

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos

ESTUDO DA SORÇÃO DO ANTIBIÓTICO
OXITETRACICLINA A SOLOS E ÁCIDOS HÚMICOS E
AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE INTERAÇÃO
ENVOLVIDOS

Sílvio Vaz Júnior

Tese apresentada ao
programa de pós-graduação
do IQSC, como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências
(Química Analítica).

Orientador: Dr. Ladislau Martin Neto

São Carlos

2010

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, maio de 2010.

Nome do autor: Sílvio Vaz Júnior

Assinatura:



Sílvio Vaz Júnior

Dedico este trabalho à minha mãe, Izaura de Carvalho Vaz (“In Memoriam”).

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, ao Dr. Ladislau Martin Neto pela oportunidade de continuar buscando e aperfeiçoando meu conhecimento na Química e ao e à minha família por ter me dado as condições educacionais para esta empreitada.

Agradeço especialmente a algumas pessoas da EMBRAPA–CNPDIA que contribuíram sobremaneira para a execução deste Estudo de doutorado, além de darem motivação nas horas de desânimo: Dr. Wilson Tadeu Lopes (delineamento experimental e interpretação de resultados), Dr. Marcelo Simões (realização de medidas de RPE, interpretação dos resultados e discussões durante a etapa de Qualificação), Dra. Aline Segnini (discussão e preparo da apresentação de Qualificação), Dra. Débora Milori (planejamento de experimentos de Fluorescência), Dr. Sérgio Saab (discussão da teoria da RPE e de resultados de caracterização dos AH), MSc. Gabriela Byzynsky (fornecimento e caracterização de amostra de solo), MSc. Joana Bresolin, MSc. Silviane Hubinger e Renê De Oeste (suporte de laboratório).

Ao Prof. Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues (IQSC/USP) pelas sugestões quanto à parte espectroscópica, isotermas de sorção e aos possíveis mecanismos envolvidos.

À Profa. Dra. Dharni Vasudevan (Department of Chemistry, Bowdoin College, USA) pelas sugestões e envio das referências utilizadas na elaboração do experimento de sorção solos-OTC.

Ao IQSC/USP e à EMBRAPA-CNPDIA pela estrutura disponibilizada.

À Ana Suelen, pela paciência, compreensão e carinho durante esta fase de minha vida.

SUMÁRIO

| | |
|---|--------------------|
| LISTA DE FIGURAS | <i>vii</i> |
| LISTA DE TABELAS | <i>xi</i> |
| LISTA DE ABREVIATURAS | <i>xii</i> |
| RESUMO | <i>xiii</i> |
| ABSTRACT | <i>xv</i> |
| 1 INTRODUÇÃO | <i>1</i> |
| 1.1 Matéria Orgânica do Solo e os Ácidos Húmicos | <i>4</i> |
| 1.2 Interação dos Ácidos Húmicos com Contaminantes Químicos | <i>8</i> |
| 1.3 Antibióticos Tetraciclínicos | <i>9</i> |
| 1.4 Conseqüências da Sorção Solo-Oxitetraciclina e Ácido Húmico – Oxitetraciclina | <i>13</i> |
| 1.5 Contextualização do Estudo | <i>17</i> |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | <i>22</i> |
| 2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | <i>22</i> |
| 2.1.1 Isotermas de Sorção | <i>27</i> |
| 2.2 Análise Elementar | <i>32</i> |
| 2.3 Técnicas Espectroscópicas | <i>33</i> |
| 2.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível | <i>33</i> |
| 2.3.2 Espectroscopia de Fluorescência na Região do Ultravioleta-Visível | <i>39</i> |
| 2.3.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier | <i>42</i> |
| 2.3.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Próximo | <i>47</i> |
| 2.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear | <i>48</i> |
| 2.3.6 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica | <i>52</i> |
| 3 OBJETIVOS | <i>58</i> |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | <i>60</i> |
| 4.1 Caracterizações Preliminares | <i>60</i> |

| | |
|--|------------|
| 4.1.1 Caracterização dos Solos | 60 |
| 4.1.2 Caracterização dos Ácidos Húmicos de Solo | 62 |
| 4.1.2.1 Análise Elementar e Teor de Cinzas | 65 |
| 4.1.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C no Estado Sólido com Amplitude Variável da Polarização Cruzada em Torno do Ângulo Mágico | 65 |
| 4.1.2.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier | 66 |
| 4.1.2.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica | 66 |
| 4.2 Sorção Solos-Oxitetraciclina | 67 |
| 4.3 Sorção Ácido Húmicos-Oxitetraciclina | 69 |
| 4.4 Averiguação dos Mecanismos de Interação por Técnicas Espectroscópicas | 72 |
| 4.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível | 76 |
| 4.4.2 Espectroscopia de Fluorescência na Região do Ultravioleta-Visível | 78 |
| 4.4.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier | 79 |
| 4.4.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Próximo | 80 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 81 |
| 5.1 Caracterizações Preliminares | 81 |
| 5.1.1 Caracterização dos Solos | 81 |
| 5.1.2 Caracterização dos Ácidos Húmicos de Solo | 82 |
| 5.1.2.1 Análise Elementar e Teor de Cinzas | 82 |
| 5.1.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C no Estado Sólido com Amplitude Variável da Polarização Cruzada em Torno do Ângulo Mágico | 83 |
| 5.1.2.3 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica | 87 |
| 5.1.2.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier | 88 |
| 5.2 Sorção Solos-Oxitetraciclina | 89 |
| 5.3 Sorção Ácido Húmicos-Oxitetraciclina | 98 |
| 5.4 Averiguação dos Mecanismos de Interação por Técnicas Espectroscópicas | 111 |
| 5.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível | 112 |

| | |
|---|------------|
| 5.4.2 Espectroscopia de Fluorescência na Região do Ultravioleta-Visível | 129 |
| 5.4.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier | 135 |
| 5.4.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Próximo | 141 |
| 6 CONCLUSÕES | 146 |
| 7 PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE | 148 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 149 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma de um processo de avaliação de risco em solo, onde as caixas verdes ilustram as etapas nas quais a aplicação da Química Analítica é indispensável. Fonte: adaptado de Pierzynski, Sims e Vance (2005) ^[4]. **2**
- Figura 2.** Propostas de estruturas macromoleculares para os AH: a) moléculas aleatoriamente enoveladas de Swift (1999) ^[11], b) modelo de Schulten e Schnitzer (1995) ^[16], onde (A), (B) e (C) indicam espaços vazios capazes de interação com outras espécies químicas; esferas brancas: H, azuis: C, vermelhas: O e pretas: N. **5**
- Figura 3.** Estrutura do AH otimizada com o uso de ferramentas computacionais, a partir do modelo de Schulten e Schnitzer ^[17]. **6**
- Figura 4.** Modelo supramolecular de Diallo et al. (2003) ^[18], apresentando alguns isômeros constituintes de um AH genérico de solo, onde átomos de C estão em preto, átomos de O em vermelho, átomos de N em azul, átomos de S em amarelo e átomos de H em branco. **7**
- Figura 5.** Microscopia Eletrônica de Varredura apresentando as conformações estruturais de um AH extraído de solo, onde a figura de cima refere-se à conformação retraída em meio ácido (pH 3) e a figura de baixo refere-se à conformação expandida em meio neutro (pH 7). Fonte: Senesi et al. (1996) ^[19]. **8**
- Figura 6.** Estruturas moleculares dos principais representantes da classe dos antibióticos tetraciclínicos utilizados como fármacos veterinários. Fonte: Meyer et al. (2000) ^[26]. **10**
- Figura 7.** Valores de pK_a (esquerda) e a especiação da OTC (direita) em solução aquosa. Fonte: adaptado de Mitscher (1978) ^[44]. **12**
- Figura 8.** Fluxograma conceitual representando a contextualização do Estudo de forma a demonstrar a necessidade de obtenção de dados consistentes sobre o impacto da presença da OTC no meio ambiente. **19**
- Figura 9.** Diagrama de bloco de um sistema de CLAE, onde: A) reservatório de solvente, B) filtro, C) sistema de bombas e gradiente, D) indicador de pressão e fluxo, E) injetor, F) forno, G) coluna de separação, H) detector, I) processador de dados, J) gravador de dados. Fonte: adaptado de Lindsay (1992) ^[67]. **25**
- Figura 10.** Níveis energéticos das transições eletrônicas observadas na região do UV-Visível a partir dos orbitais moleculares. Fonte: adaptado de Pavia, Lanpman e Kriz (2001) ^[79]. **36**
- Figura 11.** Níveis de energia eletrônicos e vibracionais em uma molécula poliatômica e os caminhos das transições eletrônicas radioativas (absorção, fluorescência e fosforescência) e não-radioativas (conversão interna de energia e *intersystem crossing*). Fonte: traduzido de Krasovitskii e Bolotin (1987) ^[86]. **41**

| | |
|---|------------|
| Figura 12. Dois níveis de energia de um núcleo em um campo magnético de magnitude B_0 . N é a população de núcleos, a direção do campo magnético é para cima, paralelo à ordenada, e B_0 aumenta para a direita. Fonte: adaptado de Silverstein e Webster (2000) ^[94] . | 50 |
| Figura 13. Representação esquemática do Efeito Zeeman. | 53 |
| Figura 14. Geração e obtenção do espectro de RPE. | 54 |
| Figura 15. Geração de espectro decorrente de interação hiperfina, onde A^* é a constante de desdobramento hiperfino e m_I é o spin nuclear. | 55 |
| Figura 16. Esquema de estabilização do radical livre do tipo semiquinona (estrutura do meio) ^[115] . | 57 |
| Figura 17. Fluxograma detalhado do procedimento de extração utilizado para obtenção dos AH de solos (Swift, 1996) ^[120] . | 64 |
| Figura 18. Fluxograma detalhado da ROTA 1 de preparo dos produtos de interação AH-OTC. | 72 |
| Figura 19. Fluxograma detalhado da ROTA 2 de preparo dos produtos de interação AH-OTC. | 74 |
| Figura 20. Espectros de RMN de ^{13}C dos AH extraídos. | 84 |
| Figura 21. Espectros de RPE obtidos na banda-x dos AH extraídos de solo. | 88 |
| Figura 22. Espectros no Infravermelho Médio dos AH extraídos dos solos CAP (esquerda) e PD (direita). | 88 |
| Figura 23. Curvas de calibração (padrão externo) em diferentes valores de pH para o método cromatográfico de determinação de OTC. | 90 |
| Figura 24. Cromatogramas sobrepostos para solo "M1"-OTC obtidos em pH 4,8, onde: C_i OTC = 120 mg L^{-1} (preto), C_i OTC = 60 mg L^{-1} (vermelho), C_i OTC = 30 mg L^{-1} (azul), C_i OTC = 20 mg L^{-1} (rosa). | 91 |
| Figura 25. Cromatogramas sobrepostos para solo "T1"-OTC obtidos em pH 4,8, onde: C_i OTC = 120 mg L^{-1} (preto), C_i OTC = 60 mg L^{-1} (vermelho), C_i OTC = 30 mg L^{-1} (azul), C_i OTC = 20 mg L^{-1} (rosa). | 92 |
| Figura 26. Isotermas obtidas para solo-OTC, segundo o modelo linear ou de partição. | 93 |
| Figura 27. Isotermas obtidas para solo-OTC, segundo o modelo de Freundlich após ajuste linear. | 94 |
| Figura 28. Isotermas obtidas para solo-OTC, segundo o modelo de Langmuir. | 95 |
| Figura 29. Sobreposição dos perfis de K_d em função da concentração inicial de OTC para os dois solos estudados. | 97 |
| Figura 30. Cromatogramas sobrepostos para AH"CAP"-OTC (acima) e para AH"PD"-OTC (abaixo) obtidos em pH 3,1, onde: C_i OTC = 120 mg L^{-1} (preto), C_i OTC = 60 mg L^{-1} (vermelho), C_i OTC = 30 mg L^{-1} (azul escuro), C_i OTC = 20 mg L^{-1} (rosa), C_i OTC = 10 mg L^{-1} (verde) e C_i OTC = 5 mg L^{-1} (azul claro). | 99 |
| Figura 31. Cromatogramas sobrepostos para AH"CAP"-OTC (acima) e para AH"PD"-OTC (abaixo) obtidos em pH 4,8, onde: C_i OTC = 120 mg L^{-1} (preto), C_i OTC = 60 mg L^{-1} (vermelho), C_i OTC = 30 mg L^{-1} (azul escuro), C_i OTC = 20 mg L^{-1} (rosa), C_i OTC = 10 mg L^{-1} (verde) e C_i OTC = 5 mg L^{-1} (azul claro). | 100 |
| Figura 32. Cromatogramas sobrepostos para AH"CAP"-OTC (acima) e para AH"PD"-OTC (abaixo) obtidos em pH 8,3, onde para AH"CAP"-OTC: C_i OTC = 120 mg L^{-1} (preto), C_i OTC = 60 mg L^{-1} (azul escuro), C_i OTC = 30 mg L^{-1} (verde), C_i OTC = 20 mg L^{-1} (azul claro), C_i OTC = 10 mg L^{-1} (cinza) e C_i OTC = 5 mg L^{-1} (marrom). Para AH"PD"-OTC: C_i OTC = 120 mg L^{-1} (preto), C_i OTC = 60 mg L^{-1} (vermelho), C_i OTC = 30 mg L^{-1} (azul escuro). | 101 |

| | |
|--|------------|
| Figura 33. Isotermas obtidas para AH ⁺ CAP ⁻ -OTC, segundo o modelo linear ou de partição. | 103 |
| Figura 34. Isotermas obtidas para AH ⁺ PD ⁻ -OTC, segundo o modelo linear ou de partição. | 104 |
| Figura 35. Isotermas obtidas para AH ⁺ CAP ⁻ -OTC, segundo o modelo de Freundlich após ajuste linear. | 106 |
| Figura 36. Isotermas obtidas para AH ⁺ PD ⁻ -OTC, segundo o modelo de Freundlich após ajuste linear. | 106 |
| Figura 37. Isotermas obtidas para AH ⁺ CAP ⁻ -OTC, segundo o modelo de Langmuir. | 107 |
| Figura 38. Isotermas obtidas para AH ⁺ PD ⁻ -OTC, segundo o modelo de Langmuir. Em pH 4,8 o modelo foi linearmente ajustado via regressão linear. | 108 |
| Figura 39. Efeito do pH na variação de K _r (capacidade de sorção) para AH CAP e AH PD. | 110 |
| Figura 40. Efeito do pH na variação de N (intensidade da sorção) para AH CAP e AH PD. | 110 |
| Figura 41. Espectros de UV-Visível da OTC obtidos em diferentes valores de pH para um período de solubilização de 1 h em temperatura ambiente e uma concentração de OTC de 20 mg L ⁻¹ (4,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹). | 114 |
| Figura 42. Espectros de UV-Visível do AH CAP obtidos em diferentes valores de pH para um período de solubilização de 24 h em temperatura ambiente e uma concentração de 600 mg L ⁻¹ . Para o pH 8,3 aplicou-se uma diluição de 1 : 20 (v/v). | 115 |
| Figura 43. Espectros de UV-Visível da formação de produtos de interação AH-OTC em pH 3,1 em função do tempo (máximo de 4 h), para a relação m/v de 30AH : 1OTC (600 mg L ⁻¹ AH : 20 mg L ⁻¹ OTC). | 115 |
| Figura 44. Espectros de UV-Visível da formação de produtos de interação AH-OTC em pH 4,8 em função do tempo (máximo de 4 h), para a relação m/v de 30AH : 1OTC (600 mg L ⁻¹ AH : 20 mg L ⁻¹ OTC). | 116 |
| Figura 45. Espectros de UV-Vis da formação de produtos de interação AH-OTC em pH 8,3 em função do tempo (máximo de 4 h), para a relação m/v de 30AH : 1OTC (600 mg L ⁻¹ AH : 20 mg L ⁻¹ OTC), obtidos com a aplicação de diluição 1 : 20 v/v. | 116 |
| Figura 46. Monitoramento das bandas de absorção no UV para a determinação do tempo de equilíbrio de sorção e interação para AH-OTC a uma razão m/v de 30AH : 1OTC (600 mg L ⁻¹ AH : 20 mg L ⁻¹ OTC). | 119 |
| Figura 47. Espectros de UV-Visível da OTC em função do pH do meio, onde: A) pH 3,1, B) pH 4,8 e C) pH 8,3. | 121 |
| Figura 48. Espectros de UV-Visível de AH CAP, OTC, AHOTC e a subtração de AHOTC - AH em pH 3,1 e para 24 h de interação. | 122 |
| Figura 49. Espectros de UV-Visível de AH CAP, OTC, AHOTC e a subtração de AHOTC - AH em pH 4,8 e para 24 h de interação. | 123 |
| Figura 50. Espectros de UV-Visível de AH CAP, OTC, AHOTC e a subtração de AHOTC - AH em pH 8,3 e para 24 h de interação. | 124 |
| Figura 51. Sobreposição de espectros de absorção da OTC em diferentes solventes na região do UV. | 125 |
| Figura 52. Sobreposição de espectros de absorção da OTC em diferentes solventes na região limite | 126 |

entre o UV e o Visível.

- Figura 53.** Sobreposição de espectros de Fluorescência no UV-Visível obtidos no modo de emissão, com ajuste de pH após período de interação de 24 h, com uma excitação em 240 nm. Relação 30AH : 1OTC (m/v). **130**
- Figura 54.** Sobreposição de espectros de Fluorescência no UV-Visível obtidos no modo de emissão, com ajuste de pH após período de interação de 24 h, com uma excitação em 465 nm. Relação 30AH : 1OTC (m/v). **131**
- Figura 55.** Sobreposição de espectros de Fluorescência no UV-Visível obtidos no modo de excitação, com ajuste de pH após período de interação de 24 h, com uma emissão em 510 nm. Relação 30AH : 1OTC (m/v). **132**
- Figura 56.** Sobreposição de espectros de Fluorescência no UV-Visível obtidos no modo de varredura sincronizada, com ajuste de pH após período de interação de 24 h, com um $\Delta\lambda$ de 55 nm. Relação 30AH : 1OTC (m/v). **133**
- Figura 57.** Espectros de Infravermelho Médio da OTC em diversos valores de pH, após 24 h de solubilização à temperatura ambiente e a uma concentração de 20 mg L⁻¹. **136**
- Figura 58.** Comparação de espectros de Infravermelho Médio em pH 3,1 (ROTA 2). **137**
- Figura 59.** Comparação de espectros de Infravermelho Médio em pH 4,8 (ROTA 2). **137**
- Figura 60.** Comparação de espectros de Infravermelho Médio em pH 8,2 (ROTA 2). **138**
- Figura 61.** Comparação de espectros de Infravermelho Médio em pH 11,5 (ROTA 2). **138**
- Figura 62.** Sobreposição de espectros de Infravermelho Médio em pH 8,2 (detalhe de região da Figura 60). **139**
- Figura 63.** Efeito do pH no perfil dos espectros no Infravermelho Próximo de AH CAP (600 mg L⁻¹). **141**
- Figura 64.** Efeito do pH no perfil dos espectros no Infravermelho Próximo de OTC (20 mg L⁻¹). **141**
- Figura 65.** Comparação de espectros no Infravermelho Próximo de AH CAP, OTC e AH-OTC em pH 3,1. **143**
- Figura 66.** Comparação de espectros no Infravermelho Próximo de AH CAP, OTC e AH-OTC em pH 5,3. **143**
- Figura 67.** Comparação de espectros no infravermelho próximo de AH CAP, OTC e AH-OTC em pH 8,2. **144**
- Figura 68.** Comparação de espectros no infravermelho próximo de AH CAP, OTC e AH-OTC em pH 11,5. **144**

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|------------|
| Tabela 1. Dados da literatura sobre a sorção da OTC a solos e sedimentos. | 21 |
| Tabela 2. Formas de isotermas de sorção propostos por Giles, Smith e Huitson (1974). Fonte: traduzido de Hinz (2001) ^[78] . S é a concentração sorvida, C_e é a concentração no equilíbrio e K_d é a constante de partição ou se sorção. | 31 |
| Tabela 3. Transições eletrônicas e os comprimentos de onda máximos de bandas de grupamentos químicos cromóforos na região do Ultravioleta. | 37 |
| Tabela 4. Atribuição de bandas características de deformações e estiramentos vibracionais dos AH. | 44 |
| Tabela 5. Valores do Fator-g para exemplos de centros paramagnéticos. | 56 |
| Tabela 6. Parâmetros analíticos de caracterização dos solos e sua utilização para a interpretação dos dados de sorção solo-OTC. Definição dos parâmetros adaptada de EMBRAPA (1997) ^[117] e EMBRAPA (1998) ^[118] . | 61 |
| Tabela 7. Identificação e classificação das amostras de solo utilizadas para a extração dos AH. | 63 |
| Tabela 8. Propriedades físico-químicas e estruturais do clorohidrato de oxitetraciclina. | 67 |
| Tabela 9. Aspectos operacionais das técnicas espectroscópicas utilizadas para a determinação de mecanismos de interação. | 75 |
| Tabela 10. Resultados de caracterização dos solos M1 (mata, latossolo vermelho-amarelo distrófico) e T1 (turfa, organossolo). | 81 |
| Tabela 11. Valores de porcentagens atômicas obtidas por Análise Elementar e de teor de cinzas obtido por aquecimento e pesagem. | 82 |
| Tabela 12. Porcentagem de área relativa para os principais grupos funcionais aos quais os carbonos encontraram-se associados na molécula dos AH e os parâmetros moleculares derivados. | 86 |
| Tabela 13. Valores para os parâmetros de RPE determinados para os AH extraídos. | 87 |
| Tabela 14. Valores calculados para as isotermas de Freundlich após ajuste linear da equação em sua forma logarítmica. | 96 |
| Tabela 15. Valores determinados para K _d para sorção da OTC aos solos T1 e M1. | 96 |
| Tabela 16. Valores médios determinados em duplicata para K _d em diferentes valores de pH para produtos de interação com o AH CAP e o AH PD. | 102 |
| Tabela 17. Valores calculados para as isotermas de Freundlich após ajuste linear da equação em sua forma logarítmica. | 107 |
| Tabela 18. Ambiente de interação para AH-OTC em função do pH do meio. | 112 |
| Tabela 19. Propriedades físicas dos solventes relacionadas à polaridade de suas moléculas e as possíveis interações com a molécula de OTC. | 127 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|---|
| AH | Ácidos Húmicos |
| AF | Ácidos Fúlvicos |
| APC | Antibiótico Promotor de Crescimento |
| CAP | Capoeira |
| CETESB | Companhia Ambiental do Estado de São Paulo |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CTC | Capacidade de Troca Catiônica |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| FE | Fase Estacionária |
| FM | Fase Móvel |
| IBAMA | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| LQ | Limite de Quantificação do Método |
| M1 | Solo de Mata – Ponto 1 de Amostragem |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MO | Matéria Orgânica |
| OTC | Oxitetraciclina |
| PD | Plantio Direto – 20 Anos |
| K_a | Constante Ácida/Constante de Ionização |
| K_d | Coefficiente de Partição |
| K_f | Coefficiente de Freundlich |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RPE | Ressonância Paramagnética Eletrônica |
| SH | Substâncias Húmicas |
| T1 | Solo Tipo Turfa – Ponto 1 de Amostragem |
| t_R | Tempo de Retenção |
| UV-Visível | Ultravioleta-Visível |

RESUMO

Na atualidade estudos direcionados para a avaliação do risco químico e do impacto ambiental produzidos por compostos químicos de uso intensivo, como agrotóxicos, petroquímicos e fármacos, vêm ganhando importância por elucidarem as implicações ao meio ambiente e à saúde pública decorrentes deste uso pela sociedade moderna de forma a estabelecer parâmetros restritivos para suas aplicações, evitando-se danos posteriores.

Este Estudo compreendeu as observações de sorção e de interação do antibiótico de uso animal e agrícola oxitetraciclina (OTC) com solos brasileiros e ácidos húmicos (AH) extraídos de solos, tendo-se como objetivos gerais comprovar a sorção aos solos e aos AH e verificar a influência da matéria orgânica (MO) e do pH sobre a sorção, definindo quais os mecanismos moleculares de interação envolvidos, cabendo destacar que as tetraciclina são uma das principais classes de antibióticos utilizadas na pecuária brasileira, tanto para tratamento de enfermidades quanto como Antibióticos Promotores de Crescimento (APC), além de serem freqüentemente aplicados na agricultura para controle de fungos e bactérias.

Utilizou-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a coleta de dados quantitativos que permitiram a construção de isotermas de sorção solo-OTC em pH 4,8 e AH-OTC em três valores de pH (3,1, 4,8 e 8,3) para a comprovação da sorção e da influência do conteúdo de MO no primeiro caso, e na sorção aos AH, para o segundo caso. Os solos foram caracterizados conforme procedimento padrão da EMBRAPA, enquanto que os AH foram caracterizados segundo procedimentos recomendados pela literatura por meio

das técnicas instrumentais de Análise Elementar, Absorção na Região do Infravermelho Médio, Ressonância Magnética Nuclear e Ressonância Paramagnética Eletrônica. Foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de Absorção na Região do Infravermelho (Próximo e Médio) e Absorção e Fluorescência na Região do UV-Visível, para a avaliação dos possíveis mecanismos de interação envolvidos, como ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica e transferência de elétrons.

A isoterma de Freundlich apresentou-se como um modelo matemático adequado para a verificação da sorção solos-OTC e AH-OTC, a partir da aplicação de um método cromatográfico adequado, comprovando a sorção para os dois casos, bem como o efeito do conteúdo de MO dos solos e do pH do meio sobre a capacidade e a intensidade da sorção, a qual foi quantificada como de capacidade de sorção inferior em comparação a dados obtidos em clima temperado e de alta capacidade de sorção quando comparada à legislação ambiental brasileira. Foi observado que a OTC interagiu com os AH em uma larga faixa de valores de pH, indo de 3,1 a 8,3. Contudo, o meio no qual foi possível observar de uma forma mais acentuada a interação entre AH e OTC foi o meio básico (pH 8,2), sendo notado a existência de mecanismos de interação associados e dependentes do pH do meio, como: ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica e transferência de prótons.

ABSTRACT

At present further studies on the risk assessment of chemical and environmental impact produced by chemical-intensive, such as pesticides, petrochemicals and pharmaceuticals, have gained importance for elucidating the implications for the environment and public health arising from this use by modern society to establish restrictive parameters for their applications, avoiding further damage.

This Study comprised observations of sorption and interaction of antibiotic for animal and agriculture use oxytetracycline (OTC) with brazilian soils and humic acids (HA) extracted from soil, having as objectives to prove the general sorption to soils and the AH and the influence of organic matter (OM) and pH on the sorption, which define the molecular mechanisms of interaction involved, highlighting that tetracyclines are a major classes of antibiotics used in the brazilian cattle industry, both for treatment of diseases such as antibiotic growth promoters (AGP), and frequently also applied in agriculture to control fungi and bacteria.

The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to collect quantitative data that allowed the construction of sorption isotherms soils-OTC in pH 4.8 and AH-OTC in three pH values (3.1, 4, 8 and 8.3) for proof of sorption and the influence of OM content in the first case, and sorption to AH, for the second case. The soils were characterized as standard procedure of EMBRAPA, while AH were characterized according to procedures recommended by the literature by means of instrumental techniques for Elemental Analysis, Absorption in the Region of the Middle Infrared, Nuclear

Magnetic Resonance and Electron Paramagnetic Resonance. The Spectroscopic Absorption in the Infrared Region (Middle) and Fluorescence and Absorption in the Region and the UV-Visible were used for the evaluation of interaction mechanisms involved, such as hydrogen bonding, hydrophobic interactions and electron transfer.

The Freundlich isotherm was presented as a mathematical model suitable for the verification of soils-OTC sorption and AH-OTC sorption from the application of a chromatographic method that is suitable, proving the sorption for the two cases as well as the effect of OM content of soils and the pH on the capacity and sorption intensity, which was quantified as the lower sorption capacity in comparison with data from temperate and high sorption capacity when compared to Brazilian environmental legislation. It was observed that the OTC interacted with the HA in a wide range of pH values, ranging from 3.1 to 8.3. However, the way in which it was possible to observe a more pronounced interaction between HA and OTC was the basic medium (pH 8.2), and noted the existence of mechanisms of interaction associated and dependent on pH, such as: link hydrogen, hydrophobic interaction and proton transfer.

1 INTRODUÇÃO

A matéria orgânica (MO) do solo é originária da decomposição de resíduos da biomassa vegetal e de restos animais que, por meio de processos químicos, físicos e biológicos, sofrem modificação estrutural dando origem a uma série de compostos orgânicos, cujos principais representantes são as substâncias húmicas (SH), as quais contribuem de forma fundamental para as propriedades do solo, como no caso da capacidade de seqüestro, mobilização e efeito redox de moléculas orgânicas estranhas ao meio (*xenobióticos*) ^[1], já que as SH interagem com diversos contaminantes orgânicos, como pesticidas e derivados de petróleo, e inorgânicos como os metais pesados ^[2].

Considerando-se as diversas fontes de contaminação às quais o meio ambiente encontra-se exposto, devido às atividades humanas ligadas principalmente à indústria e comércio de produtos químicos diversos, a Avaliação de Risco tem-se tornado uma ferramenta fundamental para determinação das fontes de contaminação, rotas de exposição e o risco potencial ao meio ambiente e à saúde humana ^[3], havendo uma importante contribuição da Química Analítica para este tema, como demonstrado no fluxograma conceitual da Figura 1. Esta Avaliação de Risco também deve ser considerada para o caso das interações sofridas pela MO com xenobióticos, em função do uso intenso do solo para atividades agrícolas e pecuárias, pois a mesma poderá fornecer dados sobre o comportamento de tais xenobióticos frente às condições ambientais do meio.

