KER *et al.*, 2015). Observando os dados fornecidos pela Tabela 5, é possível verificar que o horizonte A apresentou um nível muito alto para esse índice, enquanto que o horizonte B não seguiu a mesma tendência. Entretanto, em termos de fertilidade do solo e nutrição de plantas, no horizonte A é que ocorre a maior parte da absorção de nutrientes, devido ao grande acúmulo de raízes e predominância de organismos (BRADY; WEIL, 2013). De acordo com Ker *et al.* (2015), o alto percentual de saturação por alumínio presente no complexo sortivo é passível de preocupação, dependendo do clima e da sensibilidade de determinada cultura, podendo ser um problema, caso em algum momento, tenha-se o intuito ou a necessidade do manejo no local de predomínio desse tipo de latossolo.

No que diz respeito aos teores de matéria orgânica obtidos para os dois horizontes, é possível verificar uma desproporção considerável. Na amostra de solo referente ao horizonte A o teor de matéria orgânica é classificado como médio, enquanto que no horizonte B esse índice é considerado baixo. Essa diferença tem relação direta com a vegetação de cobertura e maior presença de organismos nas porções superiores desse solo. Como o horizonte A é a camada onde ocorre a

deposição de materiais de origem animal e vegetal – que ali se decompõem –, o local de maior predominância de raízes das plantas e o habitat de maior prevalência de organismos vivos, certamente terá uma maior influência desses agentes sobre sua composição química. Logo, é esperado que esses valores tenham diferenças significativas (LEPSCH, 2011). A notação desse índice se faz importante, principalmente como indicador de qualidade do solo, pois por meio dele é possível avaliar aspectos físicos, como textura e composição de agregados; químicos, como presença ou ausência de nutrientes; e biológicos, como a influência e predominância de organismos (DICK *et al.*, 2016).

Em relação ao fósforo remanescente (P_{rem}) fornecida pelas análises desse solo, os valores se mantiveram muito baixos, seguindo a mesma tendência observada para os níveis de fósforo disponível obtidos para os dois horizontes, que apresentou baixos teores. Isso acontece devido à grande capacidade de adsorção desse elemento pelos óxidos, muito presentes nos latossolos (LEPSCH, 2011). Pode-se concluir assim que esse Latossolo Vermelho-amarelo, tomando como referência os valores de P_{rem} , possui uma baixa disponibilidade de fósforo (EMBRAPA, 2000).

De acordo com a Tabela 5, se referindo aos minerais encontrados na fração argila das amostras desse solo, foi constatada a presença de dois compostos no horizonte A: caulinita e goethita; e três no horizonte B: caulinita, goethita e gibbsita.

Os difratogramas obtidos com as análises por DRX dos dois horizontes e, posteriormente, encaminhados pelo laboratório de apoio espanhol, são demonstrados nas Figuras 22 e 23.

Horizonte A

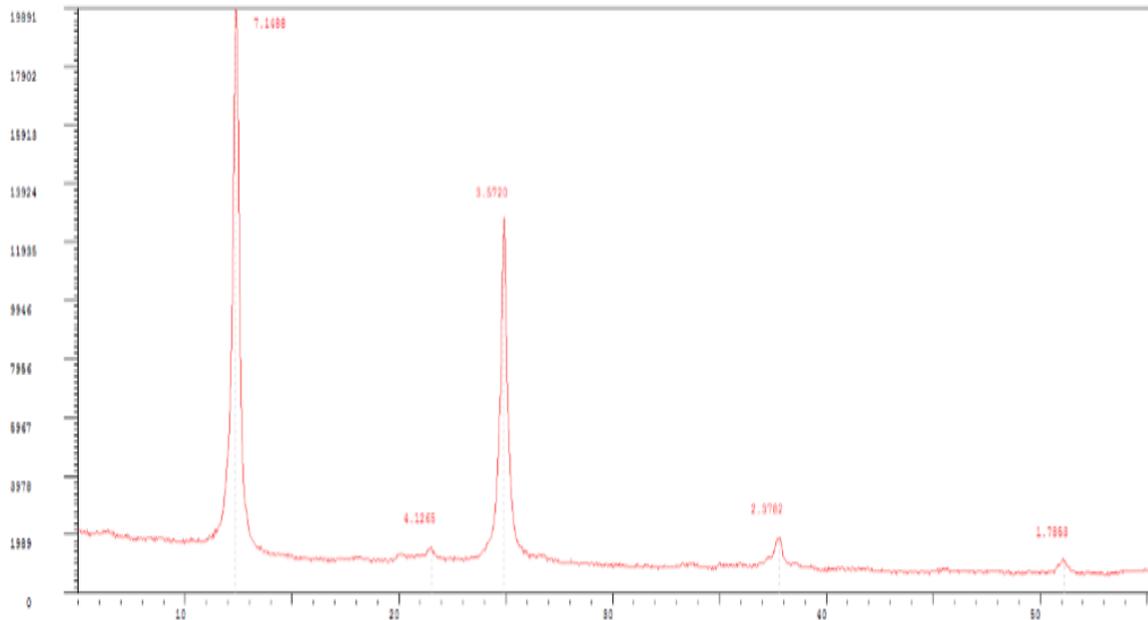


Figura 22 – Difratoograma apresentando os picos referentes aos compostos caulinita e goethita, presentes na fração argila correspondente ao horizonte A.

Fonte: *Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada* (Espanha) (2018).

Horizonte B

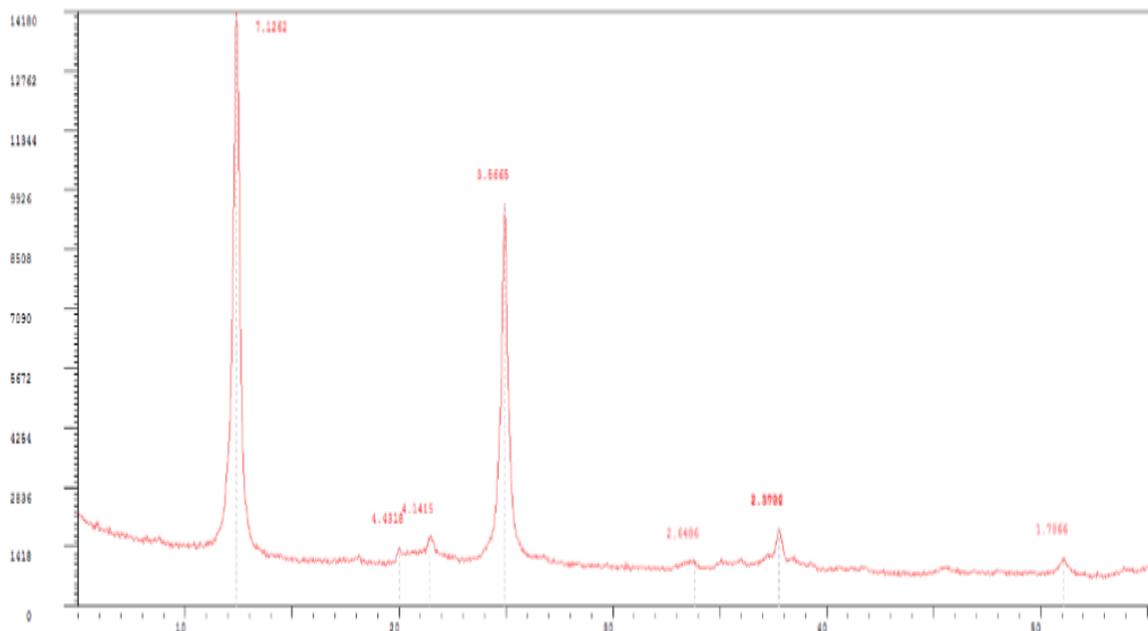


Figura 23 – Difratoograma apresentando os picos referentes aos compostos caulinita, goethita e gibbsita, presentes na fração argila correspondente ao horizonte B.

Fonte: *Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada* (Espanha) (2018).

Analisando inicialmente a Figura 22, que apresenta o difratograma com os picos e suas respectivas distâncias interplanares (Å) geradas pelos compostos presentes no horizonte A, é possível identificar a predominância de caulinita que produziu quatro picos, sendo um de intensidade máxima na posição 7.1 (001), seguido de outro pico secundário em aproximadamente 3.6, um terciário em aproximadamente 2.4 e outro quaternário em aproximadamente 1.8. Neste horizonte também foi identificada a presença de goethita em quantidades menores na posição 4.1 (ALBERS *et al.*, 2002).

A Figura 23 apresenta o difratograma correspondente aos compostos identificados no horizonte B, onde é possível observar também a dominância neste horizonte por caulinita, seguindo a mesma tendência avaliada na análise mineralógica do horizonte A, apresentando um pico de intensidade máxima na posição 7.1 (001), um secundário em 3.6, um terciário em 2.4 e outro quaternário em 1.8. Identificou-se, novamente, a presença de goethita na posição 4.1 – só que em maior quantidade que no horizonte A – e gibbsita em 4.4, também em quantidades menores, como se verificou com a goethita em relação à caulinita em ambos os horizontes analisados.

Os latossolos, por terem sido intensamente intemperizados, apresentam na fração areia a predominância de quartzo e, na argila, caulinita revestida por quantidades variáveis de óxidos de ferro e/ou alumínio (produtos residuais menos solúveis de intenso intemperismo) (LEPSCH, 2011).

A caulinita, cuja fórmula molecular corresponde a $Al_2Si_2O_5(OH)_4$, é um argilomineral silicatado bem cristalizado, de coloração branca e brilho terroso, muito utilizada como mineral de rocha e pela indústria de cerâmica (TEIXEIRA *et al.*, 2009). A alta frequência da ocorrência de caulinita nos solos deve-se, em parte, à possibilidade da sua formação a partir de muitos minerais diferentes, desde que haja remoção parcial de cátions básicos e de sílica. O processo de dessilicação parcial, dominante nas regiões de clima quente e úmido, favorece sua formação e estabilidade nos solos. Por essa razão, é o argilomineral mais abundante e comum nos solos brasileiros, ocorrendo praticamente em todas as classes de solos (KER *et al.*, 2015).

A goethita, α -FeOOH, um oxihidróxido de ferro, e a gibbsita, γ -Al(OH)₃, um oxihidróxido de alumínio, são óxidos que apresentam estruturas cristalinas bem definidas, ocorrendo na forma amorfa e, frequentemente, recobrimo boa parte das partículas do solo. São encontrados em muitos solos, mas são especialmente importantes nos solos altamente intemperizados das regiões tropicais quentes e

úmidas, onde ocorrem os latossolos (BRADY; WEIL, 2013; KER *et al.*, 2015). Ambos os óxidos são minerais de minério comumente utilizados como fontes de elementos químicos, sendo neste caso o ferro e o alumínio os de interesse pela indústria siderúrgica ou de transformação mineral, respectivamente (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Por serem compostos relativamente abundantes nesse tipo de solo, exercem considerável influência na disponibilidade de alguns elementos como o fósforo e na retenção de outros, como compostos que apresentam carga elétrica negativa (LEPSCH, 2011).

A técnica que foi utilizada para identificação dos compostos da fração argila, identificados nas amostras de solo estudadas, é uma ferramenta analítica que fornece, de forma robusta, apenas resultados semi-quantitativos destes sólidos, podendo apenas estimar os valores obtidos, em termos de porcentagem, por meio de uma interpretação criteriosa dos difratogramas pelo laboratório responsável pelas análises. Levando isso em conta, os teores que foram apresentados na Tabela 5 são porcentagens estimadas desses minerais nos horizontes e não valores absolutos desses materiais nesse solo.

5.2 Métodos analíticos

A escolha e o emprego da espectrofotometria por absorção molecular para a análise da AMOX e da DOX se deu devido à boa seletividade que a mesma apresenta, sua facilidade operacional e, também, ao seu baixo custo em relação a outras técnicas utilizadas na identificação e quantificação de fármacos.

Com o intuito de se obter o comprimento de onda onde ocorre a absorção máxima dos fármacos avaliados, foram realizadas varreduras de 200-800 nm na região UV-Vis do espectrofotômetro, empregando-se soluções-padrão em separado de cada analito na concentração de 15,0 mg L⁻¹. A Figura 24 apresenta os espectros de absorbância para a AMOX e a DOX.

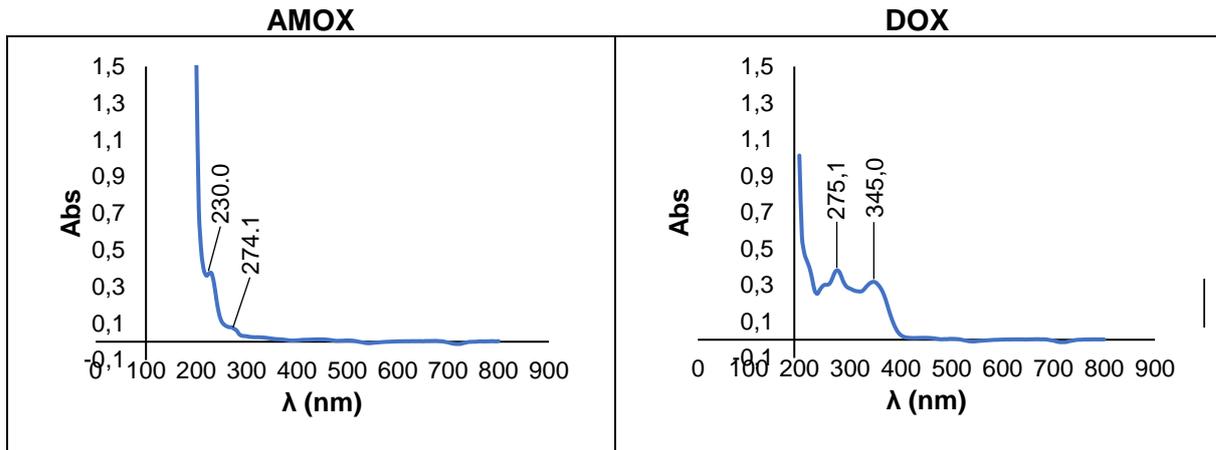


Figura 24 – Espectros de absorvância da AMOX e da DOX na região de 200-800 nm do UV-VIS. Fonte: o autor (2018).

A Figura 24 demonstrou a presença de dois picos no espectro correspondente à AMOX, onde a absorvância máxima ocorreu em 230,0 nm, estando em conformidade com a *United States Pharmacopeia* (USP 40) no que diz respeito à utilização de detectores UV-Vis na análise deste fármaco. Quanto ao espectro que corresponde à DOX, a presença de picos ocorreu em 275,1 e 345,0 nm, sendo que a absorção máxima para este composto se dá em 275,1, também em conformidade com a USP 40, no que diz respeito aos mesmos parâmetros analíticos utilizados na análise da AMOX.

Após a verificação dos melhores comprimentos de onda para absorção dos fármacos, foram realizadas varreduras na mesma região do UV-Vis, porém em diferentes condições (pontos) de acidez (pH), pontos estes que abrangeriam a faixa de pH que seria estudada nas análises seguintes. O propósito dessas análises seria estar em concordância, de certa forma, com a realidade dos solos brasileiros, que costumam ser ácidos em sua grande maioria (Ker *et al.*, 2015).

Visou-se, assim, investigar se o comprimento de onda variava nos três pontos de acidez que compõem este estudo, sendo um extremamente ácido (pH 3,0), simulando uma provável acidificação deste tipo de solo por eventual chuva ácida, um muito ácido (pH 4,8) (KER *et al.*, 2015), que é uma faixa que reflete, na maioria das vezes, as condições de acidez comuns em alguns latossolos do sul do Estado de Minas Gerais e, por último, um pH ligeiramente ácido, que poderia representar alguns solos submetidos a correções de acidez (pH 6,5), correções estas comuns e, por vezes, necessárias para a prática da agricultura.

Entretanto, após realizadas essas varreduras, não foram observadas variações significativas ao ponto de ajustes terem sido feitos e, sendo assim, foram mantidos os comprimentos de onda de absorção máxima, anteriormente obtidos.

Essas varreduras também se sucederam com os extratos aquosos filtrados de amostras de solo (horizontes A e B) em solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, com a finalidade de se averiguar a presença de interferentes no mesmo local de absorbância dos compostos analisados, verificando se ocorreriam mudanças significativas ou deslocamentos que poderiam exercer alguma influência no ponto da região de varredura onde ocorreu a absorção máxima.

A Figura 25 mostra os espectros de absorbância obtidos para a AMOX e para a DOX em relação aos horizontes estudados neste tipo de solo.

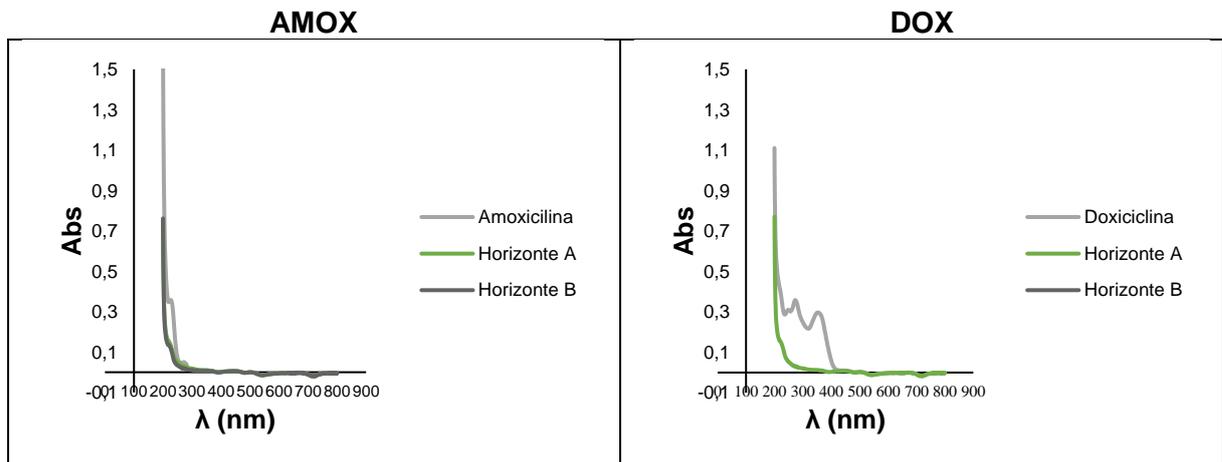


Figura 25 – Espectros de absorbância da AMOX e da DOX na região de 200-800 nm do UV-Vis em relação aos horizontes A e B.

Fonte: o autor (2018).

Como é possível observar na Figura 25, na análise da AMOX, ao que parece, foram visualizados picos próximos ao comprimento de onda de absorção máxima, porém o equipamento não chegou a reconhecê-los e identificá-los como algo que absorva a luz naquela região do espectro ultravioleta. No espectro correspondente à DOX, não é observado nenhum pico próximo ao comprimento de onda de absorção máxima. Logo, os dois horizontes avaliados em relação aos analitos, por meio desta técnica, não possuem interferentes na identificação e quantificação dos fármacos estudados.

5.3 As curvas de calibração

A partir dos dados obtidos e analisando os espectros dos dois fármacos nas diferentes condições em que estiveram submetidos, foram construídas as curvas de calibração utilizadas durante todo o estudo seguinte. As curvas de calibração para os fármacos AMOX e DOX encontram-se na Figura 26, respectivamente.

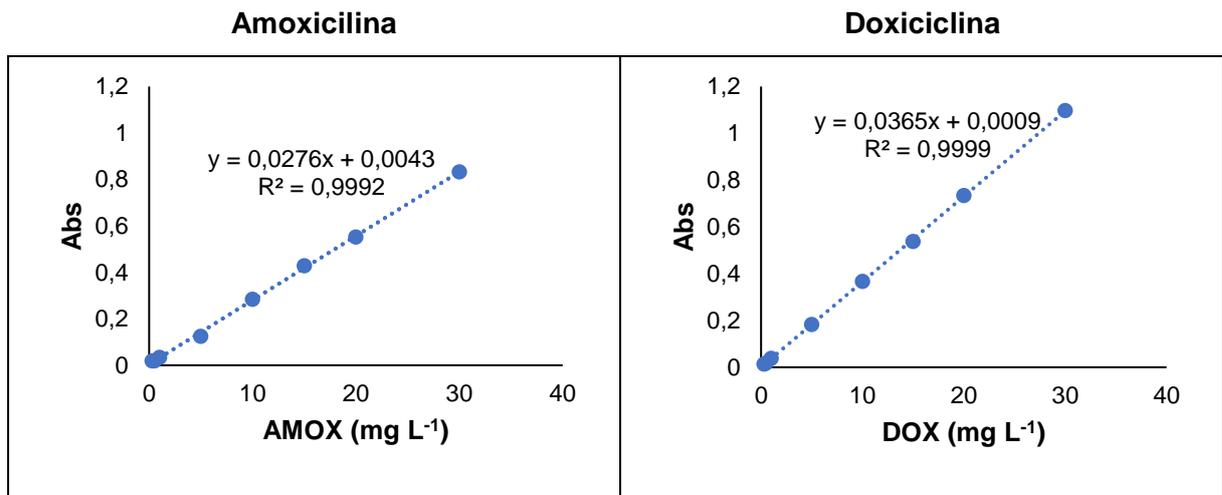


Figura 26 – Curvas de calibração da AMOX e da DOX em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹.
Fonte: o autor (2018).

Como mostrado na Figura 26, o valor de R^2 , para cada curva construída, foi superior a 0,99. O coeficiente de correlação, também chamado de “r” quadrado (R^2), que pode ser calculado a partir de pontos experimentais por um método matemático conhecido como regressão linear, trata-se de um dos coeficientes de regressão, como o “a” (coeficiente angular) e o “b” (coeficiente linear). A utilização desse parâmetro permite fazer uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados, como o coeficiente linear e o angular (CUSTODIO; ANDRADE; AUGUSTO, 1997; CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda, quando utilizados, coeficientes angulares, significativamente, diferentes de zero e, de correlação, superiores a 0,990 (ANVISA, 2018b).

Na Tabela 7, são encontrados os valores para o Limite de Quantificação (LQ) e o Limite de Detecção (LD) para ambos os métodos analíticos.

Tabela 7 – Valores obtidos para as curvas de calibração em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

Fármaco	Faixa linear (mg L^{-1})	LD (mg L^{-1})	LQ (mg L^{-1})
Amoxicilina	0,3 a 30,0	0,01	0,04
Doxiciclina	0,3 a 30,0	0,02	0,08

Fonte: o autor (2018).

Como apresentado na Tabela 7, para cada curva de calibração, foi calculado um Limite de Detecção (LD) e um Limite de Quantificação (LQ), com o objetivo de validar a metodologia aplicada no presente trabalho. O LD reflete a menor concentração do composto em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental; sendo esse parâmetro calculado de três maneiras diferentes: pelo método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. O LQ, entretanto, corresponde à menor concentração do composto examinado que pode ser mensurada, empregando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004).

Para se chegar aos valores encontrados na Tabela 7, foram empregadas as equações 9 e 10 (**item 4.4.1**) para os respectivos cálculos destes limites analíticos. O método aqui adotado foi o baseado em parâmetros da curva analítica, por se tratar do mais confiável, estatisticamente, de acordo com Ribani *et al.* (2004); e todos os valores de concentração obtidos com os ensaios realizados estiveram contidos nas curvas construídas para os dois antimicrobianos estudados.

5.4 Estudos de estabilidade

O estudo da estabilidade dos fármacos, em relação aos tubos tipo falcon de polipropileno, teve como efeito avaliar se ocorreria alguma sorção nas paredes deste acessório, material este que foi utilizado em praticamente todos os ensaios com solo em suspensão. A Figura 27 mostra o gráfico da estabilidade da AMOX e da DOX no que se refere ao polipropileno.

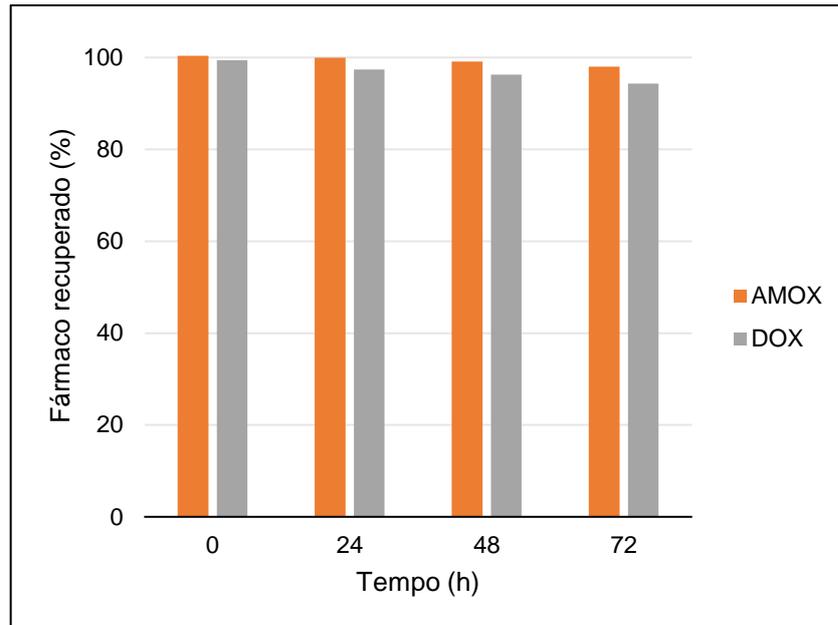


Figura 27 – Gráfico de estabilidade da AMOX e da DOX nos tubos tipo falcon de polipropileno.
Fonte: o autor (2018).

É possível verificar que nenhum dos fármacos apresentou variação significativa na concentração durante o período analisado. Sendo assim, o tubo mostrou-se adequado para a realização dos estudos envolvendo esses antibióticos. A porcentagem de recuperação ficou na faixa de, aproximadamente, 98-100% (média de 99%) para a AMOX e de 94-99% (média de 96,5%) para a DOX.

5.5 Estudos da relação solo/solução

As variações da razão solo/solução dos analitos para os horizontes A e B que foram objetos de estudo estão expressas na Figura 28.

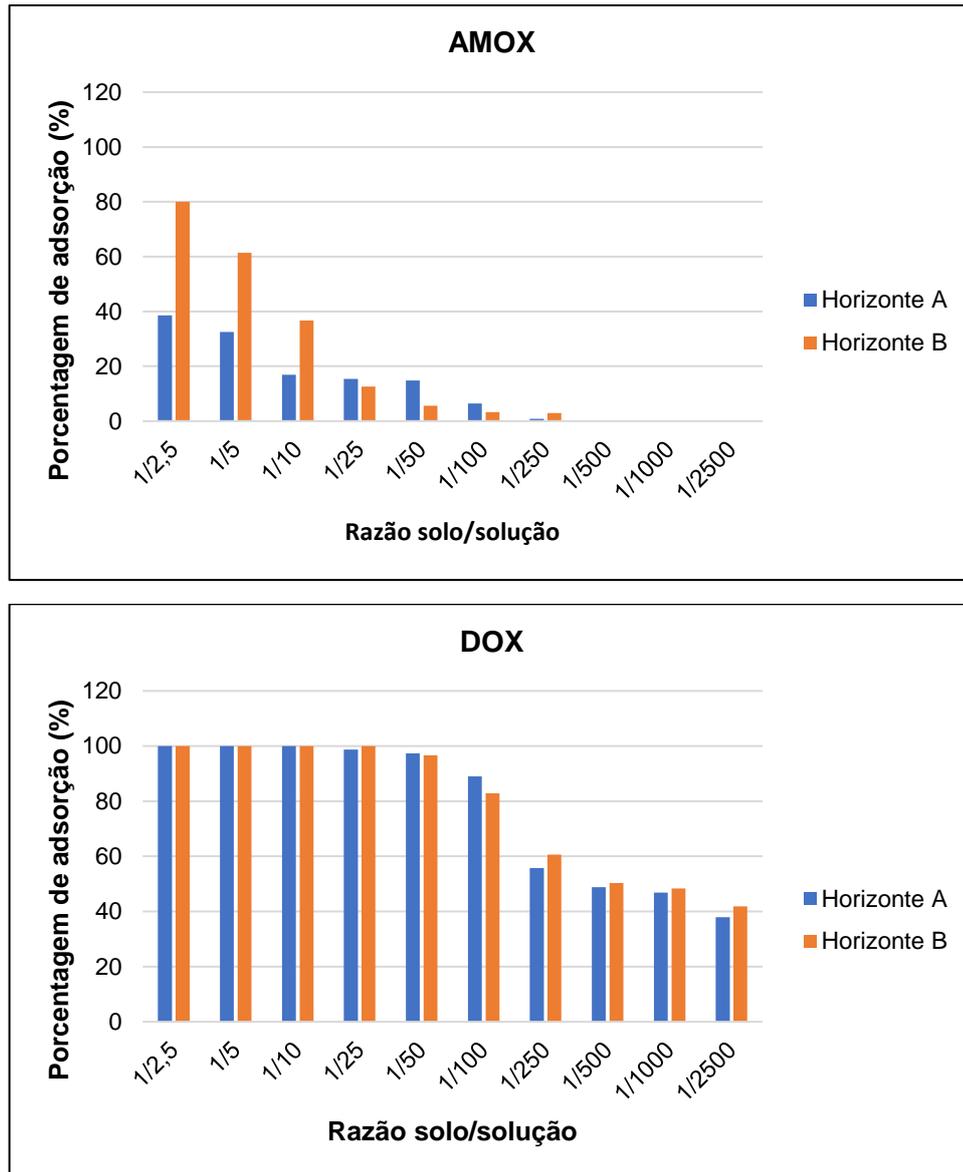


Figura 28 – Gráficos para as diferentes razões solo/solução testadas para a AMOX e DOX.

Fonte: o autor (2018).

Na Figura 28, analisando o gráfico que corresponde à AMOX, é possível observar que este antibiótico na razão 1/2,5 (equivalente a 10,0 g de amostra de solo em 25,0 mL de solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1}) tem a melhor adsorção nos dois horizontes avaliados. Entretanto, no horizonte B a adsorção chega a 80% do fármaco, não estando em conformidade com o OECD (2000), que recomenda que uma adsorção seja preferivelmente superior a 50% e inferior a 80%. É observado, também, para a AMOX, que não existe uma diferença significativa de adsorção entre as razões 1/2,5 e 1/5 nos dois horizontes, principalmente no horizonte A; fato que levou a

escolha da razão 1/5 (equivalente a 5,0 g de amostra de solo em 25,0 mL de solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1}) para os ensaios que se seguiram.

Com relação à DOX, a primeira ocorrência que chamou atenção foi a sua alta capacidade de adsorção no solo, com enfoque aos ensaios com o horizonte B. Por esse motivo, para a realização dos estudos com esse fármaco, foi necessário escolher uma razão muito menor. Para estar em conformidade com a OECD (2000), a razão de escolha foi 1/250 (equivalente a 0,1 g de amostra de solo em 25,0 mL de solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1}) para os dois horizontes. Acima de 1/250 nenhuma outra razão seria adequada para a realização dos ensaios seguintes, pois todas ultrapassariam os 80% de adsorção do analito nos dois horizontes examinados.

5.6 Estudos do efeito de componentes da matriz sobre os fármacos

Esses ensaios tiveram como foco verificar se a matriz (amostra de solo em suspensão com solução extratora) poderia conter interferentes que, de alguma forma, ocasionariam subestimação ou superestimação dos resultados analíticos obtidos.

A partir dos mesmos parâmetros utilizados na construção das curvas analíticas (**item 4.4.1**), foram construídas doze curvas analíticas para cada antibiótico, com o objetivo de reproduzir todas as condições as quais estes fármacos foram submetidos no decorrer do presente trabalho.

A Figura 29 apresenta os gráficos com as curvas construídas para a AMOX e para a DOX, respectivamente.

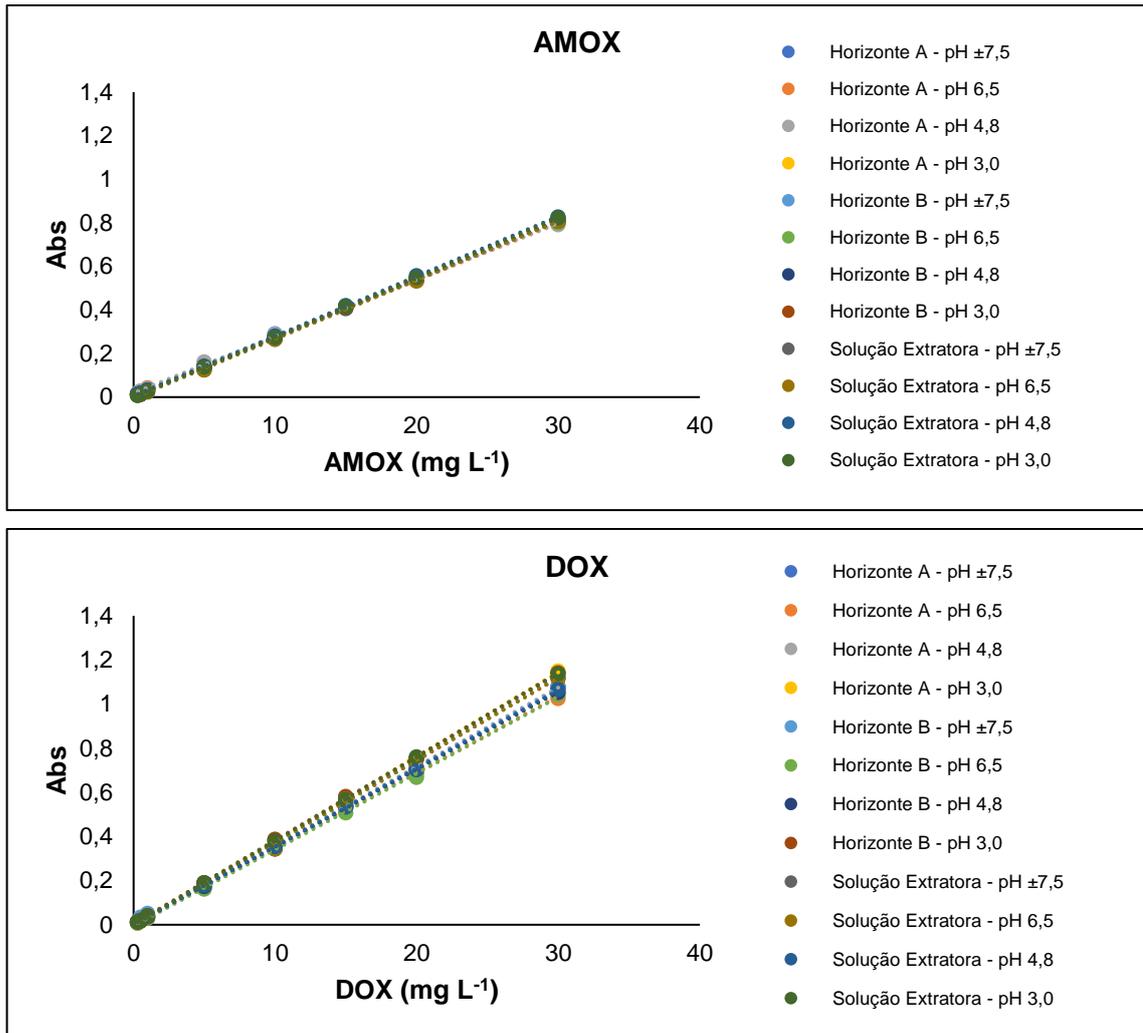


Figura 29 – Gráficos contendo as curvas de calibração da AMOX e da DOX obtidas nos diferentes horizontes e condições de acidez da solução extratora.
 Fonte: o autor (2018).

Para cada curva de calibração construída, foi obtido um diferente valor do coeficiente de correlação (R^2), da Equação Reduzida da Reta ($y = ax + b$), do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ). As Tabelas 8 e 9 apresentam esses valores, que correspondem às curvas construídas para a AMOX e para a DOX.

Tabela 8 – Valores obtidos para as curvas de calibração da AMOX em diferentes condições

Solução/Suspensão	pH	R ²	y = ax + b	LD	LQ
Horizonte A + CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹	± 7,5	0,9992	y = 0,0268x + 0,0032	0,19	0,64
	6,5	0,9998	y = 0,0262x + 0,0127	0,18	0,60
	4,8	0,9991	y = 0,026x + 0,0193	0,07	0,24
	3,0	0,9999	y = 0,0268x + 0,0036	0,07	0,24
Horizonte B + CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹	± 7,5	0,9999	y = 0,0269x + 0,0062	0,15	0,52
	6,5	0,9994	y = 0,0268x + 0,0028	0,14	0,46
	4,8	1,0000	y = 0,0268x + 0,0045	0,10	0,34
	3,0	1,0000	y = 0,0269x + 0,0028	0,10	0,34
CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹ (solução extratora)	± 7,5	0,9996	y = 0,0271x + 0,0029	0,03	0,12
	6,5	0,9998	y = 0,0266x + 0,0085	0,04	0,12
	4,8	1,0000	y = 0,0275x + 0,0051	0,04	0,14
	3,0	1,0000	y = 0,0274x + 0,0002	0,03	0,11

Fonte: o autor (2018).

Tabela 9 – Valores obtidos para as curvas de calibração da DOX em diferentes condições

Solução/Suspensão	pH	R ²	y = ax + b	LD	LQ
Horizonte A + CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹	± 7,5	0,9995	y = 0,0357x + 0,0047	0,06	0,29
	6,5	0,9991	y = 0,0344x + 0,0025	0,03	0,10
	4,8	0,9999	y = 0,0358x + 0,0008	0,02	0,07
	3,0	0,9999	y = 0,0383x + 0,0041	0,02	0,08
Horizonte B + CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹	± 7,5	0,9991	y = 0,0355x + 0,0028	0,06	0,21
	6,5	0,9993	y = 0,0345x + 0,0046	0,03	0,09
	4,8	0,9999	y = 0,0351x + 0,0024	0,10	0,30
	3,0	0,9999	y = 0,0379x + 0,0032	0,07	0,22
CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹ (solução extratora)	± 7,5	0,9991	y = 0,0374x + 0,0029	0,06	0,20
	6,5	0,9998	y = 0,0330x + 0,0034	0,06	0,20
	4,8	0,9999	y = 0,0354x + 0,0011	0,01	0,04
	3,0	1,0000	y = 0,0379x + 0,0011	0,04	0,12

Fonte: o autor (2018).

Verificando os dados apresentados nas Tabelas 8 e 9, foi possível observar que todos os valores de R² permaneceram superiores a 0,99 e, para cada curva de calibração, foi calculado um LD e um LQ, com o objetivo de validar toda a metodologia aplicada neste estudo, como proposto por Ribani *et al.* (2004).

A partir da utilização das diferentes absorvâncias e dos dados fornecidos pelas equações reduzidas das retas, extraídas das curvas de calibração construídas para os dois fármacos, em todas as condições a que foram submetidos, também foi possível obter, de forma isolada para cada equação, o valor de uma concentração conhecida ($15,0 \text{ mg L}^{-1}$) e, assim, calcular uma média entre todos esses valores obtidos, juntamente com o seu respectivo desvio padrão; além de utilizar um único valor conhecido de absorvância em todas as equações da reta, se obtendo uma nova média e um novo desvio padrão, podendo compará-los entre si, posteriormente.

As Tabelas 10 e 11 mostram as concentrações resultantes da utilização de cada uma das diferentes absorvâncias e equações fornecidas pela construção das curvas de calibração da AMOX e da DOX.

Tabela 10 – Valores de concentração de AMOX fornecidos pela utilização de diferentes absorvâncias e equações reduzidas da reta

Solução/Suspensão	pH	[AMOX]	[AMOX]
		Abs _{variável}	Abs _{fixo}
Horizonte A + CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$	$\pm 7,5$	$15,0 \text{ mg L}^{-1}$	$15,0 \text{ mg L}^{-1}$
	6,5	$15,2 \text{ mg L}^{-1}$	$15,0 \text{ mg L}^{-1}$
	4,8	$15,3 \text{ mg L}^{-1}$	$14,9 \text{ mg L}^{-1}$
	3,0	$15,2 \text{ mg L}^{-1}$	$15,0 \text{ mg L}^{-1}$
Horizonte B + CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$	$\pm 7,5$	$15,1 \text{ mg L}^{-1}$	$14,9 \text{ mg L}^{-1}$
	6,5	$15,5 \text{ mg L}^{-1}$	$15,0 \text{ mg L}^{-1}$
	4,8	$15,1 \text{ mg L}^{-1}$	$15,0 \text{ mg L}^{-1}$
	3,0	$15,1 \text{ mg L}^{-1}$	$15,0 \text{ mg L}^{-1}$
CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (solução extratora)	$\pm 7,5$	$15,2 \text{ mg L}^{-1}$	$14,9 \text{ mg L}^{-1}$
	6,5	$15,2 \text{ mg L}^{-1}$	$14,9 \text{ mg L}^{-1}$
	4,8	$15,0 \text{ mg L}^{-1}$	$14,6 \text{ mg L}^{-1}$
	3,0	$15,1 \text{ mg L}^{-1}$	$14,8 \text{ mg L}^{-1}$
Média		$15,2 \text{ mg L}^{-1}$	$14,9 \text{ mg L}^{-1}$
Desvio padrão		0,14	0,13

Fonte: o autor (2018).

Tabela 11 – Valores de concentração de DOX fornecidos pela utilização de diferentes absorvâncias e equações reduzidas da reta

Solução/Suspensão	pH	[DOX]	[DOX]
		Abs _{variável}	Abs _{fixo}
Horizonte A + CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹	± 7,5	14,7 mg L ⁻¹	14,7 mg L ⁻¹
	6,5	15,8 mg L ⁻¹	15,3 mg L ⁻¹
	4,8	15,0 mg L ⁻¹	14,8 mg L ⁻¹
	3,0	14,7 mg L ⁻¹	13,7 mg L ⁻¹
Horizonte B + CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹	± 7,5	14,9 mg L ⁻¹	14,8 mg L ⁻¹
	6,5	14,6 mg L ⁻¹	15,2 mg L ⁻¹
	4,8	15,2 mg L ⁻¹	15,0 mg L ⁻¹
	3,0	15,2 mg L ⁻¹	13,9 mg L ⁻¹
CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹ (solução extratora)	± 7,5	15,2 mg L ⁻¹	14,0 mg L ⁻¹
	6,5	15,0 mg L ⁻¹	15,9 mg L ⁻¹
	4,8	15,0 mg L ⁻¹	14,9 mg L ⁻¹
	3,0	15,0 mg L ⁻¹	13,9 mg L ⁻¹
Média		15,0 mg L ⁻¹	14,7 mg L ⁻¹
Desvio padrão		0,31	0,67

Fonte: o autor (2018).

De acordo com os dados fornecidos pelas Tabelas 10 e 11, foi observado em todos os parâmetros estudados que não ocorreu variação significativa nas concentrações da AMOX e da DOX quando se alterou a absorvância, ou quando se empregou um único valor desta variável para todas as equações da reta extraídas das curvas de calibração destes fármacos. Com base nesses resultados, verificou-se que a utilização de qualquer uma das curvas correspondentes aos antibióticos não implicaria em alteração considerável na quantificação desses compostos, levando em conta, quaisquer condições as quais estes foram submetidos no desenvolvimento deste trabalho.

Logo, o emprego das curvas de calibração, inicialmente construídas, continuaram sendo utilizadas no decorrer de todo este estudo, não implicando em provável superestimação ou subestimação na quantificação destes antimicrobianos.

5.7 Estudo de período máximo de adsorção

Em concordância com a Diretriz 106 da OECD (2000), que orienta sobre a realização de ensaios com produtos químicos, em análises que abrangem processos de adsorção/dessorção, é recomendado um período de adsorção dos analitos de, no mínimo, 24 h e um tempo de dessorção de, no mínimo, o dobro do tempo de adsorção.

As Figuras 30 e 31 apresentam os gráficos com as porcentagens de adsorção da AMOX e da DOX, respectivamente, nos dois horizontes estudados e em cinco tempos consecutivos para esses ensaios.

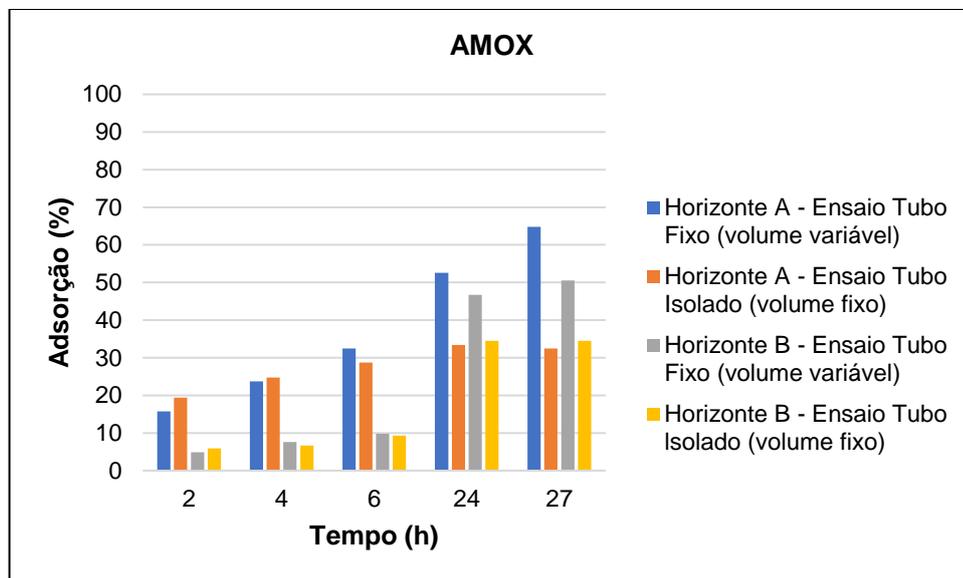


Figura 30 – Gráfico da porcentagem de adsorção da AMOX, nos horizontes A e B, em cinco diferentes tempos.
Fonte: o autor (2018).

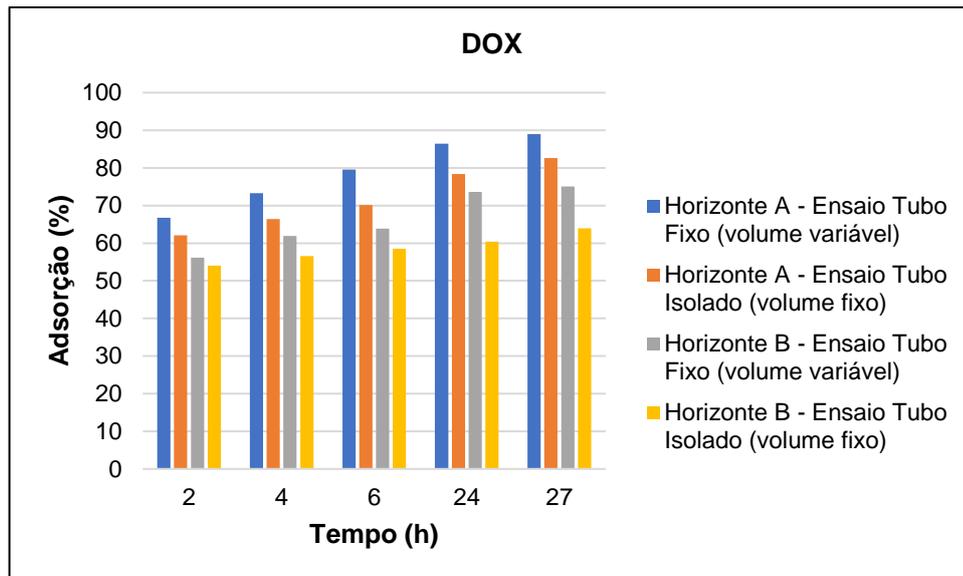


Figura 31 – Gráfico da porcentagem de adsorção da DOX, nos horizontes A e B, em cinco diferentes tempos.
Fonte: o autor (2018).

É possível observar na Figura 30, que apresenta o gráfico em barras correspondente à AMOX, que o período máximo de adsorção deste antibacteriano nos dois horizontes foi o mesmo, de 27 h para o ensaio tubo fixo, o qual o volume total da suspensão (25,0 mL) variou, progressivamente, de um intervalo de tempo para o outro; e de 24 h para o ensaio tubo isolado, que o volume total da suspensão não alterou, pois apenas uma alíquota de 5,0 mL foi retirada para posterior quantificação deste fármaco. Isso demonstra que o volume de solução extratora presente na suspensão, contida no tubo, exerce alguma influência na porcentagem de adsorção da AMOX.

Também, foi possível constatar no ensaio tubo isolado, referente ao horizonte A, uma queda na adsorção a partir de 24 h do início do experimento, o que não aconteceu no ensaio tubo isolado referente ao horizonte B, em que a adsorção da AMOX se estabilizou no intervalo de 24 a 27 h.

Levando em conta as informações obtidas nesses ensaios, ficou determinado para os ensaios que se seguirem, que o período máximo de adsorção para a AMOX seria de 24 h e, de dessorção, 48 h.

De acordo com a Figura 31, que mostrou o gráfico em barras referente à DOX, o período máximo de adsorção deste antibacteriano nos dois horizontes, similarmente ao observado com a AMOX, foi o mesmo, de 27 h para o ensaio tubo fixo, porém, de 27 h para o ensaio tubo isolado.

Para estar em conformidade com a Diretriz 106 da OECD, no período em que transcorreu a adsorção máxima da DOX (27 h), não poderia suceder a extrapolação dos 80% de adsorção deste fármaco, o que de fato, não aconteceu. Por esse motivo, foi necessário manter o período máximo de adsorção para a DOX de 24 h e, de dessorção, 48 h.

Com isso, de certa forma, ocorreu a padronização desses parâmetros, para utilização nas próximas etapas que se seguiram no decorrer do presente estudo; que, até então, tinham sido adaptadas de trabalhos desenvolvidos, anteriormente, por Oliveira Neto (2015) e Oliveira Neto *et al.* (2017).

5.8 Estudo de reprodutibilidade na adsorção em relação ao tempo

O presente estudo teve como finalidade verificar se as condições de adsorção, no que diz respeito à composição da matriz estudada, se perduravam em um determinado intervalo de tempo. Como mostrado, anteriormente, nas Tabelas 4 e 5 (**item 5.1**), o horizonte B apresentou diferenças quanto à presença de alguns atributos e mineralogia do solo, como teor de matéria orgânica quase ausente e constituintes da fração argila – exclusiva presença de gibbsita. Tendo em vista esses fatores, o horizonte A foi o escolhido para a realização destes ensaios.

As Figuras 32 e 33 expressam os resultados obtidos, para os dois antibióticos estudados no período de 12 meses.

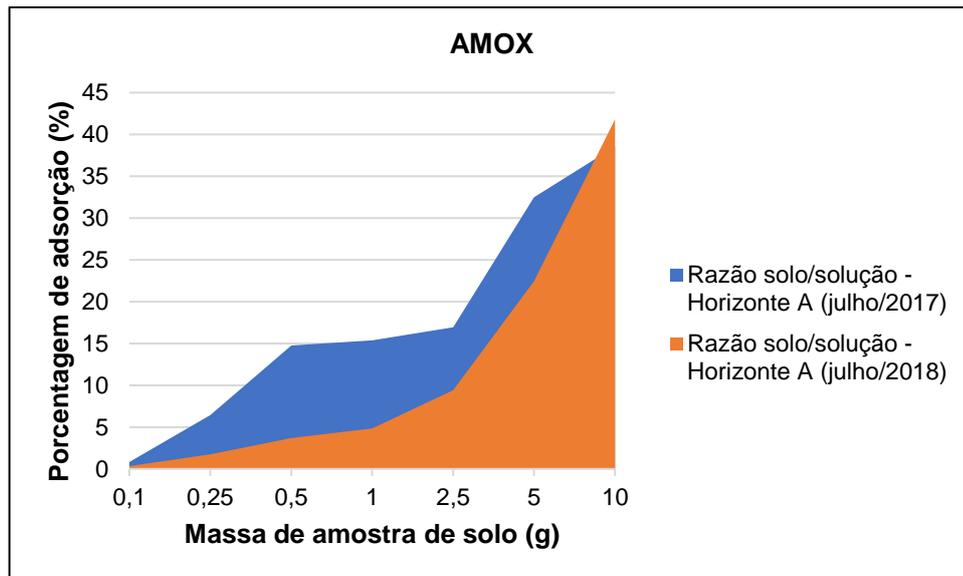


Figura 32 – Gráfico com as porcentagens de adsorção da AMOX no horizonte A no período de 12 meses.
Fonte: o autor (2018).