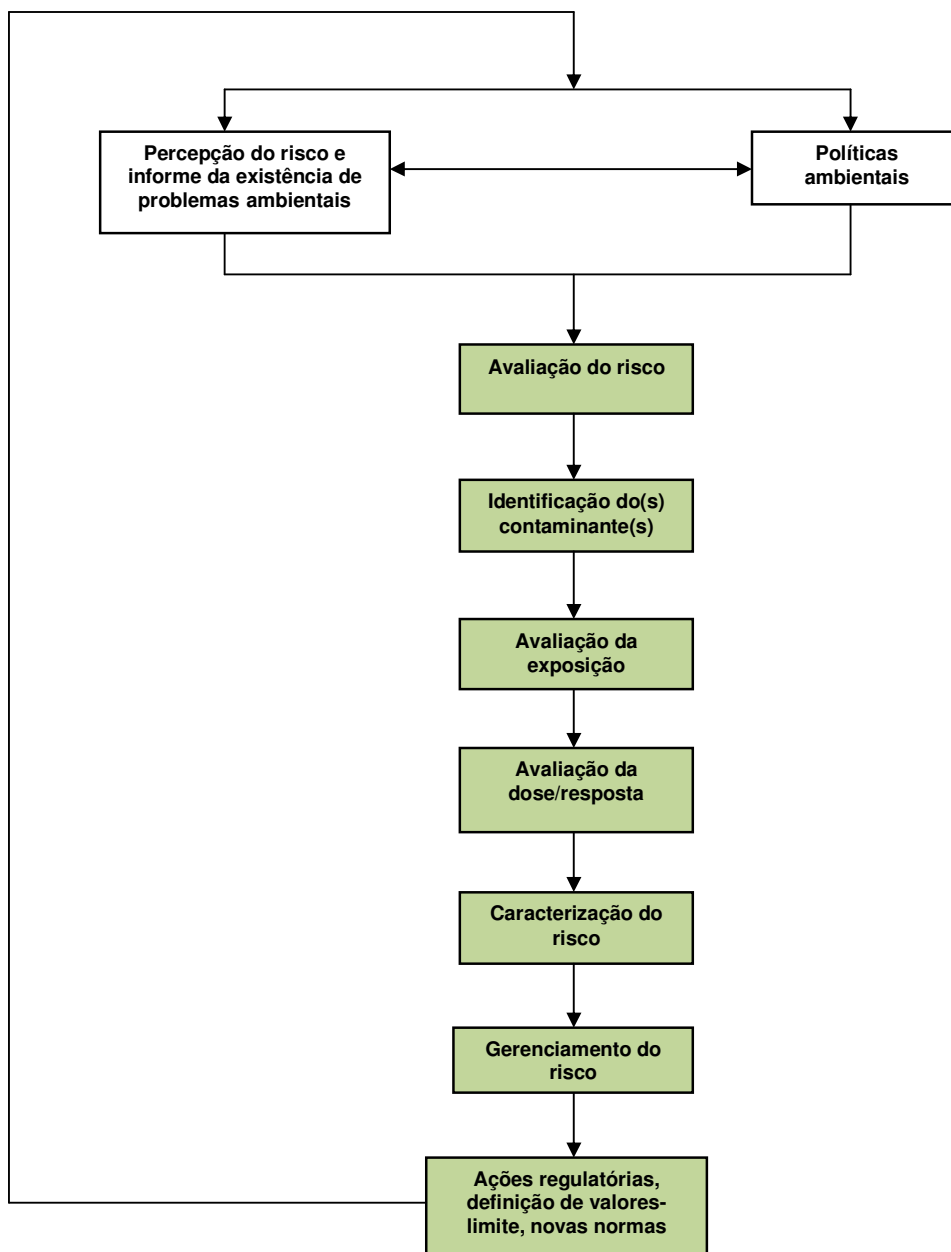


Figura 1. Fluxograma de um processo de Avaliação de Risco em solo, onde as caixas verdes ilustram as etapas nas quais a aplicação da Química Analítica é indispensável. Fonte: adaptado de Pierzynski, Sims e Vance (2005) ^[4].

A Química Analítica atua por meio do desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos que possam fornecer resultados representativos, confiáveis e rastreáveis, de acordo com padrões nacionais e internacionais de qualidade.

No Brasil existem diversas legislações ambientais que regulamentam a presença de contaminantes químicos no meio ambiente, podendo-se destacar:

- Portaria n^o. 518/2004 do Ministério da Saúde (MS) que estabelece os procedimentos e responsabilidades para o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade [5];
- Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) que estabelece os valores de Coeficientes de Partição (K_d) para a determinação da mobilidade de substâncias químicas no solo [6];
- Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo/2005 da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) que estabelece os parâmetros de controle de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas [7];
- Procedimento para Gerenciamento de Áreas Contaminadas/2007 da CETESB que dispõe sobre o gerenciamento de tais áreas [8].

Contudo, existe ainda uma grande variedade de compostos químicos de uso diverso que não são contemplados em tais legislações, podendo-se destacar os produtos de higiene e os farmacoquímicos.

1.1 Matéria Orgânica do Solo e os Ácidos Húmicos

SH são, seguramente, as mais abundantes fontes de componentes orgânicos da natureza e estão presentes em todos os solos e águas naturais que contenham MO ^[1]. Atualmente é aceito que a turfa e a MO do solo são as fontes ativas principais de carbono em termos de reversibilidade de entrada e saída deste elemento no ciclo biogeoquímico da natureza ^[9].

A constituição das SH, baseada operacionalmente na solubilidade em meio ácido ou alcalino, é a seguinte ^[1]:

- Ácidos Fúlvicos (AF): fração solúvel em todas as condições de pH;
- Ácidos Húmicos (AH): fração solúvel em meio alcalino;
- Humina: fração insolúvel em qualquer condição de pH.

Destas três frações, os AH são mais suscetíveis às mudanças estruturais decorrentes de práticas de manejo do solo e dos processos de degradação da MO ^[10].

Do ponto de vista estrutural, a definição de uma estrutura química dos AH é um tema polêmico, por existirem duas propostas em discussão: macromolecular ^[11] e supramolecular ^[12, 13], onde a macromolecular estabelece que as variações estruturais dos AH são similares às aquelas observadas em macromoléculas biológicas, como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e ligninas e dependem do pH e da força iônica do meio; já a supramolecular estabelece que os AH em solução formam agregados moleculares que são estabilizados por interações fracas, como ligação de hidrogênio e interações

hidrofóbicas (van der Waals). Estudos mais recentes apontam que a associação supramolecular de componentes húmicos de baixa massa molecular é o modelo estrutural mais consistente, baseando-se em informações cromatográficas dos elementos constituintes de tais componentes húmicos, como o nitrogênio, e das interações sofridas em função do ambiente químico ^[14], como no caso do surgimento de regiões protetoras hidrofóbicas em condições de meio ácido, detectado pela diminuição da largura de linha do sinal de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) do radical tipo semiquinona dos AH ^[15].

Estas propostas estruturais são apresentadas nas Figuras 2, 3 e 4.

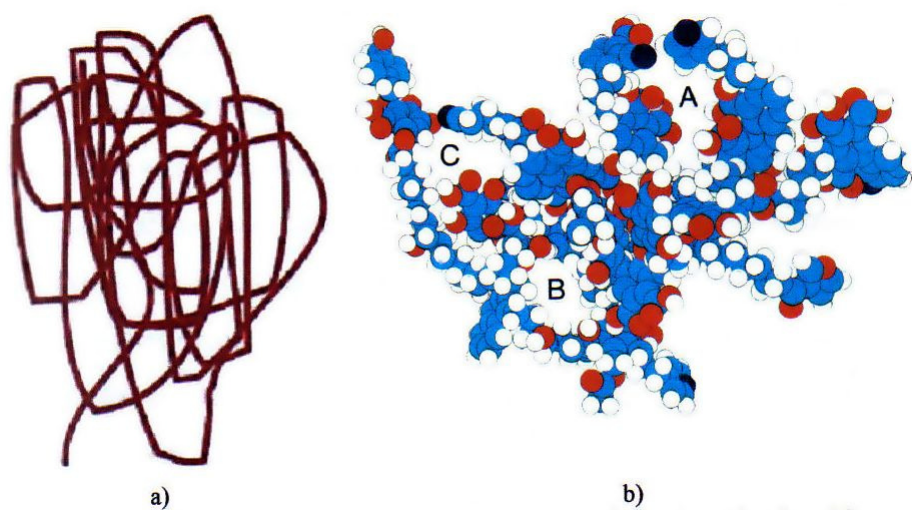


Figura 2. Propostas de estruturas macromoleculares para os AH: a) moléculas aleatoriamente enoveladas de Swift (1999) ^[11], b) modelo de Schulten e Schnitzer (1995) ^[16], onde (A), (B) e (C) indicam espaços vazios capazes de interação com outras espécies químicas; esferas brancas: H, azuis: C, vermelhas: O e pretas: N.

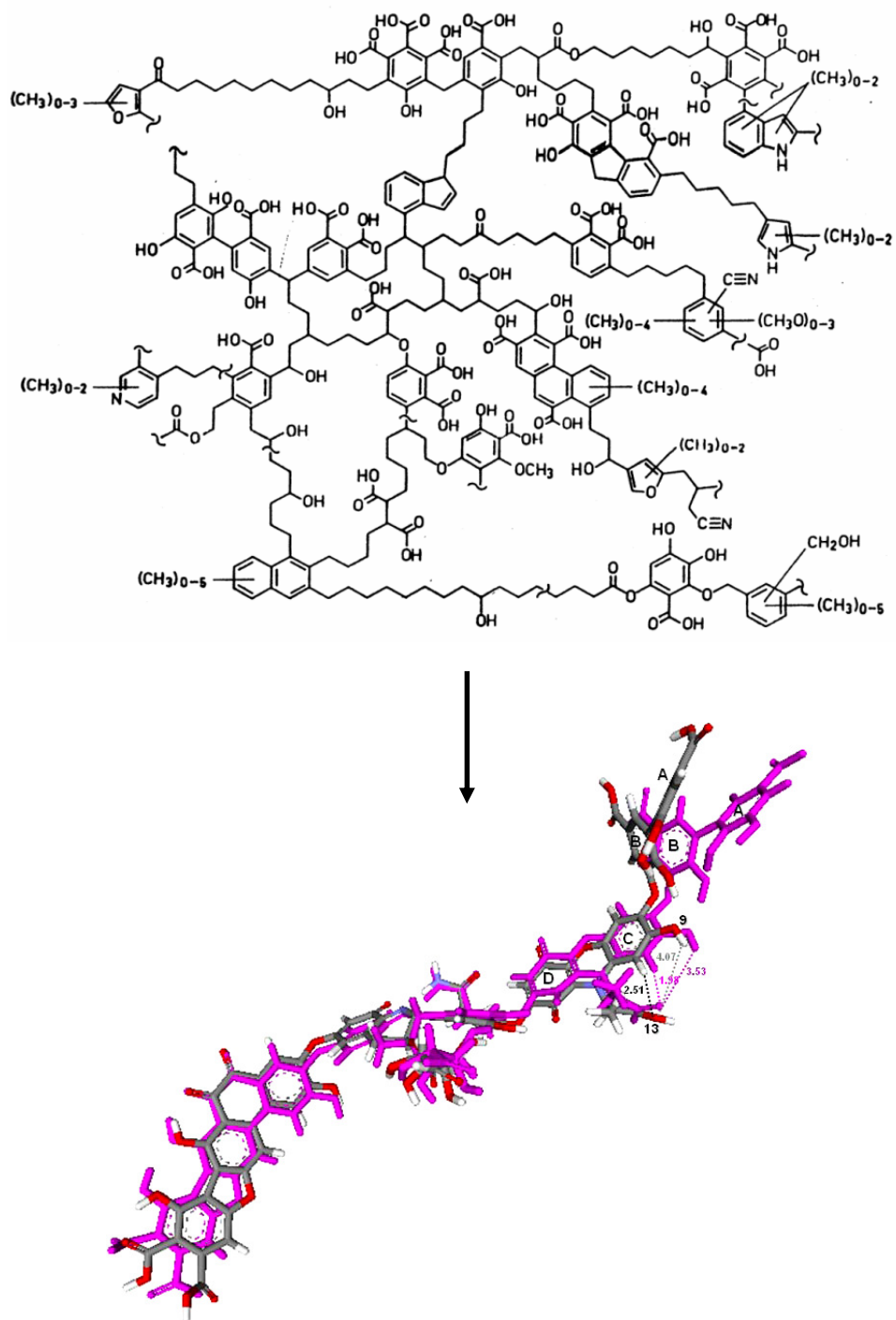


Figura 3. Estrutura do AH otimizada com o uso de ferramentas computacionais, a partir do modelo de Schulten e Schnitzer ^[17].

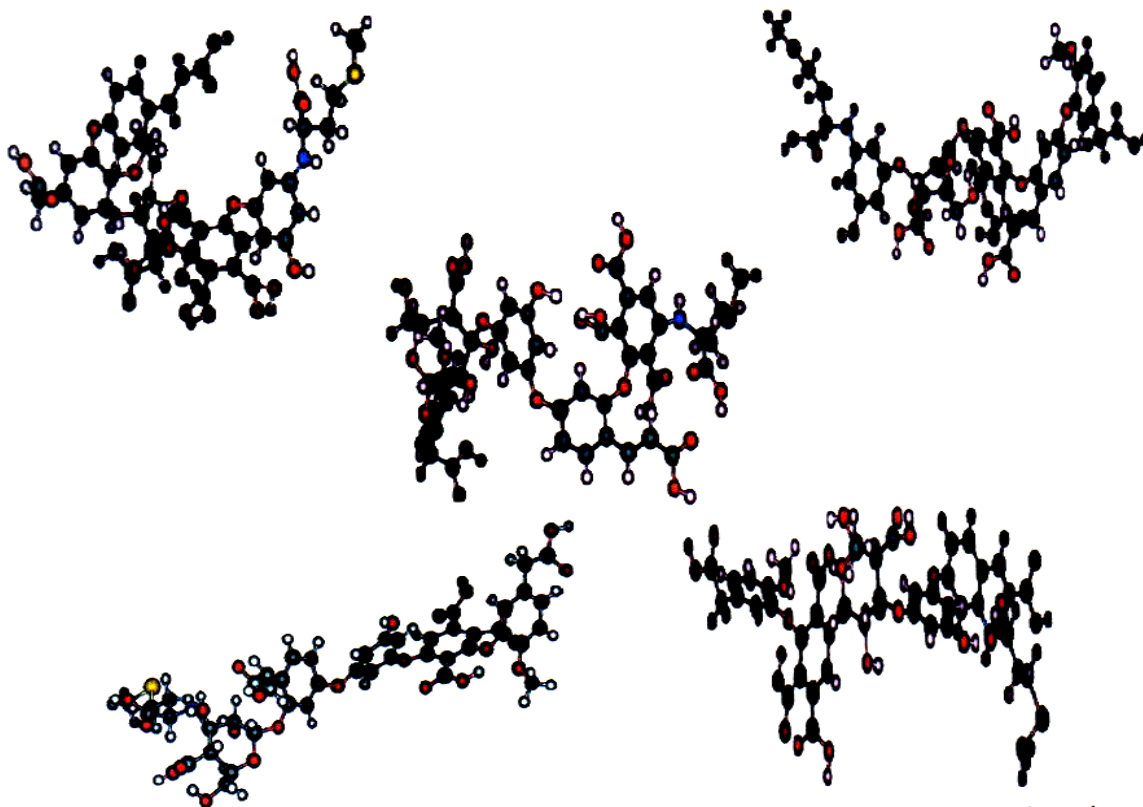


Figura 4. Modelo supramolecular de Diallo et al. (2003) ^[18], apresentando alguns isômeros constituintes de um AH genérico de solo, onde átomos de C estão em preto, átomos de O em vermelho, átomos de N em azul, átomos de S em amarelo e átomos de H em branco.

Os AH, como produtos de degradação da biomassa, são ricos em estruturas fenólicas, quinonas e aromáticas (originárias principalmente da lignina), carboxílicas e anéis N-heterocíclicos (originários de aminoácidos e proteínas), além de resíduos polissacarídeos (originários da celulose e hemicelulose) ^[18], conferindo terminações polares e não-polares à estrutura molecular.

Independentemente da definição do modelo estrutural mais adequado, foi observado que a conformação estrutural dos AH varia em função do pH do meio ^[19], onde em um meio ácido tem-se uma estrutura retraída devido às

ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que em meio neutro a alcalino tem-se uma estrutura aberta devido à repulsão eletrostática de grupamentos carboxílicos e fenólicos desprotonados; a Figura 5 apresenta estas conformações.

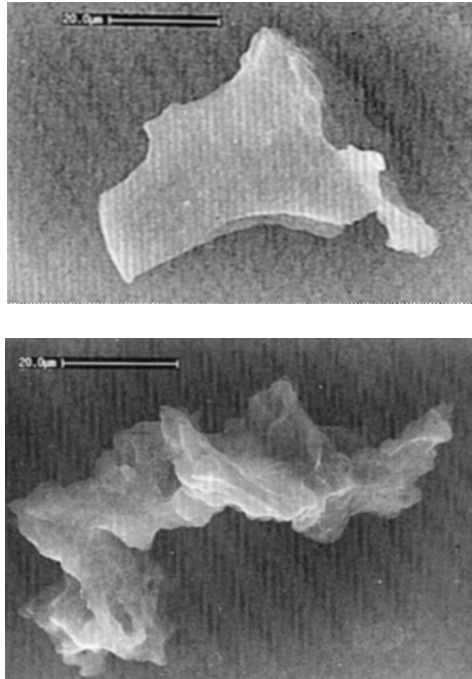


Figura 5. Microscopia Eletrônica de Varredura apresentando as conformações estruturais de um AH extraído de solo, onde a figura de cima refere-se à conformação retraída em meio ácido (pH 3) e a figura de baixo refere-se à conformação expandida em meio neutro (pH 7). Fonte:

Senesi et al. (1996) ^[19].

1.2 Interação dos Ácidos Húmicos com Contaminantes Químicos

As SH interagem com diversos contaminantes orgânicos (ex.: pesticidas e derivados de petróleo) e inorgânicos (metais tóxicos) ^[2], em função de sua estrutura molecular variada, o que facilita tanto interações de caráter não-polar, quanto de caráter polar temporário, para compostos orgânicos, e a formação de ligações coordenadas, como no caso dos metais. Desta forma, grupamentos

fenólicos e carboxílicos são freqüentemente observados como principais sítios de ligação para xenobióticos catiônicos orgânicos pela atração eletrostática entre moléculas, além de formação de agregados moleculares com cátions metálicos [2].

Outras formas de interação como ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica entre grupamentos alifáticos, transferência de carga e sobreposição de sistemas π aromáticos são também observadas entre AH e xenobióticos orgânicos [20-23].

1.3 Antibióticos Tetraciclínicos

Antibióticos são compostos químicos inibidores eficientes do crescimento de bactérias produzidos por microorganismos comumente presentes no meio ambiente, como os fungos, com sua importância na natureza devida à inibição de competidores microbiológicos, com a resistência ao antibiótico determinando se o microorganismo (ex.: bactéria) poderá evitar a atividade do antibiótico e ganhar tal competição [24].

A produção mundial estimada de antibióticos é da ordem de 200.000 toneladas anuais, sendo a metade desta quantidade utilizada para aplicação em animais, e com as tetraclicinas figurando entre as classes de antibiótico de maior uso, conforme observado por Wise (2002 apud KÿMMER, 2009, p. 417 – 434) [25].

WISE, R. Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, p. 585 – 586, 2002.

Os principais representantes desta classe são apresentados na Figura 6 em ordem decrescente de uso veterinário: oxitetraciclina > tetraciclina > clorotetraciclina ^[26].

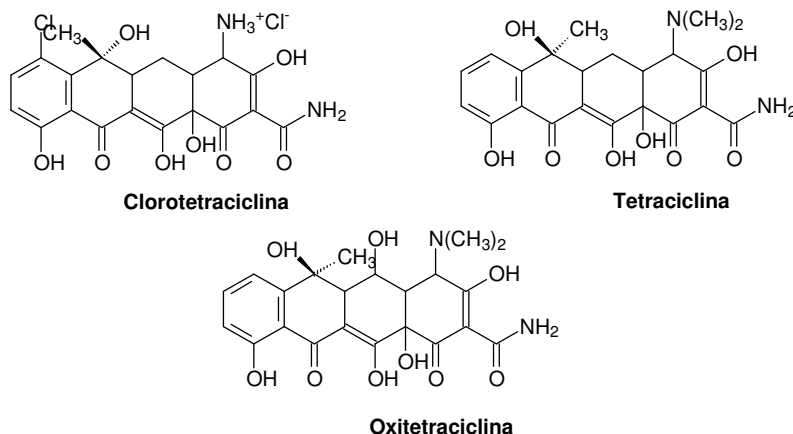


Figura 6. Estruturas moleculares dos principais representantes da classe dos antibióticos tetraciclínicos utilizados como fármacos veterinários. Fonte: Meyer et al. (2000) ^[26].

A oxitetraciclina (OTC) é um antibiótico de largo espectro de uso animal e humano produzido por microorganismos do gênero *Streptomyces* sp. via imersão ou fermentação no estado sólido e seu rendimento depende da levedura fermentadora utilizada, das condições do meio (pH e temperatura) e da composição do meio de cultura ^[27]. Seu modo de ação se dá via inibição de síntese protéica, em decorrência de danos ao fragmento ribossômico 30S ^[28].

O uso de tetraciclina como Antibiótico Promotor de Crescimento (APC) e para o tratamento de bactérias do gênero *Salmonella* em aves é bastante difundido no Brasil ^[31], pois estes são, certamente, uma das principais classes de antibióticos comercializados e aplicados na pecuária brasileira ^[32].

Um fato preocupante no uso de antibióticos tetraciclínicos veterinários é que uma grande fração destes, entre 20 e 90 %, não é absorvida pelo organismo animal, sendo excretada de forma inalterada na urina e nas fezes [33], o que pode levar à criação de resistência a estes antibióticos, e dependendo de seu transporte no solo, alcançar a água subterrânea e conferir resistência por parte dos microorganismos da água. Caso esta água venha a ser consumida por seres humanos e animais, microorganismos serão resistentes no organismo receptor a medicação por estes antibióticos, podendo transmitir genes resistentes a tais medicamentos [34, 35]. Destaca-se como uma fonte de contaminação do solo por antibióticos a aplicação de esterco suíno, bovino e de aves em áreas cultiváveis [36], com a comprovação recente da presença de resíduos destes compostos no solo decorrentes deste tipo de aplicação agrícola [29, 37]. Soma-se a este problema de ordem ambiental e de saúde pública o fato de que a nova geração de APCs em desenvolvimento não é absorvida pelo trato intestinal, para evitar resíduos na carne [38], o que poderá aumentar a presença destes compostos em matrizes ambientais. O uso destes APCs pode levar a riscos bioquímicos e microbiológicos, já que estudos realizados no Brasil demonstraram que frangos de corte podem funcionar como reservatório de genes resistentes a antibióticos de importante uso em medicina veterinária e humana, dentre eles as tetraciclinas [39], o que também foi observado na Europa [40].

No Brasil a OTC também é utilizada como bactericida para aplicação em diversas cultivares, conforme permitido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com seu uso se estendendo para as lavouras de tomate, batata, feijão, pepino, café, pêssego, ameixa e pimenta, com um Limite

Máximo de Resíduo de 0,25 mg kg⁻¹ [41]. Em estudo recente, Maia et al. (2009) [42] observaram que para o caso da aplicação no cultivo de tomate no Brasil, caso não haja um respeito ao intervalo de pré-colheita, que é de 7 dias, aumenta-se a possibilidade de detecção de resíduos da OTC neste tipo de alimento, além de evidenciar a necessidade de estudos mais aprofundados para uma melhor avaliação da presença de resíduos e de produtos de degradação após a aplicação em cultivo a campo e fechado.

Dentre os antibióticos de uso comum no Brasil como medicamento veterinário, dos quais a OTC é o princípio ativo, destaca-se a Terramicina L.A.® (PFIZER) para uso em diferentes animais de criação, sendo a OTC certamente o principal antibiótico tetraciclínico em uso atualmente no país [43].

As características ácido-base da OTC e a distribuição das espécies são apresentadas na Figura 7.

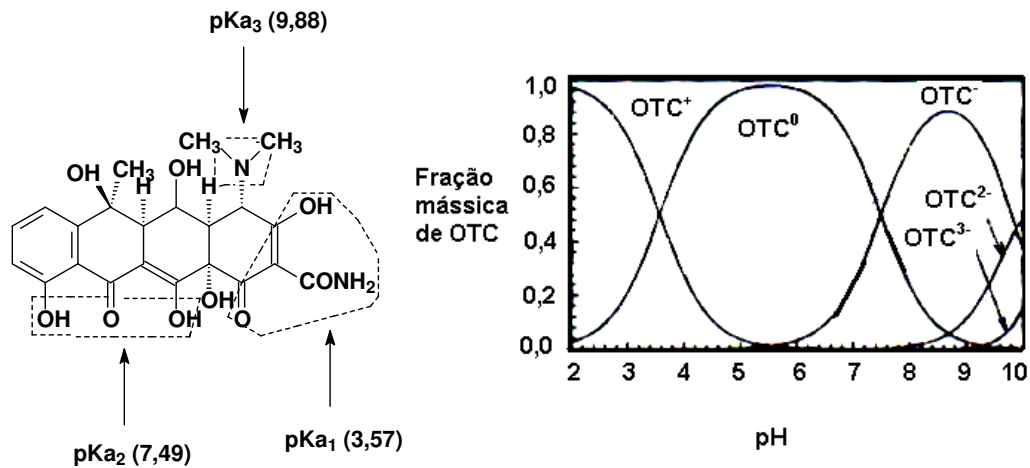


Figura 7. Valores de pK_a (esquerda) e a especiação da OTC (direita) em solução aquosa.

Fonte: adaptado de Mitscher (1978) [44].

Os três valores de pK_a da molécula de OTC são atribuídos às ionizações dos seguintes grupamentos: hidroxila e amida (pK_{a1} = 3,57), hidroxilas-

carbonila ($pK_{a2} = 7,49$) e amina secundária ($pK_{a3} = 9,88$). Este comportamento do pK_a reflete a característica dos sítios de ligação da molécula e a labilidade de cada um deles.

A existência de três valores de pK_a na molécula de OTC, além de um *zwitterion* em pH em torno de 5, condição na qual a molécula possui uma carga positiva e uma carga negativa distribuídas em sua estrutura decorrente da transferência intramolecular de próton ^[45], poderão ser determinantes para as propriedades de interação intramoleculares e intermoleculares devido às influências do pH e da força iônica decorrentes da ionização dos sítios de ligação referentes a cada valor de pK_a .

1.4 Consequências da Sorção Solo–Oxitetraciclina e Ácido Húmico–Oxitetraciclina

Como anteriormente comentado, o grande aporte no meio ambiente de antibióticos pode levar aos seguintes efeitos que caracterizam um risco químico e biológico:

- Mortalidade dos microorganismos do solo, os quais são de grande importância para a funcionalidade do solo;
- Criação de resistência em microorganismos a antibióticos;
- Caso o antibiótico alcance a água subterrânea, e caso esta água venha a ser consumida, pode-se ingerir microorganismos patogênicos resistentes ao mesmo antibiótico.

Portanto, é de grande importância a obtenção de informações criteriosas a respeito da sorção, ou interação decorrente de mecanismos moleculares físicos e químicos ^[4], de um antibiótico como a OTC com o solo brasileiro, de maneira que possibilite estabelecer futuramente critérios que regulamentem seu uso e as consequências de sua presença no solo e na água. Neste sentido, vale destacar que a Agência Ambiental dos Estados Unidos (*US-EPA: United States Environmental Protection Agency*) tem monitorado a presença e os efeitos toxicológicos da OTC no meio ambiente desde o final da década de 1980 ^[46] de forma a avaliar possíveis danos ambientais e de saúde pública decorrentes de seu uso, sendo estes aspectos considerados para a liberação de sua comercialização.

É importante ressaltar que ainda não existem estudos no Brasil a respeito da sorção entre antibióticos veterinários com a MO do solo. Porém, Sassman e Lee (2005) estudando a sorção de antibióticos tetraciclínicos a vários tipos de solo de clima temperado da América do Norte e com diferentes propriedades, como conteúdo de carbono orgânico, pH e Capacidade de Troca Catiônica (CTC), obtiveram valores amplos para a constante de partição (K_d) entre 13 – 310.000 L kg⁻¹, o que já indica uma variação considerável em sua capacidade de interação para esta matriz ^[47].

Algumas considerações pertinentes retiradas da literatura a respeito da sorção SH-OTC e AH-OTC:

- Oleszczuk, Pan e Xing (2009) investigaram os processos de sorção e desorção da OTC às superfícies nanométricas não-polares de carbono, similares a grupamentos alquila e arila de AH, utilizando Isotermas de

Sorção e modelos cinéticos, observando uma rápida cinética de sorção e uma desorção dependente do pH do meio e da quantidade inicial sorvida, bem como da agregação intermolecular ^[48];

- Hayes et al. (2007) simulando terminações húmicas suportadas em sílica fundida com utilização de medidas de ângulo de contato e Geração de Segundo Harmônico (SHG, *Second Harmonic Generation*) por polarização não-linear, obtiveram indicativos de que em pH 8 a OTC interage com SH através de ligação de hidrogênio entre grupos metil-amida e metil-éster, interações hidrofóbicas entre grupamentos alquila e arila e dipolo-induzido de sistemas π aromáticos, com a presença de ligação via grupamento amida acoplado a ácido benzóico podendo perturbar os valores de pK_a interfacial, alterando o pH ótimo de ligação da OTC, e sugeriram, ainda, que o sistema amida-ácido carboxílico possui alta constante de ligação ($6,0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$), o que também deve facilitar uma possível transferência de carga entre as duas espécies ^[20];
- Miflin, Konek e Geiger (2006) examinando a sorção da OTC às interfaces óxidos minerais/água, na presença e ausência de grupos funcionais de SH, com o uso de SHG por polarização não-linear e Isotermas de Sorção, observaram que a sorção se dá de forma reversível via grupamentos metil-éster, ácido carboxílico e alquila, com uma intensidade apreciável ocorrendo somente em pH 8, definindo que a mobilidade da OTC no ambiente depende fortemente do pH e da constituição do solo ^[49];

- Kulshrestha, Giese e Aga (2004) utilizando Isotermas de Freundlich, Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Médio e Difração de Raios X, observaram que a sorção de OTC à argila do tipo montmorilonita diminui com o aumento do pH do meio devido à presença de interação por troca catiônica, a qual é mais efetiva em meio ácido, enquanto que a interação hidrofóbica em pH 5 se dá devido ao zwitterion, com uma grande quantidade de MO dissolvida inibindo a sorção ^[50];
- Whershaw (1999) apontou os sistemas π sobrepostos como possível mecanismo de agregação de compostos orgânicos, os quais contenham anéis aromáticos em sua estrutura, com o carbono orgânico dissolvido ^[23];
- Masel (1996) e Somorjay (1994) definiram que a fisiosorção (ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica) é termodinamicamente favorecida sobre a quimisorção (ligação covamente) pela diminuição da densidade interfacial da Energia Livre de Gibbs, o que leva a uma tendência de formação de interações fracas em meios com a presença de grupamentos não-polares ^[21, 22].

Mesmo obtendo-se informações na literatura sobre a sorção da OTC com SH, ainda não se tem definido ao certo quais os mecanismos de interação envolvidos ou muito menos o pH ótimo de interação para AH se solos brasileiros, dadas as características estruturais dos AH que dependem da matéria-prima de formação e das características físico-químicas e biológicas do meio ^[1], bem como quais as implicações destas interações em solos brasileiros.

1.5 Contextualização do Estudo

Uma avaliação do cenário agropecuário brasileiro e de seus números de produção se faz necessária para identificar o potencial de contaminação da OTC, e desta forma, contextualizar o tema do Estudo junto ao meio ambiente, setor produtivo e à sociedade, fundamentando a importância do estudo.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)^[51] o Brasil possui três classes de rebanho animal para produção, em valores aproximados: rebanho de grande porte (209 milhões de cabeças), rebanho de médio porte (62 milhões de cabeças) e rebanho de pequeno porte (1 bilhão de cabeças).

Conforme anteriormente comentado no **Item 1.3**, um dos antibióticos de uso animal mais comercializado, e cujo princípio ativo é a OTC, é a Terramicina L.A. (PFIZER), a qual é recomendada para a maioria dos rebanhos de grande, médio e pequeno porte. Como também comentado no **Item 1.3**, a OTC é utilizada no Brasil como bactericida em diversas culturas, com a mesma PFIZER produzindo fungicidas e bactericidas à base de OTC^[53].

A partir dos dados recentes da produção agropecuária brasileira e aquelas dos produtos à base de OTC disponíveis comercialmente para aplicação é possível notar que a OTC possui um grande potencial de contaminação ambiental baseado, principalmente, na grande demanda por medicamentos veterinários e por defensivos agrícolas. Conforme dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), o faturamento do setor em 2008 foi de R\$ 2,7 bilhões, onde os antimicrobianos ou antibióticos representaram R\$ 646,7 milhões (principal grupo), cujos

principais tipos de rebanhos consumidores foram os ruminantes (R\$ 1,5 bilhão), as aves (R\$ 405,1 milhões) e os suínos (R\$ 387,2 milhões) ^[54]. Já os dados do Sindicato Nacional da Indústria para Defesa Agrícola (SINDAG) do mercado de 2008 apontam para um mercado total de R\$ 10,2 bilhões, onde os herbicidas responderam por R\$ 4,6 bilhões e os fungicidas por R\$ 2,2 bilhões, as quais são as principais classes de defensivos agrícolas comercializados ^[55]. No entanto, este potencial de contaminação é de difícil estimativa, pois não se tem dados disponíveis no Brasil sobre a produção e a aplicação da OTC tanto para fins veterinários como para fins agrônômicos.