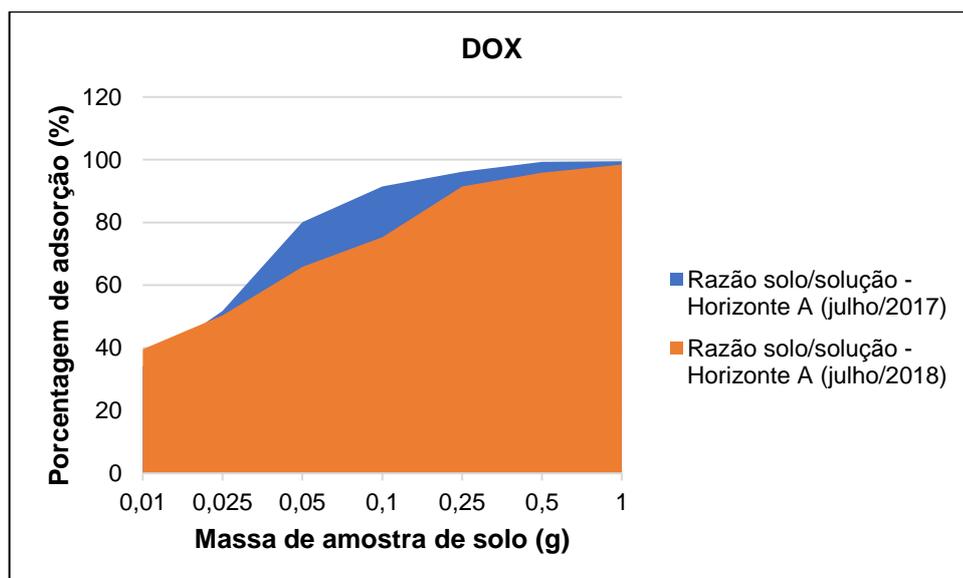


Figura 33 – Gráfico com as porcentagens de adsorção da DOX no horizonte A no período de 12 meses.
Fonte: o autor (2018).

De acordo com a Figura 32, que apresenta o gráfico com as porcentagens de adsorção da AMOX, é possível visualizar que, no intervalo de 12 meses, ocorreu uma queda na adsorção deste antibiótico, pois, inicialmente, utilizando a razão solo/solução 1/25, equivalente a 5,0 g de amostra de solo, se chegava a uma porcentagem de adsorção de 32,5%, enquanto que após 12 meses – empregando a mesma amostra inicial –, essa porcentagem caiu para 22,4%; uma diminuição de, aproximadamente, 31% na taxa de adsorção deste fármaco.

Analisando a Figura 33, que exibe o gráfico com as porcentagens de adsorção da DOX, foi observado o mesmo comportamento verificado, anteriormente, na análise da AMOX. No início do experimento, a porcentagem de adsorção da DOX, utilizando a razão solo/solução 1/500, equivalente a 0,05 g de amostra de solo, era de 80,1%. Passados 12 meses – empregando a mesma amostra inicial –, para se chegar a uma taxa de adsorção próxima à inicial, seria necessário utilizar uma massa de solo de 0,11 g, mais que o dobro da primeira, para se alcançar uma taxa de adsorção de aproximadamente 75%, que foi a taxa de adsorção da DOX após 12 meses; um aumento superior a 100% em relação à razão solo/solução, inicialmente, utilizada.

As amostras de solo testadas após 12 meses do início do experimento não estavam mais refrigeradas e apresentando valores de umidade 11 vezes menores que o inicial (2,3%). O teor de matéria orgânica nesse período passou de 2,14 dag/kg para 2,09 dag/kg (diminuição de aproximadamente 2%).

Levando em conta apenas a presença de água e dos componentes mineralógicos e orgânicos do solo estudado, que foram os atributos investigados no decorrer deste trabalho, e comparando-os em termos de suscetibilidade ao decaimento ou a mudanças estruturais/químicas que poderiam ser consideradas significativas, em um curto espaço de tempo (meses), os que melhor poderiam se encaixar, em termos de relação, em uma tentativa de explicar o que poderia estar interferindo na adsorção desses fármacos pela matriz, seriam a umidade e a matéria orgânica do solo (MOS) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

De acordo com Canellas *et al.* (2000), a água é um fator preponderante na formação de material húmico. A diminuição gradual por evaporação desse componente no solo poderia, conseqüentemente, desfavorecer à sua disponibilidade. Esse fator, somado ao processo de mineralização promovido por fungos e bactérias ali presentes – favorecido também pelo aumento da temperatura no solo –, poderiam ocasionar o seu decaimento com o passar do tempo, esgotando as frações mais prontamente disponíveis da matéria orgânica para esses microrganismos (CARDOSO; ANDREOTE, 2016; DICK *et al.*, 2016).

Entretanto, como foi demonstrado, a matéria orgânica teve uma diminuição pouco relevante no decorrer do período de tempo avaliado, apesar de alterações significativas terem ocorrido nos processos de adsorção dos dois antibióticos estudados. Uma das propostas de mecanismo que poderiam estar ocorrendo neste caso sugeriria uma relação, não em termos quantitativos, quanto ao teor de matéria

orgânica disponível no solo, mas com a sua qualidade, a forma que essa matéria orgânica se apresenta distribuída e, também, quanto à sua localização no solo.

De acordo com Dick *et al.* (2016) a MOS pode ser agrupada em: matéria orgânica particulada (MOP), matéria orgânica associada aos minerais (MOAM) e matéria orgânica dissolvida (MOD). A MOP corresponde ao material orgânico pouco decomposto que preserva vestígios da estrutura celular ou tecidual do organismo que lhe deu origem. Os constituintes dessa fração são fragmentos de origem vegetal e animal que são formados basicamente por biomoléculas, por estarem em estágios iniciais de decomposição. A MOAM é formada principalmente por substâncias húmicas, que interagem com a superfície de minerais por meio de seus diversos grupos funcionais, formando complexos organominerais, aumentando a estabilidade da MOS e diminuindo a sensibilidade do seu estoque, sendo muito dependente da textura e mineralogia da fração argila do solo. E a MOD, que compõe a fração orgânica solúvel do solo e é composta por uma variedade de compostos orgânicos que compreende desde moléculas simples, como ácidos e polissacarídeos a substâncias húmicas complexas. A MOD desempenha papel ambiental importante decorrente de sua alta reatividade com íons e moléculas do meio, podendo complexar metais pesados e xenobióticos. Possivelmente, nas amostras de solo estudadas, a MOAM e a MOD poderiam ser as formas de MO que mais exerceram influência sobre a adsorção dos fármacos.

Novamente, ao consultar a Tabela 5 (**item 5.1**), é possível visualizar que o solo estudado apresenta altas quantidades de caulinita, um argilomineral silicatado bem cristalizado, e goethita, um óxido de ferro com estrutura cristalina bem definida (TEIXEIRA *et al.*, 2009; BRADY; WEIL, 2013; KER *et al.*, 2015). A caulinita e óxidos de ferro e alumínio com alto grau de cristalinidade tendem a formar interações organominerais menos estáveis quando comparados aos óxidos desses elementos com baixo grau de cristalinidade (DICK *et al.*, 2016).

Sendo assim, é possível que, quando as amostras de solo ainda mantinham a sua umidade, a MOD, por meio de seus grupos funcionais carboxílicos, influenciava mais os processos de adsorção dos antibióticos. Com a perda de água das amostras, essa se manteve na forma de MOAM, ficando complexada, principalmente, na caulinita e na goethita, mesmo através de ligações menos estáveis. Por esse motivo, não ocorreu variação significativa no teor de MOS. É possível também que essa MOD,

agora na forma de MOAM, seja formada, na sua grande maioria, por substâncias húmicas mais complexas (MOREIRA; SIQUEIRA; 2006; DICK *et al.*, 2016).

Outra proposta de mecanismo que poderia estar ocorrendo sugeriria uma relação de capacidade de retenção dos antibióticos no solo ligada à qualidade dessa matéria orgânica agora disponível. Uma menor quantidade de água no componente orgânico da matriz poderia ter interferido, com o passar dos meses, de forma irreversível na viabilidade reacional dos grupos polares presentes nos ácidos húmicos, ocasionando, assim, em uma menor interação dos fármacos com as substâncias húmicas contidas nas amostras de solo.

Para um melhor entendimento sobre a dinâmica da MO na matriz-objeto do presente estudo, seria necessária a realização de experimentos mais direcionados para esse constituinte morfológico do solo, e por essa perspectiva, se compreender de forma mais esclarecedora, os mecanismos envolvidos, o papel desempenhado pela MOS e a sua influência nos processos de retenção dos antibióticos analisados. Entretanto, não foi possível a realização de ensaios com esse objetivo no decorrer deste trabalho.

5.9 Isotermas de adsorção e de dessorção

Com o propósito de se entender os processos de adsorção e de dessorção da AMOX e da DOX no latossolo empregado neste estudo, os resultados obtidos foram utilizados seguindo três modelos matemáticos: o linear, o de Freundlich e o de Langmuir. Para isso, construíram-se as isotermas com o objetivo de analisar a capacidade e intensidade de adsorção dos analitos nos dois horizontes estudados. Os gráficos foram construídos e correlacionaram-se as concentrações dos fármacos no solo (C_s) e a concentração no equilíbrio (C_w).

Tanto nos processos de adsorção quanto nos de dessorção, o modelo que melhor descreveu esses sistemas foi o que apresentou o maior coeficiente de correlação (R^2), e para se assomar à constante de Freundlich (K_F) e à constante empírica (n) foram utilizados os coeficientes angular e linear, correspondentes a essas equações da reta simplificadas geradas.

5.9.1 Isotermas de adsorção e de dessorção da AMOX

A Figura 34 apresenta as isotermas de adsorção da AMOX para os horizontes A e B sem correção de pH, de acordo com os modelos linear, de Freundlich e de Langmuir, respectivamente.

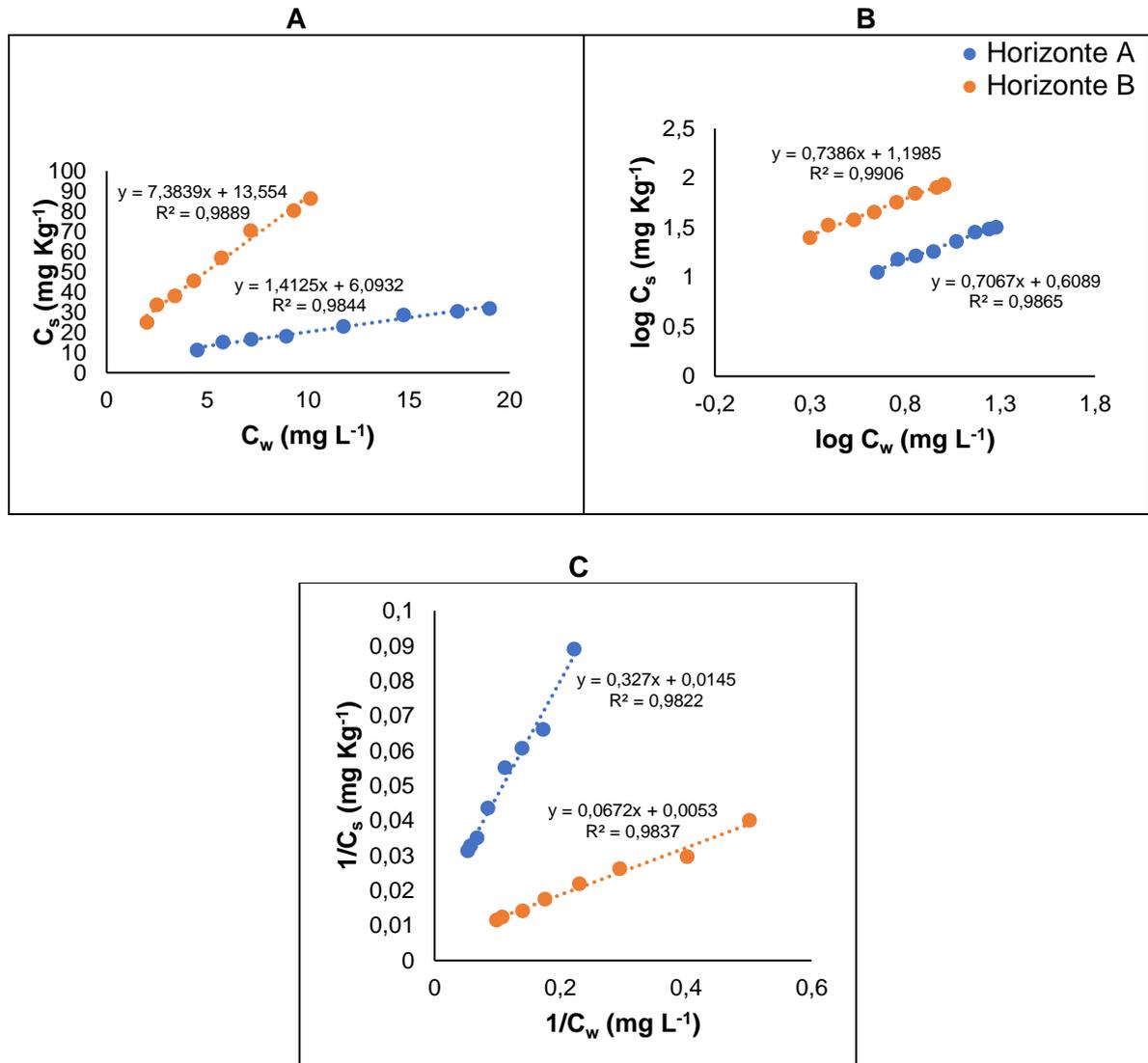


Figura 34 – Isotermas de adsorção da AMOX, sem ajuste de pH, de acordo com os modelos linear (A), de Freundlich (B) e de Langmuir (C).
Fonte: o autor (2018).

Na adsorção, para os dois horizontes estudados, verificou-se que o modelo que mais se ajustou foi o de Freundlich, pois consistiu ao que apresentou maior R^2 na equação da reta.

Os gráficos que demonstram as correlações no processo de dessorção da AMOX são apresentados na Figura 35, seguindo os mesmos parâmetros de construção empregados no de adsorção.

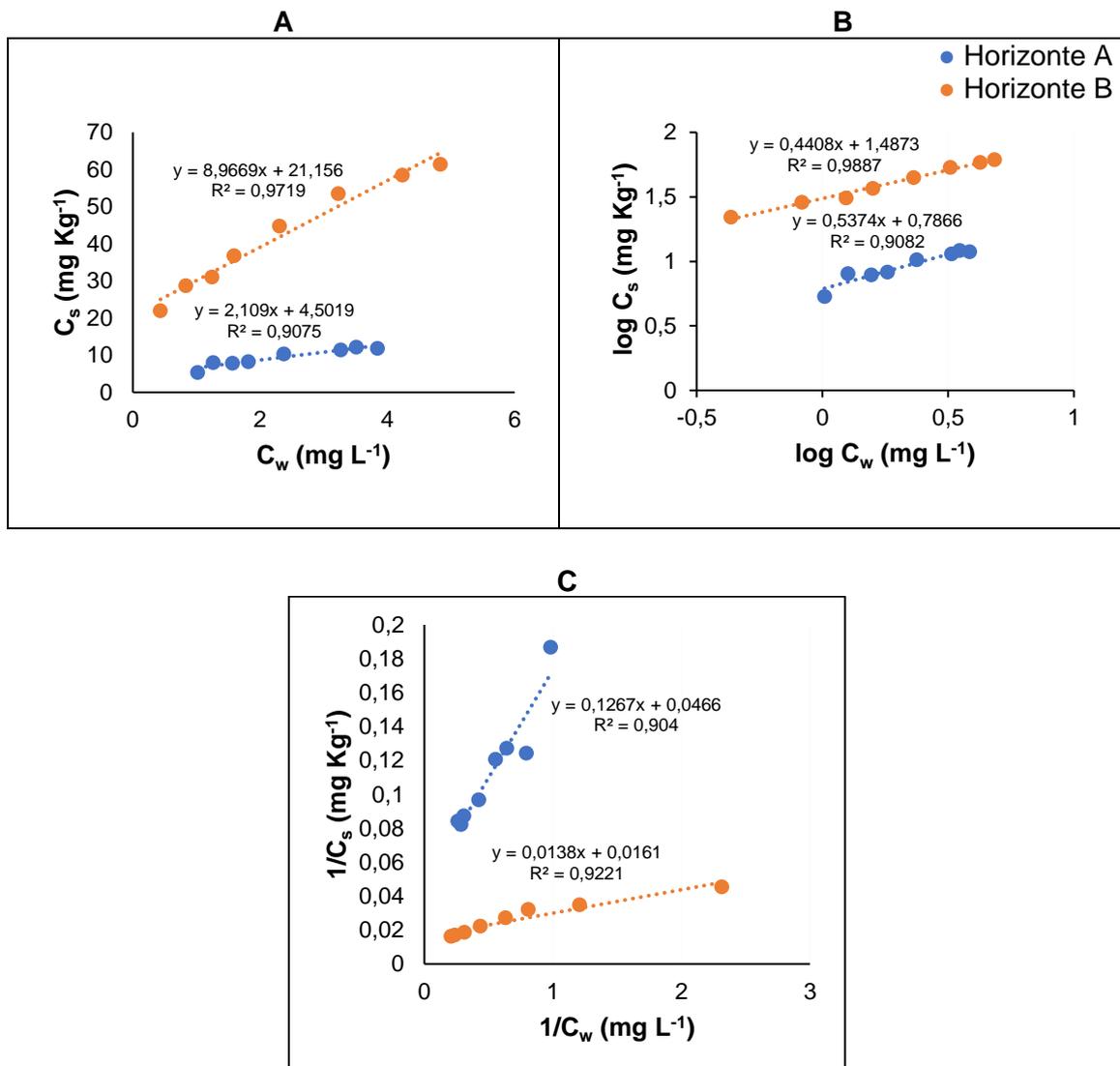


Figura 35 – Isotermas de dessorção da AMOX, sem ajuste de pH, de acordo com os modelos linear (A), de Freundlich (B) e de Langmuir (C).
 Fonte: o autor (2018).

Na dessorção, para os dois horizontes estudados, também se verificou que o modelo que mais se ajustou foi o de Freundlich, pois correspondeu ao que apresentou maior R^2 na equação da reta.

A partir da análise das informações adquiridas por meio da construção das isotermas de adsorção e dessorção nos dois horizontes, sem ajuste de pH, foi possível repetir o mesmo experimento de forma isolada para cada condição de acidez

previamente determinada, visando se obter as isotermas correspondentes e saber em qual modelo, sob tais condições, a AMOX melhor se adequaria. A Tabela 12 apresenta os valores de R^2 obtidos em cada modelo e nos pH estudados.

Tabela 12 – Valores de R^2 obtidos pelas isotermas de adsorção e dessorção da AMOX nas três condições de acidez analisadas

Horizonte	pH	Modelo	Adsorção	Dessorção
			R^2	
A	6,5	Linear	0,9801	0,9362
		Freundlich	0,9831	0,9452
		Langmuir	0,9705	0,9339
	4,8	Linear	0,9961	0,9704
		Freundlich	0,9965	0,9790
		Langmuir	0,9874	0,9534
	3,0	Linear	0,9756	0,9182
		Freundlich	0,9819	0,9192
		Langmuir	0,9795	0,9173
B	6,5	Linear	0,9934	0,9767
		Freundlich	0,9937	0,9798
		Langmuir	0,9823	0,8857
	4,8	Linear	0,9855	0,9804
		Freundlich	0,9880	0,9892
		Langmuir	0,9715	0,9789
	3,0	Linear	0,9895	0,9753
		Freundlich	0,9946	0,9958
		Langmuir	0,9880	0,9949

Fonte: o autor (2018).

Examinando os valores de R^2 obtidos nas isotermas com ajuste de pH, observaram-se que os números gerados demonstram que o fármaco seguiu a mesma tendência verificada nas isotermas sem ajuste, ou seja, a AMOX melhor se adequou ao modelo de Freundlich, nos dois horizontes e nas três condições de acidez analisadas.

Na Figura 36 é possível visualizar as isotermas de adsorção e de dessorção nos dois horizontes com pH ajustado e, em seguida, compará-las com as isotermas sem ajuste (pH 7,0-7,5), mediante à utilização do modelo de Freundlich.

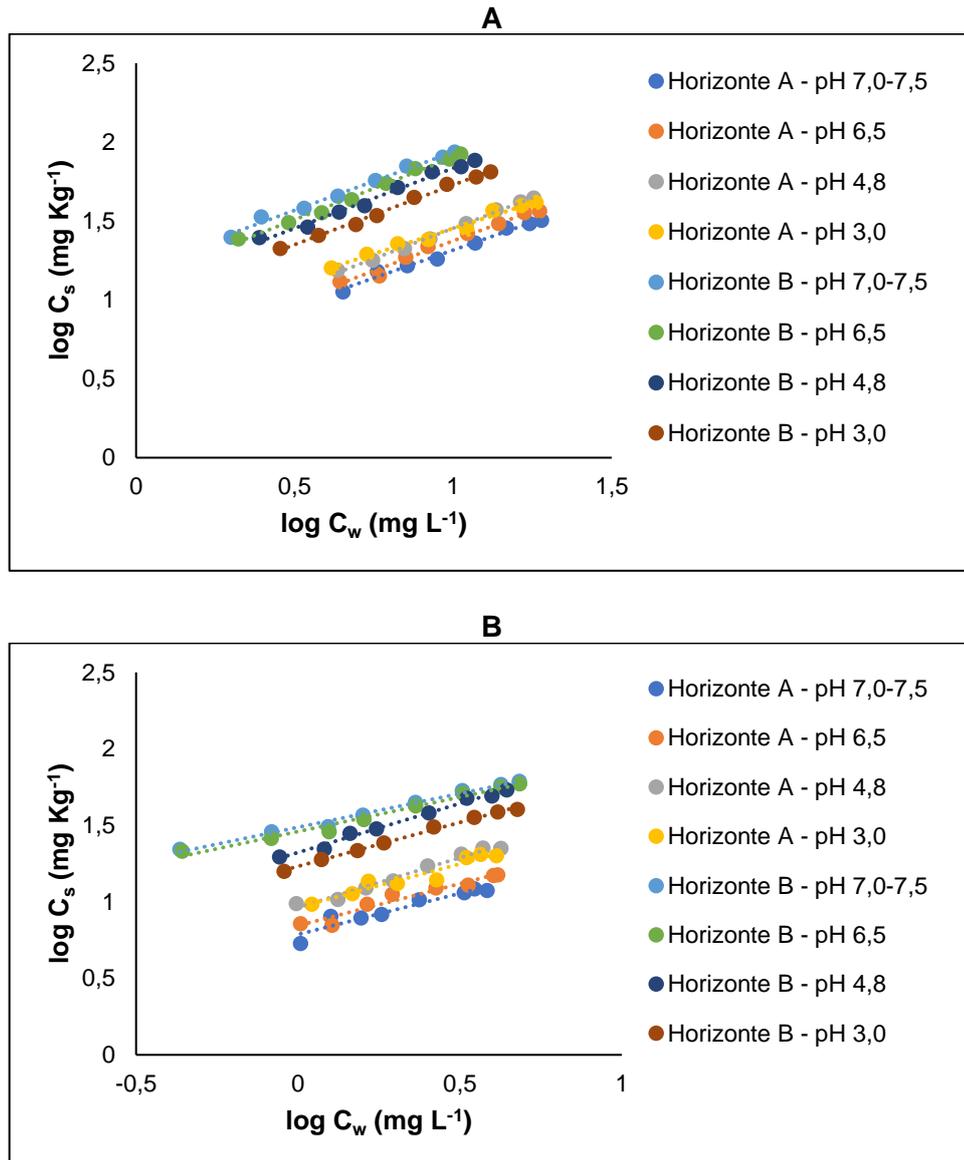


Figura 36 – Isotermas de adsorção (A) e de dessorção (B) da AMOX com e sem ajuste de pH nos dois horizontes estudados.
Fonte: o autor (2018).

Ao observar a Figura 36, foi possível certificar que os processos de adsorção e dessorção ocupam regiões distintas em ambos os gráficos e isso, possivelmente, se deve às diferentes interações que a AMOX realiza com os constituintes morfológicos dos diferentes horizontes, que apresentam diferenças, como foi constatado ao analisar as Tabelas 4 e 5 (**item 5.1**). A Tabela 13 apresenta as constantes e outras variáveis obtidas com a construção das isotermas e as relações de interação do analito com as variáveis estudadas.

Tabela 13 – Constantes e parâmetros obtidos para a AMOX a partir do ajuste das isotermas ao modelo de Freundlich

Horizonte	pH	Fenômeno	K_F (mg Kg ⁻¹)	1/n	n	Capacidade
A	± 7,5	Adsorção	4,06	0,7067	1,42	Baixa
	6,5	Adsorção	4,11	0,7606	1,31	Baixa
	4,8	Adsorção	4,83	0,7705	1,30	Baixa
	3,0	Adsorção	6,45	0,644	1,55	Baixa
	± 7,5	Dessorção	6,12	0,5374	1,86	Baixa
	6,5	Dessorção	6,98	0,5476	1,83	Baixa
	4,8	Dessorção	9,19	0,6503	1,54	Baixa
	3,0	Dessorção	9,21	0,567	1,76	Baixa
B	± 7,5	Adsorção	15,79	0,7386	1,35	Baixa
	6,5	Adsorção	12,95	0,7918	1,26	Baixa
	4,8	Adsorção	11,81	0,7625	1,31	Baixa
	3,0	Adsorção	9,37	0,7566	1,32	Baixa
	± 7,5	Dessorção	30,71	0,4408	2,27	Média
	6,5	Dessorção	28,80	0,4503	2,22	Média
	4,8	Dessorção	21,01	0,6407	1,56	Baixa
	3,0	Dessorção	17,06	0,5738	1,74	Baixa

Fonte: o autor (2018).

Ao examinar a Tabela 13, é possível verificar que os indicadores de eficiência na retenção da AMOX neste tipo de latossolo avaliado demonstram a baixa capacidade de adsorção e dessorção deste fármaco, com valores de $K_F < 24$ e de n próximos de 1 (Tabela 3) (**item 3.4**), para um número expressivo de variáveis a que este antibiótico foi submetido neste estudo (REGITANO; OLIVEIRA Jr., 2016).

Observa-se, também, que o K_F tem um aumento discreto no horizonte A na medida em que diminui o pH, tendo um efeito contrário no horizonte B, sob as mesmas condições. Apesar do horizonte B apresentar valores de K_F relativamente mais altos em relação aos fornecidos pelas isotermas no horizonte A – um indicativo de melhor adsorção nesta camada de solo –, a AMOX parece sofrer influência negativa do pH mesmo em condições mais favoráveis de retenção do adsorvente, não possuindo nos processos de sorção, em uma primeira análise, relação direta com a presença de material húmico como constituinte morfológico presente neste horizonte.

Consultando as Tabelas 4 e 5 (**item 5.1**), que apresentam algumas das propriedades físicas e químicas deste solo estudado, foi observada a presença de matéria orgânica, de forma considerável, apenas no horizonte A; e uma menor porcentagem de argila no horizonte B. Aparentemente, a presença de material orgânico não era um fator preponderante nos processos de retenção da AMOX neste

tipo de solo, prevalecendo apenas a influência do pH do meio e a presença de argilas em maior quantidade no horizonte A, como fatores que dominavam os processos de sorção. Porém, no **item 5.8**, contrariando essa teoria, se constatou que a matéria orgânica, possivelmente, também poderia exercer influência na adsorção da AMOX, como foi demonstrado pela análise dos resultados obtidos com esses ensaios.

Sendo assim, pode-se dizer que, em condições de maior acidez e na presença de matéria orgânica, como foi visto no horizonte A, ocorre favorecimento nos processos de adsorção e de dessorção da AMOX. Entretanto, a medida em que se aumenta a quantidade de argila, mesmo sob medidas de pH mais baixas, isso não acontece, concluindo que a fração argila também contribui para uma melhora (horizonte B) ou piora (horizonte A) na retenção desse fármaco. Logo, quanto maior a quantidade de argila, menor o valor de K_F obtido para a AMOX neste latossolo estudado.

Regitano e Leal (2015) descreveram que a sorção da maioria dos antibióticos é especialmente influenciada pelo pH e pela fração orgânica e mineral do solo. Kim *et al.* (2012) ao estudarem as características de sorção da oxitetraciclina, amoxicilina e sulfatiazol em dois diferentes tipos de solo da Coreia (um siltoso e o outro arenoso), relataram que a capacidade de sorção desses antibióticos foi influenciada pelo pH, teor de matéria orgânica e textura do solo; concluindo que a diminuição do pH, o aumento do teor de matéria orgânica e a presença de argilas em maiores ou menores quantidades aumentaram a retenção desses fármacos no solos.

A fração argila deste solo estudado é composta, em sua grande maioria, por caulinita, com menores teores de goethita e gibbsita. De acordo com Ker *et al.* (2015), as características de carga variável da caulinita conferem aos solos a possibilidade de retenção de ânions em pH ácido e de cátions em pH elevado. Apesar da baixa CTC presente neste solo (Tabelas 5 e 6) (**item 5.1**) essas trocas iônicas acontecem e poderiam influenciar no potencial de sorção da AMOX, mesmo este fármaco permanecendo na sua forma neutra em uma faixa de pH variando entre 2,4 (pK_{a1}) e 7,4 (pK_{a2}), devido à sua alta estabilidade molecular em condições muito ácidas (Tabela 1) (**item 3.2**) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; BRADY; WEIL, 2013). É esperado que este antibiótico, devido à sua polaridade, propriedades anfóteras e grupos funcionais ionizáveis, interaja com este argilomineral e com os óxidos de ferro (goethita) e alumínio (gibbsita) presentes na fração argila sob diferentes condições de pH, da mesma forma que isso acontece com os grupos

polares dos ácidos húmicos presentes na MOS; podendo essa interação ocorrer de forma sinérgica com outros atributos, favorecendo os processos de adsorção e dessorção, ou antagônica, desfavorecendo alguns processos, possivelmente, como decorreu com este antibiótico (REGITANO; LEAL, 2015).

Apesar da AMOX ter apresentado, no presente estudo, valores de K_F , em sua grande maioria, inferiores a 24, evidenciando baixa sorção deste composto no solo e alta mobilidade, se faz necessária a realização de estudos mais detalhados, incluindo avaliação de processos de transporte e de transformação para entender melhor sua dinâmica nos latossolos (REGITANO; OLIVEIRA Jr., 2016).

5.9.2 Isotermas de adsorção e de dessorção da DOX

A Figura 37 apresenta as isotermas de adsorção da DOX para os horizontes A e B sem correção de pH, de acordo com os modelos linear, de Freundlich e de Langmuir, respectivamente.

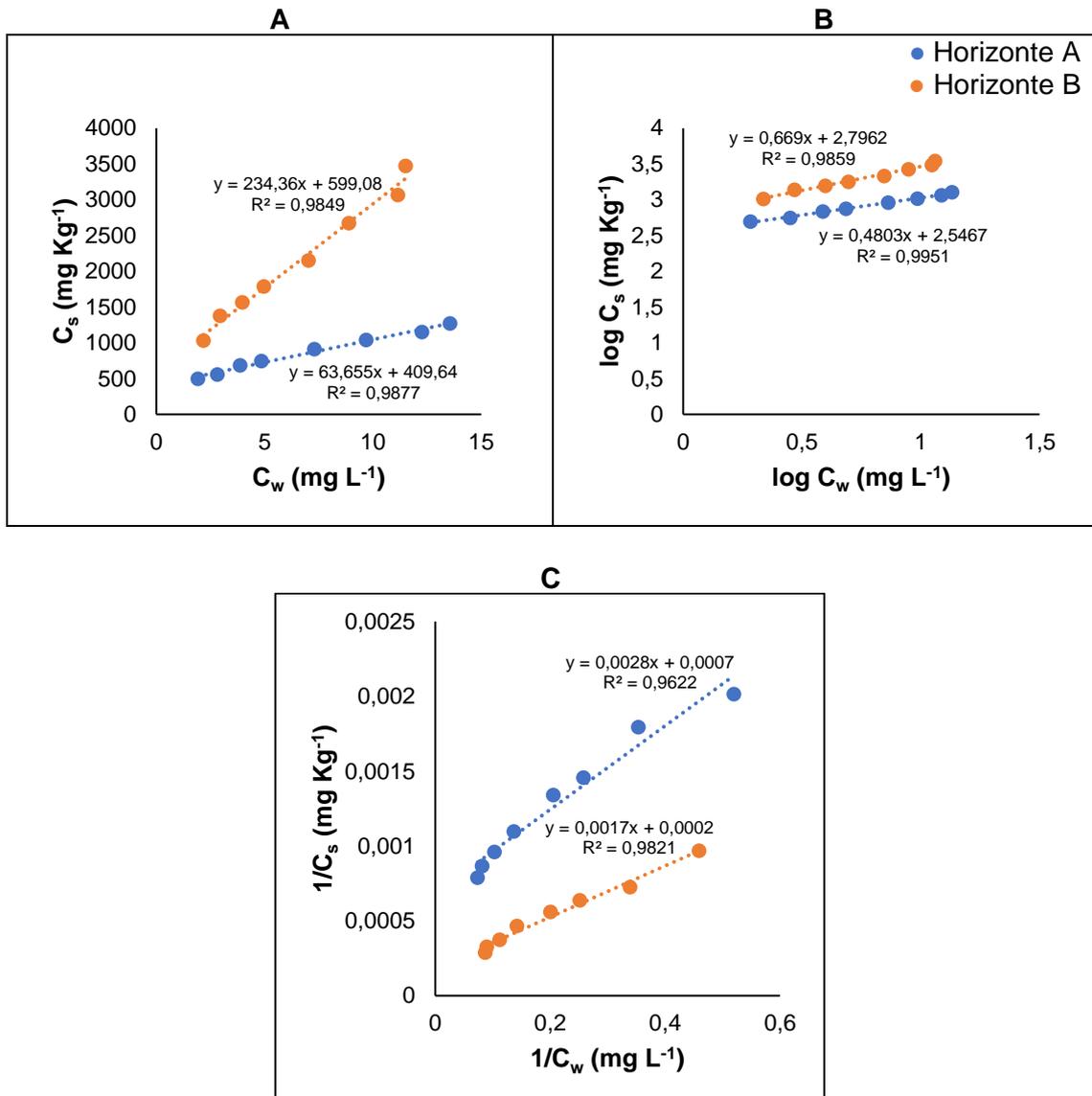


Figura 37 – Isotermas de adsorção da DOX, sem ajuste de pH, de acordo com os modelos linear (A), de Freundlich (B) e de Langmuir (C).
Fonte: o autor (2018).

Na adsorção, para os dois horizontes estudados, verificou-se que o modelo que mais se ajustou foi o de Freundlich, pois consistiu ao que apresentou maior R^2 na equação da reta.

Os gráficos que demonstram as correlações no processo de dessorção da DOX são apresentados na Figura 38, seguindo os mesmos parâmetros de construção empregados no de adsorção.

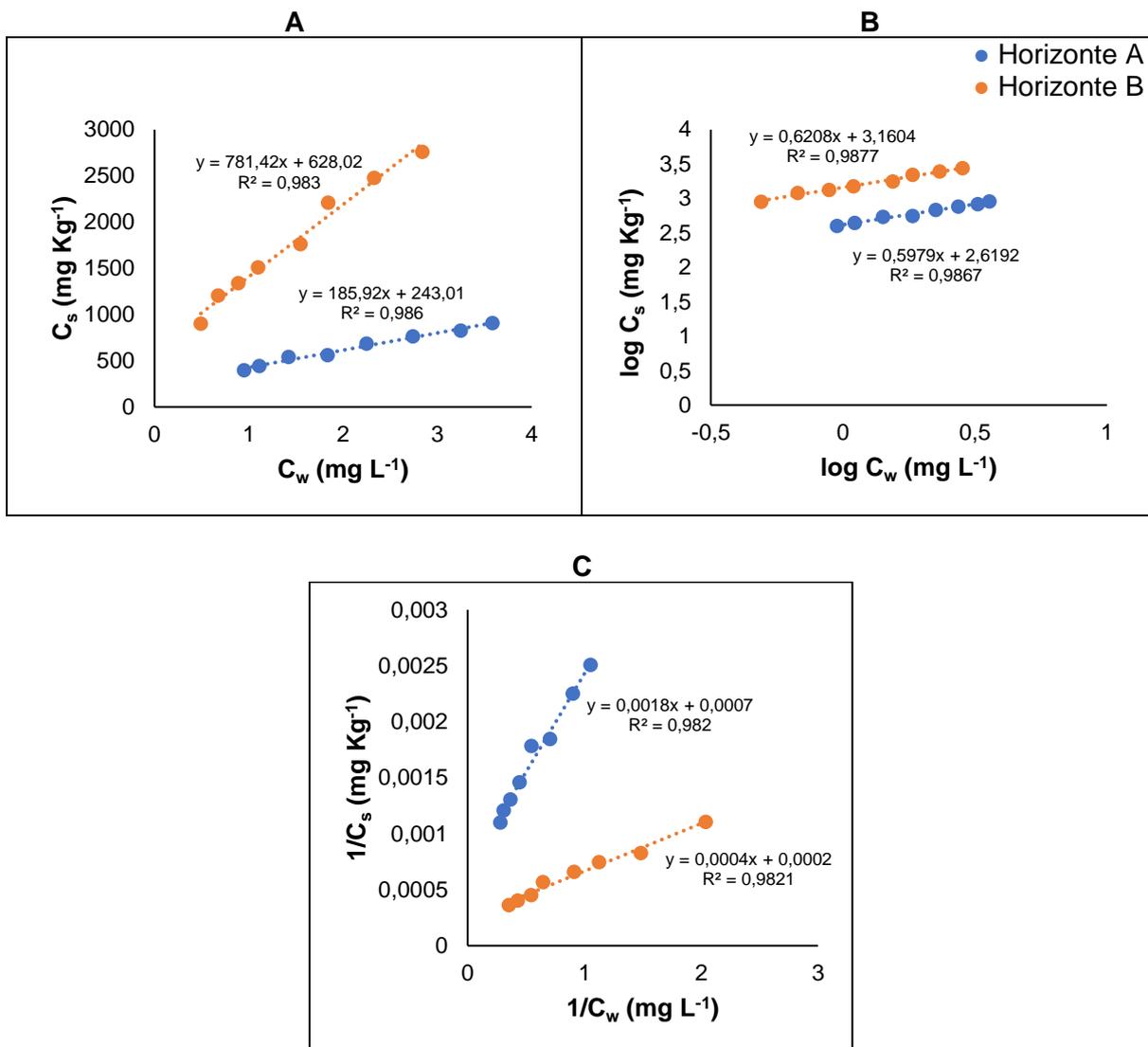


Figura 38 – Isotermas de dessorção da DOX, sem ajuste de pH, de acordo com os modelos linear (A), de Freundlich (B) e de Langmuir (C).
Fonte: o autor (2018).

Na dessorção, para os dois horizontes estudados, também se verificou que o modelo que mais se ajustou foi o de Freundlich, pois se traduziu como o de maior R^2 na equação da reta.

A partir da análise das informações adquiridas por meio da construção das isotermas de adsorção e dessorção nos dois horizontes, sem ajuste de pH, repetiram-se, assim, como no estudo com a AMOX, o mesmo experimento de forma isolada para cada condição de acidez anteriormente determinada, visando se obter as isotermas correspondentes e saber em qual modelo, sob tais condições, a DOX melhor se amoldaria. A Tabela 14 apresenta os valores de R^2 obtidos em cada modelo e nos pH estudados.

Tabela 14 – Valores de R^2 obtidos pelas isotermas de adsorção e dessorção da DOX nas três condições de acidez analisadas

Horizonte	pH	Modelo	Adsorção	Dessorção
			R^2	
A	6,5	Linear	0,9653	0,9580
		Freundlich	0,9749	0,9698
		Langmuir	0,9430	0,9474
	4,8	Linear	0,9696	0,9664
		Freundlich	0,9910	0,9798
		Langmuir	0,9693	0,9599
	3,0	Linear	0,9335	0,9661
		Freundlich	0,9955	0,9870
		Langmuir	0,9379	0,9507
B	6,5	Linear	0,9608	0,9549
		Freundlich	0,9629	0,9592
		Langmuir	0,9145	0,9365
	4,8	Linear	0,9651	0,9660
		Freundlich	0,9692	0,9731
		Langmuir	0,9047	0,9570
	3,0	Linear	0,9732	0,991
		Freundlich	0,9925	0,9945
		Langmuir	0,9838	0,9884

Fonte: o autor (2018).

Ao examinar os valores de R^2 obtidos nas isotermas com ajuste de pH, observaram-se que os números gerados demonstram que o fármaco seguiu a mesma tendência verificada nas isotermas sem ajuste, ou seja, a DOX melhor se adequou ao modelo de Freundlich, nos dois horizontes e nas três condições de acidez analisadas.

Por meio da análise da Figura 39 é possível visualizar as isotermas de adsorção e de dessorção nos dois horizontes com pH ajustado e, em seguida, compará-las com as isotermas sem ajuste (pH 7,0-7,5), mediante à utilização do modelo de Freundlich.

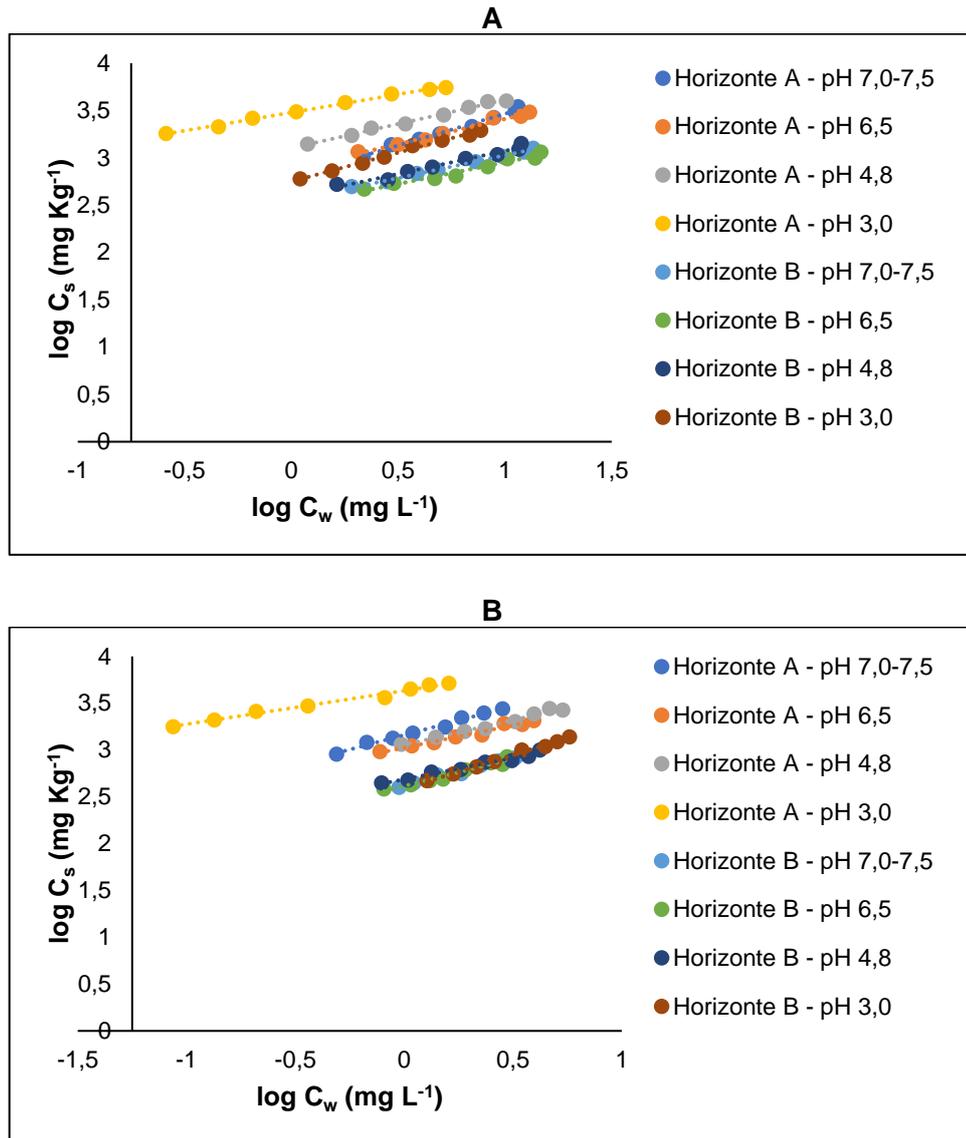


Figura 39 – Isothermas de adsorção (A) e de dessorção (B) da DOX com e sem ajuste de pH nos dois horizontes estudados.
Fonte: o autor (2018).

Observando a Figura 39, foi possível certificar que os processos de adsorção e dessorção ocupam regiões distintas em ambos os gráficos, da mesma forma que antes foi notado com a AMOX e isso, possivelmente, se deve, também, às diferentes interações que a DOX realiza com os constituintes morfológicos dos diferentes horizontes, que apresentam discrepâncias, como foi verificado ao analisar as Tabelas 4 e 5 (**item 5.1**). A Tabela 15 apresenta as constantes e outras variáveis que se obteve com a construção das isothermas e as relações de interação do fármaco com as variáveis estudadas.

Tabela 15 – Constantes e parâmetros obtidos para a DOX a partir do ajuste das isotermas ao modelo de Freundlich

Horizonte	pH	Fenômeno	K_F (mg Kg ⁻¹)	1/n	n	Capacidade
A	± 7,5	Adsorção	625,46	0,669	1,49	Elevada
	6,5	Adsorção	756,66	0,5315	1,88	Elevada
	4,8	Adsorção	1.267,36	0,5029	1,99	Elevada
	3,0	Adsorção	3.010,23	0,3847	2,60	Elevada
	± 7,5	Dessorção	1.446,77	0,6208	1,61	Elevada
	6,5	Dessorção	1.058,28	0,4784	2,09	Elevada
	4,8	Dessorção	1.138,15	0,5264	1,90	Elevada
	3,0	Dessorção	4.300,31	0,3579	2,79	Elevada
B	± 7,5	Adsorção	352,13	0,4803	2,08	Elevada
	6,5	Adsorção	312,68	0,4579	2,18	Elevada
	4,8	Adsorção	385,74	0,4876	2,05	Elevada
	3,0	Adsorção	561,82	0,6101	1,64	Elevada
	± 7,5	Dessorção	416,10	0,5979	1,67	Elevada
	6,5	Dessorção	412,38	0,5861	1,71	Elevada
	4,8	Dessorção	486,74	0,4551	2,20	Elevada
	3,0	Dessorção	387,43	0,7156	1,40	Elevada

Fonte: o autor (2018).

Examinando a Tabela 15, é possível verificar que os indicadores de eficiência na retenção da DOX neste tipo de latossolo avaliado demonstram a elevada capacidade de adsorção e dessorção deste fármaco, com valores de $K_F > 150$ (Tabela 3) (**item 3.4**), para todas as variáveis a que este antibiótico foi submetido no presente estudo (REGITANO; OLIVEIRA Jr., 2016).

Tendo em vista os dados fornecidos pela Tabela 15, é possível verificar que os K_F gerados nos estudos das isotermas de adsorção e de dessorção da DOX apresentam valores muito altos, quando comparados aos obtidos, inicialmente, com a AMOX. Logo, é fato notório que a DOX tem uma forte interação com os componentes dos dois horizontes deste latossolo estudado. É visto, também, que quando correlacionam os valores de K_F gerados nos horizontes A em relação aos do horizonte B, os resultados obtidos mostram valores mais altos no primeiro, chegando a ser quase 6 vezes maiores em condição de acidez extrema (pH 3,0), como verificado no processo de adsorção. Foi observado que o K_F tem um aumento significativo nos processos de adsorção e dessorção no horizonte A, na medida em que o pH diminui, enquanto que no horizonte B, apesar desse comportamento favorecer a adsorção, isso não ocorreu, implicando em valores de K_F mais baixos para esse horizonte.

Diferente de como ocorreu ao se estudar os processos de retenção da AMOX, a DOX parece sofrer influência positiva (favorável) do pH na adsorção nos dois horizontes. A presença de matéria orgânica, em quantidade relevante, e uma maior porcentagem de argila apenas no horizonte A (Tabelas 4 e 5) (**item 5.1**) também podem ter contribuído de forma positiva nos processos que regem a sorção da DOX neste tipo de latossolo avaliado.

A sorção da maioria dos antibióticos no solo é especialmente influenciada pelo pH, MOS e constituintes da fração argila, e antibacterianos do grupo das tetraciclina, como a DOX, seguem esse mesmo comportamento (REGITANO; LEAL, 2015; ALBERO *et al.*, 2018).

Teixidó *et al.* (2012), ao estudarem a sorção de quatro tetraciclina – oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina – em 15 solos naturais de diferentes locais espanhóis, concluíram que a sorção desses antibióticos no solo é governada por vários fatores, na seguinte ordem de importância: pH, CTC (dominante no pH ácido-neutro do solo), teor de metais de transição e textura. Ressaltaram, também, que as tetraciclina são adsorvidas por vários mecanismos, como atração eletrostática, troca catiônica e complexação de superfície com óxidos metálicos.

Apesar desses autores não descreverem a influência da MOS na retenção de tetraciclina, de acordo estudo apresentado no **item 5.8**, ao menos no que diz respeito à DOX, se constatou que a matéria orgânica poderia ter exercido influência na retenção desse antibiótico no latossolo avaliado, como foi mostrado pela análise dos resultados obtidos com esses experimentos. De acordo com Brady e Weil (2013), a presença no solo de material húmico carregado exerce influência significativa na capacidade e intensidade dos fenômenos que regem a sorção de moléculas orgânicas; e isso parece que se confirmou com este fármaco.

Regitano e Leal (2010) relataram que, na Alemanha, resíduos de antibióticos da classe das tetraciclina foram detectados em poucas ou mesmo nenhuma das amostras de água analisadas, devido à forte interação que as tetraciclina apresentam com material orgânico e/ou mineral do solo/sedimento.

Como foi descrito, anteriormente, no estudo com a AMOX, a fração argila deste latossolo é composta, em sua grande maioria, por caulinita e menores quantidades de goethita e gibbsita. A presença desses minerais na fração argila podem, assim como ocorreu com a AMOX, ter um papel determinante na retenção da DOX no solo. As características de carga variável da caulinita, somadas à capacidade que os óxidos

apresentam para atrair eletrostaticamente formas aniônicas de compostos orgânicos com caráter ácido (como as tetraciclinas), podem favorecer os processos de sorção (KER *et al.*, 2015; REGITANO; OLIVEIRA Jr., 2016).