Segundo dados do MAPA sobre a projeção da produção agropecuária brasileira entre o período de 2008/2009 a 2018/2019 ^[56] a produção de grãos (soja, milho, trigo, arroz e feijão) deverá passar de 139,7 milhões de toneladas em 2007/2008 para 180 milhões em 2018/2019, indicando um acréscimo de 40 milhões de toneladas à produção atual. A produção de carnes (bovina, suína e aves), deverá aumentar em 12,6 milhões de toneladas, o que representa um acréscimo de 51,0 % em relação à produção de carnes de 2008. Estes fatores levarão a uma expressiva mudança de posição do Brasil no mercado mundial em 2018/2019, onde as exportações de carne bovina brasileira representarão 60,6 % do comércio mundial; a carne suína representará 21,0 % do comércio, e a carne de frango representará 89,7 % do comércio mundial. Esses resultados indicam que o Brasil continuará a manter sua posição de primeiro exportador mundial de carne bovina e de carne de frango. Como consequência, haverá um aumento da demanda por produtos veterinários e por defensivos agrícolas de forma a se alcançar tais previsões de produção.

A Figura 8 demonstra a contextualização do Estudo de forma a ressaltar suas justificativas e seus objetivos, fundamentados nas informações introdutórias sobre MO do solo, AH, antibióticos tetraciclínicos e cenário agropecuário brasileiro.

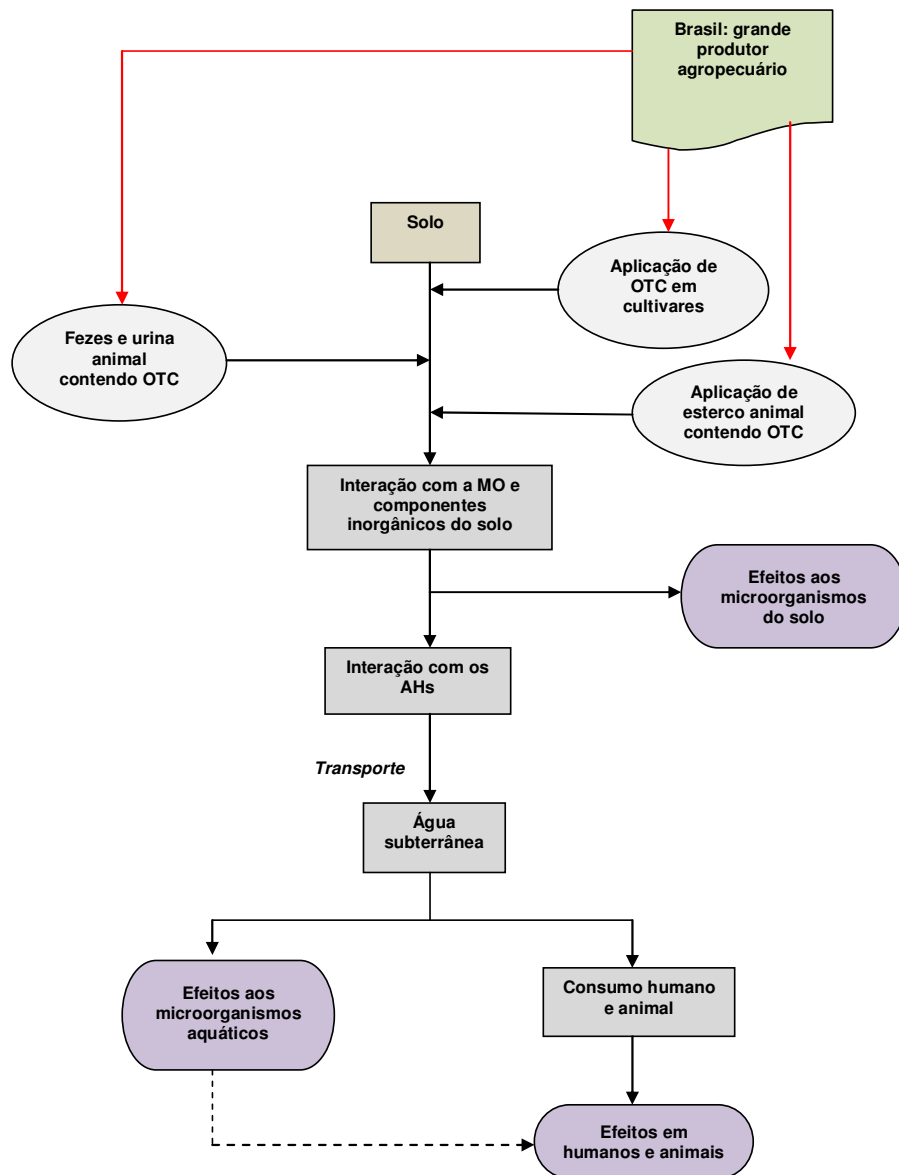


Figura 8. Fluxograma conceitual representando a contextualização do Estudo de forma a demonstrar a necessidade de obtenção de dados consistentes sobre o impacto da presença da

OTC no meio ambiente.

É importante destacar o *tempo de residência*, que é uma propriedade cinética de um composto em um ambiente químico/físico/biológico em que este se encontra ^[58]. No caso da OTC, em animais criados para fins comerciais este tempo de residência foi determinado em cerca de três dias para suínos para uma dose intramuscular de 30 mg kg⁻¹ ^[59] e em camarão tratado com ração contendo OTC como antibiótico para a eliminação de bactérias *gram(+)* e *gram(-)*, o tempo máximo de residência na carapaça foi de 13 dias, enquanto que no músculo foi de 5 dias ^[60]. Já o tempo de meia-vida determinado em esterco bovino foi de 8,1 dias (a 25 °C), 33 dias em solo após aplicação do esterco e 56 dias em solo sem a aplicação do esterco, o que a torna ambientalmente persistente principalmente em esterco saturado com água ^[29].

Uma revisão da literatura sobre dados de sorção da OTC a solos e sedimentos é apresentada na Tabela 1 de forma a demonstrar a preocupação decorrente de sua presença no meio ambiente e de seu impacto a partir de uma possível Avaliação de Risco.

Tabela 1. Dados da literatura sobre a sorção da OTC a solos e sedimentos.

| Tipo de Solo ou Constituinte | Origem | K_d (L kg ⁻¹)* | K_{oc} (L kg ⁻¹)** |
|--|-----------|------------------------------|----------------------------------|
| Solo arenoso com presença de argila | Dinamarca | 680 | 42.506 |
| Areia | Dinamarca | 670 | 47.900 |
| Solo arenoso com presença de argila | Dinamarca | 1.030 | 93.300 |
| Solo argiloso-arenoso | Dinamarca | 420 | 27.800 |
| Sedimento marinho (fração arenosa) | França | 0,3 | 17 |
| Sedimento de lagoa de água doce de criação de peixes | Taiwan | 490 | <i>Não determinado</i> |
| Sedimento marinho de fazenda de camarão | Taiwan | 290 | <i>Não determinado</i> |

Fonte: adaptado de Tolls (2001) ^[61].

Estas informações denotam a importância de se entender as implicações da presença da OTC no solo brasileiro e sua interação com a MO, já que dados do transporte do antibiótico em solo e o possível alcance da água subterrânea decorrente do primeiro são objetos de estudo em nível mundial na atualidade, no que diz respeito às suas fontes e controle de disposição ^[62], seu transporte no solo, via lixiviação decorrente de irrigação e chuva após aplicação de esterco ^[63], e o alcance da água subterrânea ^[64].

* K_d é o coeficiente de sorção para sólidos representado por C_s/C_e , onde C_s é a concentração sorvida de um composto e C_e é a concentração do composto em equilíbrio na fase aquosa;

** K_{oc} é o coeficiente de partição para o carbono orgânico, que normaliza K_d , e é representado por K_d/f_{oc} , onde f_{oc} é o conteúdo de carbono orgânico determinado na matriz analítica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão contempla as técnicas analíticas instrumentais de interesse ao Estudo, as quais foram divididas em três grupos, sendo cada uma delas detalhadamente comentadas: *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Análise Elementar e Técnicas Espectroscópicas*.

2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) também conhecida como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica de separação utilizada para análise e purificação desenvolvida entre as décadas de 1960 e 1970, sendo largamente aplicada em áreas como análise ambiental, indústria farmacocômica, de alimentos e de polímeros, cujo os usos podem ser os mais diversos ^[65]:

- Separação de uma grande variedade de compostos: orgânicos, inorgânicos, biológicos, compostos poliméricos, compostos quirais, compostos termicamente lábeis, pequenos íons a macromoléculas;
- Análise de impurezas;
- Determinação de moléculas neutras, iônicas ou zwitteriônicas;
- Isolamento e purificação de compostos;
- Separação de compostos intimamente relacionados;
- Separações ultratraço, separações preparativas e de escalonamento de processos;

- Método não-destrutivo;
- Método qualitativo e quantitativo.

As amostras deverão estar no estado líquido para a injeção no instrumento, com as amostras sólidas devendo ser solubilizadas em solvente compatível com as Fases Estacionária (FE) e Móvel (FM) utilizadas pelo método analítico seguido, com sua quantidade variando de 1 a 100 μL – geralmente os volumes de injeção mais utilizados estão entre 5 a 15 μL , os quais dependem da sensibilidade e da faixa analítica do detector para o analito.

Uma preparação simples ou extensiva da amostra pode ser requerida a partir da definição da complexidade da amostra, podendo incluir: diluição, pré-concentração, filtração, extração, ultrafiltração ou derivatização.

O tempo de análise varia entre 5 min a 2 h (geralmente entre 10 - 25 min), com o tipo de preparação influenciando diretamente no tempo de análise.

As limitações da técnica são:

- Identificação de compostos limitada para o caso de não haver uma hifenização com a Espectrometria de Massas;
- Resolução pode ser dificilmente atingida com amostras complexas;
- Somente uma amostra pode ser analisada por vez;
- Requer treinamento para a otimização do processo analítico;
- Tempo de análise pode ser longo comparado com outras técnicas de separação como a Eletroforese Capilar;
- Preparação da amostra é freqüentemente requerida.

No entanto, esta é certamente uma das principais técnicas instrumentais utilizadas em Química Analítica e ciências correlatas, dada sua robustez e facilidade de adaptação às necessidades analíticas. Para estudos de contaminação de matrizes ambientais visando à comprovação da existência de sorção e do(s) mecanismo(s) envolvido(s) a Cromatografia de Partição é bastante utilizada para fornecer dados a serem utilizados na elaboração de Isotermas de Sorção [61, 66].

Seu princípio de funcionamento baseia-se no fato de que um soluto é resolvido por diferentes velocidades de eluição (*tempo de retenção*, t_R) quando este passa através de uma coluna cromatográfica, com sua separação sendo governada por sua distribuição entre a FM (solvente ou mistura de solventes de eluição) e a FE (material de empacotamento da coluna). Várias operações têm influência direta no sucesso de sua aplicação, como: tipo de material de preenchimento da coluna, constituição e polaridade da FM, comprimento e diâmetro da coluna, fluxo da FM, temperatura da coluna, volume de injeção e tipo de detector. Quanto aos detectores, estes podem ser: Absorção no UV-Visível, Fluorescência no UV-Visível, Eletroquímicos, Condutividade, Índice de Refração e Espectrometria de Massas; seu uso depende das características estruturais, eletrônicas e redox do analito.

A Figura 9 apresenta o diagrama de blocos de um sistema genérico de CLAE.

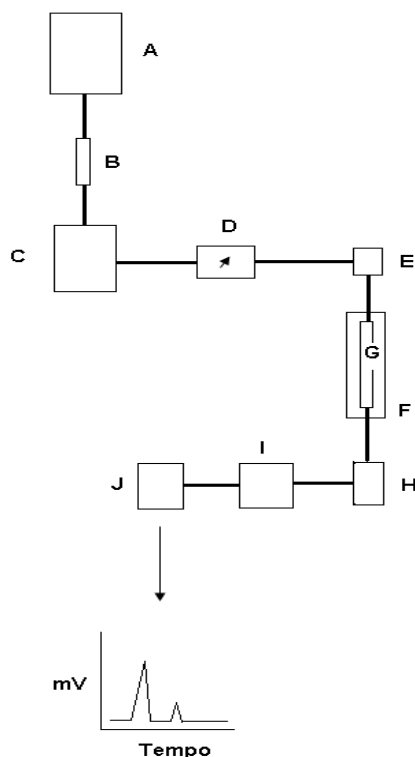


Figura 9. Diagrama de bloco de um sistema de CLAE, onde: A) reservatório de solvente, B) filtro, C) sistema de bombas e gradiente, D) indicador de pressão e fluxo, E) injetor, F) forno, G) coluna de separação, H) detector, I) processador de dados, J) gravador de dados. Fonte:

adaptado de Lindsay (1992) ^[67].

A CLAE pode ser aplicada em uma variedade de modos operacionais, com o melhor modo dependendo das características estruturais do analito a ser separado no procedimento analítico. Os modos mais freqüentemente utilizados são: Cromatografia de Partição, Cromatografia de Adsorção, Cromatografia Iônica e de Troca Iônica, Cromatografia de Exclusão de Tamanho, Cromatografia de Afinidade e Cromatografia Quiral.

FEs para a maioria dos modos de cromatografia consistem de um material de preenchimento central (usualmente sílica ou um polímero como um polissacarídeo ou poliestireno) com grupos funcionais de interesse ligados a

superfície deste substrato, com uma grande variedade de grupos funcionais podendo ser utilizados para cada modo. A FE geralmente é constituída por partículas esféricas de diâmetro entre 5 a 10 μm , firmemente empacotadas na coluna.

A seleção da FM é crítica para as Cromatografias de Partição, Adsorção e Troca Iônica e menos crítica para os demais modos. Para os solventes utilizados, propriedades como o comprimento de onda de corte no UV-Visível e o índice de refração são parâmetros importantes quando se trabalha com detectores de UV-Visível e/ou de Índice de Refração. O Índice de Polaridade (P') e a Força do Eluente (ϵ^0) são parâmetros de polaridade que auxiliam na escolha da FM para a Cromatografia de Partição e de Adsorção, respectivamente.

A Cromatografia Líquida por Exclusão de Tamanho tem sido usada para a separação e quantificação de AH e AF aquáticos, fornecendo um método de varredura rápido o qual pode fornecer informações qualitativas e quantitativas, as quais podem ser utilizadas em estudos de monitoramento ambiental ^[68]. A CLAE também pode ser utilizada no estudo da formação de produtos de biodegradação de pesticidas, como a atrazina sorvida sobre a superfície de argilas e AH, com a construção de Isotermas de Sorção ^[69]. Já em relação a antibióticos, seu uso para controle de qualidade de produção e aplicação, controle de resíduos em alimentos e monitoramento ambiental é freqüente, inclusive para antibióticos tetraciclínicos ^[70 - 73]. Para a OTC, um considerável número de métodos de CLAE pode ser obtido na literatura, tanto para aplicação em resíduos em alimentos, quanto para monitoramento ambiental, os quais utilizam de detectores como Absorção no UV-Visível, Fluorescência no

UV-Visível e Espectrometria de Massas, de acordo com a finalidade de aplicação de cada método e com a matriz analítica [66, 74, 75].

2.1.1 Isotermas de Sorção

Os processos de sorção, ou de interações de superfícies, devem-se à *fisiosorção* e à *quimisorção*. Na fisiosorção tem-se a existência de interações fracas de van der Waals (ex.: interação por dispersão e dipolar) e de ligação de hidrogênio entre o sorbato e a superfície do sorbente, ou substrato, com a energia liberada quando uma partícula é sorvida sendo da mesma ordem de magnitude da entalpia de condensação, em torno de 20 kJ mol^{-1} , havendo uma acomodação de moléculas de sorbato na superfície sorbente em função da dispersão do movimento térmico [76]. Na quimisorção as moléculas do sorbato são sorvidas na superfície do substrato pela formação de ligações químicas, usualmente ligação covalente, tendendo a encontrar sítios que maximizam seu número de coordenação com o substrato, além da entalpia da quimisorção ser maior do que a da fisiosorção, com valores em torno de 200 kJ mol^{-1} , e da distância entre sorbato e sorbente ser freqüentemente menor para a quimisorção [76].

Isotermas de Sorção são curvas que representam a concentração de espécie química sorvida pela sua concentração não sorvida, usualmente em meio aquoso, a uma temperatura constante e podendo ser atribuído um modelo matemático às mesmas, com tais isotermas sendo utilizadas para quantificar a capacidade de sorção de um sorbente frente a variáveis experimentais [4]. De

acordo com Giles, Smith e Huitson (1974) ^[77], as atribuições que podem ser feitas sobre os tipos de Isotermas de Sorção mais comuns são:

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

A Isoterma de Sorção Linear, ou de Partição, é definida por:

$$K_d = C_s / C_e \quad (1)$$

Onde C_s é a concentração do soluto sorvido em mmol g⁻¹ e C_e é a concentração do soluto na fase aquosa no equilíbrio em mmol L⁻¹, com K_d em L g⁻¹, que é a constante de partição, fornecendo a tendência do soluto em se manter sorvido ou em fase aquosa após alcançado o equilíbrio químico entre as espécies, ^[77].

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

$$S = k_f C_e^N \quad (2)$$

Onde S é a concentração do soluto sorvido em mg g⁻¹, k_f é o coeficiente de sorção em mg¹⁻ⁿ L gⁿ, C_e é a concentração do soluto em equilíbrio em solução

aquosa em mg L^{-1} e \mathbf{N} é o parâmetro de linearidade. Em um caso simples, $\mathbf{N} = 1$ e k_f é equivalente à K_d para isothermas lineares. A forma logarítmica da equação é utilizada para o ajuste linear do modelo:

$$\mathbf{LogS} = \mathbf{logK}_f + \mathbf{NlogC}_e \quad (3)$$

A Isotherma de Langmuir, a qual se restringe às superfícies homogêneas, é representada por:


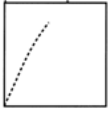



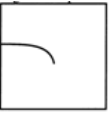



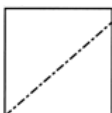


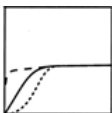



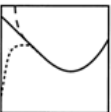
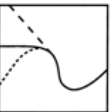
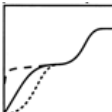
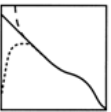

$$\mathbf{S} = \mathbf{C}_m \mathbf{C}_e / \mathbf{K}_L + \mathbf{C}_e \quad (4)$$

Onde \mathbf{S} é a concentração do soluto sorvido em mg g^{-1} , \mathbf{C}_m é a quantidade máxima do soluto sorvido em mg g^{-1} , \mathbf{C}_e é a concentração do soluto em equilíbrio em solução aquosa em mg L^{-1} e \mathbf{K}_L é o coeficiente de sorção de Langmuir em mg L^{-1} .

Conforme acima comentado, Giles, Smith e Huitson (1974) ^[77] classificaram, ainda, as Isothermas de Sorção baseadas em suas formas e curvaturas. Ao levar em conta platôs, pontos de inflexão e de máximo, também foram distinguidos subgrupos de isothermas. No entanto, esta classificação operacional é puramente empírica e não revela os processos que levaram às diferentes formas das isothermas ^[78]. A Tabela 2 apresenta estas classes de isothermas e suas características de acordo com o tratamento matemático aplicado. Em referência às características da interação sorbente–sorbato, e conforme comentários já realizados a respeito das Isothermas de Sorção, estas curvas podem ser assim interpretadas ^[4]:

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

Tabela 2. Formas de isotermas de sorção propostos por Giles, Smith e Huitson (1974). Fonte: traduzido de Hinz (2001) ^[78]. **S** é a concentração sorvida, **C_e** é a concentração no equilíbrio e **K_d** é a constante de partição ou se sorção.

| Classe | Subgrupo | Formas da Isoterma (S x C _e) | Formas da Isoterma (K _d x S) | Formas da Isoterma (Log K _d x log S) |
|---------|----------|---|--|--|
| S | 1 | Côncavo  | Inclinação positiva  | Inclinação positiva  |
| L | 1 | Convexo  | Inclinação negativa, linha  | Inclinação negativa  |
| H | 1 | Convexo  | Inclinação negativa, curva  | Inclinação negativa  |
| C | 1 | Linha reta  | Inclinação zero  | Inclinação zero  |
| S, L, H | 2 | Platô  | Inclinação negativa, linha ou curva  | S _T = S a baixo valor de K _d  |
| S, L, H | 3 | Platô, inflexão  | Mínimo  | Mínimo  |
| S, L, H | 4 | Platô, inflexão, platô  | Mínimo  | Mínimo  |

2.2 Análise Elementar

A Análise Elementar ou Microanálise é uma técnica analítica que possibilita determinar quais são os elementos constituintes de uma molécula, sobretudo orgânica, através da pirólise de um determinado composto que contenha O, C, S, N e H e da análise dos gases resultantes de sua decomposição (ex.: N_xO_x , SO_2 , CO_2 e H_2O), podendo-se inferir sobre a sua composição percentual em massa destes elementos ^[79].

O método analítico para C consiste na combustão completa a 900 °C da amostra de massa conhecida do material orgânico em estudo e determinação da massa de CO_2 e de H_2O formada. O vapor produzido pela reação é passado por um tubo contendo $CaCl_2$ para reter a umidade e depois por outro tubo contendo hidróxido de sódio, para reter o CO_2 em forma de $CaCO_3$, necessária para calcular a porcentagem de C e de H na amostra. Para análise de N, os produtos são arrastados com um jato de He através de um forno a 750 °C, no qual Cu aquecido reduz os óxidos de N ao elemento que é então separado e pesado. Para análise de S, a amostra sofre combustão em uma atmosfera de O_2 em um tubo empacotado com WO_2 ou CuO ; o SO_2 seco é absorvido por um reagente de Ag_2O , separado e determinado pelo detector; O pode ser determinado por diferença dos valores de C, H, N e S, e descontando o material inorgânico (cinzas), se houver ^[79].

Esta técnica é de uso freqüente na caracterização da constituição química dos AH ^[1]. Nardi et al. (2007) a utilizaram em estudo visando a observação da relação entre características moleculares dos AH e ciclos microbiológicos decorrentes de plantio de milho ^[80], enquanto Nagamitsu et al. (2002) a

utilizaram em estudo da comparação das características estruturais entre AH extraídos de subsolo e AH extraídos de solos superficiais ^[81].

2.3 Técnicas Espectroscópicas

2.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível

Para o entendimento dos princípios físicos e químicos que governam a técnica, há que se considerar que a região do Ultravioleta (UV) do espectro da radiação eletromagnética está compreendida entre 200 a 400 nm e que a região do Visível está compreendida entre 400 a 800 nm, com as energias correspondentes para estas regiões compreendidas entre 150 a 72 kcal mol⁻¹ e entre 72 a 36 kcal mol⁻¹, respectivamente. Energias desta magnitude freqüentemente correspondem às diferenças energéticas entre estados eletrônicos moleculares ^[79].

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

$$E = h\nu \quad (5)$$

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

A radiação eletromagnética pode ser considerada uma combinação de campos elétricos e magnéticos alternados que são transportados através de um espaço por um movimento de onda. Como a radiação atua como uma

onda, ela pode ser classificada em termos de seu comprimento de onda ou de sua frequência, de acordo com a seguinte equação:

$$\nu = c / \lambda \quad (6)$$

Onde ν é novamente a frequência, c é a velocidade da luz ($3,0 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$) e λ é o comprimento de onda (nm). De acordo com a Equação 6, radiação com comprimento de onda curto possui uma alta energia e vice-versa.

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

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

$$E_{p(\text{total})} = E_{\text{eletrônica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}} \quad (7)$$

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

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

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

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

Na Figura 10 é apresentada a distribuição energética das transições eletrônicas.

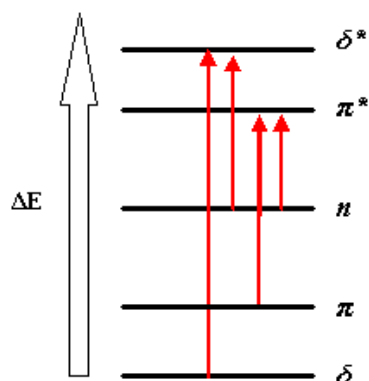


Figura 10. Níveis energéticos das transições eletrônicas observadas na região do UV-Visível a partir dos orbitais moleculares. Fonte: adaptado de Pavia, Lanpman e Kriz (2001) ^[79].

Deslocamentos no comprimento de onda e variação na intensidade de absorção devido à interação do analito com o meio (ex.: solvente) são classificados como: *efeito batocrômico* (deslocamento para maiores comprimentos de onda), *efeito hipsocrômico* (deslocamento para menores comprimentos de onda), *efeito hiperocrômico* (aumento na intensidade de absorção) e *efeito hipocrômico* (diminuição na intensidade de absorção) ^[79].

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

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

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

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

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

$$T = I / I_0 \quad (8)$$

Ou

$$\% T = I / I_0 \times 100 \quad (9)$$

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

$$A = -\log T \quad (10)$$

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

$$A = \epsilon bc \quad (11)$$

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

A utilização da Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Visível para os estudos dos AH se dá, dentre outros, para a determinação da razão E_4/E_6 , que é a razão dos valores de absorção a 465 nm e a 665 nm, e no estudo de interação com xenobióticos solúveis em meio aquoso ^[1], com a absorção da radiação na região do UV se devendo a elétrons de grupamentos aromáticos e carboxílicos, enquanto que a absorção na região do Visível se deve principalmente a grupamentos quinona e ceto-enol ^[82]. Um exemplo do uso desta técnica aliada à Polarografia para o estudo da influência das SH na degradação de pesticidas é o caso do *p*-nitrofenol, que é o principal produto da hidrólise do pesticida organoclorado metilparation, de grande uso na agricultura mundial ^[83]. O estudo da interação entre o pesticida atrazina e as SH também é

um importante exemplo de aplicação aliada às outras técnicas espectroscópicas, como Absorção no Infravermelho Médio e RMN ^[84].

2.3.2 Espectroscopia de Fluorescência na Região do Ultravioleta-Visível

Compostos fluorescentes apresentam espectros eletrônicos que são caracterizados pela energia de transição entre o estado não excitado (fundamental) e o estado excitado da molécula. A transição entre o estado fundamental para o estado excitado corresponde ao espectro de absorção (anteriormente discutido para a Absorção no UV-Visível) e a transição na direção oposta corresponde ao espectro de emissão ou de *luminescência* ^[85, 86].

Quando ocorre a absorção de energia e, caso não seja suficiente para ionizar ou dissociar a molécula, esta permanecerá no estado excitado e para retornar ao estado fundamental a energia absorvida deve ser dissipada. Isto normalmente ocorre por decaimentos não radioativos em que o excesso de energia é transferido na forma de vibrações, rotações e translações ^[76]. Porém, quando a dissipação de energia pela molécula se dá pela emissão de fótons tem-se um decaimento radioativo que é a *fotoluminescência*.

No estado fundamental os elétrons ocupam o mesmo orbital molecular, porém com spins antiparalelos, com o spin resultante (**S**) sendo zero, enquanto que o nível de multiplicidade, definido em módulo como $|2\mathbf{S}+1|$, é igual à unidade, com este estado de energia sendo conhecido como estado singleto (**S**). Se a transição para o estado excitado é acompanhada pelo inverso do spin de um dos elétrons, o spin total será unitário e a multiplicidade será três

(estado tripleto, T). Se a absorção da radiação não trazer nenhuma mudança na multiplicidade de estados, o estado excitado correspondente será o estado singlete S_1 . No caso do primeiro estado eletrônico excitado possuir a mesma multiplicidade de spin do estado eletrônico fundamental, a emissão será denominada Fluorescência, e no caso de diferentes multiplicidades a emissão será denominada Fosforescência.

A transição singlete-singlete ($S_0 \rightarrow S_1$) associada com a absorção da radiação pode resultar em uma transferência de valência de elétrons π da molécula para o orbital π^* ($S_0 \rightarrow S_{\pi-\pi^*}$) ou da transferência de elétrons do orbital n de um heteroátomo para um orbital π^* ($S_0 \rightarrow S_{n-\pi^*}$), como para o caso de moléculas contendo C=C, N=N, C=N e NO_2 .

Em uma molécula pode haver tanto uma transição de um estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 , com a emissão de radiação, quanto de um estado excitado T_1 para o mesmo estado fundamental S_0 , por meio de cruzamento intersistema ou *intersystem crossing* (transição entre estados de diferentes multiplicidades). Desde que o tempo de vida de uma molécula excitada no estado T_1 seja muito maior que no estado S_1 , a probabilidade de perda de energia não-radioativa (conversão energética interna) é muito maior no estado T_1 . O tempo de vida da emissão fluorescente ($S_1 \rightarrow S_0$) é de 10^{-9} s enquanto que da emissão fosforescente ($T_1 \rightarrow S_0$) é de 10^{-7} a 10^{-5} s.

A Figura 11 mostra que a energia de emissão é, via-de-regra, menor que a de absorção, processo este conhecido como Deslocamento de Stokes ^[87].

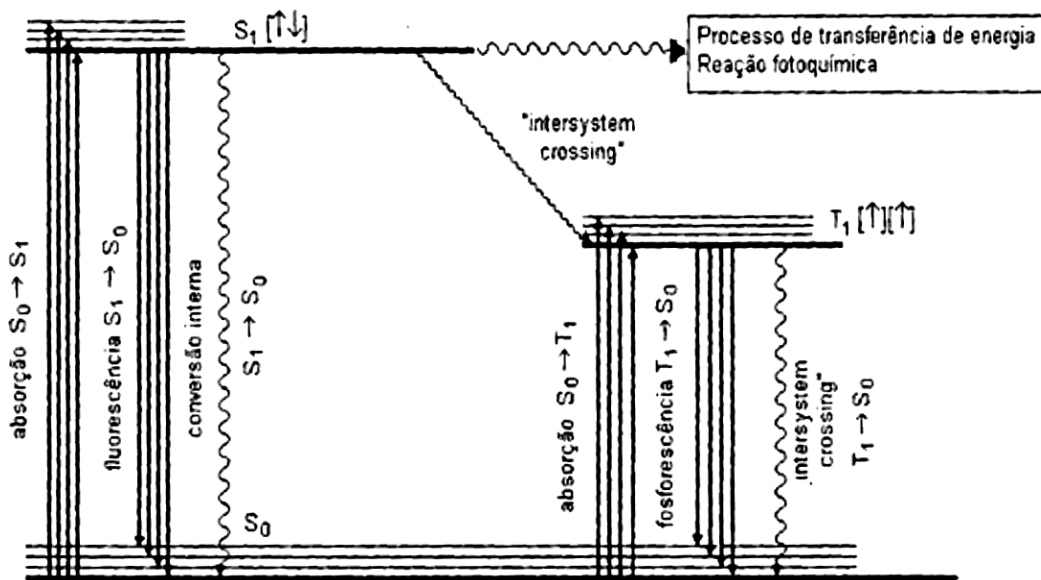


Figura 11. Níveis de energia eletrônica e vibracionais em uma molécula poliatômica e os caminhos das transições eletrônicas radioativas (absorção, fluorescência e fosforescência) e não-radioativas (conversão interna de energia e *intersystem crossing*). Fonte: traduzido de Krasovitskii e Bolotin (1987) ^[86].