Apesar da baixa CTC presente neste solo (Tabelas 5 e 6) (**item 5.1**) para a DOX, forças eletrostáticas, troca de cátions e reações de superfície com os óxidos poderiam influenciar no potencial de sorção desse antibiótico (TEIXIDÓ *et al.*, 2012). Assim como ocorreu com a AMOX, é esperado que este composto anfótero, por sua polaridade e grupos funcionais ionizáveis, interaja sob diferentes condições de pH com óxidos de ferro (goethita) e alumínio (gibbsita) e argilominerais (caulinita) presentes na fração argila; da mesma forma que isso pode acontecer com os grupos polares dos ácidos húmicos presentes na MOS (REGITANO; LEAL, 2015).

Com relação à diminuição no processo de adsorção da DOX no horizonte B, inclusive em condições de acidez extrema (pH 3,0), um mecanismo que poderia explicar esse comportamento do fármaco tem relação com o seu pK_{a1} , que tem valor 3,4. De acordo com Regitano e Leal (2015), para tetraciclinas como a clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina, uma faixa de pH com valores de pK_a abaixo de 3,3 faz com que esses antibióticos permaneçam em maior quantidade na sua forma catiônica. Como este solo apresenta baixa CTC nos dois horizontes, isso implicaria em baixa interação com a fração argila, incluindo os óxidos, que são mais reativos com formas aniônicas; além deste horizonte, praticamente, não apresentar matéria orgânica como seu componente, que devido às suas cargas negativas disponíveis e altamente reativas, poderia interagir com as formas catiônicas da DOX. Esses fatores somados podem estar interferindo na retenção da DOX sob tais condições e, assim, consequentemente, diminuir sua sorção no solo.

Ainda que a DOX tenha apresentado, no presente estudo, valores de K_F muito elevados, evidenciando alta retenção desse antibiótico no solo, resíduos de tetraciclinas foram identificados e quantificados, por outros autores, em amostras de água de superfície, águas subterrâneas, estações de tratamentos de efluentes e outros ambientes aquáticos (BORGHI; PALMA, 2014). Por esse motivo, se faz necessária a realização de estudos mais detalhados, incluindo avaliação de processos de transporte e de transformação, que não foram realizados no presente trabalho, para melhor compreender sua dinâmica nos solos e em outros tipos de matrizes.

5.10 Estudo de atividade microbiana, biomassa e coeficiente metabólico

A finalidade desta parte da metodologia foi verificar a sensibilidade de atributos microbiológicos do solo, ao avaliar o impacto, a curto prazo (período de 10 dias), que os antibacterianos AMOX e DOX promovem, de forma isolada, nesses bioindicadores de qualidade do solo.

A atividade microbiana foi o primeiro indicador de qualidade do solo a ser investigado e as Figuras 40 e 41 apresentam os gráficos do comportamento da atividade microbiana em função das diferentes doses de antibióticos inseridas nas amostras de solo, respectivamente para a AMOX e DOX.

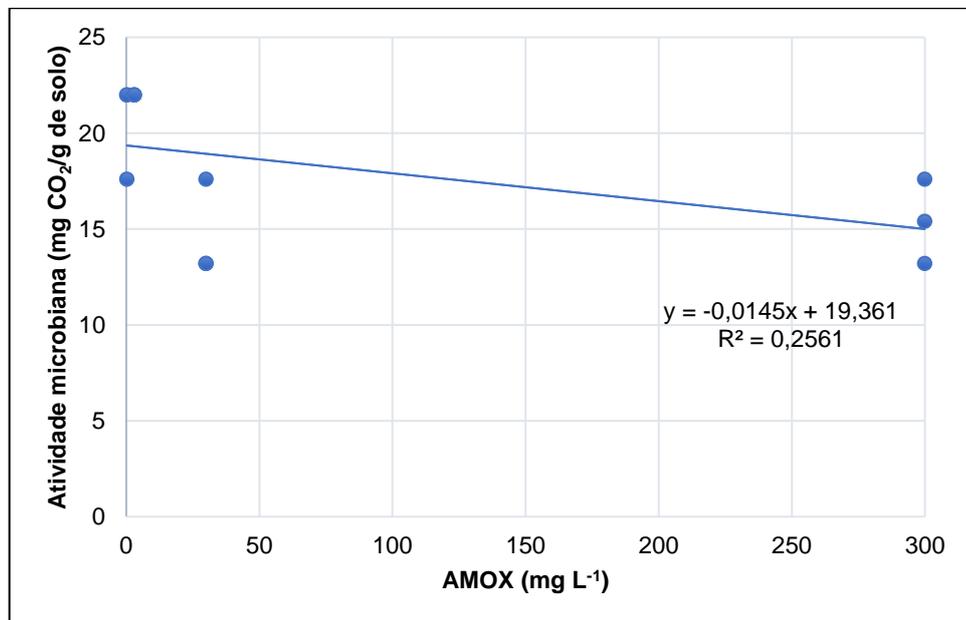


Figura 40 – Gráfico da atividade microbiana em mg CO₂/g de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico AMOX, no período de incubação de 10 dias a $\pm 28^{\circ}\text{C}$.

Fonte: o autor (2018).

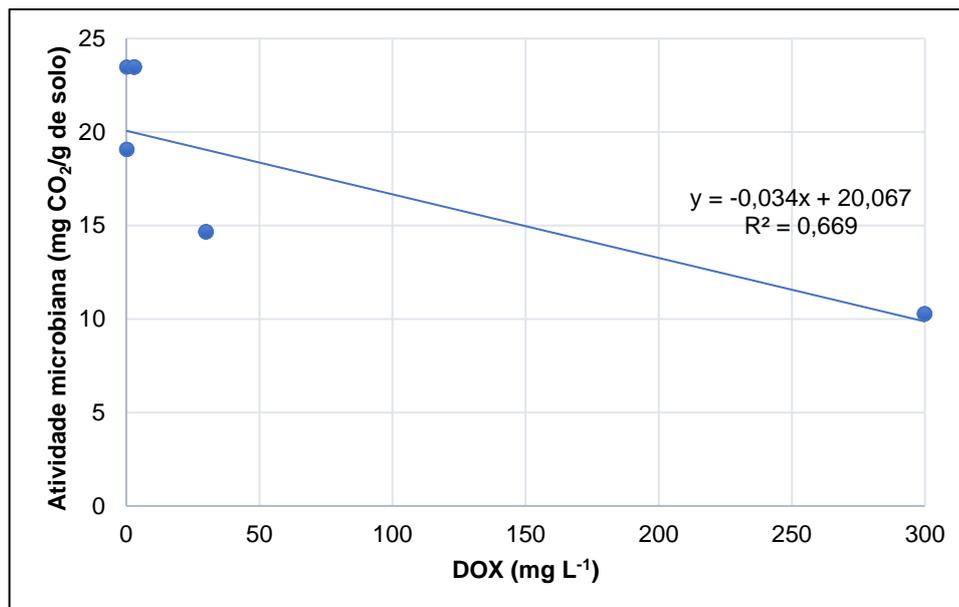


Figura 41 – Gráfico da atividade microbiana em mg CO₂/g de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico DOX, no período de encubação de 10 dias a $\pm 28^{\circ}\text{C}$.
Fonte: o autor (2018).

Inicialmente, foi possível observar, pela Figura 40, que – em uma primeira análise – a atividade microbiana apresentou queda, à medida em que as doses de AMOX aumentaram, podendo evidenciar uma condição de perturbação à microbiota presente no solo. Entretanto, isso deve ser visto com cautela, pois o coeficiente de correlação (R^2) revelou-se baixo, com a variável dependente (mg CO₂) sendo pouco explicativa para as diferentes doses de antibiótico (variável independente), as quais a microbiota do solo foi exposta. Isso pode indicar pouca influência das concentrações crescentes de AMOX sobre a atividade microbiana.

Já com a DOX, (Figura 41), o R^2 foi mais explicativo, com 66,9% da variável dependente sendo explicada pelas concentrações deste fármaco na regressão linear. Logo, à medida em que as doses do antibiótico testado aumentaram, a atividade foi decaindo, de forma progressiva, sendo um indício de condição de maior estresse microbiano. Sendo assim, evidenciou-se que o efeito promovido pela ação da DOX sobre a microbiota do solo foi mais significativo que o gerado pela AMOX, inclusive com melhor ajuste de equação na análise de regressão.

No que se refere à biomassa em peso de carbono, um dos componentes formadores da matéria orgânica do solo, são demonstrados nas Figuras 42 e 43, os gráficos com os resultados da biomassa microbiana (C_{mic}) em função das diferentes

doses dos dois antibióticos em que se submeteu as amostras de solo, respectivamente.

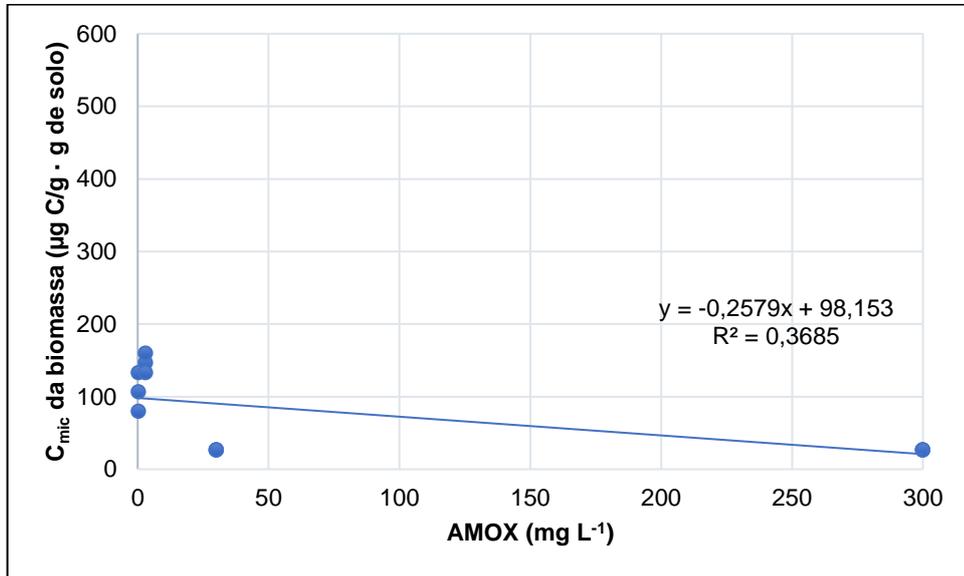


Figura 42 – Gráfico do carbono estimado da biomassa microbiana, em $\mu\text{g C/g} \cdot \text{g}$ de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico AMOX, no período de incubação de 10 dias a $\pm 28^\circ\text{C}$.
Fonte: o autor (2018).

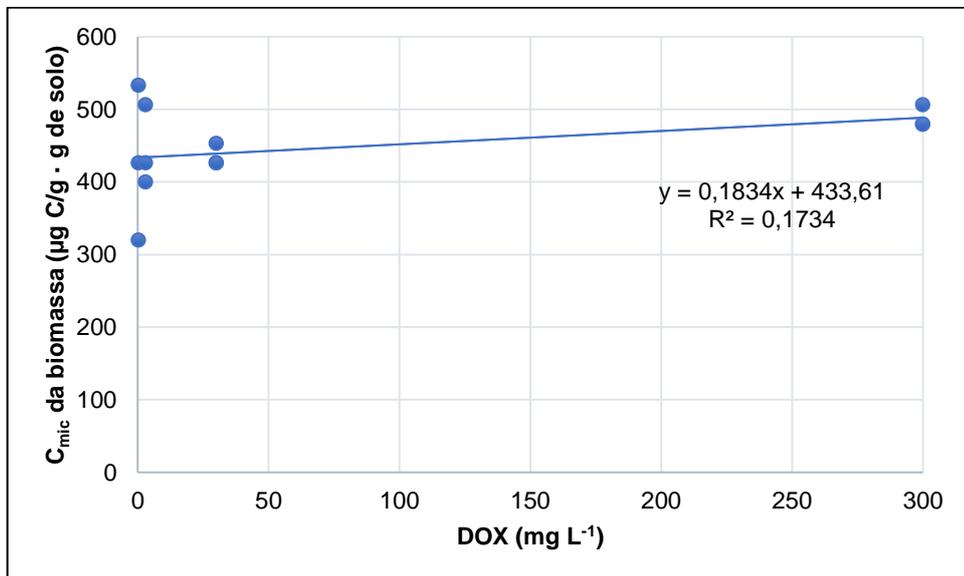


Figura 43 – Gráfico do carbono estimado da biomassa microbiana, em $\mu\text{g C/g} \cdot \text{g}$ de solo em relação a diferentes concentrações do antibiótico DOX, no período de incubação de 10 dias a $\pm 28^\circ\text{C}$.
Fonte: o autor (2018).

Examinando os gráficos mostrados nas Figuras 42 e 43, notou-se que ocorreram diferenças na formação de biomassa microbiana nas amostras contendo os diferentes antibióticos. Enquanto que nas amostras de solo contaminadas com

AMOX se verificou uma diminuição acentuada na formação de biomassa, nas amostras de solo enriquecidas com DOX o carbono estimado da biomassa dos microrganismos, aparentemente, teve um aumento discreto, mesmo quando estes organismos estiveram submetidos a condições ambientais que envolviam dosagens mais altas deste antibiótico. Da mesma forma que foi observado ao analisar o efeito da AMOX sobre a atividade microbiana, o R^2 obtido para a análise com a DOX foi muito baixo, podendo indicar que esse ajuste não seja significativo, assinalando falta de efeito sobre a biomassa microbiana à exposição desse antibiótico.

Apesar de não ter sido verificada, de forma clara, uma diminuição da atividade microbiana quando a microbiota deste solo estava suscetível aos efeitos da AMOX, a influência desse antibiótico sobre a biomassa foi confirmada. Porém, é importante destacar que para a DOX, isso não foi evidenciado, podendo implicar em nenhum impacto desse antibiótico sobre a microbiota do solo, determinado por um possível aumento da biomassa nas amostras de solo contendo este antibacteriano. Concluindo, a exposição dos microrganismos do solo à AMOX causou redução da biomassa e pouco ou nenhum efeito sobre a atividade microbiana, enquanto que a DOX reduziu a atividade e praticamente não promoveu efeito sobre o carbono da biomassa microbiana.

Kotzerke *et al.* (2011) investigaram os efeitos do esterco de porco contaminado com AMOX na comunidade microbiana de dois diferentes solos (um *Orthic Luvisol* e um *Gleyic Cambisol*), provenientes da Alemanha, ao longo de um período de incubação de 18 dias. Por meio de análises coulométricas e técnicas de extração e quantificação, como cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massa (LC-MS), os autores concluíram que a respiração basal no solo não foi influenciada pela adição do antibiótico com esterco. Em contrapartida, a cinética da respiração induzida pelo substrato e a transformação do nitrogênio foram claramente alterados pelos tratamentos empregados logo após a adição de esterco contaminado com a AMOX, indicando que as perturbações causadas aos microrganismos do solo têm relação com a presença de substrato e com as concentrações do fármaco na matriz.

Os β -lactâmicos são fármacos que apresentam baixa estabilidade no ambiente (CHRISTIAN *et al.*, 2003). A AMOX corresponde a um antibacteriano β -lactâmico e deve seguir esse comportamento nos mais variados tipos de matrizes. A sua baixa permanência e alta degradação no solo devem amenizar o impacto promovido aos microrganismos, principalmente em períodos que ultrapassam sua meia vida nos

solos (REGITANO; LEAL, 2015). De acordo com Binh *et al.* (2007), a adição de esterco de porco contaminado com AMOX tem efeitos transitórios na comunidade microbiana do solo. Apesar deste antibiótico impactar negativamente a microbiota no início da exposição, ocorre efeito contrário após períodos mais prolongados – com ou sem contato com esse fármaco –, pois promove aumento da comunidade microbiana, resistência a múltiplos antibióticos e transferência dessas informações genéticas ao longo de toda comunidade bacteriana do solo.

Ao estudarem o impacto ocasionado pela oxitetraciclina (OTC) e o sulfametoxazol (SMX) aos microrganismos de um solo franco-arenoso iraniano, Molaei *et al.* (2017) averiguaram que esses antimicrobianos produziram diferentes efeitos na atividade/respiração cumulativa e biomassa microbiana. O antibiótico SMX afetou significativamente a biomassa e atividade microbiana cumulativa, ocasionando diminuição nos valores obtidos para esses indicadores, à medida em que se aumentou a concentração do fármaco e o tempo de incubação, em um experimento de 21 dias, pelos métodos extração-fumigação e titulação com NaOH, respectivamente. O antibiótico OTC, por outro lado, somente provocou diminuição da atividade cumulativa e não acarretou influência clara na biomassa durante o intervalo de tempo avaliado.

Avaliando os efeitos de uma sulfonamida (sulfapiridina) e uma tetraciclina (oxitetraciclina) sobre a microbiota presente em dois tipos de solos alemães, um *Eutric Cambisol* e um *Albic Luvisol*, Thiele-Bruhn e Beck (2005) relataram que nenhum desses antibióticos desencadearam alterações na atividade microbiana, em dois diferentes ensaios para este indicador: respiração basal e atividade da enzima desidrogenase. Porém, ao pesquisarem os efeitos na biomassa, descreveram que a sulfapiridina promoveu decaimento do valor nas amostras após 14 dias de incubação pelo método de extração-fumigação, enquanto que a oxitetraciclina não exerceu efeito significativo sobre esse indicador. Concluíram que ambos os fármacos exerceram uma pressão seletiva na comunidade microbiana do solo, acarretando dominância fúngica, quantificada por aumento de ergosterol nas amostras com os dois tipos de solo, enquanto que o número de bactérias diminuiu após esse período. A OTC, sendo uma tetraciclina, apresentou o mesmo comportamento demonstrado pela DOX neste tipo de ensaio, confirmando de certa forma, uma tendência evidenciada por antibióticos pertencentes à essa mesma classe ou grupo químico.

Quin *et al.* (2018) investigaram, empregando o método de extração-fumigação, o efeito de diferentes fertilizantes contaminados com OTC sobre a biomassa de um

ustalf procedente da província de Shanxi, China, e esse estudo revelou que esse antibiótico afetou negativamente a biomassa, concluindo que perturbações causadas por esse fármaco podem ser geradas ou amenizadas pela escolha de diferentes tipos de fertilizantes associados ou não a inoculantes, fornecendo uma boa base para o desenvolvimento de metodologias que visam remediar solos contaminados com essa tetraciclina.

Ma *et al.* (2016) também verificaram as consequências da exposição à microbiota de um solo da província de Liaoning, situada no nordeste da China, à OTC em um experimento com duração de 120 dias. Ao avaliarem a biomassa microbiana pelo método de extração-fumigação constataram que o alto teor de OTC no solo influenciou muito a biomassa, pois sob tais condições, a microbiota do solo consome mais energia para manter seu crescimento e metabolismo, implicando em redução numérica dos microrganismos. Entretanto, passados 28 dias de incubação e perdurando esse comportamento, após 42 dias ocorreu ligeira recuperação nos valores de biomassa, evidenciando restabelecimento da comunidade microbiana do solo. Observaram que a OTC pode ter inibido as bactérias típicas, mas não as actinobactérias ou fungos, que podem ter aumentado e contribuído com o número e função da diversidade microbiana do solo. Os autores concluíram que os efeitos da OTC nos microrganismos do solo estão associados a numerosos fatores como propriedades básicas do solo, tipos e atividades dessa comunidade, conteúdo residual de OTC e também o tempo de exposição a este fármaco.

Como mostrado por Molaei *et al.* (2017) e Thiele-Bruhn e Beck (2005), a OTC apresentou o mesmo comportamento demonstrado pela DOX na atividade e biomassa microbianas no presente estudo; seguindo, inclusive o mesmo padrão metabólico quando esses autores avaliaram a atividade/respiração cumulativa e respiração basal, respectivamente. Porém isso deve ser avaliado com cuidado, pois Quin *et al.* (2018) e Ma *et al.* (2016), apesar de avaliarem o impacto sobre a microbiota por outras metodologias e sob diferentes condições ambientais, obtiveram resultados diferentes, que relacionam diminuição da biomassa à exposição dos microrganismos do solo aos antibióticos. Dessa forma, torna-se importante a utilização de técnicas moleculares para efeito de comparação de resultados e validação de metodologias empregadas.

Cui *et al.* (2014) em um trabalho que se pesquisou a influência do ciprofloxacino (CIP), um antibiótico da classe das quinolonas, sobre a estrutura e função da comunidade microbiana de um *Ustic Cambosol* proveniente da província de Hebei,

localizada no centro-norte da China, utilizaram cromatografia a gás (GC) para mensurar a atividade do solo por quantificação de CO₂ liberado e análise de ácidos graxos derivados de fosfolipídios (PLFAs) para se obter biomassa microbiana, bacteriana e fúngica, e concluíram que o CIP diminuiu significativamente a biomassa microbiana ($p < 0,05$), mas não afetou a atividade/respiração do solo, mesmo em altas doses, em um ensaio com duração de 40 dias. Os mesmos autores confirmaram que o CIP diminuiu a proporção de bactérias para fungos e aumentou a proporção de bactérias Gram-positivas para bactérias Gram-negativas.

O CIP, assim como os antibióticos da classe das tetraciclina, como a DOX utilizada no presente estudo, é um fármaco com alta sorção no solo, implicando em baixa disponibilidade, maior persistência e menor taxa de decaimento em relação aos β -lactâmicos, como a AMOX (REGITANO; LEAL, 2015). Correlacionando os resultados obtidos por Cui *et al.* (2014), empregando uma técnica de análise molecular, com os dois antibióticos estudados neste trabalho, fica a evidência que a DOX tem um impacto menor em relação à AMOX, devido ao baixo efeito que esse antibiótico desencadeou nos microrganismos do latossolo avaliado.

Com relação ao qCO₂, que corresponde à razão entre a atividade e a biomassa microbianas, as Figuras 44 e 45 expressam a relação qCO₂ em função das diferentes doses dos antimicrobianos adicionadas às amostras de solo.

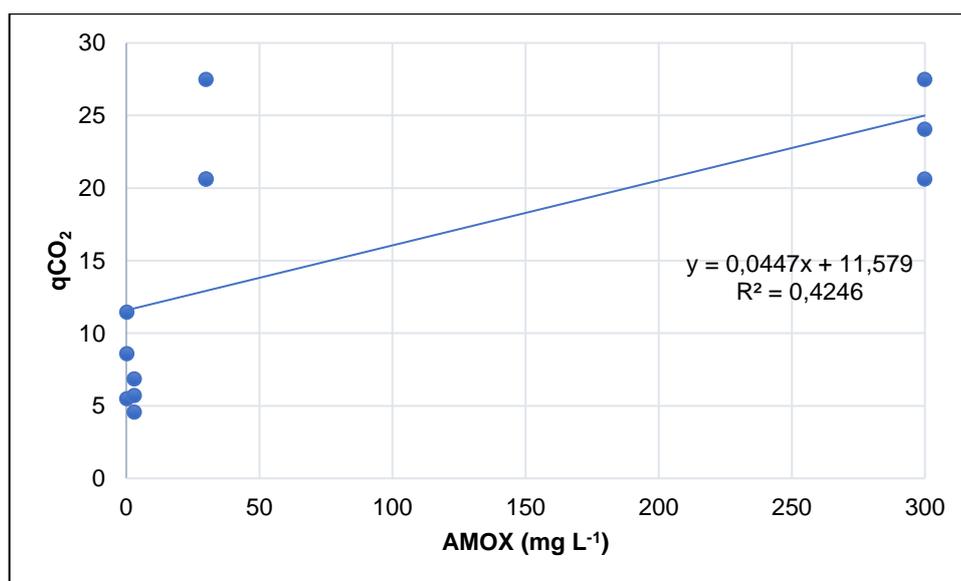


Figura 44 – Gráfico do quociente metabólico em relação a diferentes concentrações do antibiótico AMOX, no período de incubação de 10 dias a $\pm 28^{\circ}\text{C}$.
Fonte: o autor (2018).

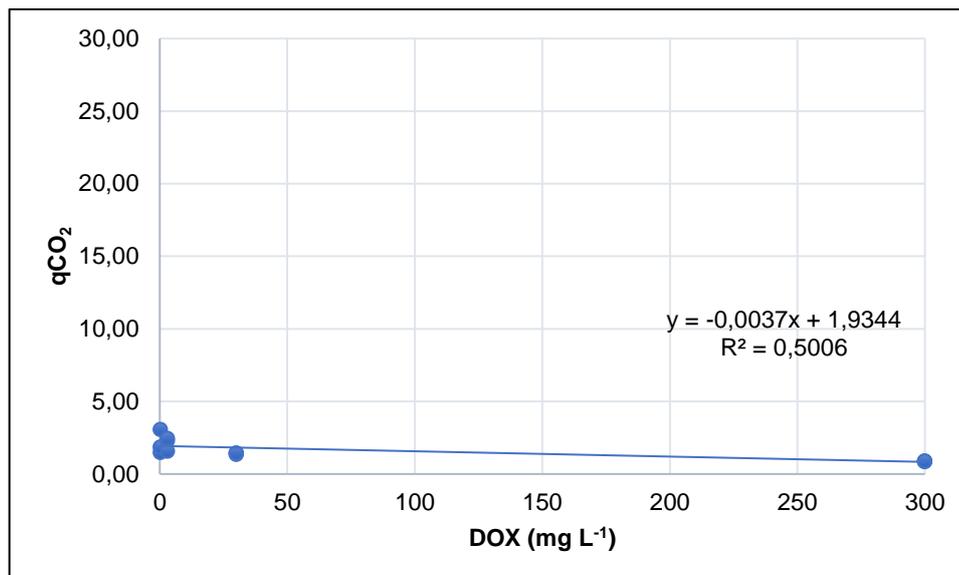


Figura 45 – Gráfico do quociente metabólico em relação a diferentes concentrações do antibiótico DOX, no período de encubação de 10 dias a $\pm 28^{\circ}\text{C}$.
Fonte: o autor (2018).

Analisando os gráficos apresentados nas Figuras 44 e 45, foi verificado que ocorreu um comportamento oposto entre os antibióticos. Quando as amostras de solo foram sujeitas ao contato com a AMOX (Figura 44), o $q\text{CO}_2$ aumentou, significativamente, a medida em que as concentrações dos fármacos ficaram mais altas no solo, evidenciando assim, uma provável perturbação no metabolismo microbiano. Já nas amostras que continham a DOX como contaminante (Figura 45), não se verificou o mesmo comportamento observado na AMOX, ao contrário, o $q\text{CO}_2$ foi diminuindo, mesmo com as concentrações de DOX aumentando cada vez mais nas amostras.

Em um primeiro momento, teoricamente, devido à diminuição progressiva do $q\text{CO}_2$, é possível afirmar que não ocorre uma reação de estresse microbiano em relação à DOX, pois mesmo sob a influência de altas doses do antibiótico, o $q\text{CO}_2$ continuou a cair, evidenciando uma condição normal de metabolismo microbiano.

Entretanto, mesmo tendo como parâmetro o decréscimo do valor do $q\text{CO}_2$ e uma não influência sobre o aumento do carbono estimado da biomassa microbiana, sob condições biológicas reais, não é possível afirmar que os microrganismos estão isentos de sofrerem alterações metabólicas quando sujeitos ao contato com a DOX, pois a atividade microbiana teve queda, e isso é uma evidência de perturbação no metabolismo respiratório microbiano.

Muitos compostos, principalmente os xenobióticos, podem exercer influência significativa no metabolismo microbiano, e isso pode não ser percebido ou quantificado pelos indicadores utilizados nos experimentos. De um modo geral, os microrganismos precisam de um período para se adaptarem à presença dessas substâncias em seus habitats e organismos, mas dependendo da forma, intensidade e tempo da exposição a determinados agentes, nem sempre isso ocorre em um intervalo hábil para surgirem adaptações. Entretanto, essas adequações a novas condições ambientais acontecem e isso pode ter implicações negativas sobre as comunidades microbianas do solo e ser impactante até para o ser humano (BINH *et al.*, 2007; WILLING; RUSSELL; FINLAY, 2011; MA *et al.*, 2014; CETECIOGLU *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2016).

Reichel *et al.* (2013) investigando os efeitos ocasionados por lama de suínos medicados com sulfadiazina (SDZ) e difloxacina (DIF) na diversidade estrutural microbiana de um solo rizosférico (*Iuvisol*) da Alemanha, observaram um aumento significativo no qCO₂ resultante de uma concentração de 1,0 mg de SDZ por quilo de solo, em um experimento com duração de 63 dias; e concluíram que isto reflete uma resposta de alta perturbação à comunidade microbiana do solo a esse antibiótico. Esses autores também verificaram que a forte sorção de DIF para a matriz não eliminou o efeito da lama dos porcos medicados com DIF na composição da comunidade microbiana.

Ao examinar os efeitos da matéria orgânica dissolvida (MOD), extraída do esterco de porco, e de sua combinação com o antibacteriano clortetraciclina, na diversidade funcional da comunidade microbiana do solo na China, Liu *et al.* (2014) verificaram que a atividade enzimática microbiana, determinada pelas enzimas desidrogenase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina e urease, aumentava na presença de MOD, mas quando essa estava enriquecida com clortetraciclina, este antibiótico causou a redução da diversidade funcional e da atividade enzimática de todas as enzimas avaliadas; além de aumentar a biodisponibilidade desse fármaco no solo.

Efeito contrário ao observado por Liu *et al.* (2014) foi verificado por Binh *et al.* (2007) ao estudarem os efeitos a curto prazo da AMOX sobre às comunidades microbianas de solos adubados da Alemanha. Esses autores ao examinarem dois solos por meio de técnicas moleculares de quantificação e identificação, concluíram que a presença de esterco no solo, além de promover aumento significativo no número de unidades formadoras de colônia (UFC) pode desencadear crescimento no número

de bactérias resistentes à AMOX e a outros antibióticos, afetando assim, a estrutura e função de toda comunidade bacteriana.

De um modo geral, esse estudo indicou que classes ou grupos químicos distintos de antibióticos acarretam diferentes impactos à microbiota do solo. Segundo Kotzerke *et al.* (2011), a AMOX é um fármaco com baixas taxas de recuperação no solo, tem degradação rápida e, conseqüentemente, baixa persistência. Porém, Kim *et al.* (2012) descreveram que ela é um composto que apresenta baixa retenção, implicando em alta mobilidade, é muito influenciada pelo pH, presença de MO e teores de argila do solo. Apesar do latossolo matriz-objeto deste trabalho apresentar elevada acidez (pH 3,9) – o que favoreceria sua retenção –, o teor de matéria orgânica é médio e este contém uma textura argilosa, condições que dificultam sua sorção neste solo. Esses fatores poderiam fazer com que esse fármaco permanecesse disponível por um tempo maior dissolvido na fração coloidal e, mesmo em pequenas concentrações, desencadearia efeitos significativos nos microrganismos, influenciando negativamente e a curto prazo, a microbiota do solo (THIELE-BRUHN; BECK, 2005; BINH *et al.*, 2007).

Com relação a DOX, o seu efeito sobre os microrganismos do solo poderia ter sido comprometido, retardado ou atenuado. Apesar dela apresentar baixa degradação e um maior tempo de persistência no solo, seguindo o padrão demonstrado pelas tetraciclina, de um modo geral, e devido às interações desse antibiótico com este tipo de matriz, sob as mesmas condições as quais a AMOX foi exposta, esse fármaco apresenta alta retenção no solo, principalmente na presença de argilominerais como a caulinita e óxidos de ferro (goethita) e alumínio (gibbsita), constituintes da sua fração argila. Por esse motivo a DOX acaba permanecendo, na maior parte do tempo em que se encontra inserida no solo, indisponível na fração coloidal; promovendo, dessa forma, pouca ou breve perturbação à microbiota do solo (THIELE-BRUHN; BECK, 2005; Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

O presente estudo mostrou, experimentalmente, que antibióticos como a AMOX e a DOX acarretaram perturbações em alguns indicadores da qualidade microbiana do solo, como os investigados. Contudo, se verificou que esses efeitos são específicos para cada fármaco, não ocorrendo da igual maneira, mesmo se padronizando variáveis como tipo de matriz (neste caso o solo), dosagens e tempo de exposição.

Essas diferenças ocorrem, principalmente, pela forma como esses fármacos interagem com o tipo de matriz a qual estão inseridos, ou seja, devido a características

químicas intrínsecas, tempo de persistência e, também, pela forma de dissipação no ambiente (MA *et al.*, 2014; REGITANO; LEAL, 2015).

A pesquisa por meio de outros trabalhos com substâncias bioativas, como os antimicrobianos, e analisando outros indicadores merece atenção; e deveriam ser realizados, para entender melhor o efeito que esses compostos podem desempenhar, a curto e longo prazo, sobre os microrganismos presentes no solo, assim, avaliando o seu impacto sobre organismos que destes dependem, incluindo, principalmente, o ser humano.

5.11 Estudo de fitotoxicidade

Com o objetivo de avaliar se os fármacos estudados poderiam exercer alguma influência na germinação de sementes, uma espécie de vegetal foi escolhida – o feijão-carioca (*Phaseolus vulgaris*) –, em concordância com o Guia 208, da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e, também, seguindo as recomendações da norma E1963 – 09, do Guia Padrão para Realização de Testes de Toxicidade em Plantas, da Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM).

O emprego do feijão-carioca nos ensaios que se seguiram se deu, também, devido ao curto prazo de germinação das sementes desta leguminosa e ao rápido crescimento das plântulas e desenvolvimento do vegetal como um todo.

Os resultados dos ensaios realizados nas placas de Petri, empregando o antibiótico AMOX como contaminante e tendo como substrato o papel de filtro, são demonstrados pelas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 – Taxas de germinação das sementes de feijão (%) em placas de Petri, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de AMOX em 4 tempos distintos

		TEMPO (h)			
		48	72	96	168
AMOX (mg L⁻¹)	Controle	6,0	96,0	99,0	100,0
	0,03	4,0	98,0	99,0	100,0
	0,3	4,0	96,0	99,0	99,0
	3,0	3,0	94,0	97,0	99,0
	30,0	4,0	98,0	99,0	99,0
	300,0	5,0	97,0	99,0	100,0
			CV(%) = 3,84 SE(%) = 1,43		

Médias seguidas nas mesmas linhas e nas mesmas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5,0% de probabilidade.

Fonte: o autor (2018).

Tabela 17 – Crescimento das radículas de sementes de feijão (cm), avaliado após exposição a diferentes concentrações de AMOX em 4 tempos distintos

		TEMPO (h)			
		48	72	96	168
AMOX (mg L⁻¹)	Controle	0,24 a	5,52 a	9,16 a	11,30 a
	0,03	0,58 a	5,11 a	8,78 a	10,06 b
	0,3	0,66 a	4,99 a	7,84 b	8,85 c
	3,0	0,31 a	4,02 b	6,35 c	7,90 d
	30,0	0,38 a	3,77 b	5,29 d	6,27 e
	300,0	0,61 a	3,48 b	4,83 d	5,92 e
			CV(%) = 15,51 SE(%) = 0,20		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5,0% de probabilidade.

Fonte: o autor (2018).

De acordo com as análises estatísticas, não ocorreu diferença significativa entre as variáveis no que diz respeito à germinação das sementes de feijão (Tabela 16), presumindo que a AMOX não exerceu influência sobre este parâmetro. Porém, com relação à variável Tempo, na análise de variância, foi verificada significância nos tratamentos aplicados.

Uma vez que o principal objetivo deste estudo foi o de avaliar se as concentrações dos antibacterianos empregados influenciavam no desenvolvimento da planta, e não se observou diferenças estatisticamente consideráveis para este parâmetro, como ocorreu quando se verificou as taxas de germinação das sementes

de feijão na placa de Petri, perdeu-se a necessidade de inserir essas informações (tratamentos) na tabela. Normalmente, quando se aplica um tratamento estatístico e este não gera uma diferença significativa na saída desta análise, fica opcional a descrição de outras informações obtidas com esses tratamentos estatísticos. Logo, foram demonstradas na Tabela 16, apenas as taxas de germinação em relação às dosagens aplicadas, em função do tempo em que as sementes ficaram em contato com o contaminante. Também foram omitidos os tratamentos relacionados a variável Tempo, pois mesmo tendo apresentado significância na análise de variância, não ocorreu interação entre as duas variáveis (Concentração x Tempo), além de já ser esperado sucederem mudanças morfológicas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento de um vegetal no decorrer do tempo (SOUZA; FLORES; LORENZI, 2013).

Como mostrado na Tabela 17, que trata do crescimento da radícula de sementes de feijão, é possível verificar que ocorreu diferença significativa entre as variáveis, porém o tratamento aplicado e expresso nesta tabela, para este parâmetro, corresponde unicamente à interferência da concentração de AMOX de forma progressiva no distúrbio de crescimento das radículas.

Ainda em relação à Tabela 17, notou-se que no tempo de 48 h não houve diferença nos tratamentos aplicados. Entretanto, no tempo de 72 h, nos três primeiros tratamentos (incluindo o controle), ocorreu o maior crescimento das radículas e, nos três últimos, os menores comprimentos foram observados; e a medida em que se aumentou a concentração de antibiótico no substrato, menor foi o tamanho da radícula aferido. No tempo de 96 h, nos dois primeiros tratamentos (incluindo o controle), deram-se os maiores crescimentos das radículas e, nas concentrações de 30,0 e 300,0 mg L⁻¹, foram verificados os menores tamanhos, respectivamente. Com 168 h de experimento, apenas no controle se chegou ao maior tamanho de radícula e, nas duas últimas concentrações, obtiveram-se os piores resultados para este tempo avaliado.

A partir dos dados obtidos na Tabela 17, é possível constatar que a exposição das sementes a concentrações cada vez maiores, promoveram uma maior influência sobre o comprimento das radículas que, na maioria das vezes, foi diminuindo, sucessivamente, em comparação ao tamanho observado no controle. As Figuras 46 e 47 expõem algumas alterações que foram observadas nessas sementes ao final desse experimento.



Figura 46 – Imagem demonstrando o resultado do contato a diferentes dosagens de AMOX, as quais cinco sementes de feijão foram submetidas, em placas de Petri, tendo como substrato papel de filtro. Da esquerda para a direita: controle, 0,03 mg L⁻¹, 0,3 mg L⁻¹, 3,0 mg L⁻¹, 30,0 mg L⁻¹ e 300,0 mg L⁻¹.

Fonte: o autor (2018).



Figura 47 – Imagem com o resultado da exposição de uma semente de feijão (à direita) em relação ao controle (à esquerda), submetida a uma dose de 300,0 mg L⁻¹ de AMOX por um período de 168 h, em placa de Petri, tendo como substrato papel de filtro.
Fonte: o autor (2018).

Ao analisar as Figuras 46 e 47, ficou evidente o efeito promovido pela exposição das sementes de feijão a concentrações crescentes de AMOX, quando comparadas ao controle, que não teve a interferência negativa (desfavorável) do antibiótico no crescimento das radículas.

É possível observar que a medida em que as sementes tiveram contato com doses cada vez maiores desse antibiótico, o crescimento das radículas foi prejudicado, com diminuição do tamanho e presença de alterações morfológicas significativas. A formação de raízes secundárias foi visivelmente prejudicada em concentrações $\geq 3,0$ mg L⁻¹, com baixa predominância e/ou má formação; no entanto, este tipo de raiz é essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta. Em estágios mais avançados de crescimento e desenvolvimento, em algum momento, possivelmente, um vegetal nessas condições sofrerá algum tipo de deficiência estrutural ou nutricional (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os ensaios realizados diretamente em amostras de solo, ainda usando o antibiótico AMOX como contaminante, são apresentados nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18 – Taxas de germinação das sementes de feijão no solo, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de AMOX em 5 dias distintos

		TEMPO (dias)				
		7	8	10	13	15
AMOX (mg L⁻¹)	Controle	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0
	0,03	90,0	90,0	90,0	95,0	95,0
	0,3	90,0	90,0	90,0	95,0	95,0
	3,0	75,0	75,0	75,0	85,0	85,0
	30,0	85,0	85,0	90,0	90,0	90,0
	300,0	90,0	90,0	95,0	95,0	95,0
		CV(%) = 13,99				
		SE(%) = 6,26				

Médias seguidas nas mesmas linhas e nas mesmas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5,0% de probabilidade.

Fonte: o autor (2018).

Tabela 19 – Crescimento de partes aéreas nas plântulas de feijão, avaliado após exposição a diferentes concentrações de AMOX em 5 dias distintos

		TEMPO (dias)				
		7	8	10	13	15
ALTURA DO CAULE (cm)	AMOX (g L⁻¹)					
	Controle	11,54 a	12,31 a	14,03 a	15,13 a	15,93 a
	0,03	10,00 a	11,38 a	12,95 a	14,18 a	15,43 a
	0,3	8,80 a	10,58 a	11,55 a	11,80 b	12,40 b
	3,0	7,86 a	9,40 a	10,28 a	10,58 b	11,20 b
	30,0	8,45 a	9,85 a	10,65 a	11,05 b	11,03 b
300,0	10,75 a	12,25 a	12,58 a	13,38 a	13,63 a	
LARGURA DA FOLHA (cm)	Controle	3,05 a	4,42 a	5,05 a	5,50 a	6,57 a
	0,03	3,30 a	3,83 a	5,45 a	5,83 a	6,21 a
	0,3	2,80 a	3,41 a	4,83 a	5,36 a	5,59 b
	3,0	2,46 a	2,99 a	4,83 a	5,06 a	5,36 b
	30,0	3,06 a	3,54 a	4,88 a	5,07 a	5,21 b
	300,0	2,86 a	3,46 a	4,81 a	5,10 a	5,18 b
NÚMERO DE FOLHAS (unidade)	Controle	7,00 a	7,00 a	7,75 a	15,00 a	20,50 a
	0,03	7,75 a	7,75 a	8,00 a	17,75 a	20,75 a
	0,3	8,00 a	8,50 a	8,75 a	10,00 b	20,50 a
	3,0	6,00 a	6,00 a	6,00 a	8,25 b	18,00 a
	30,0	6,75 a	6,75 a	7,00 a	15,75 a	19,00 a
	300,0	8,50 a	8,50 a	8,50 a	11,75 b	17,75 a
Altura do caule		CV(%) = 19,14			SE(%) = 1,12	
Largura da folha		CV(%) = 14,76			SE(%) = 0,33	
Número de folhas		CV(%) = 20,96			SE(%) = 1,15	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5,0% de probabilidade.

Fonte: o autor (2018).

Seguindo a mesma tendência observada no ensaio com as placas de Petri, cujo substrato utilizado foi o papel de filtro, não ocorreu diferença significativa entre as variáveis, no que diz respeito à germinação das sementes de feijão no solo (Tabela 18); novamente entendendo que a AMOX não exerceu influência sobre este atributo. Entretanto, diferente do que ocorreu nos ensaios anteriores, neste experimento não se verificou nenhuma significância nas análises de variância em função do tempo, como anteriormente foi observado.

Ficou entendido, analisando as Tabelas 16 e 18, para os dois tipos de substratos utilizados, nas duas análises envolvendo o estudo de germinação de sementes de feijão, independente da concentração de AMOX a que estas foram submetidas, que não se confirmou a influência deste antibiótico nesse tipo de experimento, pois em ambos os ensaios, não se observou ao final de cada um valor inferior a 85% na taxa de germinação dessas sementes.

Bellino *et al.* (2018) ao avaliarem o efeito de quatro antibióticos, cloranfenicol (CAP), espiramicina (SPR), espectinomicina (SPT) e vancomicina (VAN), pertencentes a diferentes grupos químicos, reconheceram que a germinação de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. San Marzano) não foi afetada por estes fármacos, porém o desenvolvimento de raízes (cinética de crescimento das raízes e divisão celular) foi prejudicado. Apesar de estudarem esses efeitos empregando doses mais altas que as ambientalmente encontradas, alertam sobre a capacidade que o tomate, assim como outras plantas, apresenta para acumular antibióticos e o risco que estes compostos carregam de serem transferidos ao longo da cadeia alimentar e afetar a dinâmica populacional, assembleias comunitárias ou ecossistemas.

Com o objetivo de avaliar o risco ecológico de agroquímicos em um ambiente agrícola, efeitos tóxicos da sulfamonometoxina (SMM) e do cádmio (Cd) na germinação de sementes de trigo, couve-chinesa (*Solanum lycopersicum*) e rabanete (*Raphanus sativus* L.) foram investigados por Jin *et al.* (2015). Os resultados obtidos por esses autores mostraram que, quanto à germinação de sementes nas três culturas, este atributo não se mostrou sensível à toxicidade; e a fitotoxicidade da SMM revelou ser muito mais intensa que a do Cd.

De acordo com esses autores, parâmetros como germinação de sementes parecem não sofrer influência dos efeitos fitotóxicos de algumas classes de antibióticos, podendo incluir até metais pesados como o cádmio, porém outros

parâmetros são passíveis da interferência negativa desses compostos, como também foi confirmado com ensaios realizados no presente estudo.

No que diz respeito à avaliação de aspectos morfológicos relacionados ao crescimento das partes aéreas das plântulas de feijão, a Tabela 19 mostra os resultados obtidos para a altura do caule, a largura da folha e o número de folhas. Contudo, outros atributos também foram verificados, qualitativamente, por análise visual, como coloração e queda de folhas ou proliferação de fungos.

É importante ressaltar, antes de se analisar os dados fornecidos por essa tabela, que o tempo tende a promover um maior crescimento e desenvolvimento na planta (SOUZA; FLORES; LORENZI, 2013). Sendo assim, quanto maior o intervalo de tempo selecionado para o ensaio, maiores serão os valores obtidos, sob condições normais, para a altura do caule, largura da folha e para o número de folhas; e, provavelmente, isso se mantém na análise de outros atributos, parâmetros e estágios relacionados ao crescimento ou desenvolvimento vegetal. Trata-se de uma condição prevista no ciclo de vida de uma planta e, por esse motivo, seja esperado que essa variável tenha significância em uma análise estatística, como a do presente estudo; o que se confirmou. Então, por ser algo previamente subtendido, viu-se como desnecessário aplicar um tratamento estatístico para essa variável na Tabela 19. Isso possibilitou uma análise mais sucinta e objetiva para a discussão dos resultados obtidos.

Em relação à altura do caule e as diferenças estatísticas promovidas pelas concentrações aplicadas, foi possível verificar que houve uma diferença significativa no 13º e 15º dias de experimento, onde as letras “a” representam os melhores resultados de crescimento para este atributo (incluindo o controle) e as letras “b”, nas concentrações 0,3, 3,0 e 30 mg L⁻¹ equivalem às piores dosagens as quais as plântulas estiveram sujeitas pelos tratamentos, pois correspondem aos menores valores para o caule observados.

No que se refere à largura da folha, as diferenças estatísticas foram notadas apenas no 15º dia de análise, onde na concentração 0,03 mg L⁻¹ e controle as plântulas obtiveram os melhores resultados e nas doses 0,3, 3,0, 30,0 e 300,0 mg L⁻¹ estas alcançaram os piores valores adquiridos para este parâmetro.

Quanto ao número de folhas, as diferenças estatísticas foram notadas exclusivamente no 13º dia do ensaio, quando as plântulas obtiveram o maior número

de folhas nas concentrações 0,03, 30,0 mg L⁻¹ e no controle; e apresentaram o menor número de folhas nas concentrações 0,3, 3,0 e 300 mg L⁻¹.

As Figuras 48 e 49 mostram algumas alterações que foram observadas nessas plântulas ao final deste experimento.



Figura 48 – Imagem demonstrando o resultado do contato com diferentes dosagens de AMOX, as quais cinco sementes de feijão foram submetidas em cada um dos potes de plástico descartável, tendo como substrato amostras de solo. Da esquerda para a direita: controle, 0,03 mg L⁻¹, 0,3 mg L⁻¹, 3,0 mg L⁻¹, 30,0 mg L⁻¹ e 300,0 mg L⁻¹.
Fonte: o autor (2018).



Figura 49 – Imagem com o resultado da exposição de plântulas de feijão (à direita) em relação ao controle (à esquerda), submetidas a uma dose de 300,0 mg L⁻¹ de AMOX por um período de 15 dias, em potes de plástico descartável, tendo como substrato amostras de solo.
Fonte: o autor (2018).

Analisando as Figuras 48 e 49, da mesma forma que antes ficou comprovado o efeito promovido pela exposição das sementes de feijão a concentrações crescentes de AMOX, utilizando como substrato o papel de filtro, esse impacto se repetiu nas amostras, cujo substrato usado foram as amostras de solo, verificando, desta vez, as consequências que o que a AMOX ocasiona na parte aérea das plântulas.

Novamente se observou que a medida em que a planta como um todo recebeu doses cada vez maiores desse antibiótico, o seu crescimento foi prejudicado, com queda na quantidade e no tamanho dos parâmetros analisados. Aspectos visuais anormais também se somaram aos já investigados, como por exemplo, má formação e mudança na coloração das folhas, com algumas passando a apresentar machas brancas e amareladas; fragilidade nos caules, principalmente em regiões próximas às raízes; e infestação por fungos na porção superior da rizosfera.

Hillis *et al.* (2011), ao estudarem o efeito fitotóxico de antibióticos como a amoxicilina (AMOX), clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC) e tetraciclina (TC) em alface (*Lactuca sativa*), alfafa (*Medicago sativa*) e cenoura (*Daucus carota*), observaram que, mesmo sob a exposição da mais alta concentração dos fármacos (10.000 µg/L), a germinação das plantas foi insensível aos tratamentos. Porém diferenças no comprimento total e da raiz foram verificadas na cenoura quando esta sofreu exposição à AMOX. Diferenças no tamanho da raiz também ocorreram na

cenoura, quando exposta à TC, na alfafa e na cenoura, quando expostas à CTC e nos três vegetais quando expostos à OTC.

Em um nível morfológico, a contaminação do solo com levofloxacina, um antibacteriano do grupo das quinolonas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012), pode levar a 50% de inibição de raiz e de crescimento e uma redução semelhante na massa fresca de plântulas de tremoço-amarelo (*Lipinus luteus*). Já na massa seca das plântulas afetadas por levofloxacina o efeito é inverso, e ultrapassa os 50%. Também se verificou comprometimento enzimático dessa leguminosa quando em contato com esse antibiótico (ORZOŁ; PIOTROWICZ-CIEŚLAK, 2017).

Como foi demonstrado em estudos similares de exposição de vegetais a antibióticos, não somente a AMOX, mas outros compostos pertencentes a diferentes classes desses fármacos, apesar de, geralmente, não afetarem a germinação de sementes, são impactantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas (HILLIS *et al.*, 2011; JIN *et al.*, 2015; ORZOŁ; PIOTROWICZ-CIEŚLAK, 2017; BELLINO *et al.*, 2018).

Os resultados dos ensaios realizados nas placas de Petri, empregando o antibiótico DOX como contaminante e tendo como substrato o papel de filtro, são mostrados pelas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20 – Taxas de germinação das sementes de feijão (%) em placas de Petri, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de DOX em 4 tempos distintos

		TEMPO			
		(h)			
		48	72	96	168
DOX (mg L⁻¹)	Controle	11,0	93,0	97,0	100,0
	0,03	10,0	94,0	97,0	99,0
	0,3	6,0	98,0	100,0	100,0
	3,0	7,0	98,0	99,0	100,0
	30,0	8,0	99,0	100,0	100,0
	300,0	5,0	96,0	97,0	98,0
		CV(%) = 4,48			
		SE(%) = 1,69			

Médias seguidas nas mesmas linhas e nas mesmas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5,0% de probabilidade.