A Espectroscopia de Fluorescência na Região do UV-Visível é uma técnica largamente utilizada no estudo das SH, e em particular dos AH, já que estes apresentam uma forte característica de emissão da radiação UV-Visível em função da ocorrência de grande número de sistemas aromáticos conjugados em sua estrutura molecular ^[88, 89]. Ela também tem sido empregada para a determinação de tetraciclinas em águas superficiais ^[90], pois a ligação π dos anéis conjugados da estrutura molecular funciona como doadora de elétrons o que favorece o fenômeno de emissão de radiação ^[91], similar ao caso dos AH. Carvalho et al. (2004) investigaram com o seu uso reações de interação entre SH aquáticas tropicais com cloretos e a formação de trihalometanos ^[92], enquanto que Plaza et al. (2006) demonstraram que a

ligação de íons metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , ou Pb^{2+} com AH causa modificações significantes no sinal de fluorescência, de acordo com a origem do AH e do íon metálico, o que descreve diferentes forças de ligação AH-metal e mudanças conformacionais nos AH decorrentes do processo de complexação [93].

2.3.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier

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

Alguns aspectos importantes a serem considerados nesta técnica [94]:

- Uma molécula simples pode apresentar um espectro complexo;
- Deve-se ter em mãos um espectro-padrão para a correta interpretação;
- Uma correlação pico a pico é uma excelente evidência para a determinação da identidade de amostras;
- É muito pouco provável que duas substâncias que não sejam enantiômeras apresentem o mesmo espectro de absorção no Infravermelho.

A radiação infravermelha média converte-se, quando absorvida, em energia de vibração molecular, com o processo sendo quantizado, gerando um

espectro vibracional que é composto por uma série de bandas, já que cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a várias mudanças de níveis de energia rotacional (linhas), com estas últimas sendo sobrepostas; são estas bandas de vibração-rotação características de observação desta técnica. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos ^[94].

As intensidades das bandas de absorção são expressas como transmitância (Equação 9) ou absorção (Equação 11). Convencionou-se utilizar os seguintes termos semiquantitativos para a interpretação dos espectros de acordo com a intensidade das bandas: forte (**F**), médio(**m**) e fraco (**f**).

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

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

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

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

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

Fenômenos intermoleculares e intramoleculares que podem influenciar a absorção se dão devido às interações por acoplamento e ligações de

hidrogênio. No primeiro caso, que é um acoplamento mecânico intramolecular de osciladores, tem-se a formação de duas vibrações fundamentais de deformação: o modo simétrico e o modo assimétrico, onde o modo simétrico não produz alteração no momento dipolo da molécula (μ) sendo inativo, enquanto que o modo assimétrico produz alteração em μ , sendo observado no Infravermelho Médio; as bandas características de grupamentos químicos úteis para a identificação da estrutura molecular envolvem, freqüentemente, as vibrações acopladas, tanto as deformações angulares quanto as axiais. Já para o caso das ligações de hidrogênio, é necessário ressaltar que este tipo de ligação ocorre em qualquer sistema que contenha um grupo doador de prótons (A-H) e um grupo aceptor de prótons (B), desde que ocorra interação efetiva entre o orbital *s* do hidrogênio e orbitais *p* ou π do grupo aceptor. Os átomos A e B devem ser eletronegativos e B deve possuir pelo menos um par de elétrons livres. Exemplos de doadores: COOH, OH, R-NH₂ e CONH₂; exemplos de aceptores: O, N e X; em grupos insaturados C=C pode atuar como aceptor de prótons. A ligação é mais forte quando o grupo doador de prótons e o eixo do par de elétrons livre estão em uma mesma linha, com a força de ligação sendo inversamente proporcional à distância entre A e B. Do ponto de vista molecular, a ligação de hidrogênio altera a constante de força de ambos os grupos nela envolvidos, e assim, alteram-se as freqüências de deformação axial e angular. As bandas de deformação axial de A-H deslocam-se para menores freqüências (maiores comprimentos de onda), seguido de aumento de intensidade e alargamento de banda; a freqüência da deformação axial do aceptor também diminui, porém o deslocamento é menos pronunciado. A vibração de

deformação angular de A-H usualmente desloca-se para menores frequências, porém, o deslocamento é menor do que o das deformações axiais.

As ligações de hidrogênio intermoleculares envolvem a associação de duas ou mais moléculas do mesmo composto ou de compostos diferentes, com a formação da ligação podendo produzir dímeros (ex.: ácidos carboxílicos) ou polímeros, como em soluções puras ou concentradas de alcoóis mono-hidroxílicos. Por outro lado, formam-se ligações intramoleculares toda vez que o doador e o acceptor estão na mesma molécula e em uma relação espacial tal que permita a superposição de orbitais, como no caso de anéis de cinco ou seis átomos, com a formação da ligação dependendo da temperatura; bandas intramoleculares tendem a desaparecer com a diminuição da concentração molecular abaixo de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

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

Esta técnica espectroscópica tem sido comumente utilizada no estudo da interação da MO do solo com xenobióticos como agrotóxicos e antibióticos, fornecendo resultados confiáveis a respeito dos mecanismos de interação envolvidos ^[50, 95, 96]. Ferreira et al. (2002) utilizaram a técnica aliada à RPE no estudo da interação entre o herbicida imazaquin e AH extraído de oxisol brasileiro, definindo como mecanismos de interação a interação hidrofóbica (majoritariamente), a atração eletrostática, transferência de prótons e troca catiônica, resultando em uma sorção de fraca intensidade ^[97].

2.3.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Próximo

A região do espectro eletromagnético correspondente ao Infravermelho Próximo está compreendida entre 13.000 a 4.000 cm^{-1} , ou de 780 a 2.500 nm . As bandas observadas nesta região ocorrem em frequências aproximadamente duas ou três vezes maiores que as de uma transição fundamental, que é aquela típica do Infravermelho Médio, sendo esse tipo de transição conhecida como sobretom (*overtone*). A maioria dos sinais do tipo sobretom ocorre com intensidades cerca de 10 a 1.000 vezes menores que as observadas para as transições fundamentais do Infravermelho Médio. Outras bandas que aparecem nesta região são provenientes das bandas de combinações, que ocorrem quando um fóton excita simultaneamente dois estados vibracionais diferentes. A frequência da banda de combinação é aproximadamente igual à soma ou à diferença entre as duas frequências das bandas fundamentais que interagem para a sua formação^[98].

As bandas de absorção de sobretons ocorrem principalmente entre 12.800 e 5.500 cm^{-1} e bandas de combinação entre 5.500 e 4.000 cm^{-1} . Portanto, as bandas observadas no Infravermelho Próximo são, majoritariamente, devidas a esses dois fenômenos, sendo estas absorções correspondentes a sobretons e bandas de combinação de estiramentos e deformações angulares de transições fundamentais de ligações A-H, onde A pode ser diferentes elementos químicos ou grupos funcionais, como, por exemplo, O, N, C e grupos aromáticos. Outros grupos funcionais importantes incluem estiramentos C-O e grupos C=O, estiramentos de ligações C-N, estiramentos de ligações C-C, dentre outras. Algumas vezes, absorções que

ocorrem nesta região são capazes de caracterizar e identificar compostos, como no caso da caracterização de amins primárias, secundárias e terciárias. Contudo, uma atribuição precisa de bandas na região do Infravermelho Próximo é difícil devido ao fato que uma simples banda pode ser atribuída a uma somatória de sobretons e bandas de combinação, todas invariavelmente sobrepostas ^[98].

Apesar da Região do Infravermelho Próximo ser menos utilizada do que a do Infravermelho Médio para estudos de interação entre as SH e xenobióticos, atualmente tem havido grande interesse na utilização desta técnica como complemento da segunda, somando-se a possibilidade de realização de análises estatísticas multivariadas de componentes ^[99, 100], além de ser uma técnica já utilizada pela indústria fármaco-química para controle de qualidade de medicamentos como a OTC ^[101 - 103].

Uma vantagem desta técnica sobre a do Infravermelho Médio é de necessitar de preparo mínimo, ou em alguns casos, de nenhum preparo da amostra ^[65], otimizando tempo e custo.

No uso da técnica para fins ambientais é importante destacar sua aplicação na medida de seqüestro de C em solos e na avaliação do solo no fluxo de C ^[104, 105].

2.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é também uma técnica de espectroscopia de absorção onde, sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação

eletromagnética na região de *radiofreqüência* em uma freqüência determinada pelas suas características estruturais, com a absorção sendo função de certos núcleos constituintes da molécula ^[94]. Um espectro de RMN é um registro gráfico das freqüências dos picos de absorção contra suas intensidades.

Como todos os núcleos possuem carga, em alguns casos, esta carga gira em torno do eixo nuclear, gerando um dipolo magnético ao longo do eixo. O momento angular da carga em movimento pode ser descrito em termos do número ou momento de spin **I**, que pode assumir os valores 0, 1/2, 1, 3/2, etc. (**I** = 0 corresponde a um núcleo que não gira em torno de seu eixo). A magnitude do dipolo gerado é expressa em termos do momento magnético nuclear, μ .

Pode-se obter facilmente o espectro de vários núcleos que possuem **I** de 1/2, como: ¹H, ³H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F e ³¹P e, portanto, uma distribuição de carga esférica e uniforme. Dentre estes, os mais amplamente divulgados em RMN são ¹H e ¹³C, tanto no estado líquido quanto no estado sólido.

Os núcleos com **I** \geq 1 possuem distribuição de carga não-esférica, com esta assimetria sendo descrita por um momento elétrico de quadrupolo, o que afeta o *tempo de relaxação* e, conseqüentemente, a largura do sinal e o acoplamento com os núcleos vizinhos. Em termos de mecânica quântica, **I** determina o número de orientações diferentes que um núcleo pode assumir quando colocado em um campo magnético uniforme de acordo com a equação **2I + 1**.

Na Figura 12 estão representados dois níveis de energia com um pequeno excesso de população dos hidrogênios no estado de energia mais baixo ($N_\alpha > N_\beta$), de acordo com a Distribuição de Boltzmann. Os estados são

identificados como α ou β ou como $+1/2$ ou $-1/2$. A variação de energia é dada por:

$$\Delta E = h\gamma / 2\pi B_0 \quad (12)$$

Onde h é a constante de Planck, e ΔE é proporcional a B_0 , já que h , γ e π são constantes e B_0 é a intensidade do campo magnético.

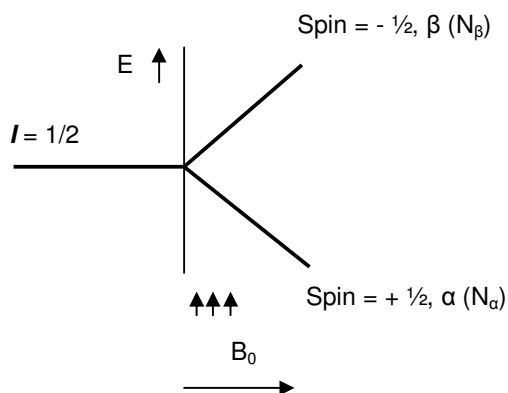


Figura 12. Dois níveis de energia de um núcleo em um campo magnético de magnitude B_0 . N é a população de núcleos, a direção do campo magnética é para cima, paralelo à ordenada, e B_0 aumenta para a direita. Fonte: adaptado de Silverstein e Webster (2000) ^[94].

Estabelecidos os dois níveis de energia para o núcleo de interesse, pode-se introduzir a energia na forma de radiofrequência (ν_1), de modo a induzir a transição entre estes níveis de energia em um campo magnético estacionário de intensidade B_0 . A equação fundamental da RMN, que correlaciona a radiofrequência aplicada com a intensidade do campo magnético é dado por:

$$\nu_1 = h\gamma / 2\pi B_0 \quad (13)$$

Uma vez que:

$$\Delta E = h\nu \quad (14)$$

A radiofrequência ν_1 é da ordem de MHz. Citando-se como exemplo o caso de ^1H , necessita-se de uma frequência de 100 MHz em um campo magnético \mathbf{B}_0 igual a 2,35 Tesla (T); nesta razão, diz-se que o sistema está em *ressonância*, e a energia é absorvida pelo ^1H , que passa para um estado energético mais elevado, daí resultando o espectro de absorção. A constante giromagnética γ é uma constante nuclear fundamental, por ser uma constante de proporcionalidade entre o momento magnético μ e o número de spin I:

$$\gamma = 2\pi\mu / hI \quad (14)$$

A radiofrequência pode ser introduzida por uma *varredura de onda contínua* ou por um *pulso de radiofrequência*.

Apenas um sinal deveria ser obtido com a interação da energia de radiofrequência e o campo magnético intenso com os núcleos, de acordo com a Equação 9. No entanto, não é isto o que se dá. Os núcleos atômicos em uma molécula (ex.: ^1H e ^{13}C) são blindados pelas nuvens eletrônicas que os cercam, cuja densidade varia com o ambiente químico, sendo σ a constante de blindagem, também conhecida como *deslocamento químico* em ppm (*partes por milhão*). Esta variação dá origem à absorção em posições diferentes, usualmente dentro de uma região de 1.000 Hz em um campo magnético correspondente a 60 MHz, ou cerca de 8.000 Hz em um campo magnético

correspondente a 300 MHz. Quanto maior a blindagem, menor o deslocamento químico, tendo-se um composto químico de referência para o qual o deslocamento é zero, geralmente o tetrametil-silano (TMS).

A técnica de RMN é uma das técnicas analíticas instrumentais convencionalmente utilizadas para a caracterização de AH ^[1], no modo de Polarização Cruzada com Amplitude Variável do ¹³C no estado sólido. Pode-se citar seu uso para a caracterização de AH naturais e sintéticos, modificados e não-modificados ^[106] e na avaliação do efeito do processo de humificação sob a estrutura molecular dos AH, confrontando-se AH extraído de solo com histórico de cultivo com AH originário de compostagem de resíduos alimentares e vegetais ^[107].

2.3.6 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Nesta técnica espectroscópica a amostra de interesse é submetida a um campo magnético aplicado para que os elétrons desemparelhados percam a degenerescência de spin e os níveis eletrônicos de Zeeman sejam estabelecidos (Figura 13), sendo utilizada para a observação de espécies paramagnéticas, como radicais livres orgânicos e metais de transição ^[108]. No caso dos AH a espécie química de interesse é o radical tipo semiquinona, o qual é detectado em um valor de campo magnético em torno de 3.400 G da banda-X da radiação eletromagnética à aproximadamente 9 GHz ^[109]. Seguindo-se estas condições descritas, é possível determinar os seguintes parâmetros quantitativos: *a*) valor do Fator-g isotrópico, *b*) largura de linha (ΔG) e *c*) concentração de radicais da amostra (spins g^{-1}), os quais podem fornecer

informações a respeito do ambiente químico ao qual o radical tipo semiquinona se encontra ligado, bem como sobre a presença de mecanismo de interação por transferência de elétrons decorrente de aumento na concentração de radicais ^[110].

A detecção de uma absorção de RPE requer que a espécie paramagnética interaja com um campo eletromagnético. Quando a amostra está em ressonância, a energia é trocada entre o campo eletromagnético e o sistema de spin tal que as transições são induzidas para cima e para baixo com igual probabilidade. Assim, a absorção de energia requer uma diferença de população para os dois níveis nos quais as transições estão sendo induzidas, com os elétrons sendo distribuídos entre os dois níveis de energia de acordo com a Distribuição de Boltzmann. Se existem N^+ elétrons no nível superior com energia E^+ e N^- elétrons no nível inferior com energia E^- , então:

$$N^+/N^- = e^{-[(E^+ - E^-)/kT]} \quad (16)$$

Somente uma pequena fração dos elétrons contribui para a absorção, o que requer um aparato sofisticado para a detecção do sinal ^[111].

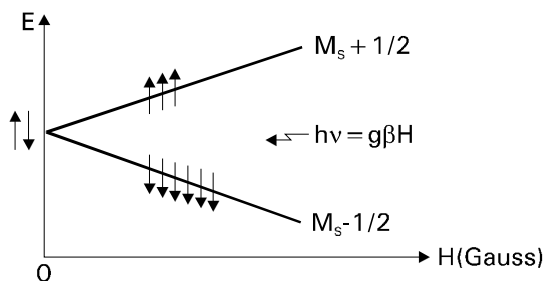


Figura 13. Representação esquemática do Efeito Zeeman.

A condição de ressonância definida a partir do Efeito Zeeman, a qual deverá ser satisfeita para a geração do espectro por meio da ocorrência de transições dipolo magnéticas, é:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H_0 \quad (17)$$

Onde g é a constante giromagnética de Landé, β é o magnéton de Bohr e H_0 é o campo magnético externo aplicado. As Figuras 14 e 15 apresentam a geração dos espectros de absorção.

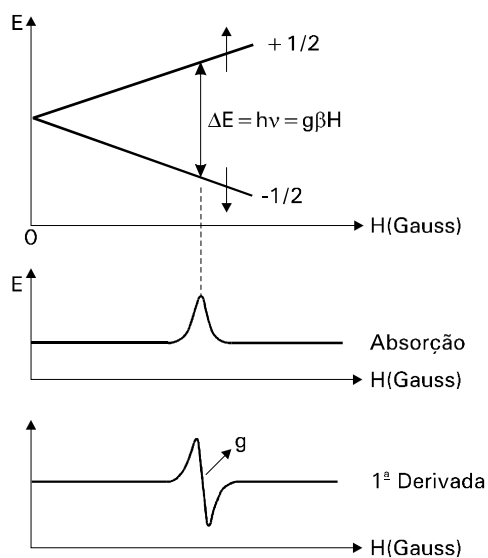


Figura 14. Geração e obtenção do espectro de RPE.

Comumente o elétron encontra-se sujeito a interações em nível atômico, iônico ou molecular, tais como: *interação spin-órbita*, *interação hiperfina*, *interação superhiperfina*, *interação fina* e outras. A interação spin-órbita é a responsável pela alteração nos valores de g do elétron livre e depende do orbital onde o elétron desemparelhado se encontra; esta interação é de grande

importância, pois permite inferir sobre o ambiente químico no qual a espécie paramagnética encontra-se. A interação hiperfina ocorre quando elétrons desemparelhados interagem com o spin nuclear de seu próprio núcleo e a interação super-hiperfina ocorre quando elétrons desemparelhados interagem com o spin nuclear de núcleos vizinhos; tanto a hiperfina quanto a super-hiperfina se devem ao acoplamento dos momentos magnéticos dos elétrons via *contato de Fermi*, o que se dá quando os elétrons têm probabilidade finita de densidade de seus núcleos ^[112].

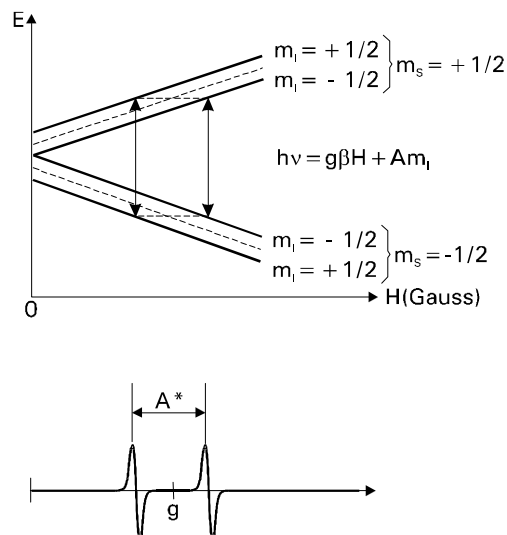


Figura 15. Geração de espectro decorrente de interação hiperfina, onde A^* é a constante de desdobramento hiperfino e m_l é o spin nuclear.

O termo g na Equação 17 é uma constante universal e característica do elétron ($g_e = 2,00232$), considerando que o campo H_0 é o campo magnético sobre o elétron. A aplicação de um campo magnético externo, contudo, pode gerar um campo magnético interno na amostra o qual pode adicionar ou subtrair energia do campo externo. Quaisquer possíveis campos magnéticos locais serão levados em conta permitindo que o Fator-g possa variar:

$$g_e = h\nu / \beta H_0 \quad (18)$$

O Fator-g pode, assim, ser considerado como uma quantidade característica da molécula onde os elétrons desemparelhados estão localizados. Na Tabela 5 são apresentados exemplos de valores do Fator-g de alguns centros paramagnéticos.

Tabela 5. Valores do Fator-g para exemplos de centros paramagnéticos.

| Espécie química paramagnética | Intervalo do Fator-g |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Radicais nitróxidos | 2,005 – 2,006 |
| Radicais peroxil | 2,01- 2,01 |
| Benzo - semiquinonas | 2,004 - 2,005 |
| Complexos de Cu(II) | 2,0 - 2,4 |
| Complexos de Fe(III), S = 1/2 | 1,4 - 3,1 |
| Complexos de Fe(III), S = 5/2 | 2,0 - 9,7 |

Fonte: Knowles (1976) ^[111].

O método quantitativo de análise de RPE é uma ferramenta que pode ser aplicada na caracterização de AH extraídos de processo de compostagem, solo, turfa e frações leves de carvão mineral por meio da determinação da concentração do radical semiquinona estável e do radical transiente (de vida curta) e de valores do Fator-g ^[113], bem como para a avaliação do efeito do pH do meio, permitindo atribuir a estabilidade do radical estável à formação de semiquinonas protonadas e a presença de radicais transientes à formação de semiquinona desprotonada ^[114].

A estabilização do radical tipo semiquinona presente nas SH e responsável pelo sinal de RPE do AH está apresentada na Figura 16.

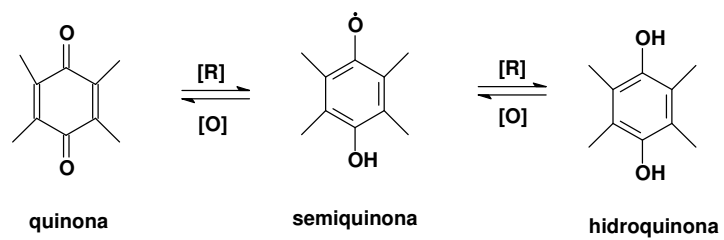


Figura 16. Esquema de estabilização do radical livre do tipo semiquinona (estrutura do meio)

[115]

3 OBJETIVOS

Os objetivos do Estudo foram os seguintes:

- a) Caracterizar com o uso de técnicas espectroscópicas (RPE, Infravermelho Médio, RMN) e Análise Elementar duas amostras de AH extraídos de solos brasileiros submetidos a situações de manejo distintas;
- b) Verificar a sorção entre a OTC e solos brasileiros de diferentes valores percentuais de MO com o uso da CLAE e a construção de Isotermas de Sorção para quantificação da capacidade de sorção;
- c) Verificar a sorção entre AH provenientes de solos brasileiros com a OTC em diferentes valores de pH com o uso da CLAE e a construção de Isotermas de Sorção para quantificação da capacidade de sorção;
- d) Observar os possíveis mecanismos físico-químicos em nível molecular envolvidos no processo de interação em diferentes valores de pH, por diferentes técnicas espectroscópicas como Espectroscopias de Absorção e Fluorescência na Região do UV-Visível e Espectroscopias de Absorção na Região do Infravermelho Próximo e Médio;
- e) Obter informações que possam auxiliar na compreensão do transporte do antibiótico no solo brasileiro;
- f) Contribuir com o aporte de dados para avaliação do risco químico ambiental relacionado ao uso em grande escala de produtos químicos para fins veterinários.

Estes objetivos estão fundamentados no fato de não existirem estudos no Brasil a respeito da interação entre antibióticos tetraciclínicos agropecuários com constituintes da MO do solo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterizações Preliminares

Foram caracterizadas duas amostras de solo e duas amostras de AH, com todos os quatro solos coletados no Estado de São Paulo.

4.1.1 Caracterização dos Solos

Foram caracterizados os solos M1 (Mata, latossolo vermelho-amarelo distrófico – 21°40'4" S e 47°50'33" O) ^[116] e T1 (Turfa, organossolo – 21°33'20" S, 47°55'08" O), os quais foram coletados em profundidade superficial (0 – 15 cm) e posteriormente utilizados em experimento de sorção solo-OTC. A Tabela 6 descreve os parâmetros físico-químicos e físicos utilizados nesta caracterização, conforme procedimentos de rotina de análise de solos da EMBRAPA.

As amostras de solo foram secas a temperatura ambiente durante 7 dias. Após este período, as amostras foram homogeneizadas em peneira granulométrica de 2 mm e encaminhadas ao Laboratório de Análise de Solos do Centro de Pesquisa da Pecuária Sudeste (CPPSE) da EMBRAPA.

Tabela 6. Parâmetros analíticos de caracterização dos solos e sua utilização para a interpretação dos dados de sorção solo-OTC. Definição dos parâmetros adaptada de EMBRAPA (1997) ^[117] e EMBRAPA (1998) ^[118].

| Parâmetro Analítico | Finalidade de Uso | Técnica* |
|-----------------------------------|---|------------------------------------|
| pH em CaCl ₂ | Averiguar a influência da protonação/desprotonação para a interação | Potenciometria direta |
| Al ³⁺ | Determinar a disponibilidade de cátion metálico trivalente para ligação | Espectroscopia de Absorção Atômica |
| H ⁺ + Al ³⁺ | Determinar a disponibilidade de cátion metálico trivalente e de próton para ligação | Titulometria |
| Ca ²⁺ | Determinar a disponibilidade de cátion metálico bivalente para ligação | Espectroscopia de Absorção Atômica |
| Mg ²⁺ | Determinar a disponibilidade de cátion metálico bivalente para ligação | Espectroscopia de Absorção Atômica |
| K ⁺ | Determinar a disponibilidade de cátion metálico monovalente para ligação | Espectroscopia de Absorção Atômica |
| Saturação de Bases | Determinar a porcentagem de sítios de troca catiônica do solo ocupados por bases | Titulometria |
| Soma de Bases | Determinar a disponibilidade total de sítios negativos para ligação, os quais estejam ocupados por metais alcalino e alcalino-terrosos (ex.: Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺) | Titulometria |

| | | |
|---------------------------------------|--|---------------------------|
| MO | Determinar a presença da origem do AH para interação e a influência da mesma nesta interação | Gravimetria |
| CTC (total) | Determinar a quantidade máxima de cargas negativas a serem liberadas em pH 7 | Coluna de Troca Catiônica |
| Granulometria (areia, silte e argila) | Classificar a composição inorgânica do solo em termos do tamanho das partículas | Peneiramento |

*EMBRAPA (1999) ^[119].

4.1.2 Caracterização dos Ácidos Húmicos de Solos

As amostras de solo utilizadas para a extração dos AH estão apresentadas na Tabela 7.

As amostras tiveram origem em duas situações de manejos distintos: ausência de cultivo (CAP) e plantio direto durante 20 anos (PD). Tais amostras eram originárias de solos podzólicos vermelhos e foram preparadas com a mistura das subamostras de seus pontos individuais de menor profundidade, seguido de secagem em temperatura ambiente por 15 dias e homogeneização em peneira granulométrica de 2 mm.

Os AH foram extraídos conforme o procedimento sugerido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, *International Humic Science Society*) a partir de Swift (1996) ^[120].

Tabela 7. Identificação e classificação das amostras de solo utilizadas para a extração dos AH.

| Amostras | Localização | Manejo | Profundidade (cm) | Densidade (g cm⁻³) |
|-----------------|---|-----------------------------------|--------------------------|--|
| CAP (P1) | 50,59 ⁰¹ '74" S, 22,79 ⁰⁷ '2'06" O | Capoeira (mata sem cultivo) | 0 - 5 | 0,82 |
| CAP (P2) | 50,59 ⁰¹ '82" S, 22,79 ⁰⁷ '2'55" O | Capoeira (mata sem cultivo) | 0 - 5 | 0,77 |
| CAP (P3) | 50,59 ⁰¹ '3'28" S, 22,79 ⁰⁷ '4'33" O | Capoeira (mata sem cultivo) | 0 - 5 | 0,86 |
| PD (P1) | 50,59 ⁰¹ '8'33" S, 22,79 ⁰⁷ '9'24" O | Plantio direto 20 anos | 0 - 5 | 0,97 |
| PD (P2) | 50,59 ⁰¹ '7'58" S, 22,79 ⁰⁷ '0'46" O | Plantio direto 20 anos | 0 - 5 | 0,95 |
| PD (P3) | 50,59 ⁰¹ '6'27" S, 22,79 ⁰⁷ '3'74" O | Plantio direto 20 anos | 0 - 5 | 0,98 |

A Figura 17 apresenta o fluxograma do processo de extração dos AH empregado.

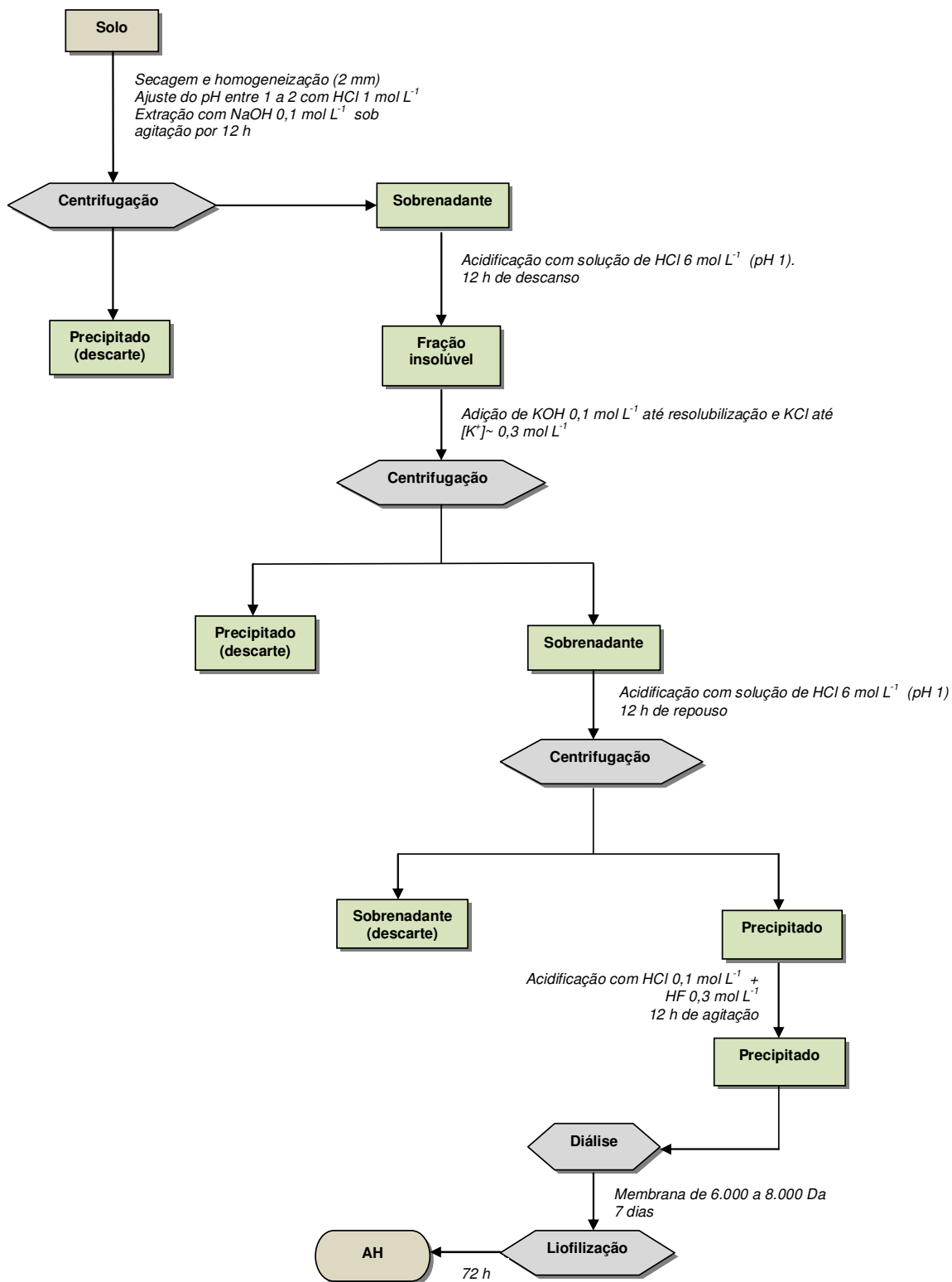


Figura 17. Fluxograma detalhado do procedimento de extração utilizado para obtenção dos AH de solos (Swift, 1996) ^[120].