Fonte: o autor (2018).

Tabela 21 – Crescimento das radículas de sementes de feijão (cm), avaliado após exposição a diferentes concentrações de DOX em 4 tempos distintos

		TEMPO			
		(h)			
		48	72	96	168
DOX (mg L⁻¹)	Controle	0,15 a	3,77 a	6,28 a	9,58 a
	0,03	0,45 a	3,61 a	6,37 a	8,33 b
	0,3	0,35 a	3,45 a	5,82 a	7,14 c
	3,0	0,40 a	3,53 a	4,94 b	6,68 c
	30,0	0,29 a	3,14 a	4,53 b	6,28 c
	300,0	0,33 a	3,08 a	3,97 b	4,74 d
		CV(%) = 18,54			
		SE(%) = 0,38			

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5,0% de probabilidade.

Fonte: o autor (2018).

Segundo as análises estatísticas, não ocorreu diferença significativa entre as variáveis, no que diz respeito à germinação das sementes de feijão (Tabela 20), concluindo que a DOX não efetuou nenhuma influência sobre este parâmetro. Porém, com relação à variável Tempo, na análise de variância, foi verificada significância nos tratamentos aplicados.

Ainda examinando a Tabela 20, somente as taxas de germinação em relação às dosagens aplicadas, em função do tempo em que as sementes ficaram em contato com o contaminante foram demonstradas, omitindo os tratamentos relacionados à variável Tempo, seguindo o mesmo critério adotado no estudo com a AMOX, pois mesmo esta variável tendo apresentado significância na análise estatística, não ocorreu interação entre as duas variáveis (Concentração x Tempo), além de já ser esperado sucederem mudanças morfológicas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento de um vegetal no decorrer do tempo (SOUZA; FLORES; LORENZI, 2013).

Como apresentado na Tabela 21, que aborda o crescimento da radícula de sementes de feijão, notou-se que ocorreu interação entre as variáveis, porém, conforme foi descrito anteriormente na análise da AMOX, o tratamento aplicado e expresso nesta tabela para este parâmetro condiz, unicamente, à interferência negativa da concentração de DOX no distúrbio de crescimento das radículas.

Interpretando os tratamentos descritos na Tabela 21, notou-se que nos tempos 48 e 72 h não houve diferença nos tratamentos aplicados, não influenciando estatisticamente no crescimento da planta. Entretanto, no tempo de 96 h, nos três

primeiros tratamentos (incluindo o controle), ocorreu o maior crescimento das radículas e, nos três últimos, os menores comprimentos foram observados. No tempo de 168 h, somente o controle obteve o melhor resultado, ou seja, após esse período, quando a espécie vegetal estudada não teve contato com o antibiótico, ela apresentou um bom resultado para o seu crescimento; mas quando influenciada pela ação deste fármaco, e a medida em que se aumentou a sua concentração no substrato, seu efeito sobre essas sementes foi negativo, sendo a dose 300,0 mg L⁻¹ a que mais afetou o crescimento das radículas do feijão.

A partir dos dados obtidos na Tabela 21, se tomou conhecimento que a exposição das sementes a concentrações cada vez maiores de DOX promoveu uma maior influência sobre o comprimento das radículas que, na maioria das vezes, de forma sucessiva, ficou com tamanho menor quando comparadas ao tamanho observado no controle. As Figuras 50 e 51 revelam algumas mudanças que foram observadas nessas sementes ao final desse experimento.



Figura 50 – Imagem mostrando o resultado do contato a diferentes dosagens de DOX, as quais cinco sementes de feijão foram submetidas, em placas de Petri, tendo como substrato papel de filtro. Da esquerda para a direita: controle, 0,03 mg L⁻¹, 0,3 mg L⁻¹, 3,0 mg L⁻¹, 30,0 mg L⁻¹ e 300,0 mg L⁻¹.

Fonte: o autor (2018).

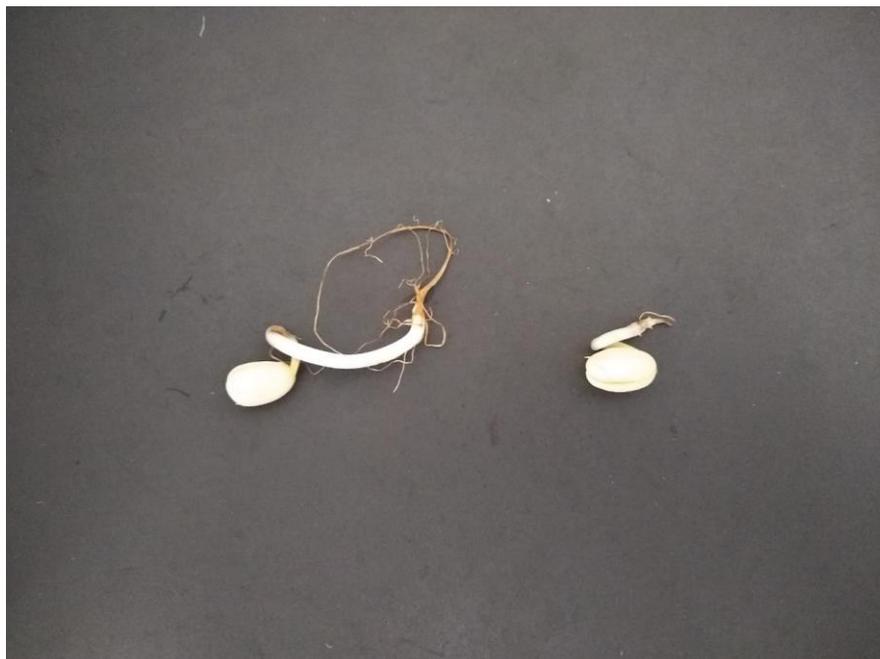


Figura 51 – Imagem com o resultado da exposição de uma semente de feijão (à direita) em relação ao controle (à esquerda), submetida a uma dose de $300,0 \text{ mg L}^{-1}$ de DOX por um período de 168 h, em placa de Petri, tendo como substrato papel de filtro.

Fonte: o autor (2018).

Ao examinar as Figuras 50 e 51, ficou perceptível o efeito causado pela exposição das sementes de feijão a concentrações crescentes de DOX, quando comparadas ao controle, que não teve a interferência negativa deste antibiótico no crescimento das radículas.

Como aconteceu, anteriormente, com as sementes de feijão expostas à AMOX, mais uma vez foi possível observar que a medida em que as sementes tiveram contato com doses cada vez maiores de DOX, o crescimento das radículas foi prejudicado, com diminuição do tamanho e presença de alterações morfológicas significativas. A formação de raízes secundárias foi visivelmente prejudicada em concentrações $\geq 3,0 \text{ mg L}^{-1}$, após 96 h de exposição ao fármaco, apresentando baixa ocorrência e/ou má formação.

As raízes secundárias tornam-se essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta pois, além promoverem maior estabilidade mecânica ao substrato, são as grandes responsáveis por absorver os nutrientes necessários ao vegetal. Provavelmente, em estágios mais avançados de crescimento e

desenvolvimento, em algum momento, uma planta nessas condições apresentará problemas estruturais e nutricionais (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os experimentos que foram feitos diretamente em amostras de solo, ainda empregando o antibiótico DOX como contaminante, são apresentados nas Tabelas 22 e 23.

Tabela 22 – Taxas de germinação das sementes de feijão no solo, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de DOX em 5 dias distintos

		TEMPO				
		(dias)				
		7	8	10	13	15
DOX (mg L⁻¹)	Controle	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0
	0,03	95,0	95,0	95,0	100,0	100,0
	0,3	85,0	85,0	85,0	85,0	85,0
	3,0	80,0	80,0	80,0	85,0	85,0
	30,0	85,0	85,0	90,0	90,0	90,0
	300,0	80,0	80,0	80,0	85,0	85,0
		CV(%) = 24,53				
		SE(%) = 10,81				

Médias seguidas nas mesmas linhas e nas mesmas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5,0% de probabilidade.

Fonte: o autor (2018).

Tabela 23 – Crescimento de partes aéreas nas plântulas de feijão, avaliadas após exposição a diferentes concentrações de DOX em 5 dias distintos

		TEMPO (dias)					
		DOX (g L ⁻¹)	7	8	10	13	15
ALTURA DO CAULE (cm)	Controle		11,54 a	12,31 a	14,03 a	15,13 a	15,93 a
	0,03		10,00 a	11,37 a	12,95 a	14,17 a	15,40 a
	0,3		9,22 a	10,93 a	11,73 a	11,83 a	12,00 b
	3,0		8,44 a	9,47 a	10,13 a	10,93 a	11,70 b
	30,0		8,90 a	10,27 a	11,55 a	12,70 a	13,50 a
	300,0		6,53 a	8,30 a	8,55 a	8,83 a	9,25 b
LARGURA DA FOLHA (cm)	Controle		3,05 a	4,42 a	5,05 a	5,50 a	6,57 a
	0,03		3,30 a	3,81 a	5,45 a	5,82 a	6,05 a
	0,3		2,52 a	3,12 b	4,29 a	4,77 a	5,10 b
	3,0		2,51 a	3,02 b	4,33 a	4,68 a	5,00 b
	30,0		2,70 a	3,35 b	4,76 a	5,24 a	5,59 a
	300,0		1,66 a	2,03 b	3,55 a	3,64 b	3,71 c
NÚMERO DE FOLHAS (unidade)	Controle		7,00 a	7,00 a	7,75 a	15,00 a	20,50 a
	0,03		8,00 a	8,00 a	8,00 a	17,75 a	20,75 a
	0,3		7,50 a	7,50 a	7,50 a	12,75 b	18,25 a
	3,0		6,25 a	6,25 a	6,25 a	10,75 b	13,75 b
	30,0		6,50 a	8,00 a	8,50 a	17,25 a	21,00 a
	300,0		4,75 a	4,75 a	4,75 a	8,75 b	13,25 b
Altura do caule			CV(%) = 28,45		SE(%) = 1,60		
Largura da folha			CV(%) = 21,31		SE(%) = 0,44		
Número de folhas			CV(%) = 29,03		SE(%) = 1,52		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5,0% de probabilidade.

Fonte: o autor (2018).

Da mesma forma que foi observado no ensaio com as placas de Petri, o qual o substrato utilizado era o papel de filtro, não ocorreu diferença significativa entre as variáveis, no que diz respeito à germinação das sementes de feijão no solo (Tabela 22); outra vez concluindo que a DOX não exerceu influência sobre este atributo. Novamente, repetindo o ocorrido no ensaio anterior com a presença de AMOX no solo, neste experimento não se verificou nenhuma significância nas análises de variância em função do tempo, como se viu, anteriormente, nas análises que estudaram a germinação das sementes nas placas com os dois fármacos.

Também se compreendeu, ao analisar as Tabelas 20 e 22, para os dois tipos de substratos empregados nas análises envolvendo a germinação de sementes de feijão que, independentemente da concentração de DOX a que estas foram submetidas, não foi confirmada a influência deste antibiótico nesse tipo de ensaio,

pois em ambos, não se verificou ao final de cada experimento um valor inferior a 85% na taxa de germinação dessas sementes.

Ao examinarem os efeitos biológicos do sulfametoxazol (SMX), da norfloxacina (NOR) e da doxiciclina (DOX) em diferentes sistemas solo-vegetais após a aplicação de estrume, Wang *et al.* (2016), observaram que apenas o SMX provocou uma suspensão aparente na germinação de sementes de repolho-chinês (*Brassica chinensis*) e rabanete (*Raphanus sativus*), da mesma forma, no que diz respeito à DOX no presente estudo, foi confirmada. Pan e Chu (2016), investigaram o efeito de cinco antibióticos de uso veterinário, TC, sulfametazina (SMZ), NOR, eritromicina (ERY) e CAP, em culturas de vegetais comestíveis e concluíram que há resultados contundentes que a TC seja o composto mais tóxico para alface, tomate, cenoura e pepino; sendo o crescimento da raiz o indicador mais sensível para estudos de fitotoxicidade. De um modo geral, os antibióticos da classe das tetraciclina apresentam o mesmo impacto fitotóxico desencadeado às plantas: pouca ou nenhuma influência sobre a germinação de sementes e efeitos negativos ou desfavoráveis ao desenvolvimento das raízes dos vegetais; como se confirmou nos ensaios realizados neste trabalho.

No que concerne à avaliação de aspectos morfológicos relacionados ao crescimento das partes aéreas das plântulas de feijão, a Tabela 23 apresenta os resultados obtidos para a altura do caule, para a largura da folha e para o número de folhas. Além destes parâmetros, outros atributos também foram verificados de forma qualitativa (por análise visual), como coloração e queda de folhas ou proliferação de fungos.

Como já foi descrito, ao se tratar dos dados correspondentes ao estudo com a AMOX, é importante salientar antes de se analisar os dados fornecidos pela Tabela 23, que o tempo tende a promover um maior crescimento e desenvolvimento na planta (SOUZA; FLORES; LORENZI, 2013). Por se referir a algo já esperado, para o descrever os resultados obtidos com a DOX, novamente viu-se como desnecessário aplicar um tratamento estatístico para essa variável na Tabela 23, da mesma forma que se fez ao descrever os resultados obtidos para esses parâmetros no estudo com a AMOX.

Em referência à altura do caule e as diferenças estatísticas promovidas pelas concentrações aplicadas, foi possível verificar que houve uma diferença significativa no 15º dia de experimento, onde as letras “a” representam os melhores resultados de

crescimento para este parâmetro (incluindo o controle) e as letras “b” , nas concentrações 0,3, 3,0 e 300 mg L⁻¹ equivalem às piores dosagens as quais as plântulas estiveram sujeitas pelos tratamentos, pois correspondem aos menores valores para o caule observados.

Com relação à largura da folha, as diferenças estatísticas foram notadas no 8^o, 13^o e 15^o dia de análise, onde no 8^o dia, as concentrações 0,03 mg L⁻¹ e controle as plântulas obtiveram os melhores resultados e nas doses 0,3, 3,0, 30,0 e 300,0 mg L⁻¹ estas alcançaram os piores valores adquiridos para este parâmetro. No 13^o dia, as concentrações 0,03, 0,3, 3,0, 30,0 mg L⁻¹ e controle apresentaram os melhores resultados e na dose de 300,0 mg L⁻¹ ocorreu o pior resultado. E, no 15^o dia de experimento, as concentrações 0,03 mg L⁻¹ e controle tiveram os melhores resultados. Dentre as doses que mais interferiram neste parâmetro ao final do ensaio a de 300,0 mg L⁻¹ foi a que promoveu o pior resultado.

No que se refere ao número de folhas, as diferenças estatísticas foram notadas no 13^o e 15^o dia do ensaio. No 13^o dia, as plântulas obtiveram o maior número de folhas nas concentrações 0,03, 30,0 mg L⁻¹ e no controle; e apresentaram o menor número de folhas nas concentrações 0,3, 3,0 e 300 mg L⁻¹; e no 15^o dia, as concentrações 0,03, 0,3, 30,0 mg L⁻¹ e controle promoveram os melhores resultados e as doses 3,0 e 300,0 mg L⁻¹ foram as que mostraram o pior resultado.

As Figuras 52 e 53 apresentam algumas alterações observadas nas plântulas ao final deste experimento sob a influência da DOX.



Figura 52 – Imagem mostrando o resultado do contato com diferentes dosagens de DOX, as quais cinco sementes de feijão foram submetidas em cada um dos potes de plástico descartável, tendo como substrato amostras de solo. Da esquerda para a direita: controle, $0,03 \text{ mg L}^{-1}$, $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, $3,0 \text{ mg L}^{-1}$, $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $300,0 \text{ mg L}^{-1}$.
Fonte: o autor (2018).



Figura 53 – Imagem com o resultado da exposição de plântulas de feijão (à direita) em relação ao controle (à esquerda), submetidas a uma dose de $300,0 \text{ mg L}^{-1}$ de DOX por um período de 15 dias, em potes de plástico descartável, tendo como substrato amostras de solo.
Fonte: o autor (2018).

Ao examinar as Figuras 52 e 53, como se observou nos ensaios anteriores, ficou comprovado o efeito promovido pela exposição das sementes de feijão a concentrações crescentes de DOX, tanto utilizando como substrato o papel de filtro,

como nas amostras cujo substrato usado foram as amostras de solo, confirmando as consequências que o contato com a DOX gera na parte aérea das plântulas.

Seguindo o mesmo comportamento constatado nos ensaios anteriores com a AMOX, a medida em que a planta como um todo teve acesso a doses cada vez maiores de DOX, o seu crescimento foi prejudicado, apresentando diminuição na quantidade e no tamanho dos parâmetros estudados. Aspectos visuais incomuns também se somaram aos já pesquisados, como por exemplo, má formação e mudança na coloração das folhas, com algumas passando a apresentar machas brancas e amareladas; fragilidade nos caules, principalmente em regiões próximas às raízes; e infestação por fungos na porção superior da rizosfera, mais uma vez repetindo as mesmas anomalias observadas nas plântulas que tiveram contato com a AMOX, anteriormente.

Xu e Zhang (2014), ao estudarem a absorção da OTC – um antibiótico da mesma classe que a DOX – e o crescimento de plantas de rabanete em solos adubados com esterco animal, verificaram que a concentração de OTC nos tecidos das plantas aumentou com o aumento desse fármaco no solo, principalmente nos estágios iniciais de crescimento; e, também, concluíram que a alta concentração de OTC no solo (>25 mg/kg) causa estresse severo na planta, com redução de taxa fotossintética das folhas e diminuição da biomassa das raízes e partes aérea deste vegetal.

Examinando os efeitos fitotóxicos da TC no trigo (*Triticum aestivum* L.), em um intervalo de concentração de 0,5 a 300,0 mg L⁻¹, Xie *et al.* (2011) observaram que no intervalo de 0,5 a 10,0 mg L⁻¹ este antibiótico poderia estimular a germinação de sementes, a mitose celular e o crescimento de mudas dessa planta, não induzindo aumento significativo na atividade enzimática. No entanto, em altas concentrações, de 10,0 a 300,0 mg L⁻¹, poderia inibir progressivamente esses parâmetros, dependendo da concentração, incluindo a germinação ($\geq 100,0$ mg L⁻¹), a altura da parte aérea ($\geq 100,0$ mg L⁻¹), o comprimento da raiz ($\geq 50,0$ mg L⁻¹) e o índice mitótico ($\geq 50,0$ mg L⁻¹); e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes ($\geq 25,0$ mg L⁻¹) de modo dose-dependente, incluindo a superóxido dismutase, a catalase e a peroxidase. Logo, concluíram que a tetraciclina promove toxicidade bioquímica e genética às células vegetais.

As plantas absorvem compostos bioativos através de suas raízes principalmente por meio de fluxo de massa ou via difusão. Fármacos neutros podem

penetrar através das membranas das células da raiz e compostos ionizáveis penetram nos tecidos vegetais através de uma combinação de processos de difusão e interações eletrostáticas (MILLER *et al.*, 2016; BARTRONS; PEÑUELAS, 2017). Fármacos de caráter básico tendem a se translocar das raízes aos caules e folhas com mais facilidade do que compostos neutros ou ácidos. O conhecimento sobre processos metabólicos e outros que podem ocorrer em plantas após a exposição a compostos bioativos é limitado, não havendo na literatura muitos estudos que investigaram esse assunto (WU *et al.*, 2015).

A AMOX e DOX apresentam processos de retenção distintos no solo, em função das diferentes características químicas que possuem e suas interações com os constituintes morfológicos da matriz a qual estão inseridos. Logo, sua disponibilidade e seus efeitos fitotóxicos podem variar, de igual maneira como outros antibióticos se comportam, mesmo quando são encontrados em concentrações comparativamente pequenas nas paisagens agrícolas; podendo ou não atrasar o tempo de germinação das sementes e/ou afetar diretamente o desenvolvimento de diferentes tipos de plantas, com efeitos dependendo de espécies, características, grupos químicos e concentrações (KIM *et al.*, 2012; TEIXIDÓ *et al.*, 2012; MINDEN *et al.*, 2017).

Foram observadas algumas diferenças significativas entre os impactos promovidos pela AMOX e pela DOX ao feijão. A diminuição na quantidade e no tamanho dos parâmetros que foram avaliados, acompanhados de má formação e mudança na coloração das folhas, fragilidade nos caules e infestação por fungos na porção superior da rizosfera foram as mesmas anomalias observadas nas plântulas sob o efeito de ambos os antibióticos.

Entretanto, o comprimento das radículas, a altura do caule, largura e número de folhas apresentaram maiores valores na exposição do vegetal à AMOX, ou seja, os valores obtidos apresentaram-se mais próximos aos valores fornecidos pelos controles na exposição a esse antibiótico. Esses resultados demonstraram que a AMOX é menos impactante para as plantas que a DOX e isso, possivelmente, se deve aos diferentes tempos de permanência e disponibilidade desses fármacos no solo e aos mecanismos de absorção dessas substâncias pelo feijão.

Pan e Chu (2017), descreveram que a maioria dos estudos que avaliaram a fitotoxicidade de antibióticos foram realizados em estufas ou placas de Petri e que os efeitos fitotóxicos crônicos dos antibióticos e de seus metabólitos em ambientes mais

realistas são desconhecidos. Afirmaram que o conhecimento sobre a fitotoxicidade de antibióticos se faz necessário, para avaliações de risco ecológico para diferentes espécies de plantas, incluindo aí as de consumo animal e humano.

6 CONCLUSÕES

No decorrer deste estudo, alcançaram-se os melhores parâmetros para se obter as isotermas de adsorção e dessorção, nos dois horizontes do perfil de solo (A e B), sob diferentes condições de pH, para os dois fármacos avaliados.

Obtiveram-se as isotermas de adsorção e dessorção para esses antibacterianos, onde se averiguou que o modelo matemático de Freundlich foi o que melhor se ajustou aos dois, em todos os parâmetros verificados.

Para a AMOX, chegou-se a um valor de K_F na faixa de 4,06-15,79 mg Kg⁻¹ (média de 11,96 mg Kg⁻¹) na adsorção e na faixa de 6,12-30,71 mg Kg⁻¹ (média de 18,48 mg Kg⁻¹) na dessorção, indicando uma baixa capacidade de adsorção/dessorção deste fármaco no solo.

Com a DOX, foi verificado um K_F na faixa de 312,68-3.010,23 mg Kg⁻¹ (média de 1.817,80 mg Kg⁻¹) na adsorção e 387,43-4.300,31 (média de 2.537,59 mg Kg⁻¹) na dessorção, demonstrando uma elevada capacidade de adsorção/dessorção desse fármaco nesse tipo de latossolo avaliado.

Os antibióticos AMOX e DOX acarretam perturbações na atividade e biomassa microbianos e quociente metabólico (qCO₂), bioindicadores de qualidade do solo relacionados à sua microbiota. A exposição dos microrganismos do solo à AMOX causou redução da biomassa, pouco ou nenhum efeito sobre a atividade microbiana e aumento do qCO₂, confirmando um maior estresse aos microrganismos presentes no solo, enquanto que a DOX reduziu a atividade e promoveu pouca influência sobre o carbono da biomassa microbiana e sobre o qCO₂, demonstrando baixa perturbação à microbiota do solo. Os efeitos são específicos para cada fármaco, tem influência dos atributos morfológicos da matriz e não seguem um comportamento ambiental idêntico, mesmo se padronizando variáveis como tipo de matriz, dosagens e tempo de exposição à essas substâncias.

A AMOX e a DOX, não exerceram influência significativa na germinação de sementes de feijão, mesmo utilizando diferentes tipos de substratos. Entretanto, são compostos que influenciaram, de forma clara, parâmetros como comprimento de raízes e crescimento de partes aéreas do vegetal, sendo a DOX o antibiótico que apresentou maior efeito fitotóxico a esta planta.

Foi possível compreender a capacidade de sorção da AMOX e da DOX, além de estimar os seus comportamentos em um Latossolo Vermelho-amarelo originário

da região sul do Estado de Minas Gerais. Também foi certificado que esses fármacos podem ser considerados como potenciais fontes de contaminação, devido à sua mobilidade, como observado no estudo com a AMOX, ou sua retenção, como se confirmou no estudo com a DOX.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho revelou que antibióticos antibacterianos como a AMOX e DOX podem causar perturbações na microbiota do solo e no crescimento de plantas, tendo relevância a realização de pesquisas mais aprofundadas sobre esses fármacos no solo.

Outra ação importante seria incluir a avaliação de processos de transporte e de transformação em estudos de retenção de compostos bioativos, como neste que foi realizado, para um melhor entendimento sobre a dinâmica dessas substâncias nos mais variados tipos de matrizes.

Deve-se priorizar a investigação do comportamento ambiental de outras classes de antibióticos em solos brasileiros, devido à pouca informação que se tem a respeito do assunto e ao impacto que essas substâncias podem gerar, a curto e longo prazos, em todos os tipos de organismos e no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z. et al. Effect of buctril super (Bromoxynil) herbicide on soil microbial biomass and bacterial population. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, n. 1, p. 9-14, 2014.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2018b. **Resolução - RDC Nº 166, de 24/07/2017**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 30 nov. 2018.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC Nº 20, de 05/05/2011**. 2018a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Documentos2012/RDC%2020%202011.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- ALBERO, B. et al. Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems. **Science of the Total Environment**, Berlin, v. 643, p. 1562-1570, 2018.
- ALBERS, A. P. F. et al. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X (A simple method for the characterization of clay minerals by X-ray diffraction). **Cerâmica**, São Paulo, v. 48, n. 305, p. 34, 2002.
- ALLEONI, L. R. F. et al. Química dos Solos Altamente Intemperizados. In: MELO V. F., ALLEONI L. R. F. (eds) **Química e Mineralogia do Solo**. Parte II. Viçosa: SBCS, 2016. Cap. XVIII. p. 381-448.
- ANTHONY A, A.; ADEKUNLE C, F.; THOR A, S. Residual antibiotics, antibiotic resistant superbugs and antibiotic resistance genes in surface water catchments: Public health impact. **Physics and Chemistry of the Earth**, New York, v. 105, p. 177-183, 2018.
- ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 61-72, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 6457: Amostras de Solo – Preparação para Ensaios de Compactação e Ensaios de Caracterização. Anexo**. Rio de Janeiro, p. 7-9. 1986.
- ASTM. **Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests – E1963 – 09**. American Society for Testing and Materials, Pensilvânia, 2014.
- AZAROFF, L. V.; BUERGER, M. J. **The powder method**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1958.
- BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.-L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.