Foi utilizado ácido fluorídrico (NUCLEAR) para solubilizar silicatos metálicos, de forma a reduzir o teor de sais inorgânicos presentes.

Para a caracterização dos AH extraídos foram utilizadas as técnicas instrumentais descritas nos itens a seguir, conforme Stevenson (1994) ^[1].

4.1.2.1 Análise Elementar e Teor de Cinzas

A determinação da porcentagem de C, N, H e S se deu por Análise Elementar (aparelho CHNS-O Eauger 200, marca CE-INSTRUMENTS), com estas análises sendo realizadas na Central de Análises Químicas (CAQI) do IQSC/USP.

A determinação do teor de cinzas se deu por tratamento térmico e diferença de massas, onde 10 mg de massa foram transferidos para cadinho de platina e aquecidos durante 4 h em mufla (modelo EDGCON3P, marca EDG) com rampa de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de resfriamento até atingir a temperatura ambiente e pesagem, com o teor sendo determinado pela diferença entre a massa inicial e a massa final.

4.1.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C no Estado Sólido com Polarização Cruzada e Amplitude Variável em Torno do Ângulo Mágico

Utilizou-se um espectrômetro Unity Inova 400 MHz, marca VARIAN, para a caracterização dos carbonos em função de seu ambiente químico, operando em frequência de ressonância de 100,58 MHz, banda espectral da Polarização

Cruzada de 50 kHz, tempo de contato de 1 ms, tempo de repetição de 500 ms, tempo de aquisição de 0,0128 ms, varredura de 0 – 230 ppm, com as amostras analisadas em rotores de zircônia de 5 mm, com Ângulo Mágico de 6,4 kHz e rampa do canal de 1H de 110 – 60 % (em kHz), conforme Novotny (2002) ^[121].

4.1.2.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Utilizou-se um espectrômetro modelo SPECTRUM 1000, marca PERKIN ELMER, para a caracterização dos grupos funcionais, operando em uma resolução de 4 cm⁻¹, 32 varreduras e em intervalo de número de onda de 4.000 a 400 cm⁻¹, com a pastilha manualmente preparada com 1 mg de amostra em 99 mg de brometo de potássio de grau analítico seco (SYNTH), com o último também sendo utilizado como branco.

4.1.2.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Utilizou-se um espectrômetro modelo EMX marca BRUKER para a caracterização do radical orgânico do tipo semiquinona, onde aproximadamente 15 mg de amostra sólida, em duplicata, foram transferidos para tubos de quartzo de forma a terem ambos o mesmo volume preenchido, sendo logo em seguida inseridos, individualmente, na cavidade retangular do espectrômetro, com cada medida realizada em temperatura ambiente e à 16 varreduras, com um ganho espectral de 1,00 x 10⁴, na banda-X; foram utilizados como padrões: KCl/Cr³⁺ (*strong pitch*, padrão primário para

quantificação de spins, BRUKER), rubi sintético (padrão secundário para correção de efeitos indesejáveis da cavidade de ressonância) e rubi sintético/Cr³⁺ (padrão interno para determinação do Fator-g, BRUKER).

4.2 Sorção Solos-Oxitetraciclina

As propriedades físico-químicas e estruturais da OTC, na sua forma de clorohidrato de oxitetraciclina, são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Propriedades físico-químicas e estruturais do clorohidrato de oxitetraciclina.

| | |
|--|--|
| Número CAS | 2058-46-0 |
| Fórmula molecular empírica | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ .HCl |
| Massa molecular | 496,89 g mol ⁻¹ |
| Doadores de H para ligação de hidrogênio | 8 |
| Aceptores de H para ligação de hidrogênio | 11 |
| Carga formal | 0 |
| Unidades de ligação covalente | 2 |
| Área superficial polar | 202 |
| Pureza | ≥ 95% (Grau HPLC), SIGMA-ALDRICH |
| Forma | Cristalina |
| Coloração | Amarela |
| Solubilidade em água | 0,6 – 0,8 mg mL ⁻¹ |

Fonte: adaptado de PUBCHEM ^[122] e ALDRICH COMPANY ^[123].

O experimento de sorção solos-OTC foi conduzido em duplicata utilizando os solos M1 e T1 conforme adaptação do procedimento desenvolvido por Jones et al. (2005) ^[124]. Como a carga e a especiação da OTC e do solo são

dependente do pH, optou-se por um meio tamponante (pH 4,8), próximo à fração mássica máxima do zwitterión da OTC e de forma a minimizar possíveis interferências de pH e de cargas eletrônicas para a sorção.

Preparou-se previamente soluções de OTC (clorohidrato de oxitetraciclina, grau HPLC com pureza ≥ 95 %, SIGMA-ALDRICH) nas seguintes concentrações em solução-tampão acetato de sódio (SYNTH)/ácido acético (SYNTH) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em água ultrapura (Milli-Q) e a partir de uma solução-estoque de OTC a 240 mg L^{-1} : 120, 60, 30, 20, 10 e 5 mg L^{-1} ; manteve-se uma solução-controle de 0 mg L^{-1} . Uma alíquota de 10 mL de cada solução foi transferida para frasco âmbar de vidro e logo em seguida adicionou-se massa de solo para uma concentração de 5 g L^{-1} . As misturas foram agitadas em mesa rotatória durante 48 h, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, e após este período seguiram para a análise cromatográfica e os resultados obtidos foram utilizados na construção das Isotermas de Sorção.

Para as análises por CLAE foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo PROSTAR marca VARIAN com detector de UV-Visível, e uma coluna de FE reversa do tipo PSDVB (*polystirene divinylbenzene*) de 15 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e $5 \mu\text{m}$ de tamanho de partícula, marca PHENOMENEX, com as seguintes condições de operação adaptadas de Loke, Tjørnelund e Halling-Sørensen (2002) ^[66]:

- FM isocrática (v/v): 26 % de acetonitrila (J.T. BACKER)/74 % de solução aquosa de ácido trifluoacético (MALLINCKRODT) à 0,05 % (v/v), com as soluções líquidas sendo previamente desaeradas em

banho de ultrassom por 15 minutos para se evitar a presença de bolhas de ar no sistema;

- Temperatura da coluna: 30 °C;
- Fluxo da fase móvel: 1 mL min⁻¹;
- Comprimento de onda do detector UV-Visível: 355 nm.

A acetonitrila utilizada era de grau HPLC enquanto que o ácido trifluoracético tinha uma pureza de 99 %.

Construiu-se uma curva de calibração externa da OTC para o método analítico e cujos pontos foram: 5, 10, 20, 30, 60, 120 e 240 mg L⁻¹. A partir desta curva foi determinado o Limite de Quantificação (LQ) do Método.

4.3 Sorção Ácidos Húmicos-Oxitetraciclina

Conforme anteriormente comentado, os AH utilizados para o preparo dos produtos de interação eram originários de sistemas de manejo distintos, onde o CAP foi primeiramente escolhido por este ser originário de um solo sem histórico de cultivo, devendo representar um cenário sem alteração humana, já que o uso do solo interfere nas características estruturais dos AH ^[10], enquanto que o do segundo se deu por este ser originário de solo exposto a plantio direto durante 20 anos, e cujas características químicas diferiram grandemente do primeiro AH (vide item **Resultados e Discussões**).

Para os experimentos de sorção AH-OTC todos os reagentes utilizados eram de grau P.A., excetuando-se a OTC, como clorohidrato de oxitetraciclina

(SIGMA-ALDRICH), que era de grau HPLC com pureza $\geq 95\%$, e a nenhum deles foi aplicada purificação prévia.

Denominou-se esta rota de preparação de ROTA 1, para a qual a relação m/v era variável, em função de serem testadas várias concentrações de OTC para a construção de Isotermas de Sorção, indo de 266AH m/v : 1OTC m/v até 11,1AH m/v : 1OTC m/v, tendo-se como referência estudos reportados na literatura tanto para a interação AH-xenobióticos orgânicos ^[97], quanto para MO-OTC ^[29]. Assim como para o experimento de sorção solos-OTC, na ROTA 1 foram utilizadas as seguintes concentrações de OTC a partir de uma solução-estoque a 240 mg L^{-1} : 120, 60, 30, 20, 10 e 5 mg L^{-1} , sendo novamente mantida uma solução-controle a 0 mg L^{-1} . Os produtos de interação obtidos também foram utilizados em medidas espectroscópicas após congelamento e liofilização, como poderá ser observado no próximo item.

Os experimentos foram conduzidos em duplicata em três valores distintos de pH: 3,1, 4,8 e 8,3, já que estes valores são próximos aos três valores de pK_a nos quais as espécies de OTC são OTC^+ , OTC^{z} e OTC^- , respectivamente (Figura 7), além de abrangerem a presença do zwitterion (pH 4,8) e o meio em que os AH encontram-se solubilizados (pH 8,3); é importante ressaltar, ainda, que os pHs 3,1 e 4,8 são de importância ambiental, por se aproximarem dos valores característicos de pH dos solos tropicais ^[121]. Assim, esperou-se evidenciar a influência do pH do meio na sorção AH-OTC e nos mecanismos de interação envolvidos.

Para o ajuste do pH do meio reacional foram utilizadas as seguintes soluções eletrólitas preparadas em água ultrapura (Milli-Q):

- pH 3,1: ácido clorídrico (QUEMIS) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$;
- pH 4,8: tampão ácido acético/acetato de sódio $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$;
- pH 8,3: bicarbonato de sódio (SYNTH) $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

As condições operacionais do método analítico por CLAE foram as mesmas utilizadas para as análises da sorção solos-OTC.

A Figura 18 apresenta a rota de preparo e suas características operacionais.

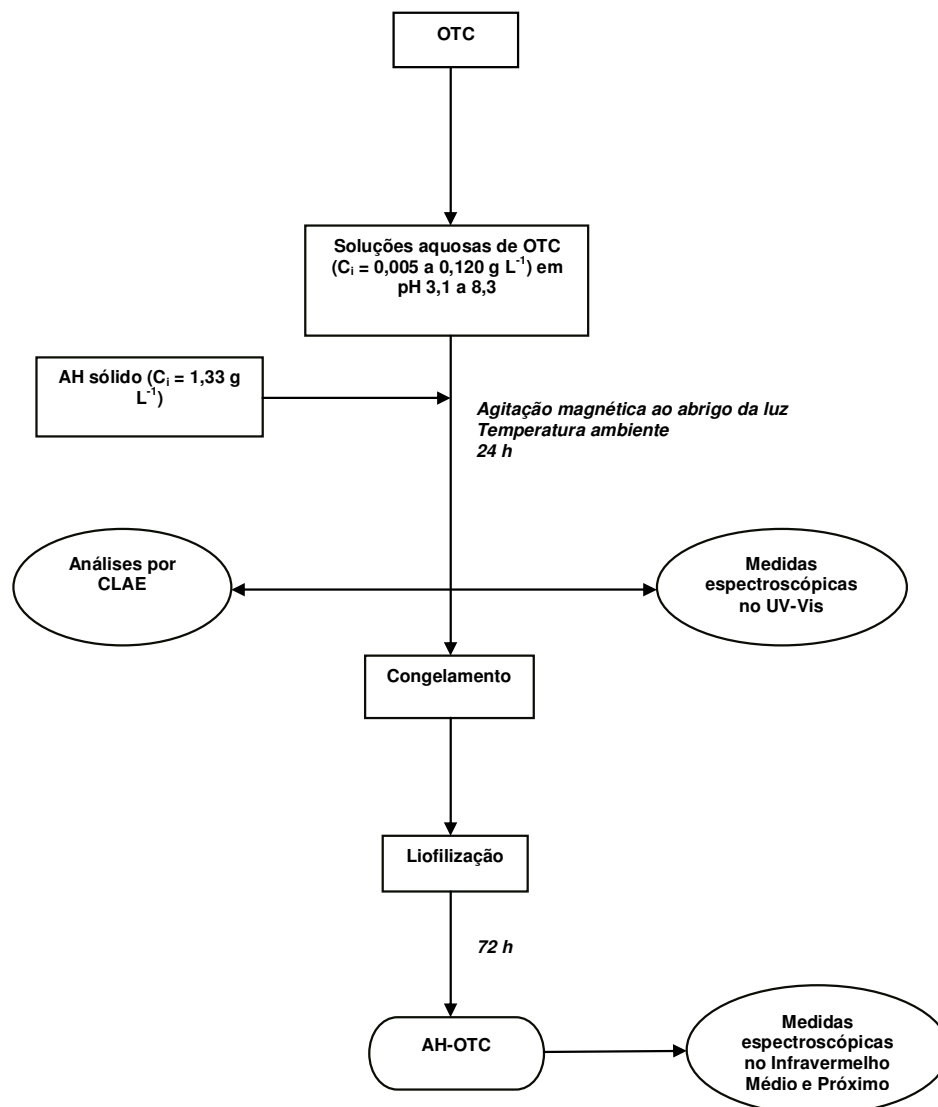


Figura 18. Fluxograma detalhado da ROTA 1 de preparo dos produtos de interação AH-OTC.

4.4 Averiguação dos Mecanismos de Interação por Técnicas Espectroscópicas

Para o preparo dos produtos de interação AH-OTC foi utilizada a ROTA 2, cuja diferença da ROTA 1 era de que a relação m/v manteve-se constante em 30AH m/v : 1OTC m/v, baseando-se em experimentos realizados para a

interação de AH com xenobióticos orgânicos descritos por Martin-Neto, Vieira e Sposito (1994) ^[125], com uma concentração de OTC de 20 mg L⁻¹ (4,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹). Foram preparados produtos de interação em pH 3,1, 5,3, 8,3 e 11,5, com o último valor de pH testado de forma a averiguar a influência de um meio fortemente alcalino na interação. No entanto, também foram realizadas medidas nos produtos de interação obtidos na ROTA 1.

Em ambas as rotas foram preparadas soluções-controle, ou produtos de referência, de AH e OTC nas mesmas condições e concentrações iniciais daquelas utilizadas para a interação.

Para o ajuste do pH do meio reacional foram utilizadas as seguintes soluções eletrólitas preparadas em água ultrapura Milli-Q:

- pH 3,1: ácido clorídrico 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹;
- pH (4,8 e 5,3): tampão ácido acético/acetato de sódio 1,0 x 10⁻¹ mol L⁻¹ e água Milli-Q ajustada com ácido clorídrico a 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, respectivamente;
- pH 8,2 e 8,3: hidróxido de sódio (SYNTH) 1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e bicarbonato de sódio 5,0 x 10⁻² mol L⁻¹, respectivamente;
- pH 11,5: hidróxido de sódio 2,75 x 10⁻³ mol L⁻¹.

Em relação ao pH próximo a 5, o uso de duas soluções para o ajuste deste valor teve como objetivo evitar a precipitação do sal do eletrólito acetato de sódio após a liofilização, o que foi freqüentemente notado, para que este não pudesse diluir o sinal do analito para medidas espectroscópicas.

Na Figura 19 é apresentado o fluxograma da rota de preparação, além de comentários das particularidades operacionais da mesma, com a descrição das técnicas analíticas utilizadas para acompanhamento (Espectroscopias de Absorção e Fluorescência na Região do UV-Visível) e caracterização dos produtos de interação e dos controles de AH e OTC (Espectroscopias de Absorção no Infravermelho Médio e Próximo).

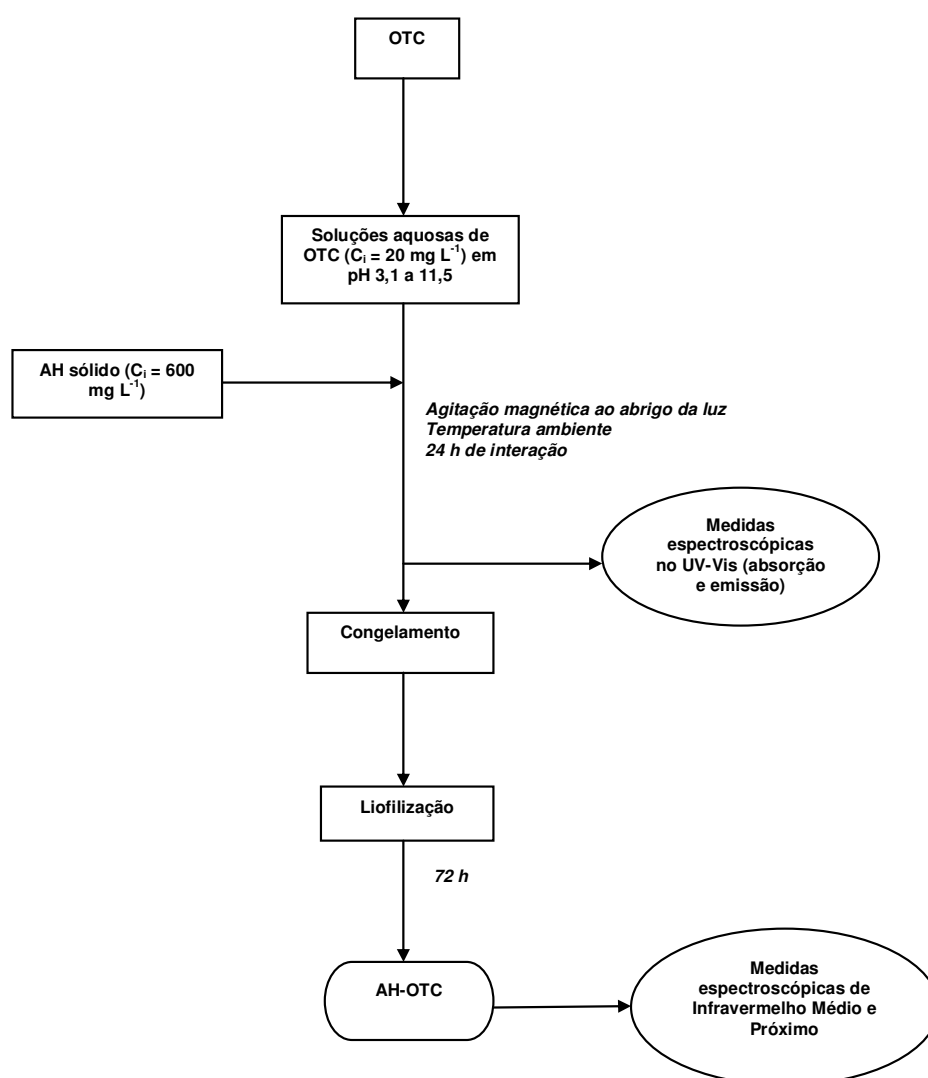


Figura 19. Fluxograma detalhado da ROTA 2 de preparo dos produtos de interação AH-OTC.

Nesta etapa foram utilizadas as seguintes técnicas espectroscópicas:

- Espectroscopias de Absorção e Fluorescência na Região do UV-Visível;
- Espectroscopias de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier e na Região do Infravermelho Próximo.

A Tabela 9 descreve aspectos operacionais relacionados à aplicação das técnicas citadas.

Tabela 9. Aspectos operacionais das técnicas espectroscópicas utilizadas para a determinação de mecanismos de interação.

| Mecanismo de Interação | Técnica Utilizada | Fenômeno Monitorado |
|-------------------------------|---|--|
| Ligação de hidrogênio | Infravermelho Médio Infravermelho Próximo | Deslocamentos, desaparecimentos, formação e/ou divisão de bandas Deslocamentos, desaparecimentos, formação e/ou divisão de bandas |
| Interação hidrofóbica | Fluorescência no UV-Visível Infravermelho Médio Infravermelho Próximo | Deslocamentos, desaparecimentos, formação e/ou divisão de bandas |
| Transferência de elétrons | Absorção no UV-Visível | Deslocamentos, desaparecimentos, formação e/ou divisão de bandas |

4.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível

Esta técnica espectroscópica foi utilizada com dois propósitos: obter dados sobre a cinética de interação AH-OTC e monitorar a formação dos produtos de interação da ROTA 1 e da ROTA 2.

Na ROTA 1, foram seguidos os procedimentos de amostragem das alíquotas apresentados nos fluxogramas dos **Itens 3.3** e **3.4**, onde eram retiradas alíquotas das misturas após finalizado o período de interação e imediatamente medidas em espectrofotômetro, no intervalo de comprimento de onda de 190 a 800 nm.

Na ROTA 2, foi utilizado o procedimento experimental proposto por Allaire, Dell Castillo e Juneau (2006) para os antibióticos clorotetraciclina e tilosin e sua interação em solos ^[126], onde uma determinada massa de AH foi previamente solubilizada durante 24 h, sob agitação e ao abrigo da luz em temperatura ambiente, em solução aquosa ajustada para pH de 3,1 (ácido clorídrico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 4,8 (tampão ácido acético/acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e 8,3 (bicarbonato de sódio $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), separadamente, seguido da adição de uma determinada massa de OTC, e posterior retirada de alíquotas da mistura de forma periódica durante 5, 15, 30, 60, 120, 150, 180, 210 e 240 min e 24 e 48 h, as quais foram imediatamente medidas em espectrofotômetro modelo UV-1601-PC marca SHIMADZU em um intervalo de comprimento de onda de 190 a 800 nm, sendo testadas várias razões m/v AH : OTC, como: 1AH : 4OTC, 1AH : 1OTC, 2,4AH : 1OTC e 30AH : 1OTC. Porém, optou-se por considerar os resultados referentes à última razão, em função da mesma já estar validada para outros tipos de interação entre AH e xenobióticos orgânicos

[15, 125]. Esta etapa foi de fundamental importância para o estudo por definir o *tempo de equilíbrio*, ou seja, o período ótimo para a reação entre AH e OTC, o qual foi posteriormente utilizado para os experimentos de interação solo-OTC e AH-OTC.

Em ambos os casos houve a necessidade de se realizar diluições para as amostras originárias de misturas em meio alcalino ($\text{pH} \geq 8$), já que neste pH o AH encontrou-se totalmente solubilizado, transpondo a linearidade da Lei de Lambert-Beer por atingir valores não permitidos para o coeficiente de absorvidade molar ϵ [95], com esta diluição mantida em cerca de 0,5 mL de amostra para 25 mL de água Milli-Q.

Testou-se, ainda, o possível efeito de solvatocromismo sofrido pela OTC em diferentes solventes com diferentes características de polaridade, e desta forma, inferir sobre interações da molécula de OTC com o meio e as conseqüentes alterações no perfil espectral. Foram preparadas soluções de OTC a uma concentração de 20 mg L^{-1} utilizando-se os seguintes solventes: água Milli-Q ($\text{pH } 6,8$), dimetil-cetona P.A. (QUEMIS), etanol P.A. (QUEMIS), metanol P.A. (SYNTH), etil-metil-cetona P.A. (SYNTH) e n-hexano P.A. (QUEMIS). Estas misturas foram medidas imediatamente após seu preparo em ambiente com baixa luminosidade e à temperatura ambiente, de forma a se evitar possível degradação fotoquímica da OTC, o que poderia alterar o perfil dos espectros a serem obtidos.

4.4.2 Espectroscopia de Fluorescência na Região do Ultravioleta-Visível

Preparou-se 10 mL de uma solução de OTC a 4 mg L^{-1} em pH 8,3 (bicarbonato de sódio $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em água Milli-Q previamente desaerada durante 20 minutos em N_2 de alta pureza (WHYTE MARTINS), com posterior adição de AH CAP de modo a se ter uma solução inicial do AH de 60 mg L^{-1} , ou seja, mantendo-se uma relação m/v de 15AH : 1OTC. Em $t(0)$, que era o tempo imediatamente após a adição de AH, foram realizadas medidas em alíquotas de cerca de 3 mL de AH, AH-OTC e OTC. A mistura foi mantida sob agitação mecânica à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 24 h, acompanhada de soluções-controle de AH e OTC, a 60 mg L^{-1} e 4 mg L^{-1} , respectivamente, e em iguais condições. Após 24 h, ou $t(1)$, foram retiradas alíquotas de cerca de 3 mL de cada solução e realizadas medidas de cada uma delas. Após finalização das medidas referentes a $t(1)$, ajustou-se o pH de cada solução para 6,1 com 3 gotas de solução de ácido clorídrico $6,0 \text{ mol L}^{-1}$, seguido de medidas de cada solução e, logo em seguida, o pH das misturas foi novamente ajustado para 2,8 com 1 gota de ácido clorídrico $6,0 \text{ mol L}^{-1}$, seguido novamente das respectivas medidas. O ajuste de pH teve por finalidade observar a influência deste sobre a interação AH-OTC.

Os modos de aquisição foram:

- **Emissão 1:** excitação em 240 nm e intervalo de emissão entre 300 - 850 nm, com o comprimento de onda da emissão sendo varrido;

- **Emissão 2:** excitação em 465 nm e intervalo de emissão entre 480 - 700 nm, novamente com o comprimento de onda da emissão sendo varrido;
- **Excitação:** emissão em 510 nm e intervalo de excitação entre 220 - 490 nm, com o comprimento de onda da excitação sendo varrido;
- **Varredura Sincronizada:** variação do comprimento de onda de 55 nm e intervalo de varredura entre 220 - 800 nm, com os monocromadores de excitação e emissão sendo varridos simultaneamente a uma diferença de comprimento de onda fixa.

Utilizou-se um espectrômetro modelo LS50B PERKIN ELMER, com largura de fenda para todos os monocromadores de 10 nm e velocidade de varredura de 120 nm min^{-1} [127].

4.4.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier

As pastilhas foram preparadas da seguinte forma: a 99 mg de brometo de potássio grau analítico, previamente secos em estufa, adicionou-se 1 mg de cada amostra, sendo a mistura sólida homogeneizada manualmente em almofariz até a formação de um pó fino, o qual foi transferido para recipiente metálico (pastilhador) com a aplicação de pressão mecânica de cerca de 10 toneladas. A pastilha resultante foi inserida em espectrômetro modelo SPECTRUM 1000, PERKIN ELMER, e o espectro foi obtido no modo de % T a uma resolução de 4 cm^{-1} para 32 varreduras, tendo-se a pastilha de brometo

de potássio como branco de medida. Cada espectro obtido sofreu posterior ajuste automático de sua linha de base.

4.4.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Próximo

Para as medidas no Infravermelho Próximo transferiu-se uma massa variável de amostra para tubo de quartzo, de forma a preencher a superfície deste, o qual foi depositado sobre a fonte de radiação do equipamento para a leitura.

O espectrômetro utilizado foi um modelo SPECTRUM 100N, PERKIN ELMER, com as medidas obtidas no modo de % T, utilizando-se como branco uma pastilha de material cerâmico fornecido pelo fabricante do equipamento, com cada medida sendo obtida em duplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterizações Preliminares

5.1.1 Caracterização dos Solos

A Tabela 10 apresenta os resultados das caracterizações dos solos utilizados para o experimento de interação solo-OTC.

Tabela 10. Resultados de caracterização dos solos M1 (mata, latossolo vermelho-amarelo distrófico) e T1 (turfa, organossolo).

| Parâmetro | Unidade | Solo | |
|-----------------------------------|----------------------|------|--------|
| | | M1* | T1 |
| pH em CaCl ₂ | - | 4,0 | 6,3 |
| Al ³⁺ | mmol L ⁻¹ | 8 | 0 |
| H ⁺ + Al ³⁺ | mmol L ⁻¹ | 72 | 15 |
| K ⁺ | mmol L ⁻¹ | 0,5 | 6,3 |
| Ca ²⁺ | mmol L ⁻¹ | 4 | 80 |
| Mg ²⁺ | mmol L ⁻¹ | 2 | 42 |
| CTC (total) | mmol L ⁻¹ | 79 | 143 |
| MO | g L ⁻¹ | 26 | 119 |
| Soma das Bases | mmol L ⁻¹ | 7 | 128 |
| Saturação de Bases | - | 8 % | 90 % |
| Granulometria | - | | |
| <i>Areia</i> | | 4 % | 19,2 % |
| <i>Silte</i> | | 78 % | 19,2 % |
| <i>Argila</i> | | 18% | 61,6 % |

*Resultados determinados por Soares (2009) ^[116].

Os dados apresentados demonstraram que o solo T1 possuía uma quantidade maior de MO e de metais, o que refletiu em maiores valores de pH e CTC, respectivamente, quando em comparação ao solo M1.

5.1.2 Caracterização dos Ácidos Húmicos de Solo

Para a caracterização química adequada dos AH extraídos foram interpretados e correlacionados os resultados de todas as técnicas analíticas instrumentais utilizadas.

5.1.2.1 Análise Elementar e Teor de Cinzas

Foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de porcentagens atômicas obtidas por Análise Elementar e de teor de cinzas obtido por aquecimento e pesagem.

| Amostra | Teor de C ^a (%) | Teor de H ^a (%) | Teor de N ^a (%) | Teor de O ^{a, b} (%) | Teor de Cinzas ^a (%) | H/C | C/N | O/C |
|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------|-------|------|
| CAP | 48,68 | 4,95 | 5,24 | 41,11 | 0,02 | 1,22 | 10,85 | 0,63 |
| PD | 45,83 | 2,91 | 4,03 | 44,35 | 2,88 | 0,76 | 13,26 | 0,73 |

^aMédia da duplicata; ^bValores obtidos pela diferença $O = 100 - (C+H+N+S)$ e considerando-se o teor de cinzas.

Todos os valores obtidos para as porcentagens atômicas e para as razões atômicas estiveram próximos aos valores reportados em literatura. Porém,

pôde-se observar que a porcentagem de O era típica para AH de solos tropicais ^[121].

Tornam-se, porém, mais importantes as relações atômicas existentes nas diferentes amostras. A maior relação H/C representa uma menor aromaticidade ^[1]; neste caso, o AH CAP apresentou a maior relação e uma menor aromaticidade, enquanto que o PD apresentou a menor relação e maior aromaticidade. A relação C/N indica a estabilidade bioquímica da MO, onde valores entre 10 e 20 são satisfatórios ^[1], e neste caso os dois AH estavam estabilizados. A relação O/C é um indicativo da quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio (fenol e ácido carboxílico) ^[128], com PD apresentado os maiores valores e, conseqüentemente, a maior quantidade destes grupamentos presentes.

Desta forma, os valores obtidos mostraram-se adequados com dados já reportados na literatura, o que demonstrou que o processo de extração aplicado foi eficiente.

5.1.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹³C no Estado Sólido com Polarização Cruzada e Amplitude Variável em Torno do Ângulo Mágico

Foram obtidos os espectros apresentados na Figura 20.

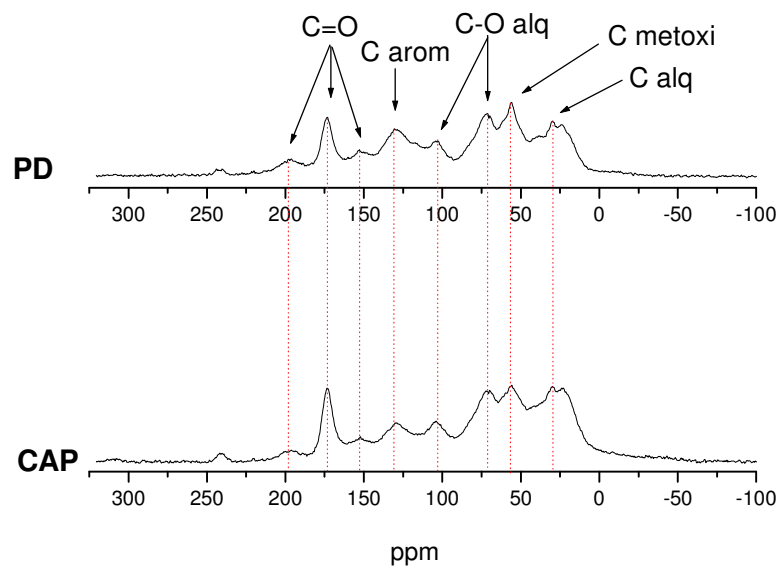


Figura 20. Espectros de RMN de ^{13}C dos AH extraídos.

As seguintes atribuições dos grupamentos em função do deslocamento químico podem ser feitas ^[1]:

- a) **0 – 45 ppm:** C alifático não substituído, como em alcanos e ácidos graxos, devido a grupamentos metil-terminais;
- b) **45 – 65 ppm:** C associado a N-alquílico, como em aminoácidos, peptídeos e proteínas e C metoxílico, devido a lignina incorporada ao solo;
- c) **60 – 110 ppm:** C associado a O alifático em carboidratos, devido a polissacarídeos incorporados aos AH;
- d) **110 – 140 ppm:** C aromático não-substituído e alquil-substituído;
- e) **110 - 160 ppm:** C aromático total relacionado a grupamento não-substituído, alquil-substituído e fenólico;
- f) **140 – 160 ppm:** C fenólico;

g) **160 – 185 ppm**: C em carboxilato;

h) **185 – 230 ppm**: C cetônico em ésteres e amidas.

As áreas relativas obtidas demonstraram a heterogeneidade dos AH em função de suas origens e forma de cultivo, já que grupamentos idênticos estão presentes em diferentes valores percentuais nas amostras pertencentes a diferentes solos.

Os valores relativos aos diferentes grupos funcionais, bem como as porcentagens relativas aos graus de aromaticidade e conteúdo alifático, são apresentados na Tabela 12. As equações abaixo foram utilizadas na determinação destas características ^[1]:

$$\text{Grau de Aromaticidade (\%)} = A_{(110-230 \text{ ppm})} / A_{(0-230 \text{ ppm})} \times 100 \quad (19)$$

Onde $A_{(110-230 \text{ ppm})}$ é a área de C-aromático total, considerando-se C-aromático + C-fenólico + C-carboxílico + C-carbônico, e $A_{(0-230 \text{ ppm})}$ é a área total de todos os picos.

$$\text{Conteúdo de C Alifático} = A_{(0-45 \text{ ppm})} + A_{(45-65 \text{ ppm})} + A_{(60-110 \text{ ppm})} \quad (20)$$

Onde $A_{(0-45 \text{ ppm})}$ é a área de C alifático não-substituído, $A_{(45-65 \text{ ppm})}$ é a área do C associado a O e N e $A_{(60-110 \text{ ppm})}$ é a área do C derivado de açúcares.

$$\text{Índice de Polaridade} = \Sigma A_{C-O} / A_{C_{arom}} + A_{C_{alquil}} \quad (21)$$

Onde ΣA_{C-O} é a somatória das áreas referentes a C ligado a O em 60 - 110 ppm, 140 – 160 ppm, 160 - 185 ppm e 185 - 230 ppm, e $A_{Carom} + A_{Calquil}$ é a soma das áreas de C aromático e alifático referentes aos deslocamentos entre 0 - 45 ppm e 110 - 140 ppm, respectivamente.

Tabela 12. Porcentagem de área relativa para os principais grupos funcionais aos quais os carbonos encontraram-se associados na molécula dos AH e os parâmetros moleculares derivados.

| Tipo de C | Faixa de Deslocamento Químico (ppm) | Área Relativa (%) | |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------|
| | | CAP | PD |
| C-alquílico | 0 – 45 | 28,2 | 21,4 |
| C-metoxílico / C-N-alquílico | 45 – 65 | 12,1 | 11,9 |
| C-O-alquílico | 60 – 110 | 28,2 | 27,8 |
| C-aromático | 110 – 140 | 11,8 | 16,0 |
| C-fenólico | 140 – 160 | 5,9 | 6,9 |
| C-carboxílico | 160 – 185 | 10,2 | 10,5 |
| C-carbônico | 185 – 230 | 5,0 | 2,2 |
| Grau de Aromaticidade (%) | | 32,4 | 36,8 |
| Conteúdo Alifático | | 68,5 | 61,1 |
| Índice de Polaridade | | 1,2 | 1,3 |

O AH CAP apresentou a menor característica aromática e menor Índice de Polaridade enquanto que o PD apresentou a maior característica aromática e maior Índice de Polaridade, corroborando com os valores da relação H/C obtidos da Análise Elementar (**Item 4.1.2.1**).

5.1.2.3 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Como comentado anteriormente no **Item 1.6.3.6**, esta técnica permite determinar parâmetros quantitativos que podem fornecer informações a respeito do ambiente químico ao qual o radical do tipo semiquinona se encontra ligado e inferir sobre a concentração do radical.

Os valores dos parâmetros, determinados em duplicata, são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores para os parâmetros de RPE determinados para os AH extraídos.

| Ácido Húmico | Spin g^{-1} (<i>desvio médio</i>) | Fator-g (<i>desvio médio</i>) | Largura de Linha (ΔG médio) |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| CAP | $2,43 \times 10^{17}$ (0,52) | 2,0033 (0,0000) | 4,6 |
| PD | $6,27 \times 10^{16}$ (0,57) | 2,0033 (0,0005) | 4,3 |

Os valores para largura da linha de absorção e para o Fator-g estão de acordo com aqueles característicos dos AH, ou seja, de 4 a 6 ΔG de largura de linha ^[110] e de 2,003 a 2,005 para o Fator-g ^[129].

Em relação à concentração dos radicais tipo semiquinona, expressa em spin g^{-1} , o AH PD apresentou valor próximo ao encontrado para lignina em solo ($5,0 \times 10^{16}$ spin g^{-1}) ^[129], com um menor grau de humificação ^[130]. O CAP apresentou valor característico para AH extraído de solo ^[131].

A Figura 21 apresenta os espectros dos dois AH caracterizados.

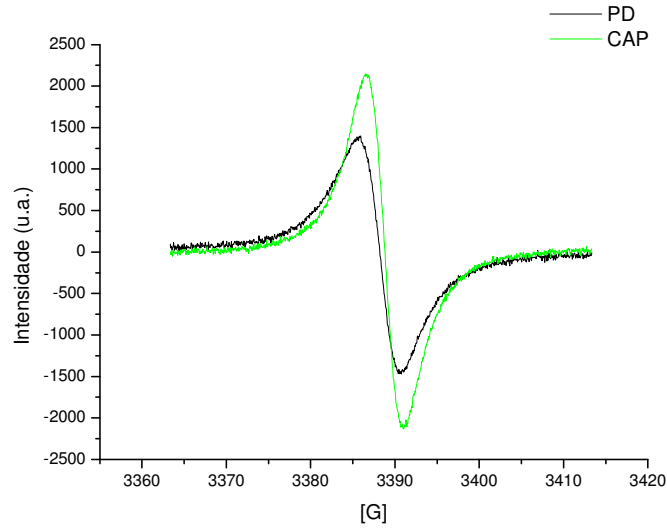


Figura 21. Espectros de RPE obtidos na banda-x dos AH extraídos de solo.

5.1.2.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier

Foram obtidos os espectros apresentados na Figura 22.

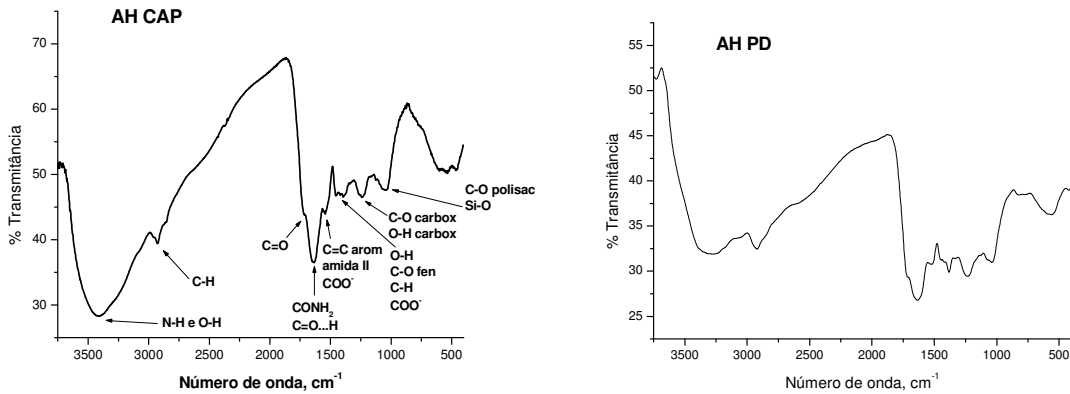


Figura 22. Espectros no Infravermelho Médio dos AH extraídos dos solos CAP (esquerda) e PD (direita).

Desta forma, e conforme as deformações vibracionais características dos AH presentes na Tabela 4 (**Item 1.6.3.3**), mesmo possuindo cada espectro pequenas diferenças de intensidade e da forma das bandas, os dois AH analisados apresentaram os grupamentos químicos característicos principais destes compostos, a saber: estiramento intramolecular de O-H e N-H entre 3.500 a 3.000 cm^{-1} , estiramento assimétrico de C-H alifático entre 2.940 a 2.900 cm^{-1} , estiramento de COO^- entre 1.660 a 1630 cm^{-1} , estiramento de C=C aromático entre 1.620 a 1.600 cm^{-1} , estiramento de C-H alifático entre 1.460 a 1.450 cm^{-1} , estiramento de OH fenólico entre 1.400 a 1.390 cm^{-1} e estiramento de OH em COOH entre 1.280 a 1.200 cm^{-1} .

5.2 Sorção Solos-Oxitetraciclina

Foram construídas isotermas para verificar a influência do tipo de solo na sorção da OTC, escolhendo-se solos com características distintas.

Primeiramente, cabe demonstrar que as curvas de calibração externas do método analítico, apresentadas na Figura 23, obtiveram valores do coeficiente de correlação linear R de 0,999 os quais eram satisfatórios para fins analíticos

[132].

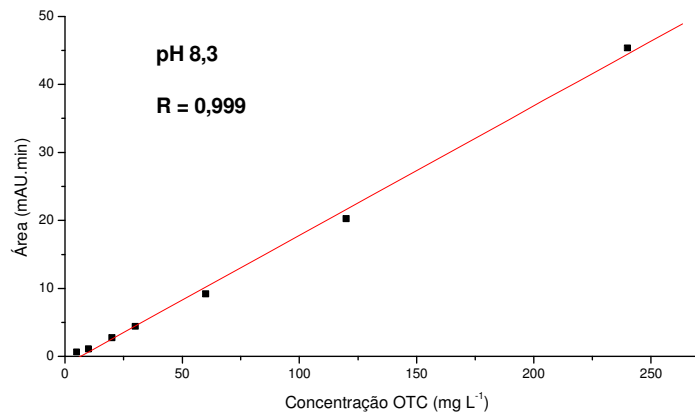
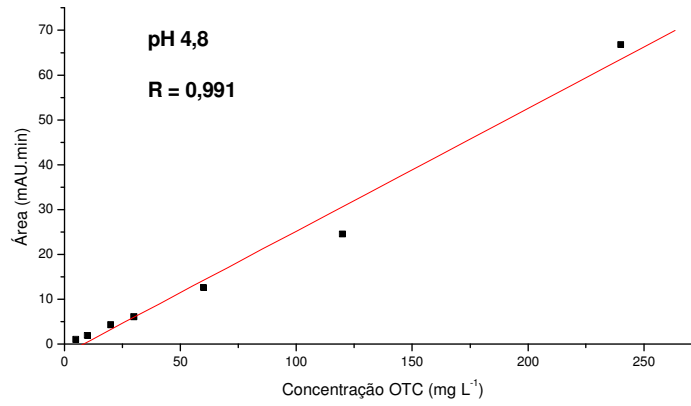
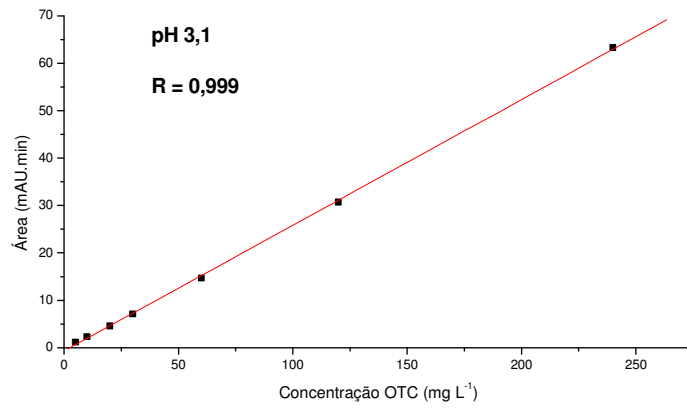


Figura 23. Curvas de calibração (padrão externo) em diferentes valores de pH para o método cromatográfico de determinação de OTC.

Os LQs foram determinados a partir da seguinte equação ^[132], seguindo-se as recomendações da IUPAC ^[58]:

$$LQ = 10 \times s / S \quad (22)$$

Onde **s** é a estimativa do desvio padrão da resposta, neste caso da equação da regressão linear, e **S** é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. Desta forma, determinou-se um LQ de 4,0 mg L⁻¹ para as três curvas da Figura 23, com o método não sofrendo maiores variações em função do pH do meio.

Os cromatogramas das Figuras 24 e 25 apresentaram os perfis cromatográficos dos produtos de sorção solo-OTC.

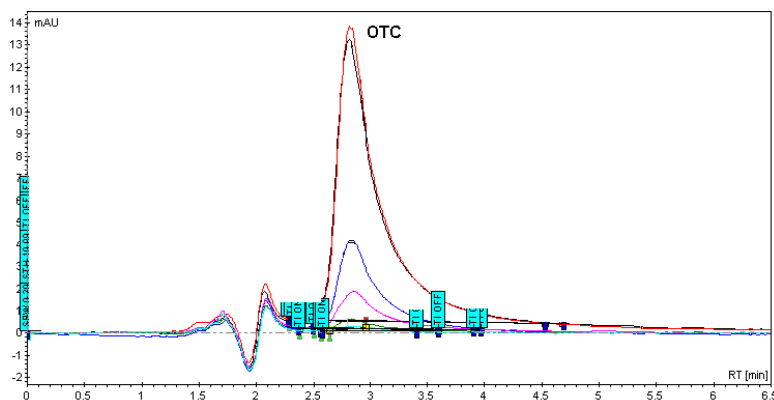


Figura 24. Cromatogramas sobrepostos para solo "M1"-OTC obtidos em pH 4,8, onde: C_i OTC = 120 mg L⁻¹ (preto), C_i OTC = 60 mg L⁻¹ (vermelho), C_i OTC = 30 mg L⁻¹ (azul), C_i OTC = 20 mg L⁻¹ (rosa).

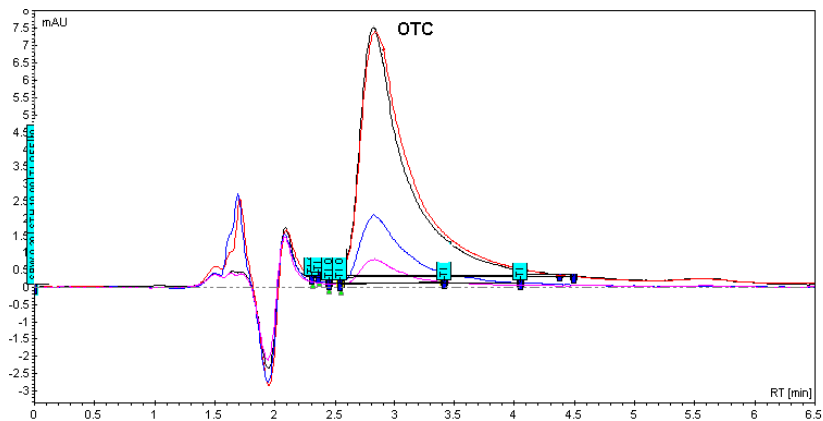


Figura 25. Cromatogramas sobrepostos para solo "T1"-OTC obtidos em pH 4,8, onde: C_i OTC = 120 mg L^{-1} (preto), C_i OTC = 60 mg L^{-1} (vermelho), C_i OTC = 30 mg L^{-1} (azul), C_i OTC = 20 mg L^{-1} (rosa).

Para as concentrações iniciais de OTC de $10,0$ e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram obtidos valores negativos para C_e , o que demonstrou que o LQ era ineficiente para estas duas concentrações, muito provavelmente em decorrência da diminuição da sensibilidade do método ^[132].

Foram testadas isotermas de sorção do tipo Linear ou de Partição, Freundlich e isotermas de Langmuir, com posterior avaliação do modelo que mais se adequou após regressão linear, ou ajuste linear, quando pertinente (Freundlich e Langmuir). Estas isotermas são apresentadas nas Figuras 26 a 28.

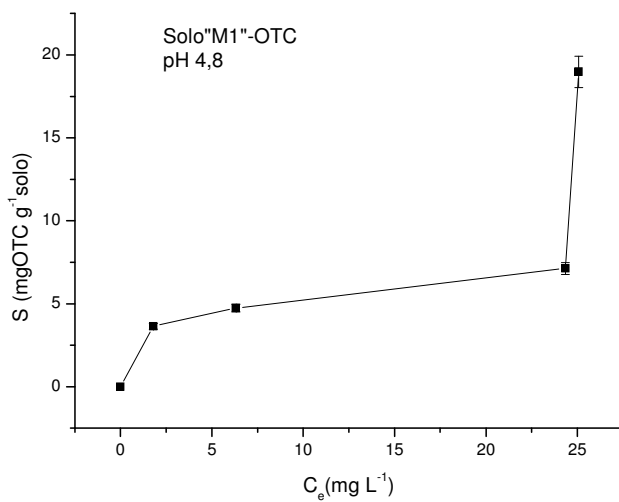
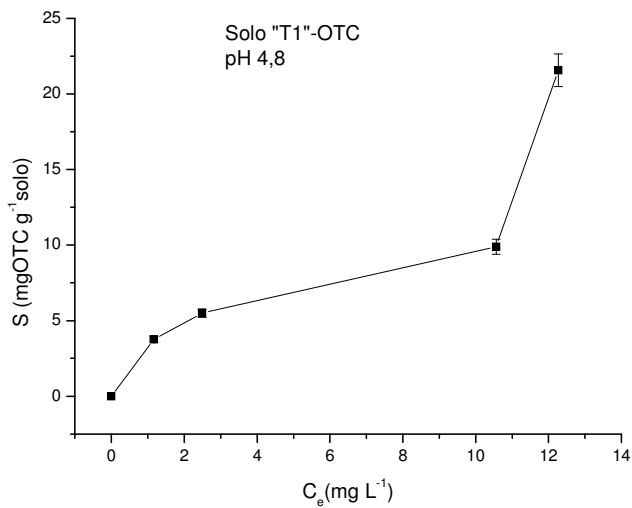


Figura 26. Isothermas obtidas para solo-OTC, segundo o modelo linear ou de partição.

De acordo com a Figura 26, a isoterma linear, ou de partição, não foi obedecida, sendo necessário testar as isothermas de Freundlich e de Langmuir.

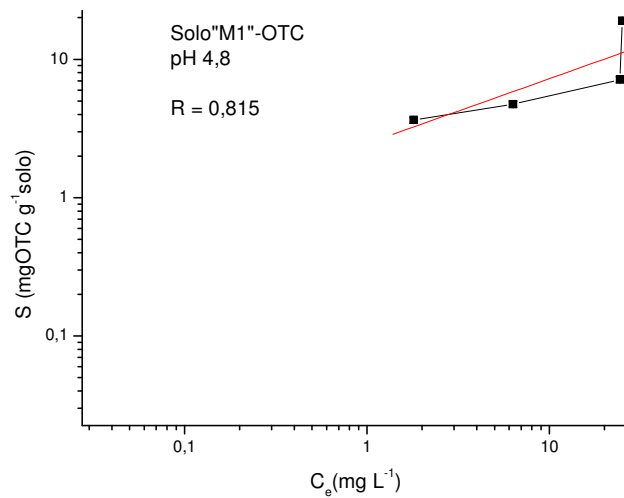
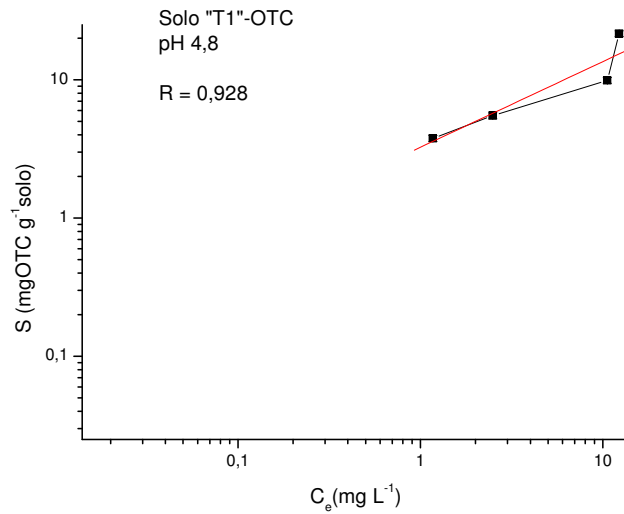


Figura 27. Isotermas obtidas para solo-OTC, segundo o modelo de Freundlich após ajuste linear.

Cabe destacar que o valor de N da isoterma de Freundlich permite inferir sobre a forma da isoterma e o mecanismo de sorção, onde $N = 1$ representa uma isoterma C linear ou de partição, $N < 1$ uma isoterma L e $N > 1$ uma isoterma S ^[78]. Quanto mais alto o valor de N , mais heterogêneo é o processo de sorção ^[97].

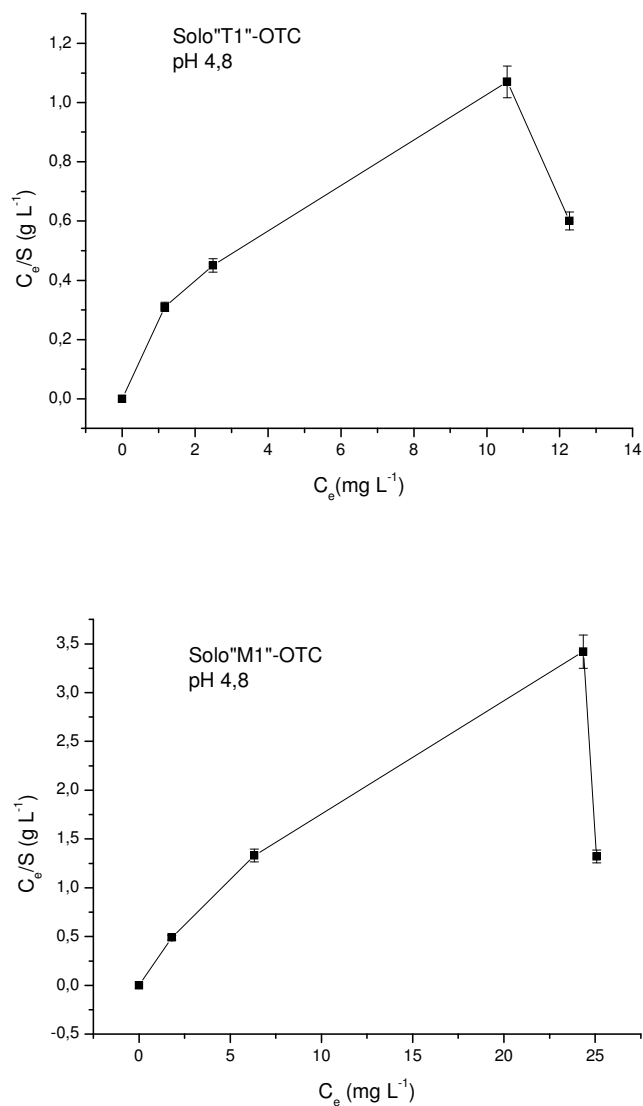


Figura 28. Isotermas obtidas para solo-OTC, segundo o modelo de Langmuir.

A partir do ajuste linear das curvas obtidas foi determinado que a isoterma de Freundlich, na forma linear logarítmica ajustada com o uso do software ORIGIN[®], foi o modelo que melhor se adequou, cabendo destacar que esta isoterma é comumente utilizada para a representação empírica da sorção de compostos orgânicos às superfícies heterogêneas (ex.: solo e MO), como fármacos veterinários^[97, 134]. A Tabela 14 apresenta os parâmetros de ajuste.

Tabela 14. Valores calculados para as isotermas de Freundlich após ajuste linear da equação em sua forma logarítmica.

| Equação da Isoterma de Freundlich | K_f ($\text{mg}^{1-n} \text{L g}^n$) | N | Tipo de Isoterma | R | Tipo de Solo |
|---|--|------|------------------|-------|--------------|
| $\text{LogS} = 0,51 + 0,62 \text{logC}_e$ | 3,24 | 0,62 | L | 0,928 | T1 |
| $\text{LogS} = 0,39 + 0,47 \text{logC}_e$ | 2,45 | 0,47 | L | 0,815 | M1 |

Os valores obtidos para K_f demonstraram que o solo com maior conteúdo de MO (T1) apresentou a maior capacidade de sorção, com uma sorção do tipo L, baseada em N, que aumenta com o aumento da concentração de OTC no meio aquoso ^[4]. Os valores obtidos de K_f estiveram abaixo daqueles obtidos em literatura para OTC em solos temperados ^[124], demonstrando que esta sorção foi fraca. Porém, Jones et al. (2005) ^[124] observaram que a constante de partição K_d é mais adequada para a observação da capacidade de sorção do que K_f . Desta forma, calculou-se K_d para os dois solos (Tabela 15).

Tabela 15. Valores determinados para K_d para sorção da OTC aos solos T1 e M1.

| C_i OTC (mg L^{-1}) | K_d (L kg^{-1}) | Solo |
|----------------------------------|------------------------------|------|
| 120,0 | 9.290 | T1 |
| | 760 | M1 |
| 60,0 | 940 | T1 |
| | 290 | M1 |
| 30,0 | 2.210 | T1 |
| | 750 | M1 |
| 20,0 | 3.220 | T1 |
| | 2.020 | M1 |

A Figura 29 apresenta o gráfico com o perfil de K_d para cada um dos solos.

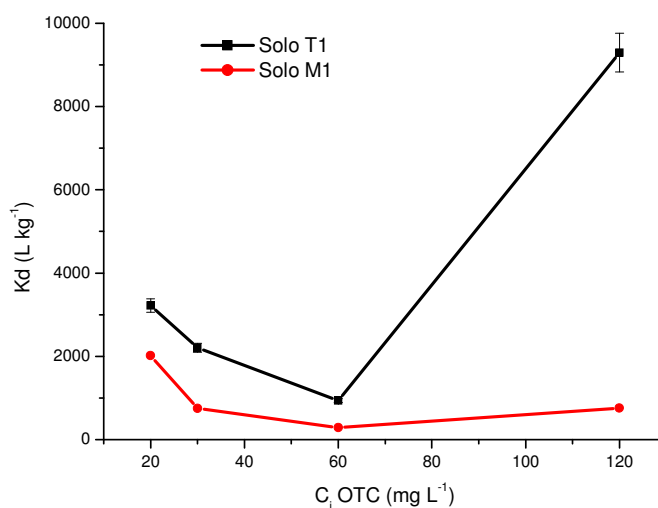


Figura 29. Sobreposição dos perfis de K_d em função da concentração inicial de OTC para os dois solos estudados.

O comportamento do gráfico da Figura 29 pode ser interpretado a partir das características de composição de cada solo. Jones et al. (2005) ^[124] observaram que a textura do solo (granulometria), juntamente com a CTC são os principais fatores de influência para a sorção de OTC a solos. Porém, tal influência é limitada ao conteúdo de MO presente, a qual diminui com o aumento da última.

Ao se correlacionar os perfis de sorção apresentados na Figura 29 com a caracterização dos solos da Tabela 10 (**Item 4.1.1**), pôde-se observar que o solo com maior conteúdo de MO e maior CTC (T1) foi o que apresentou o maior valor de K_d para a maior concentração inicial de OTC (120 mg L^{-1}). Como o interesse principal do estudo é a sorção da OTC por parte da MO, este resultado obtido foi determinante para justificar a construção das isothermas de

sorção para AH-OTC, além de demonstrar um comportamento de sorção diferente dos solos brasileiros, não se limitando à CTC e à composição textural. Outro fato também a ser considerado para o maior valor de K_d de T1 é que a maior presença de cátions metálicos leva a uma maior interação entre a OTC e a MO por meio de pontes metálicas, pois a OTC é um forte agente quelante para cátions metálicos em meios a partir de pH em torno de 5 [66, 133].

No entanto, de acordo com valores estabelecidos pelo IBAMA para avaliação da capacidade de movimentação de substâncias químicas no solo [6], valores de K_d compreendidos entre 0 a 24 L kg⁻¹ caracterizam uma baixa capacidade de sorção e um maior transporte no solo e alcance da água subterrânea por processo de lixiviação, sendo o contrário observado para a sorção solo-OTC. Os valores de K_d da Tabela 15 estiveram próximos daqueles obtidos na literatura para solos de outras regiões do mundo – entre 486 a 12.048 L kg⁻¹ [124]. Porém, tais valores determinados expressaram comportamento típico da OTC frente a solos brasileiros.

É importante destacar que ao obedecer à isoterma de Freundlich, a sorção aos solos se deu pela formação de multicamadas [76] da espécie sorvida (OTC) sobre a superfície da espécie sorbente (solo).

5.3 Sorção Ácidos Húmicos–Oxitetraciclina

As Figuras 30 a 32 apresentam os cromatogramas de AH-OTC nos três valores de pH de trabalho (3,1, 4,8 e 8,3), demonstrando o perfil em separado de cada AH em solução aquosa, destacando-se o pico da OTC como referência para o monitoramento da sorção.

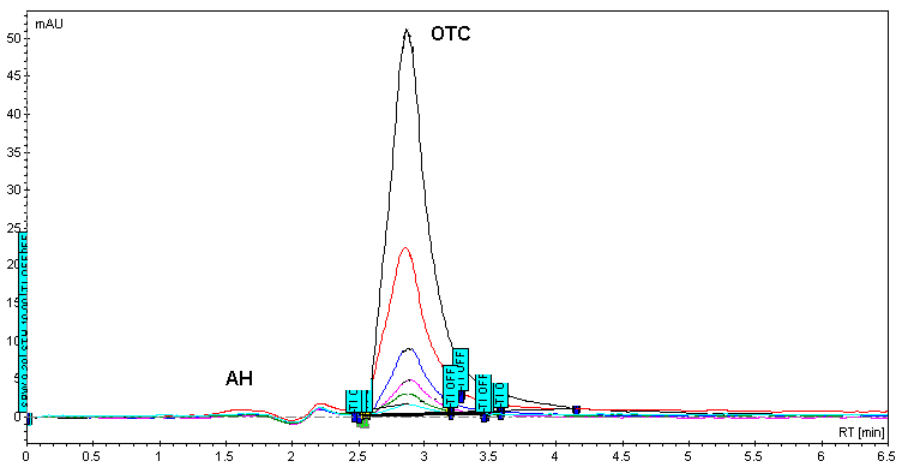
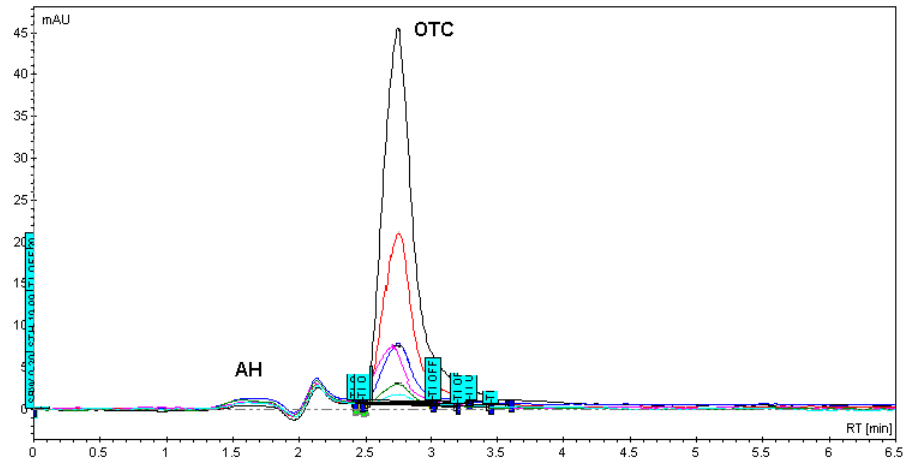


Figura 30. Cromatogramas sobrepostos para AH^{CAP}-OTC (acima) e para AH^{PD}-OTC (abaixo) obtidos em pH 3,1, onde: C_i OTC = 120 mg L⁻¹ (preto), C_i OTC = 60 mg L⁻¹ (vermelho), C_i OTC = 30 mg L⁻¹ (azul escuro), C_i OTC = 20 mg L⁻¹ (rosa), C_i OTC = 10 mg L⁻¹ (verde) e C_i OTC = 5 mg L⁻¹ (azul claro).