- BÁRTÍKOVÁ, H.; PODLIPNÁ, R.; SKÁLOVÁ, L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 144, p. 2290-2301, 2016.
- BARTRONS, M.; PEÑUELAS, J. Pharmaceuticals and personal-care products in plants. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 194-203, 2017.
- BASTIDA, F. et al. Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. **Geoderma**, Amsterdam, v. 147, n. 3-4, p. 159-171, 2008.
- BELLINO, A. et al. Antibiotic effects on seed germination and root development of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 148, p. 135-141, 2018.
- BELMONTE, S. A. et al. Effect of Long-Term Soil Management on the Mutual Interaction Among Soil Organic Matter, Microbial Activity and Aggregate Stability in a Vineyard. **Pedosphere**, Nanjing, v. 28, n. 2, p. 288-298, 2018.
- BEZERRA, I. M. **Estudo dos equilíbrios sólido-líquido presentes na síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos**. 2016. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.
- BINH, C. T. T. et al. Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. **FEMS Microbiology Ecology**, London, v. 62, n. 3, p. 290-302, 2007.
- BITTENCOURT, S. et al. Sorção de poluentes orgânicos emergentes em lodo de esgoto. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 43-53, 2016.
- BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- BORGHI, A. A. **Degradação de cloridrato de doxiciclina pelo processo Fenton**. 2013. 168 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- BORGHI, A. A.; PALMA, M. S. A. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 25-40, 2014.
- BOXALL, A. B.; KOLPIN, D. W.; HALLING-S., B.; TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science & Technology**, New York, v. 37, n. 15, p. 286A-294A, 2003.
- BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos**. Porto Alegre: Bookman Editora, 2013.
- BRASCHI, I. et al. Persistence and degradation of new β -lactam antibiotics in the soil and water environment. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 152-159, 2013.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**, 12. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012.

CANELLAS, L. P. et al. Frações da matéria orgânica em seis solos de uma topossequência no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 133-143, 2000.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221p.

CARVALHO, I. T.; SANTOS, L. Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario. **Environment International**, Amsterdam, v. 94, p. 736-757, 2016.

CARVALHO, P. N. et al. A review of plant – pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 21, n. 20, p. 11729-11763, 2014.

CASELANI, K. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 3, p. 187-195, 2014.

CETECIOGLU, Z. et al. Acute effect of erythromycin on metabolic transformations of volatile fatty acid mixture under anaerobic conditions. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 124, p. 129-135, 2015.

CHATTERJEE, J.; RAI, N.; SAR, S. K. Kinetic Isotherm of Amoxicillin Antibiotic through Adsorption and its Removal by Electrocoagulation. **Oriental Journal of Chemistry**, Bhopal, v. 30, n. 2, p. 775-784, 2014.

CHEN, H-R. et al. Assessment of veterinary drugs in plants using pharmacokinetic approaches: The absorption, distribution and elimination of tetracycline and sulfamethoxazole in ephemeral vegetables. **PloS One**, San Francisco, v. 12, n. 8, p. e0183087, 2017.

CHILDS, G. M. F. **Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado**. 2007. 61 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

CHOWDHURY, A. et al. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, Mumbai, v. 48, n. 1, p. 114-127, 2008.

CHRISTIAN, T. et al. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, Weinheim, v. 31, n. 1, p. 36-44, 2003.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 374-380, 2001.

COELHO, R. M.; ROSSI, M.; MATTOS, I. F. A. Solos da Mata Atlântica. In: CURI et al. (eds) **Pedologia: solos dos biomas brasileiros**. Viçosa: SBCS, 2017. Cap. VI. p. 261-302.

CRUZ, M. S. **Degradação da doxiciclina por processos oxidativos avançados**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade de Campinas, Campinas, 2016.

CUI, H. et al. Influence of ciprofloxacin on microbial community structure and function in soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 50, n. 6, p. 939-947, 2014.

CUSTODIO, R.; ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, p. 219-225, 1997.

DAS, P.; PAL, R.; CHOWDHURY, A. Effect of novaluron on microbial biomass, respiration, and fluorescein diacetate-hydrolyzing activity in tropical soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 387-391, 2007.

DE FRANCO, M. A. E. et al. Removal of amoxicillin from water by adsorption onto activated carbon in batch process and fixed bed column: Kinetics, isotherms, experimental design and breakthrough curves modelling. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 161, p. 947-956, 2017.

DENG, W. et al. Occurrence and risk assessment of antibiotics in river water in. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, London, v. 125, p. 121-127, 2016.

DEO, R. P.; HALDEN, R. U. Pharmaceuticals in the built and natural water environment of the United States. **Water**, Basel, v. 5, n. 3, p. 1346-1365, 2013.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. Biomassa microbiana: perspectivas para o uso e manejo do solo. In: ALVAREZ V. H. V.; FONTES, L. E. F.; FONTES, M. P. **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. p.552-564.

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

DICK, D. P. et al. Química da Matéria Orgânica do Solo. In: MELO V. F., ALLEONI L. R. F. (eds) **Química e Mineralogia do Solo**. Parte II. Viçosa: SBCS, 2016. Cap. XI. p. 1-67.

DINH, Q. T. et al. Occurrence of antibiotics in rural catchments. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 168, p. 483-490, 2017.

DORETTO, K. M.; PERUCHI, L. M.; RATH, S. Sorption and desorption of sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline and sulfamethazine antimicrobials in Brazilian soils. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 476-477, p.406-414, abr. 2014.

DU, L.; LIU, W. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Berlin, v. 32, n. 2, p. 309-327, 2012.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006.

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 3. ed. Revista e Ampliada, Brasília, 2017.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Acidez potencial do solo**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1087322/acidez-potencial-do-solo>>. Acesso em 23 nov. 2018.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Agência de Informação Embrapa. Bioma Cerrado. Latossolos**. 2018b. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_96_10112005101956.html>. Acesso em 23 nov. 2018.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Árvore do conhecimento. Solos tropicais. Saturação por bases**. 2018c. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos_tropicais/arvore/CONTAG01_21_2212200611544.html>. Acesso em: 23 nov. 2018.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Boletim **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para regiões tropicais: Capacidade de troca de cátions (CTC), soma de bases (SB) e saturação por bases (V%)**. 2010b. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31004/1/BPD-8.pdf>>. Acesso em 30 nov. 2018.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Boletim **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para regiões tropicais: O alumínio no solo**. 2010a. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31004/1/BPD-8.pdf>>. Acesso em 30 nov. 2018.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Fertilidade de solos. Cultivo do milho. Interpretação de resultados de análise do solo**. 2000. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27337/1/Fertilidade-de-solos-Interpretacao.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **SiBCS. Atributos do solo: Outros atributos – Grupamento textural**. 2018a. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/solos/sibcs/atributos-do-solo/outros-atributos>>_Acesso em: 18 jun. 2018.

FDA. Food and Drug Administration: 2017 Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed of Use in Food-producing Animals Silver Spring. **MD: US Food and Drug Administration**, 2018.

FERREIRA, A. S.; CAMARGO, F. A. O.; VIDOR, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, n. 4, 1999.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, nov./dez. 2011.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Amoxicillin**. 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/12-2012-amoxicillin.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2018.

FRANCISCO, W. C.; DE QUEIROZ, T. M. Biorremediação. **Nucleus**, Ituverava, v. 15, n. 1, p. 249-256, 2018.

GAO, M. et al. Interactive effect of oxytetracycline and lead on soil enzymatic activity and microbial biomass. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 667-674, 2013.

GASTALHO, S.; SILVA, G.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Porto, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New biotechnology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 147-156, 2015.

GOMEZ, E. et al. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, n. 2, p. 163-167, 2009.

GRENNI, P.; ANCONA, V.; CARACCILO, A. B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 136, p. 25-39, 2017.

GUO, H. et al. Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 87, n. 11, p. 1273-1280, 2012.

HAMMAD, H. M. et al. Uptake and toxicological effects of pharmaceutical active compounds on maize. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Zurich, v. 258, p. 143-148, 2018.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software: package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, Purcellville, n. 4, 2001.

HARVEY, S. C. Antimicrobial drugs. **Remington's Pharmaceutical Sciences**, 18. ed. Eston: Mack Publishing Company, Cap.62 p. 1163-1241, 1990.

HILLIS, D. G. et al. Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Berlin, v. 60, n. 2, p. 220-232, 2011.

HOFMAN, J. **Research of the soil microorganisms at the biomass, process and community levels**. 2003. Disponível em: <<http://recetox.muni.cz>>. Acesso em abril 2006.

HORVAT, A. J. M. et al. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, New York, v. 31, p. 61-84, 2012.

HRYSYK, A. S.; TIBURTIUS, E. R. L.; FUJIWARA, S. T. Photocatalytic degradation of simvastatin, amoxicillin and fluoxetine using TiO₂ immobilized in cellulose Acetate. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 6, p. 2332-2350, 2017.

IMFELD, G.; VUILLEUMIER, S. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: a critical review. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 49, p. 22-30, 2012.

JIN, C. et al. Single and joint toxicity of sulfamonomethoxine and Cadmium on three agricultural crops. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, London, v. 24, n. 4, p. 454-470, 2015.

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 & Environment**, [s.l.], v. 93, n. 1-3, p.267-278, dez. 2002.

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

KER, J. C. et al. **Pedologia: fundamentos**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2015.

KIM, Y. et al. Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 167-176, 2008.

KIM, Y. K.; LIM, S. J.; HAN, M. H.; CHO, J. Y. Sorption characteristics of oxytetracycline, amoxicillin, and sulfathiazole in two different soil types. **Geoderma**, Amsterdam, v. 185-186, p. 97-101, set. 2012.

- KORB, A. et al. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, Florianópolis, v. 4, n. 1, p. 21-36, 2011.
- KOTZERKE, A. et al. Alterations in total microbial activity and nitrification rates in soil due to amoxicillin-spiked pig manure. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 174, n. 1, p. 56-64, 2011.
- KUMAR, R. R.; LEE, J. T.; CHO, J. Y. Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, Seoul, v. 55, n. 6, p. 701-709, 2012.
- KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 75, n. 4, p. 417-434, 2009a.
- KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part II. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 75, n. 4, p. 435-441, 2009b.
- KÜMMERER, Klaus. Pharmaceuticals in the environment. **Annual Review of Environment and Resources**, Palo Alto, v. 35, p. 57-75, 2010.
- KUPPUSAMY, S. et al. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, New York, v. 257, p. 47-59, 2018.
- LEAL, R. M. P. **Ocorrência e comportamento ambiental de resíduos de antibióticos de uso veterinário**. 2012. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- LEAL, R. M. P.; REGITANO, J. B. Dinâmica de antibióticos e hormônios no Solo. In: NASCIMENTO, C. W. A. et al. (eds) **Tópicos em Ciência do Solo**. V. 9. Viçosa: SBCS, 2015. p. 48-91.
- LEGENDRE, A. O. et al. Solid state chemistry of the antibiotic doxycycline: structure of the neutral monohydrate and insights into its poor water solubility. **CrystEngComm**, London, v. 14, n. 7, p. 2532-2540, 2012.
- LEPSCH, I. F. **19 Lições de Pedologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2013.
- LI, W. C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 187, p. 193-201, 2014.
- LIAO, M. et al. Different influences of cadmium on soil microbial activity and structure with Chinese cabbage cultivated and non-cultivated. **Journal of Soils and Sediments**, Berlin, v. 10, n. 5, p. 818-826, 2010.
- LIN, H. et al. A compositional shift in the soil microbiome induced by tetracycline, sulfamonomethoxine and ciprofloxacin entering a plant-soil system. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 212, p. 440-448, 2016.

LIU, A. et al. Combinational effects of sulfomethoxazole and copper on soil microbial community and function. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 23, n. 5, p. 4235-4241, 2016.

LIU, B. et al. Combined effects of chlortetracycline and dissolved organic matter extracted from pig manure on the functional diversity of soil microbial community. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 74, p. 148-155, 2014.

LIU, F. et al. Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 95, n. 6, p. 1615-1623, 2012.

LIU, X. et al. Levels, distributions and sources of veterinary antibiotics in the sediments of the Bohai Sea in China and surrounding estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 597-602, 2016.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, London, v. 57, n. 3, p. 195-211, 1993.

LOPES, A. S. **Manual Internacional de Fertilidade do Solo**. Revista e ampliada. Piracicaba: Potafos, 1998.

LV, T. et al. Microbial community metabolic function in constructed wetland mesocosms treating the pesticides imazalil and tebuconazole. **Ecological Engineering**, Berlin, v. 98, p. 378-387, 2017.

MA, J. et al. Soil microbial systems respond differentially to tetracycline, sulfamonomethoxine, and ciprofloxacin entering soil under pot experimental conditions alone and in combination. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 21, n. 12, p. 7436-7448, 2014.

MA, T. et al. Effects of different concentrations and application frequencies of oxytetracycline on soil enzyme activities and microbial community diversity. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 76, p. 53-60, 2016.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MELLO, S.; CARVALHO, M. A.; FERREIRA, J. N.; COGO, J. M.; SILVA, R. Revisão sobre argilominerais e suas modificações estruturais com ênfase em aplicações tecnológicas e adsorção– Uma pesquisa inovadora em universidades. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 9, n. 1, p. 141-152, 2011.

MIGUEL, G. C.; ORLANDO, E. A.; SIMIONATO, A. V. C. Quantificação de antibióticos beta-lactâmicos em medicamentos veterinários: determinação de amoxicilina e ampicilina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1214-1221, 2013.

MILLER, E. L. et al. Root uptake of pharmaceuticals and personal care product ingredients. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 50, n. 2, p. 525-541, 2016.

MINDEN, V. et al. Antibiotics impact plant traits, even at small concentrations. **AoB Plants**, London, v. 9, n. 2, 2017.

Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA). **Exportações do Agro em maio alcançaram 9,97 bilhões**. 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/exportacoes-do-agro-em-maio-alcancaram-us-9-97-bilhoes>. Acesso em: 18 jun. 2018.

MOLAEI, A. et al. Assessment of some cultural experimental methods to study the effects of antibiotics on microbial activities in a soil: An incubation study. **PloS One**, San Francisco, v. 12, n. 7, p. e0180663, 2017.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2018.

MOORE, D. M.; REYNOLDS, R. C. **X-ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals**. Oxford: Oxford university press, 1989.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MORETTO, L. D.; MASTELARO, R. **Manual das Denominações Comuns Brasileiras (MDCB)**. São Paulo: SINDUSFARMA, 2013.

MUHLBACHOVA, G. et al. The influence of soil organic carbon on interactions between microbial parameters and metal concentrations at a long-term contaminated site. **Science of the Total Environment**, Berlin, v. 502, p. 218-223, 2015.

MUKHERJEE, S. et al. Persistence of the herbicides florasulam and halauxifen-methyl in alluvial and saline alluvial soils, and their effects on microbial indicators of soil quality. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 73, p. 93-99, 2016.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman Editora, 2010.

NETO, P. T. **Avaliação sobre o comportamento de antimicrobianos veterinários em solo e em cama de frango: estudos de adsorção e previsão do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas**. 2014. 194 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals 106: Adsorption-Desorption using batch equilibrium method**. Organization for Economic Cooperation and Development: Paris, 2000.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 2003.

OLIVEIRA Jr., R. S.; REGITANO, J. B. Dinâmica de pesticidas no Solo. In: MELO V. F., ALLEONI L. R. F. (eds) **Química e Mineralogia do Solo**. Parte II. Viçosa: SBCS, 2016. Cap. XV. p. 187-248.

OLIVEIRA NETO, O. F. **Sorção do tiabendazol em solos do Estado de São de Paulo**. 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

OLIVEIRA NETO, O. F.; ARENAS, A. Y.; FOSTIER, A. H. Sorption of thiabendazole in sub-tropical Brazilian soils. **Environmental Science and Pollution Research**, Luxembourg, v. 24, n. 19, p. 16503-16512, 2017.

ORZOŁ, A.; PIOTROWICZ-CIEŚLAK, A. I. Levofloxacin is phytotoxic and modifies the protein profile of lupin seedlings. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 24, n. 28, p. 22226-22240, 2017.

PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

PAMREDDY, A. et al. Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1298, p. 68-75, 2013.

PAN, M.; CHU, L. M. Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 126, p. 228-237, 2016.

PAN, M; CHU, L. M. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. **Science of the Total Environment**, Berlin, v. 599, p. 500-512, 2017.

PEÑA, W. et al. Modification of the degradative capacity of a soil artificially contaminated with diesel. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 67, n. 5, p. 1057-1063, 2007.

PEREIRA, L. A. et al. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 159-169, 2012.

PEROVANO FILHO, N.; DA SILVA, K. F. S.; LÓPEZ, A. M. Q. Ação de Micoflora de efluentes agroindustriais sobre diferentes corantes e substratos lignocelulósicos. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 33, n. 4, 2011.

PERUCHI, L. M. **Antimicrobianos veterinários: estudos de sorção em solos e desenvolvimento e validação de métodos para a determinação em medicamentos e solos**. 2015. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

PETTER, F. A. et al. Sorção e dessorção de diuron em Latossolo sob a aplicação de biochar. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 4, p. 487-496, 2016.

PINO, M. R. et al. Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 23, n. 22, p. 22530-22541, 2016.

PORTILHO, I. I. R. et al. Persistência de inseticidas e parâmetros microbiológicos em solo sob sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 1, 2015.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 159-164, 1987.

PUCKOWSKI, A. et al. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 127, p. 232-255, 2016.

QIN, J. et al. Effects of different fertilizers on residues of oxytetracycline and microbial activity in soil. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, p. 1-10, 2018.

QUADRO, M. S. et al. Biomassa e atividade microbiana em solo acrescido de dejetos suíno. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 17, n. 1, 2011.

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. 3, p. 601-616, 2010.

REICHEL, R. et al. Effects of slurry from sulfadiazine-(SDZ) and difloxacin-(DIF) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 62, p. 82-91, 2013.

REICHEL, R. et al. Soil microbial community responses to antibiotic-contaminated manure under different soil moisture regimes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 14, p. 6487-6495, 2014.

REIS, M. R. et al. Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar após aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 323-331, 2008.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, 2004.

RIVERA-UTRILLA, J. et al. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 93, n. 7, p. 1268-1287, 2013.

SAGAN, Carl. **O mundo assombrado pelos demônios: a ciência vista como uma vela no escuro**. São Paulo: Editora Companhia das Letras, 2006.

SAINI, M. et al. Detecting diclofenac in livestock carcasses in India with an ELISA: a tool to prevent widespread vulture poisoning. **Environmental Pollution**, Amsterdam, Barking, v. 160, p. 11-16, 2012.

SAM, A. T.; ASUMING-BREMPONG, S.; NARTEY, E. K. Microbial activity and metabolic quotient of microbes in soils amended with biochar and contaminated with atrazine and paraquat. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science**, Abingdon, v. 67, n. 6, p. 492-509, 2017.

SANTOS, R. D. et al. **Manual de descrição e coleta de solo no campo**. 5. ed. Revista e ampliada. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005.

SARMA, H. et al. Localization of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in surface soil of Asia's oldest oil and gas drilling site in Assam, north-east India: implications for the bio-economy. **Emerging Contaminants**, Pequim, v. 2, n. 3, p. 119-127, 2016.

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

SCHREIBER, F.; SZEWZYK, U. Environmentally relevant concentrations of pharmaceuticals influence the initial adhesion of bacteria. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 87, n. 4, p. 227-233, 2008.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, London, v. 30, n. 3, p. 507-512, set. 1974.

SHAPIRO, S. S; WILK, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, dez. 1965.

SHORE, R. F. et al. Detection and drivers of exposure and effects of pharmaceuticals in higher vertebrates. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 369, n. 1656, p. 20130570, 2014.

SILVA, R. F. et al. Identificação e Quantificação de Contaminantes Emergentes em Estações de Tratamento de Esgoto. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 8, n. 3, p. 702-715, 2016.

SIMON, B.; HANCU, G.; GYÉRESI, Á. Application of capillary electrophoresis to the simultaneous determination and stability study of four extensively used penicillin derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 50, n. 3, p. 521-527, 2014.

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN). **Anuário 2018**. 2018a. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/anoario2018/>>. Acesso em: 29 dez. 2018.

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN). **Distribuição do faturamento por classe farmacêutica**. 2018b. Disponível em <<http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2017/>>. Acesso em: 29 dez. 2018.

SIQUEIRA, J. O. et al. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental, **EMBRAPA-SPI**, Brasília, documentos 45, 1994.

SOUZA, V. C.; FLORES, T. B.; LORENZI, H. **Introdução à Botânica: morfologia**. [s.l.]: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2013.
SPARKS, D. L. **Environmental Soil Chemistry**. 2. Ed. USA: Academic Press, 2003.

STOTZER, E. S. et al. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, Fortaleza, v. 8, n. 3, p. 198-221, 2014.

STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C.A., Ed. **Methods of soil analysis**. Part 2. Madison, American Society of Agronomy, 1965. p.1550-1572.

STUHLÍKOVÁ, L.; JIRASKO, R.; SKALOVÁ, L.; PAVLÍK, F.; SZOTAKOVÁ, B.; HOLCAPEK, M.; VANEK, T.; PODLIPNÁ R. Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula rotundifolia*). **Chemosphere**, Amsterdam, v. 157, p.10-17, ago. 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAKAHASHI, J. P.; CARVALHO, M. S. Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica médica. **Agricultura**, Madrid, v. 28, p. 3, 2009.

TEIXEIRA, W. et al. **Decifrando a Terra**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2009.

TEIXIDÓ, M. et al. Sorption of tetracyclines onto natural soils: data analysis and prediction. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 19, n. 8, p. 3087-3095, 2012.

THIELE-BRUHN, S.; BECK, I-C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 59, n. 4, p. 457-465, 2005.

TIRONI, S. P. et al. Efeito de herbicidas na atividade microbiana do solo. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, p. 995-1004, 2009.

TOMASSONI, F. et al. Técnica de biorremediação do solo. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 3, n. 3, p. 46-56, 2014.

USP 40-NF 35. Amoxicillin. United States Pharmacopeia 40. Ed.-National Formulary 35. Rockville: **Pharmacopeial Convention**, p. 2785-2786, 2017.

USP 40-NF 35. Doxycycline. United States Pharmacopeia 40. Ed.-National Formulary 35. Rockville: **Pharmacopeial Convention**, p. 3887-3888, 2017.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment - a review. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 429, p. 123-155, 2012.

VON WITTENAU, M. Schach et al. 6-Deoxytetracyclines. III. Stereochemistry at C. 6. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 84, n. 13, p. 2645-2647, 1962.

VRAGOVIĆ, N. et al. Dietary exposure assessment of streptomycin and tetracycline in food of animal origin on the Croatian market. **Food Additives & Contaminants: Part B**, London, v. 5, n. 4, p. 236-240, 2012.

WAISER, M. J. et al. Effects of erythromycin, trimethoprim and clindamycin on attached microbial communities from an effluent dominated prairie stream. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 132, p. 31-39, 2016.

WANG, J. et al. Individual and combined effects of enrofloxacin and cadmium on soil microbial biomass and the ammonia-oxidizing functional gene. **Science of The Total Environment**, Berlin, v. 624, p. 900-907, 2018a.

WANG, J. et al. Variations in the fate and biological effects of sulfamethoxazole, norfloxacin and doxycycline in different vegetable–soil systems following manure application. **Journal of Hazardous Materials**, Berlin, v. 304, p. 49-57, 2016.

WATKINSON, A. J. et al. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 8, p. 2711-2723, 2009.

WEI, R. et al. Occurrence of 13 veterinary drugs in animal manure-amended soils in Eastern China. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 144, p. 2377-83, Mar. 2016.

WILLING, B. P.; RUSSELL, S. L.; FINLAY, B. B. Shifting the balance: antibiotic effects on host–microbiota mutualism. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, n. 4, p. 233, 2011.

WU, X. et al. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: a review. **Science of The Total Environment**, Berlin, v. 536, p. 655-666, 2015.

XIE, X. et al. Toxic effect of tetracycline exposure on growth, antioxidative and genetic indices of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 18, n. 4, p. 566-575, 2011.

XU, H. et al. Photosensitized degradation of amoxicillin in natural organic matter isolate solutions. **Water Research**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 632-638, 2011.

XU, Q.; ZHANG, M. Oxytetracycline Uptake and Growth of Radish Plants (*Raphanus sativus* L.) in Animal Manure-amended Soils. **Agricultural Science & Technology**, Stara Zagora, v. 15, n. 7, p. 1229, 2014.

XU, Y. et al. The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 134, p. 43-52, 2016.

YAN, C. et al. The effect of environmental and therapeutic concentrations of antibiotics on nitrate reduction rates in river sediment. **Water Research**, Amsterdam, v. 47, n. 11, p. 3654-3662, 2013.

ZHANG, C. et al. The effect of imazethapyr on soil microbes in soybean fields in northeast China. **Chemistry and Ecology**, Abingdon, v. 26, n. 3, p. 173-182, 2010.

ZHANG, H. et al. Plant Growth, Antibiotic Uptake, and Prevalence of Antibiotic Resistance in an Endophytic System of Pakchoi under Antibiotic Exposure. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 14, n. 11, p. 1336, 2017.

ZHANG, X. et al. The variations in the soil enzyme activity, protein expression, microbial biomass, and community structure of soil contaminated by heavy metals. **ISRN Soil Science**, Cairo, v. 2013, 2013.