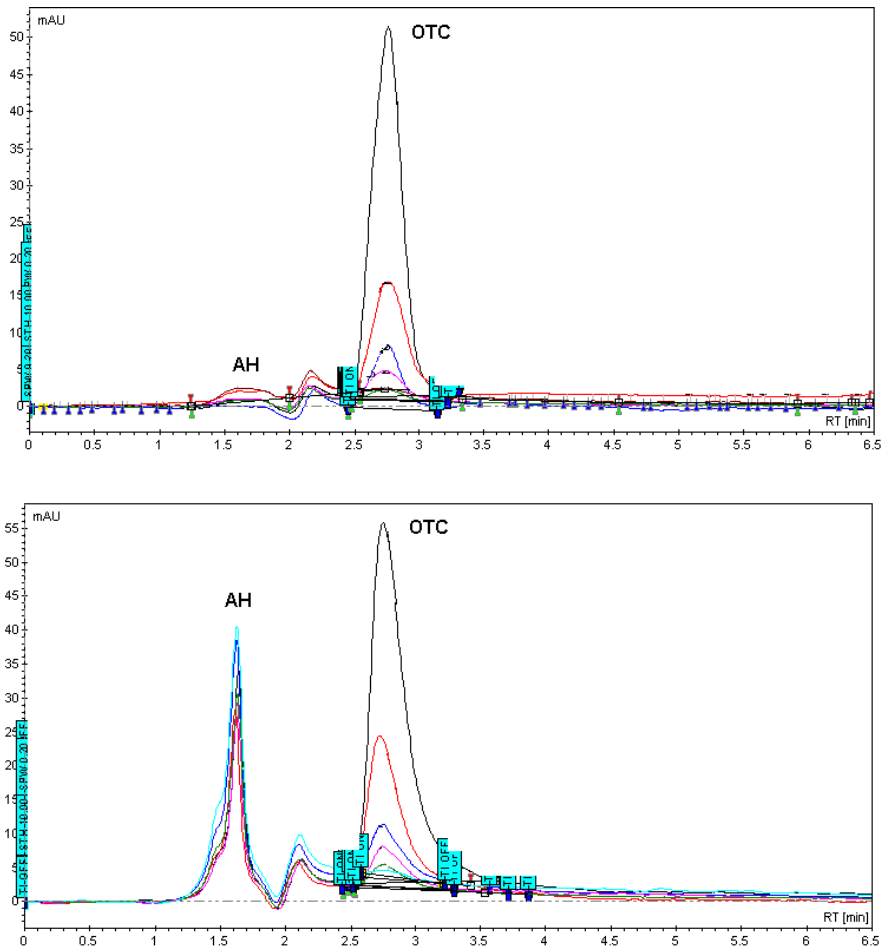


Figura 31. Cromatogramas sobrepostos para AH^oCAP^o-OTC (acima) e para AH^oPD^o-OTC (abaixo) obtidos em pH 4,8, onde: C_i OTC = 120 mg L⁻¹ (preto), C_i OTC = 60 mg L⁻¹ (vermelho), C_i OTC = 30 mg L⁻¹ (azul escuro), C_i OTC = 20 mg L⁻¹ (rosa), C_i OTC = 10 mg L⁻¹ (verde) e C_i OTC = 5 mg L⁻¹ (azul claro).

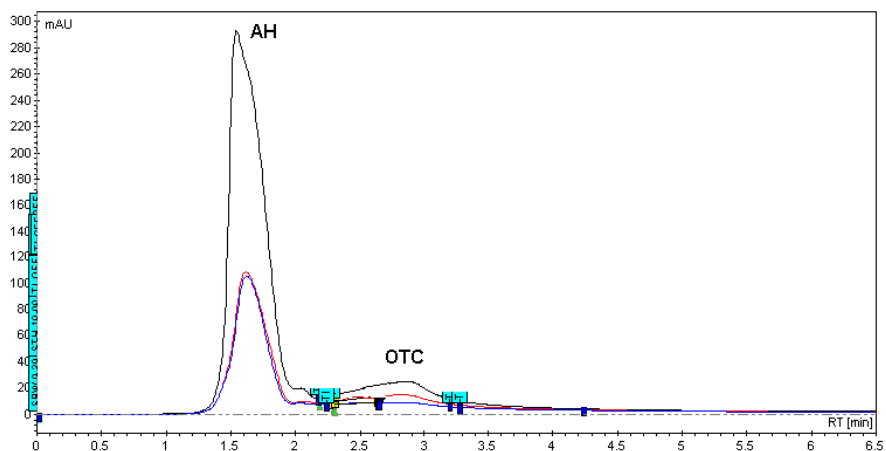
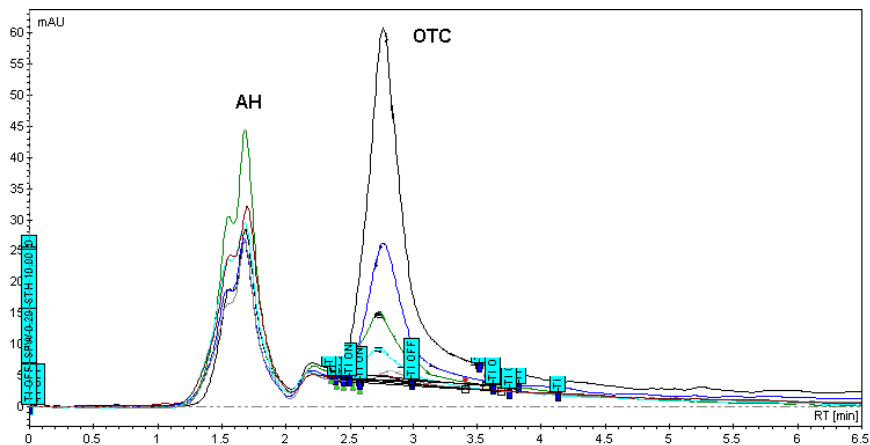


Figura 32. Cromatogramas sobrepostos para AH⁺CAP⁻-OTC (acima) e para AH⁺PD⁻-OTC (abaixo) obtidos em pH 8,3, onde para AH⁺CAP⁻-OTC: C_i OTC = 120 mg L⁻¹ (preto), C_i OTC = 60 mg L⁻¹ (azul escuro), C_i OTC = 30 mg L⁻¹ (verde), C_i OTC = 20 mg L⁻¹ (azul claro), C_i OTC = 10 mg L⁻¹ (cinza) e C_i OTC = 5 mg L⁻¹ (marrom). Para AH⁺PD⁻-OTC: C_i OTC = 120 mg L⁻¹ (preto), C_i OTC = 60 mg L⁻¹ (vermelho), C_i OTC = 30 mg L⁻¹ (azul escuro).

Os comportamentos observados podem ser explicados da seguinte forma: em pH 3,1 tem-se moléculas de AH e OTC protonadas, levando à possibilidades de interação por ligação de hidrogênio e por interações hidrofóbicas; em pH 4,8 o AH está parcialmente protonado enquanto a OTC se encontra como zwitterión, levando à possibilidades de interação por ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica e transferência de carga; em pH 8,3 o AH e a

OTC encontram-se desprotonados, levando à possibilidades de interação por ligação de hidrogênio e dipolo-induzido.

Utilizou-se a concentração inicial de 20 mg L⁻¹ de OTC como referência para a determinação simplificada da constante de partição K_d, conforme proposto por estudo anterior para a interação entre o agrotóxico imazaquin e o AH [97], sendo obtidos os resultados apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores médios determinados em duplicata para K_d em diferentes valores de pH para produtos de interação com o AH CAP e o AH PD.

| pH | K _d (L kg ⁻¹) | Ácido Húmico |
|-----|--------------------------------------|--------------|
| 3,1 | 930 | CAP |
| | 8.350 | PD |
| 4,8 | 1.910 | CAP |
| | 1.610 | PD |
| 8,3 | 2.890 | CAP |

Conforme os valores obtidos da Tabela 16, notou-se que K_d cresceu com o aumento do pH para o AH"CAP"-OTC. Ou seja, em meio alcalino a OTC apresentou maior concentração sorvida ao AH, com este meio favorecendo a sorção; para o AH PD efeito contrário foi observado, além do que em pH 8,3 a concentração inicial de OTC foi completamente sorvida impossibilitando o cálculo de K_d. Porém, os valores obtidos estiveram abaixo daqueles determinados por Sassman e Lee (2005) [47], indicando um comportamento característico de AH brasileiros, o que também foi refletido nos cromatogramas das Figuras 30 a 32, já que a concentração de AH eluído, em t_R de cerca de 1,5 min, foi maior para o PD a partir do pH 4,8. Como PD apresentou, segundo a RMN (Item 4.1.2.1), uma maior acidez carboxílica atribuída pelo maior valor

de área de C-carboxílico e C-fenólico e maior Índice de Polaridade (não deve ser confundido com índice de polaridade atribuído a solventes cromatográficos), com o aumento do pH do meio houve uma menor retenção deste AH pela coluna, com aumento da concentração eluída, expressa pela intensidade e forma do pico desta espécie no cromatograma.

As Figuras 33 e 34 apresentam as tentativas de construção de isothermas de sorção lineares, ou tipo C.

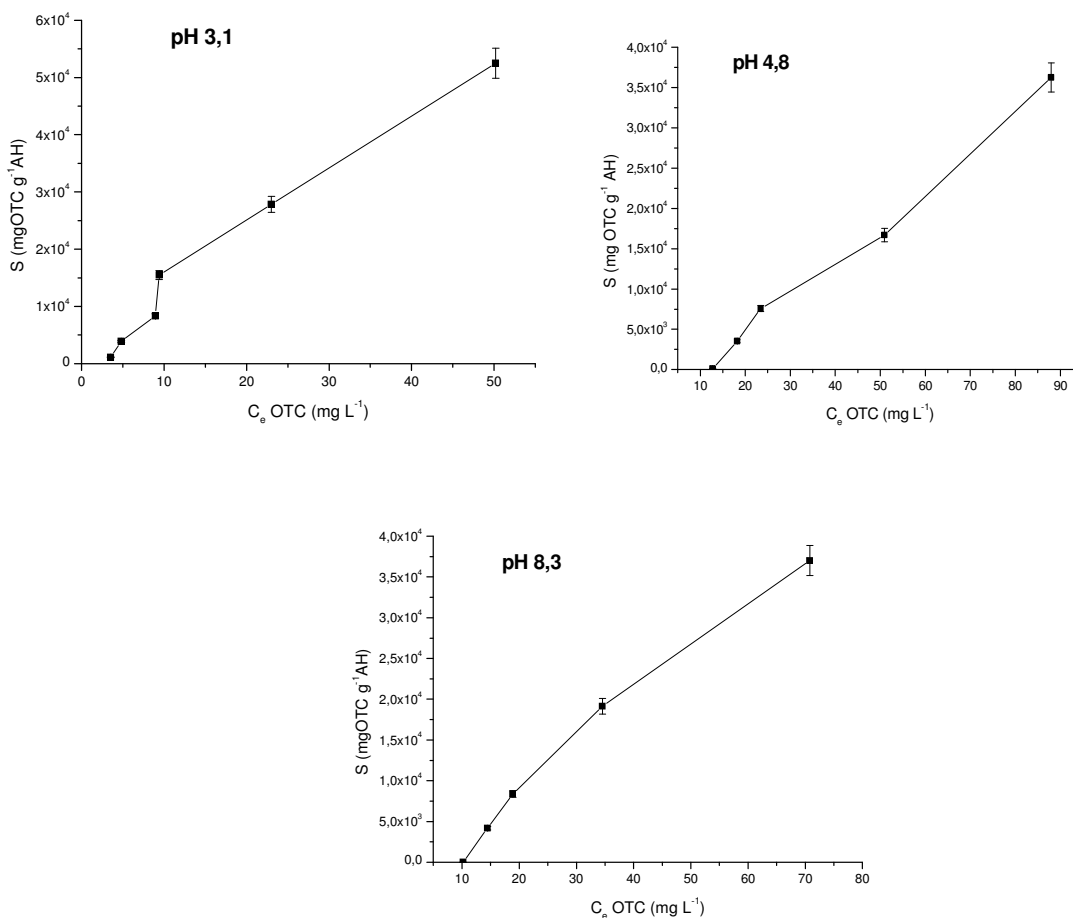


Figura 33. Isothermas obtidas para AH^oCAP^o-OTC, segundo o modelo linear ou de partição.

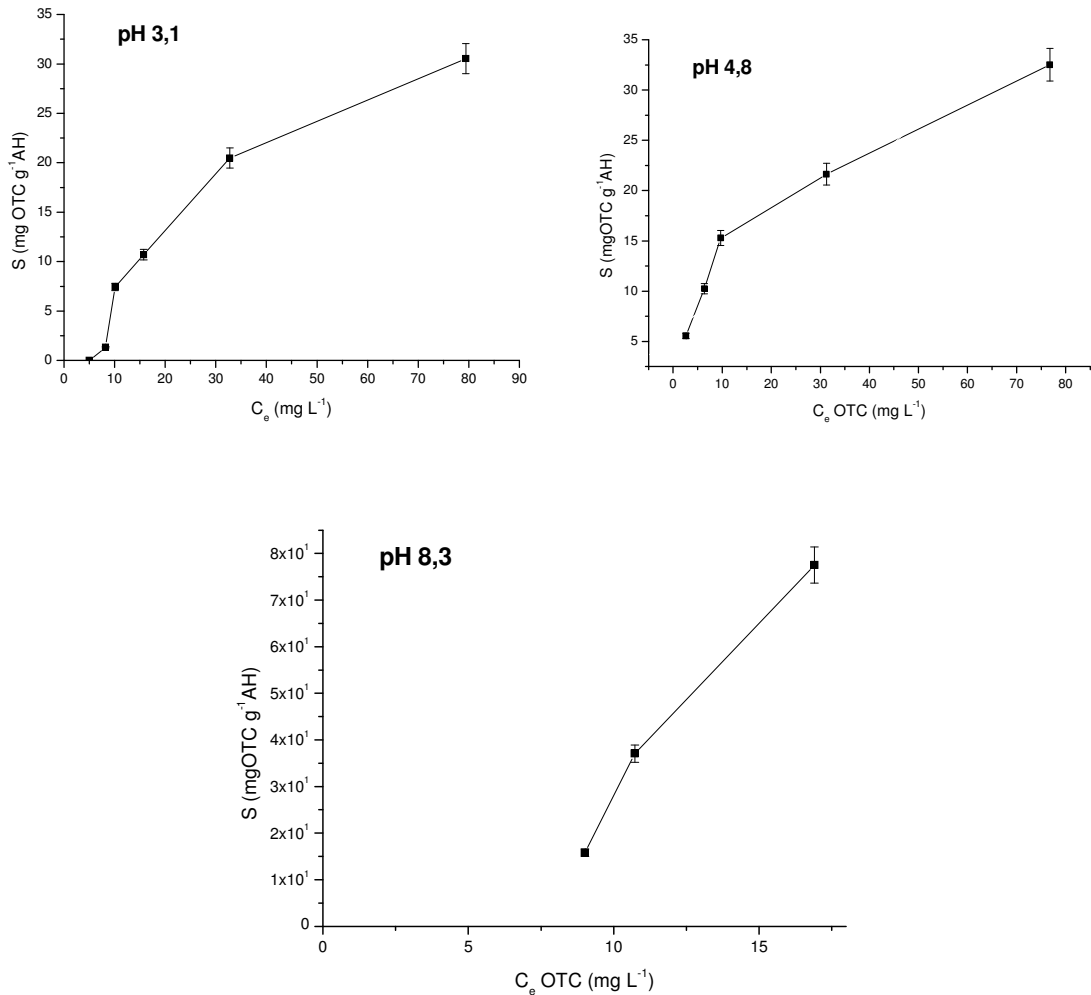


Figura 34. Isothermas obtidas para AH''PD''-OTC, segundo o modelo linear ou de partição.

Tanto na Figura 33, como na Figura 34, as isothermas não apresentaram comportamento linear, ou seja, as isothermas não representavam um fenômeno de partição. A isoterma obtida em pH 8,3 da Figura 34 foi determinada levando-se em consideração as concentrações iniciais maiores de OTC, de 120 mg L⁻¹ a 30 mg L⁻¹, com todas as demais concentrações completamente sorvidas pelo AH, porém não sendo possível inferir sobre seu formato dado o número reduzido de pontos.

Para a obtenção de parâmetros de sorção a partir de ajuste linear (equação da reta) da isoterma de Freundlich em sua forma logarítmica, foi realizado novamente o ajuste linear com o uso do software ORIGIN[®], onde os coeficientes angulares e lineares obtidos referiram-se à N e à K_f para os três valores de pH, respectivamente. As Figuras 35 e 36 apresentam tais gráficos, enquanto que a Tabela 17 apresenta as equações derivadas do ajuste e os valores de K_f , N e do coeficiente de correlação linear R.

Nas Figuras 37 e 38 são apresentadas as tentativas de construção de isotermas de Langmuir.

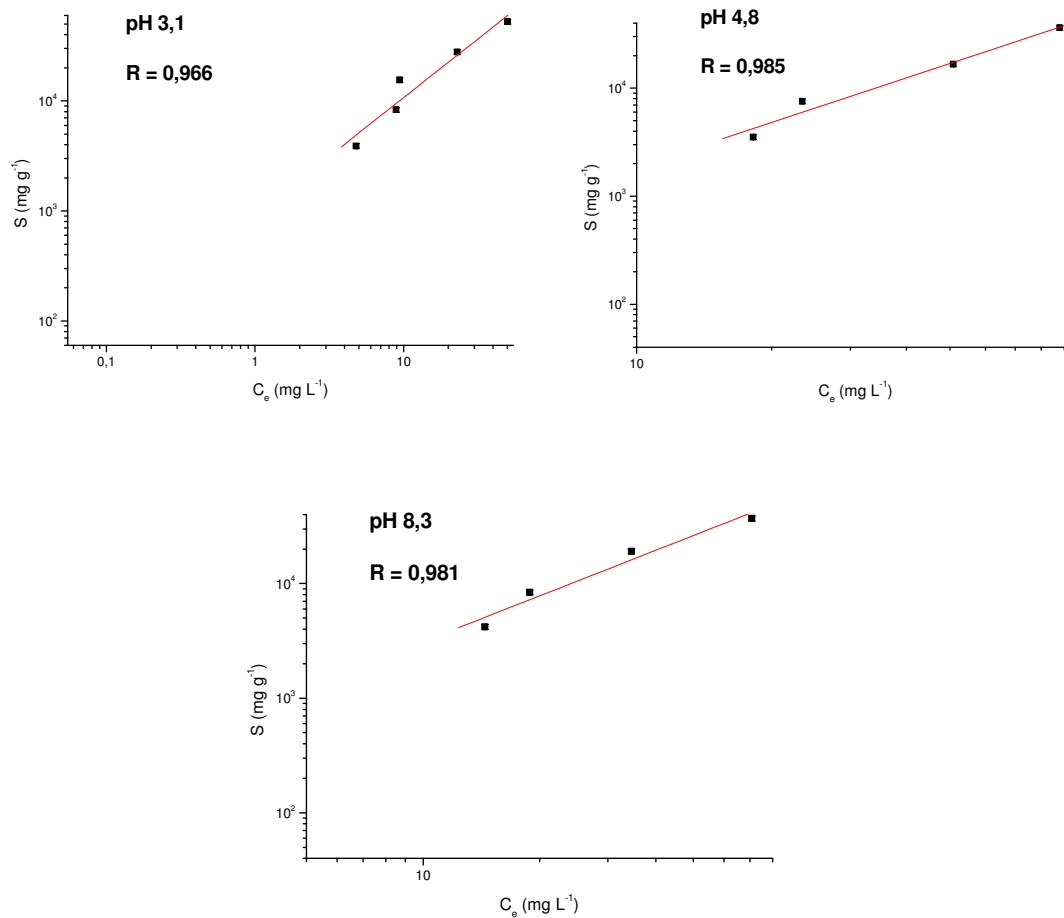


Figura 35. Isothermas obtidas para AH^{CAP}-OTC, segundo o modelo de Freundlich após ajuste linear.

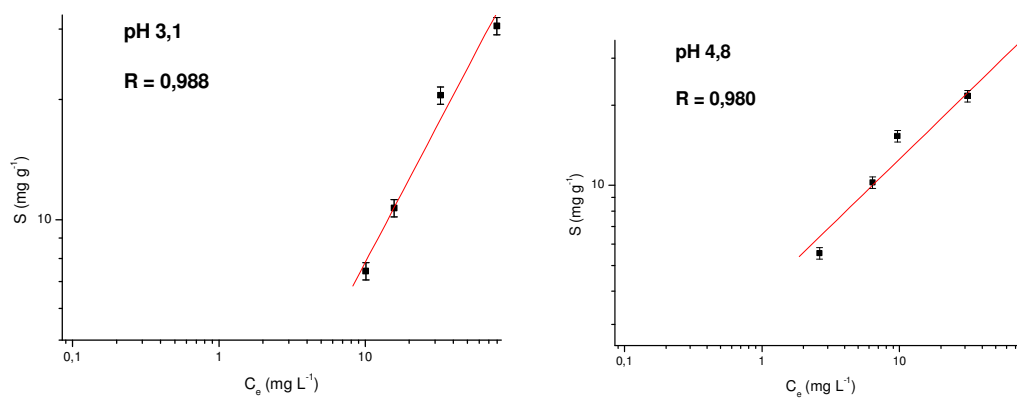


Figura 36. Isothermas obtidas para AH^{PD}-OTC, segundo o modelo de Freundlich após ajuste linear.

Tabela 17. Valores calculados para as isotermas de Freundlich após ajuste linear da equação em sua forma logarítmica.

| pH | Equação da Isoterma de Sorção de Freundlich | K_f ($\text{mg}^{1-n} \text{L}$ g^n) | N | Tipo de Isoterma | R | Tipo de AH |
|-----|---|---|------|------------------|-------|------------|
| 3,1 | $\text{LogS} = 2,96 + 1,06 \text{logC}_e$ | 919,26 | 1,07 | S | 0,966 | CAP |
| | $\text{LogS} = 0,20 + 0,70 \text{logC}_e$ | 1,58 | 0,70 | L | 0,988 | PD |
| 4,8 | $\text{LogS} = 1,89 + 1,37 \text{logC}_e$ | 78,49 | 1,37 | S | 0,985 | CAP |
| | $\text{LogS} = 0,60 + 0,50 \text{logC}_e$ | 3,94 | 0,50 | L | 0,980 | PD |
| 8,3 | $\text{LogS} = 2,17 + 1,32 \text{logC}_e$ | 148,21 | 1,32 | S | 0,981 | CAP |

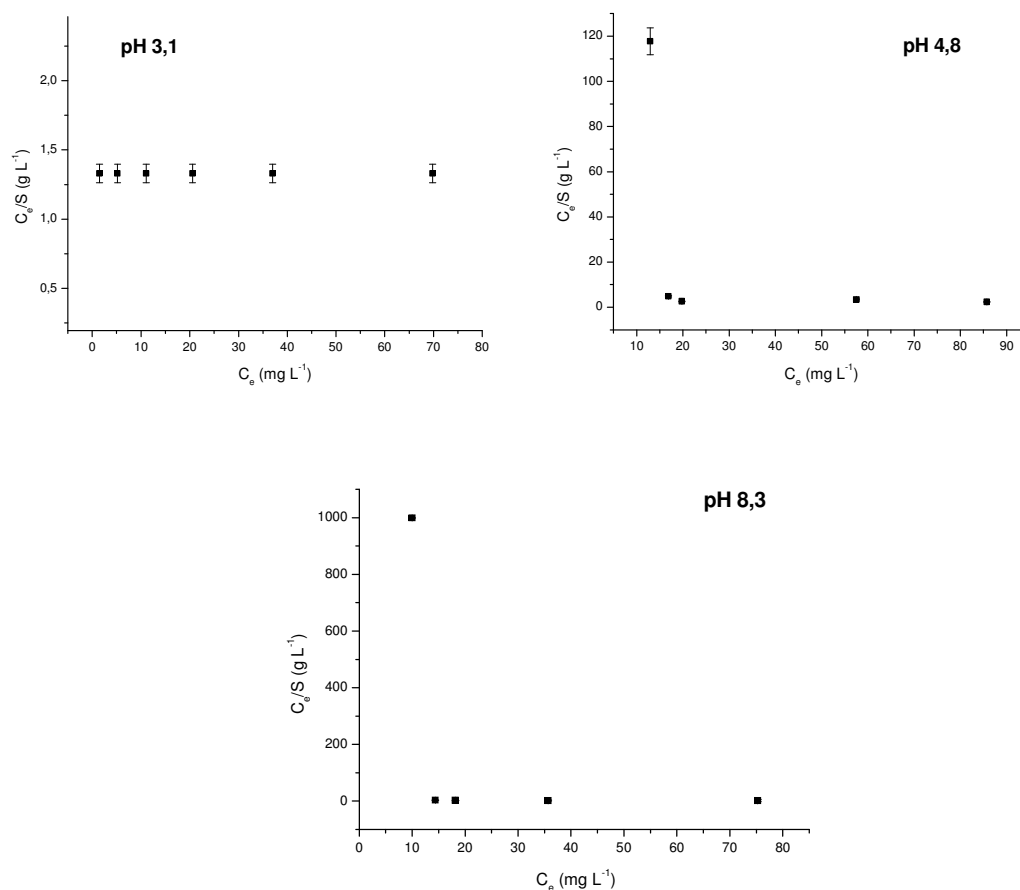


Figura 37. Isothermas obtidas para AH-CAP-OTC, segundo o modelo de Langmuir.

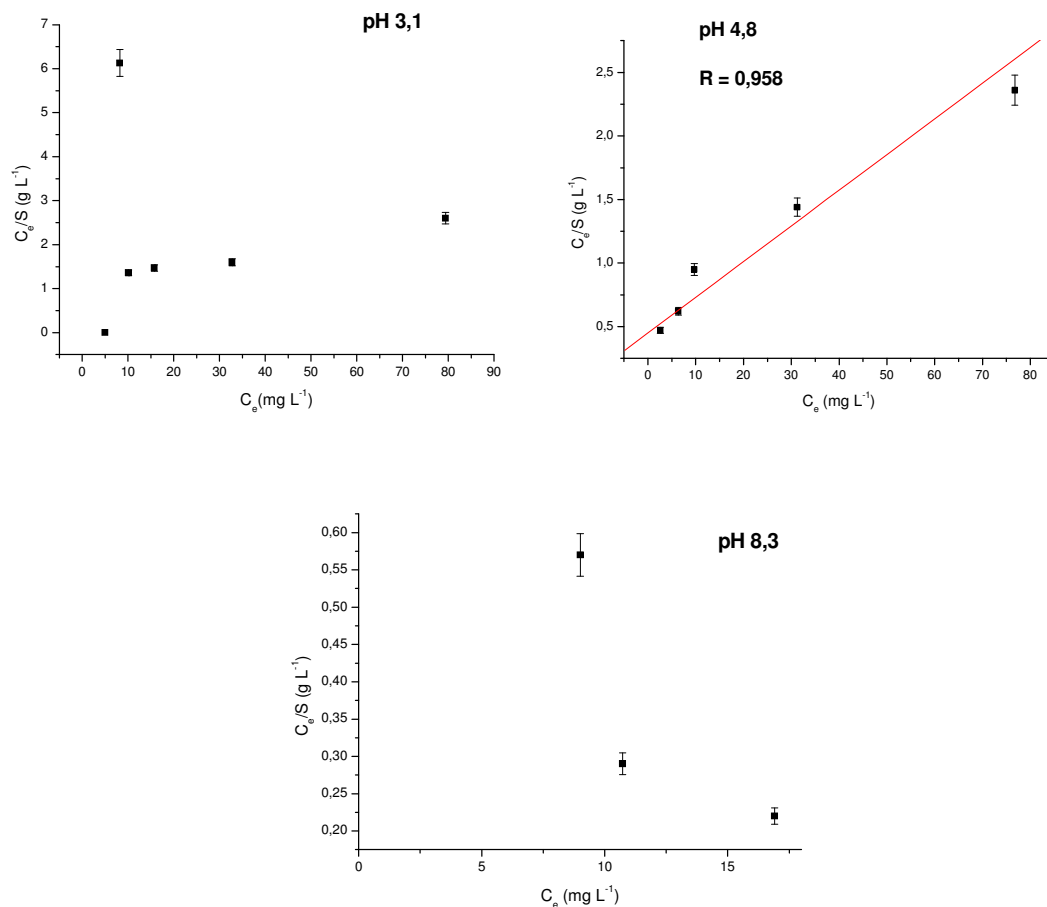


Figura 38. Isotermas obtidas para AH'PD'-OTC, segundo o modelo de Langmuir. Em pH 4,8 o modelo foi linearmente ajustado via regressão linear.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 17 e as Figuras 35 a 38 pôde-se determinar que a isoterma de Freundlich foi o modelo que melhor representou a sorção da OTC pelos AH. Para AH CAP sua capacidade de sorção (K_f) decresceu com o aumento do valor do pH de 3,1 para 4,8 e voltou a crescer em pH 8,3, enquanto que a intensidade de sorção, representada por N, aumentou com o aumento do valor do pH, de acordo com a representação físico-química dos dois parâmetros analisados e anteriormente expostos [50]. Para AH PD os valores de K_f e de N mostraram-se menores, principalmente em

relação à K_f , que cresceu com o aumento de pH de 3,1 para 4,8, decaindo em pH 8,3, com N decrescendo até pH 4,8 e aumentando em pH 8,3. Como já comentado anteriormente, houve uma limitação na determinação da isoterma em pH 8,3 de AH"PD"-OTC devido a uma sorção completa das concentrações de OTC iniciais entre 20 mg L^{-1} até 5 mg L^{-1} . Assim, a equação obtida para esta isoterma limitou a interpretação para a sorção neste valor de pH.

Em relação às isotermas resultantes segundo os valores de N , AH CAP apresentou a isoterma do tipo S ($N > 1$), com o aumento da sorção diretamente relacionada ao aumento da concentração de OTC em fase aquosa, enquanto que PD apresentou a isoterma do tipo L ($N < 1$), com uma diminuição dos sítios de sorção com o aumento da concentração de OTC na fase aquosa. Para o AH CAP, o processo de sorção apresentou-se mais heterogêneo em relação ao processo de sorção do AH PD, pois o primeiro apresentou maiores valores de N .

Determinou-se, portanto, a existência da sorção entre os dois tipos de AH e a OTC e que a quantificação desta é fortemente dependente do pH do meio, com as curvas de sorção obedecendo à isoterma de Freundlich para sorção à superfícies heterogêneas (AH). Foi observado, ainda, que a característica dos grupamentos químicos presentes nas estruturas dos AH afetou o mecanismo de sorção e a sua intensidade, conforme os valores de K_d calculados e apresentados nas Figuras 39 e 40.

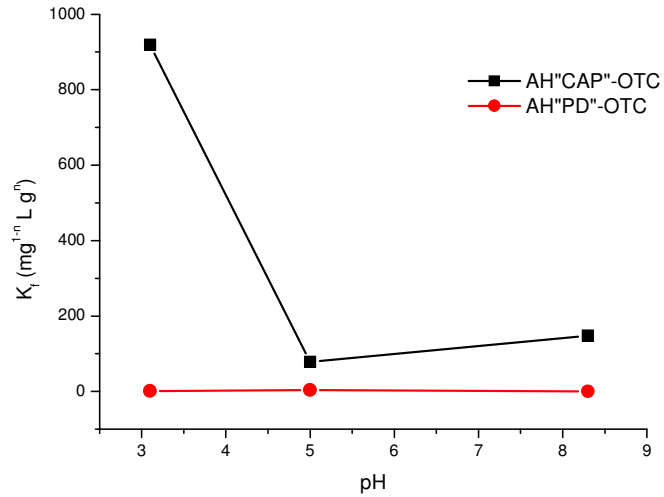


Figura 39. Efeito do pH na variação de K_f (capacidade de sorção) para AH CAP e AH PD.

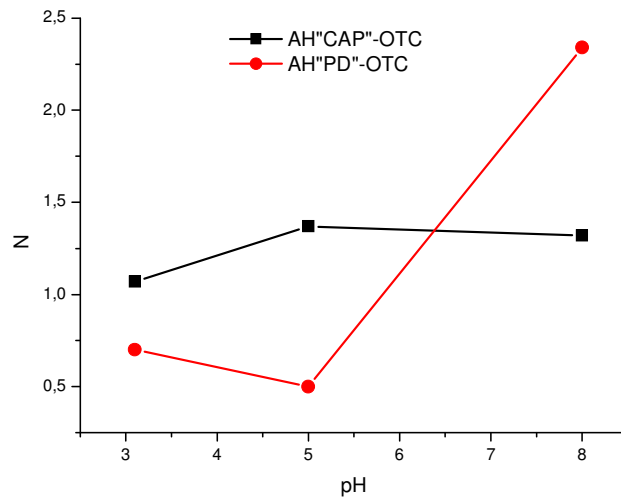


Figura 40. Efeito do pH na variação de N (intensidade da sorção) para AH CAP e AH PD.

Em pH 3,1 o AH CAP apresentou um K_f de maior valor em relação ao do AH PD, possivelmente como função da maior facilidade de formação de interação hidrofóbica, com este tipo de interação predominando frente aos demais (ex.: ligação de hidrogênio e transferência de prótons), com uma influência direta do maior conteúdo de C alifático. Porém, assim como

observado para o pesticida imazaquin ^[97], a sorção da OTC aos solos foi menor do que sua sorção aos AH, sugerindo que estes últimos, quando separados de outros componentes do solo, possuem maior capacidade de sorção, muito provavelmente devido à redução da competitividade de interação, o que favoreceu e otimizou a sorção AH-OTC. Os valores de K_f determinados apresentam uma capacidade relativa de sorção indo de baixa (fraca) à alta (forte), quando comparados a outros dados da literatura que apresentam valores de K_f entre 295 a 676 ^[50], o que denota a influência estrutural dos AH.

5.4 Averiguação dos Mecanismos de Interação por Técnicas Espectroscópicas

Com a comprovação da existência da sorção entre AH e OTC por parte das isotermas de Freundlich, as técnicas espectroscópicas foram aplicadas para a observação dos mecanismos de interação para AH-OTC, partindo-se sempre do AH como referência espectroscópica.

A interpretação detalhada da Figura 7 (**Item 1.3**) forneceu uma indicação preliminar do ambiente reacional em função do pH e dos valores de pK_a da OTC, servindo como referência para uma melhor elaboração das possibilidades de interação entre o AH e a OTC, conforme apresentado na Tabela 18.

Tabela 18. Ambiente de interação para AH-OTC em função do pH do meio.

| pH | Espécies de OTC | Porcentagem em Massa de OTC (%) | Espécies de AH |
|-----------|--|--|---|
| 3,1 | OTC ⁺ OTC ⁰ | 70 30 | Grupamentos fenol e carboxílicos protonados e em início de desprotonação Alquila e arila |
| 4,8 | OTC ⁰ | 100 | Grupamentos fenol e carboxílicos protonados e em desprotonação Alquila e arila |
| 8,3 | OTC ⁻ OTC ⁰ | 70 30 | Grupamentos fenol e carboxílicos desprotonados e parcialmente protonados Alquila e arila |
| ≥ 10,0 | OTC ²⁻ OTC ⁻ OTC ³⁻ | 50 40 10 | Grupamentos fenol e carboxílicos desprotonados Alquila e arila |

5.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível

A aplicação desta técnica teve como objetivos principais a obtenção de dados de cinética de interação para a montagem esquemática de experimentos de sorção AH-OTC, bem como para a caracterização de produtos formados após períodos definidos de interação ou de solubilização, além do acompanhamento de dados de sorção obtidos por CLAE.

Foram monitoradas as seguintes transições eletrônicas e seus grupamentos associados, a partir de grupamentos químicos presentes na molécula de OTC ^[79]:

- 365 nm: carbonila (C=O), transição $n \rightarrow \pi^*$;
- 352 nm: enona (CH=CH-CH-C=O), transição $n \rightarrow \pi^*$;
- 270 nm: dieno conjugado (C=C-C=C), transição $\pi \rightarrow \pi^*$;
- 212 nm: amida (C=ONH₂), transição $n \rightarrow \sigma^*$.

A estabilidade conformacional dos AH pode ser atribuída à entropia direcionada à exclusão de moléculas de água pela auto-associação dos sítios hidrofóbicos, o que leva a um decréscimo da energia livre total da molécula ^[120], com as propriedades eletrônicas tornando-se mais estáveis em valores menores de pH, sendo este o ponto de partida para a interpretação dos dados espectroscópicos em nível eletrônico.

Caracterização de Produtos de Interação e Solubilização

Inicialmente, conheceu-se o efeito do pH no espectro de OTC, AH e AH-OTC, com a Figura 41 mostrando que o espectro eletrônico da OTC era dependente do pH do meio.

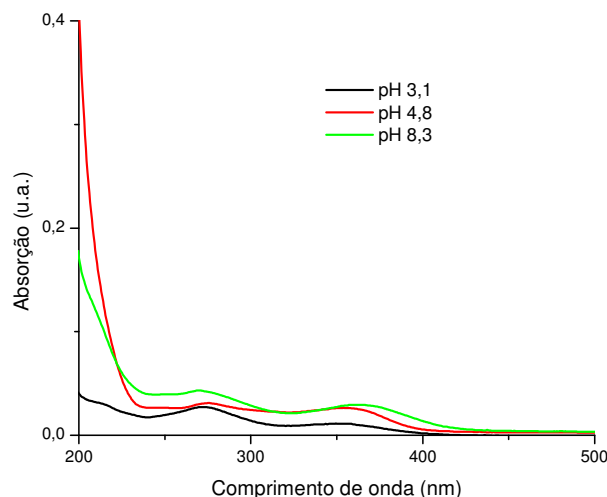


Figura 41. Espectros de UV-Visível da OTC obtidos em diferentes valores de pH para um período de solubilização de 1 h em temperatura ambiente e uma concentração de OTC de 20 mg L^{-1} ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Da mesma forma que para a OTC, o espectro eletrônico do AH também sofreu influência do pH do meio, como pode ser visto na Figura 42. Conseqüentemente, os espectros eletrônicos dos produtos de interação AH-OTC também sofreram a influência direta do pH (Figuras 43 a 45).

Esta variação se deu, sobretudo, em função da protonação/desprotonação de grupamentos funcionais carboxílicos e fenólicos, com a diminuição ou aumento da densidade eletrônica, favorecendo (pH alcalino) ou desfavorecendo (pH ácido) a transição eletrônica entre os estados energéticos e eventuais mudanças conformacionais.

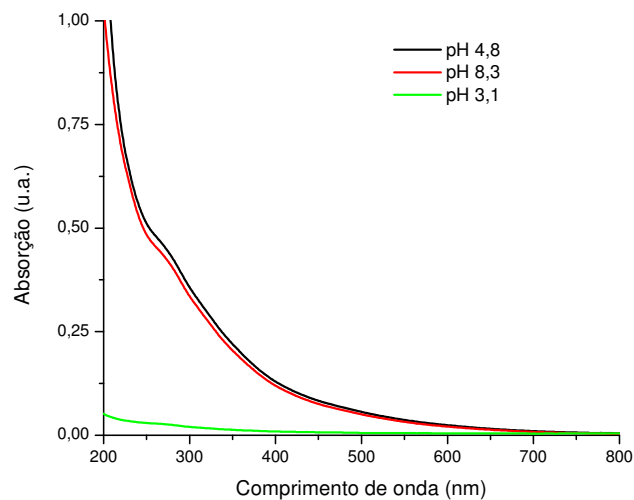


Figura 42. Espectros de UV-Visível do AH CAP obtidos em diferentes valores de pH para um período de solubilização de 24 h em temperatura ambiente e uma concentração de 600 mg L^{-1} .

Para o pH 8,3 aplicou-se uma diluição de 1 : 20 (v/v).

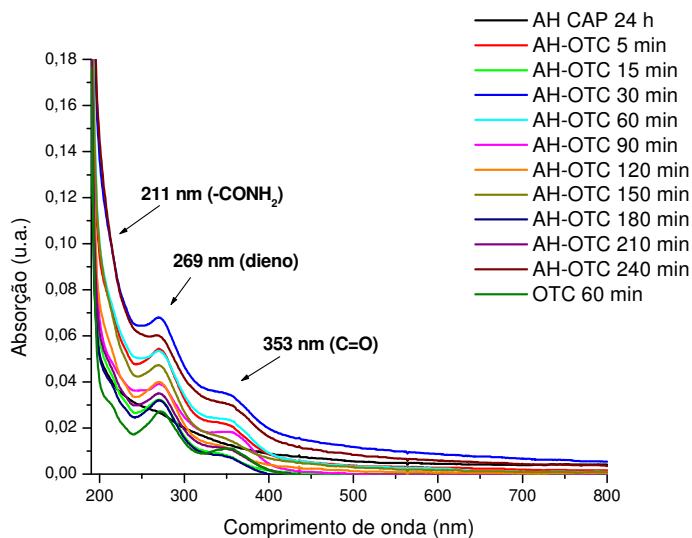


Figura 43. Espectros de UV-Visível da formação de produtos de interação AH-OTC em pH 3,1 em função do tempo (máximo de 4 h), para a relação m/v de 30AH : 1OTC (600 mg L^{-1} AH : 20 mg L^{-1} OTC).

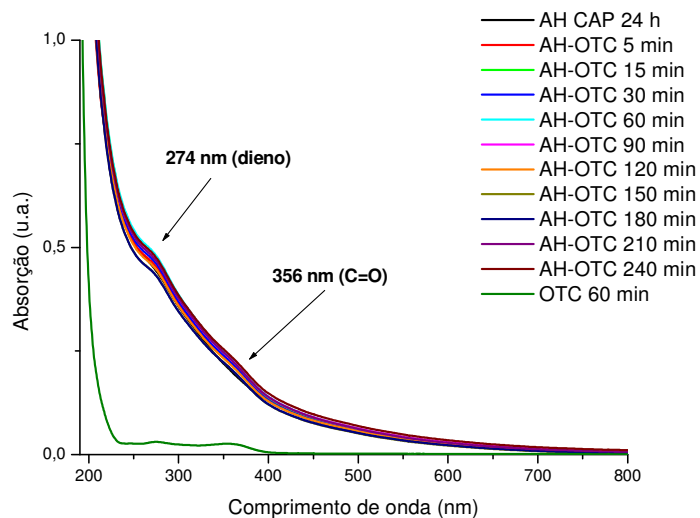


Figura 44. Espectros de UV-Visível da formação de produtos de interação AH-OTC em pH 4,8 em função do tempo (máximo de 4 h), para a relação m/v de 30AH : 1OTC (600 mg L^{-1} AH : 20 mg L^{-1} OTC).

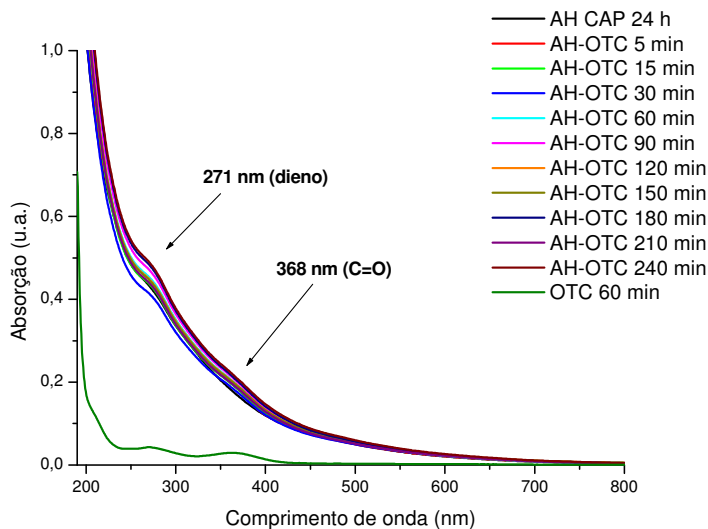


Figura 45. Espectros de UV-Vis da formação de produtos de interação AH-OTC em pH 8,3 em função do tempo (máximo de 4 h), para a relação m/v de 30AH : 1OTC (600 mg L^{-1} AH : 20 mg L^{-1} OTC), obtidos com a aplicação de diluição 1 : 20 v/v.

Não houveram mudanças significativas no perfil dos espectros, segundo cada valor de pH. De acordo com a Tabela 18, em pH 3,1 e 4,8 são esperadas interações do tipo ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica para hidrocarbonetos alifáticos e dipolo-induzido para sistemas π ; em pH 8,3 são esperadas interações do tipo ligação de hidrogênio e dipolo-induzido para sistemas π . Porém, também foi considerada a interação por transferência de elétrons, entre o grupamento amina da OTC e o grupamento carboxílico do AH [20]. No entanto, como não foram notadas mudanças significativas nos perfis dos espectros eletrônicos, provavelmente devido a uma limitação da técnica, foi possível somente inferir sobre a ocorrência de interações fracas, como ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica e dipolo-induzido.

Determinação do Tempo de Equilíbrio para AH-OTC

Para a determinação do tempo de interação, ou *tempo de equilíbrio*, baseou-se em testes de estabilidade do perfil espectral de AH-OTC a uma razão m/v de 30AH : 1OTC em meio aquoso para o pH 4,8 e 8,3, sendo monitoradas as bandas de absorção, conforme apresentado na Figura 46.

Resultados de testes de solubilização prévios em função do pH e do tempo demonstraram que a OTC é instável para todos os pHs após 24 h, o que também justificou na definição deste como o período máximo de interação. Isto se deveu muito provavelmente a uma tendência do antibiótico de mudança de sua coloração quando em solução aquosa, variando de amarelo a marrom-claro e com a formação de *epi*-OTC sem, no entanto, haver comprometimento de sua atividade fármaco-química quando conservada em temperatura de até 4 °C e período de tempo adequado (máximo de 30 dias) [136, 27].

A partir destes resultados, optou-se por um período de interação de 24 h, já que este valor se encontrava dentro da faixa de tempo de menor variação, além de ser ambientalmente mais representativo do que o de 180 min (3 h), que seria o início do tempo de equilíbrio determinado (vide Figura 46), de acordo com outros estudos de interação entre AH e xenobióticos orgânicos polares realizados no Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento da Instrumentação Agropecuária (CNPDIA) da EMBRAPA ^[125, 97] e resultados de cinética de degradação da OTC em esterco ^[29], os quais demonstraram ser este período suficientemente adequado para a avaliação tanto da sorção quanto dos mecanismos de interação. Este mesmo tempo de equilíbrio foi aplicado ao pH 3,1, com este último valor de pH não sendo considerado para a elaboração da Figura 46 por ser o meio mais ácido no qual o AH encontrava-se insolúvel e em suspensão, havendo espalhamento da radiação e levando à interferência na correta observação das bandas de absorção.

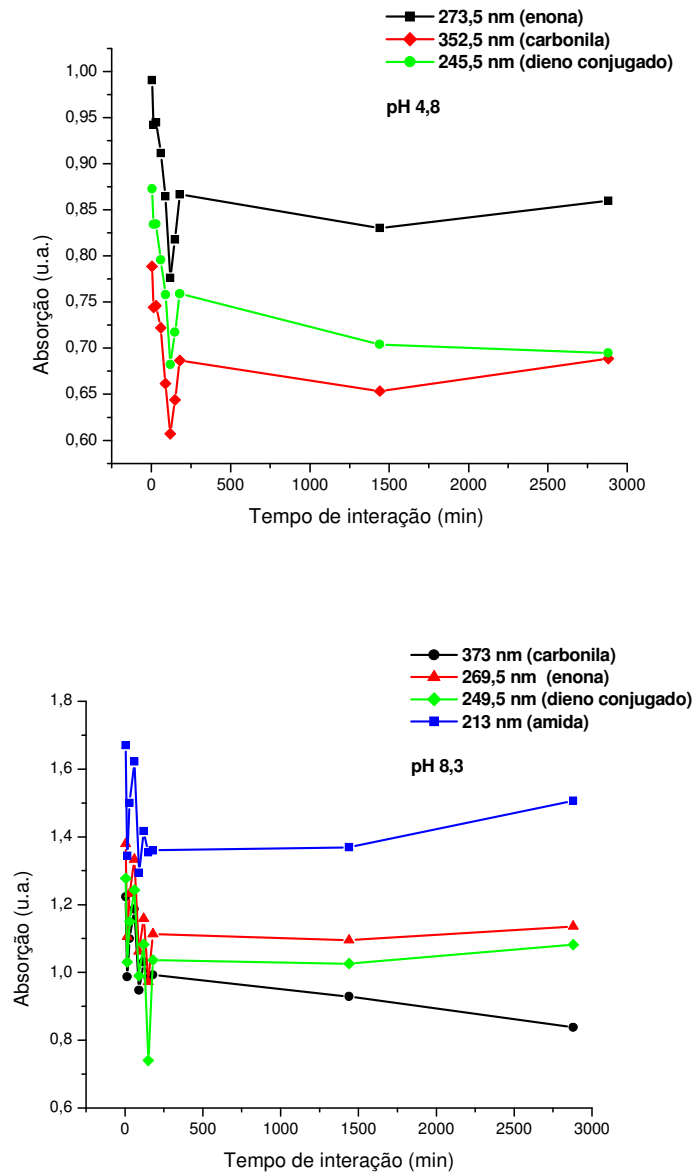


Figura 46. Monitoramento das bandas de absorção no UV para a determinação do tempo de equilíbrio de sorção e interação para AH-OTC a uma razão m/v de 30AH : 1OTC (600 mg L⁻¹ AH : 20 mg L⁻¹ OTC).

É possível observar na Figura 46 um arranjo inicial entre as moléculas do sistema até cerca de 250 min de forma a alcançar maior estabilização energética.

Acompanhamento da Sorção e da Formação de Produtos AH-OTC

Para estes resultados foram considerados no mesmo espectro sobreposto: AH/OTC/AHOTC/AHOTC – AH (subtração espectral) em pH 3,1, 4,8 e 8,3 e para diferentes concentrações de OTC em 24 h de interação.

Foram tomadas como referência para o acompanhamento de modificações espectrais as modificações observadas nas bandas da OTC da Figura 47, onde são apresentados os espectros obtidos variando-se a concentração da OTC e o pH do meio, de forma a se ter algo similar a uma curva de calibração construída com padrões externos, que comprovou a linearidade entre a concentração e a absorção na região do UV-Visível. Pôde-se observar nas Figuras 48 a 50 que as subtrações “AHOTC – AH” apresentaram um perfil crescente da OTC conforme aumentou a concentração inicial de OTC para os valores de pH 3,1 e 4,8, o que não ocorreu para o pH 8,3. Este perfil foi associado à OTC livre em solução, e que não interagiu com o AH, conforme foi comprovado pelos resultados das isotermas de Freundlich obtidas por CLAE. Desta forma, tais figuras demonstraram que a interação da OTC aumentaram com o aumento do pH do meio, porém, de forma grosseira sem a aplicação de técnica de separação para este último caso.

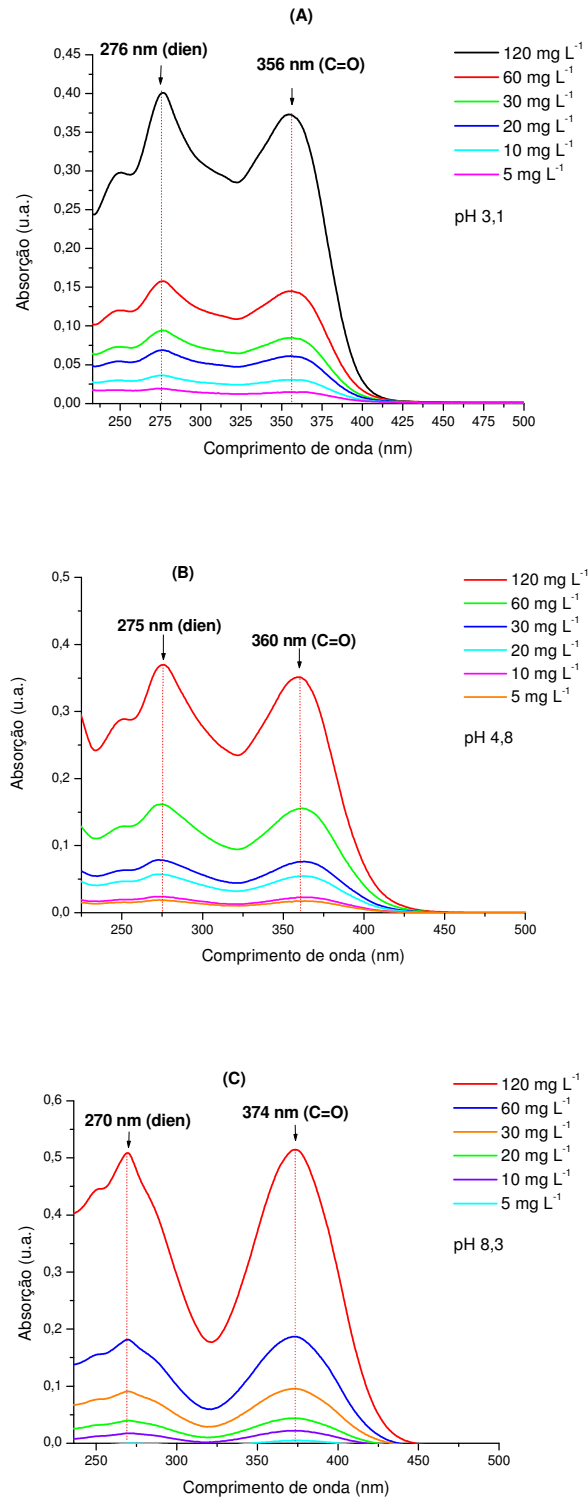


Figura 47. Espectros de UV-Visível da OTC em função do pH do meio, onde: A) pH 3,1, B) pH 4,8 e C) pH 8,3.

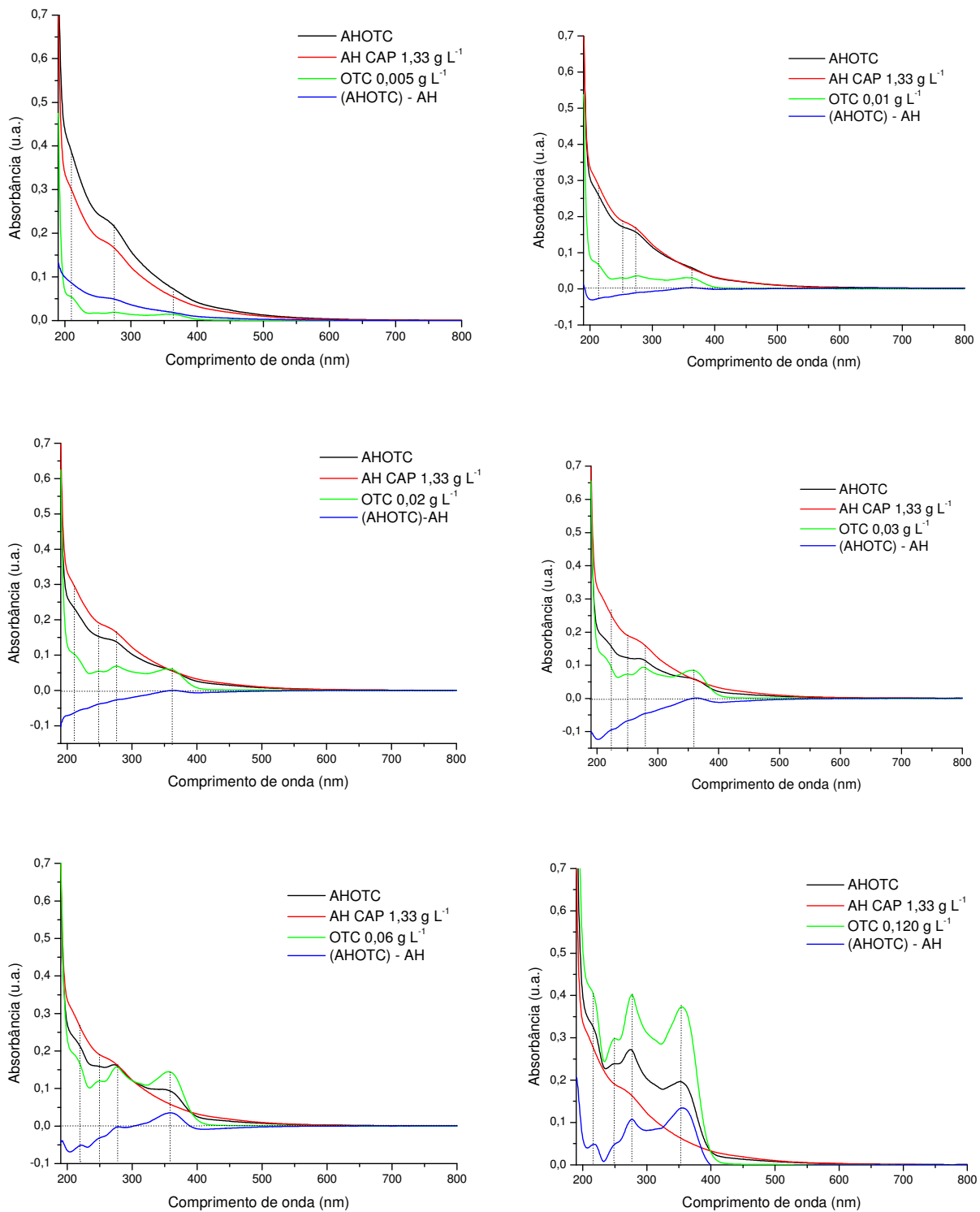


Figura 48. Espectros de UV-Visível de AH CAP, OTC, AHOTC e a subtração de AHOTC - AH em pH 3,1 e para 24 h de interação.

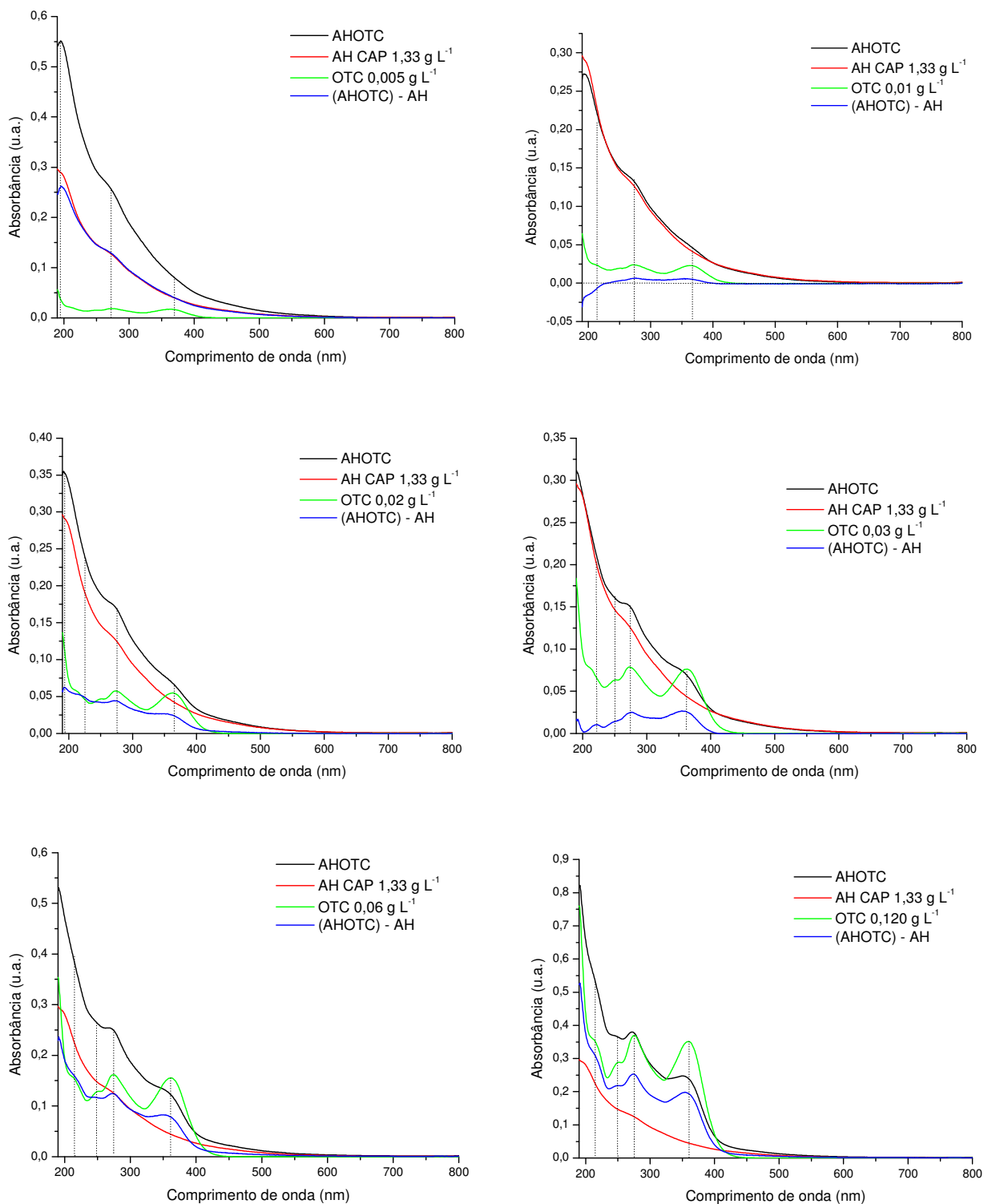


Figura 49. Espectros de UV-Visível de AH CAP, OTC, AHOTC e a subtração de AHOTC - AH em pH 4,8 e para 24 h de interação.

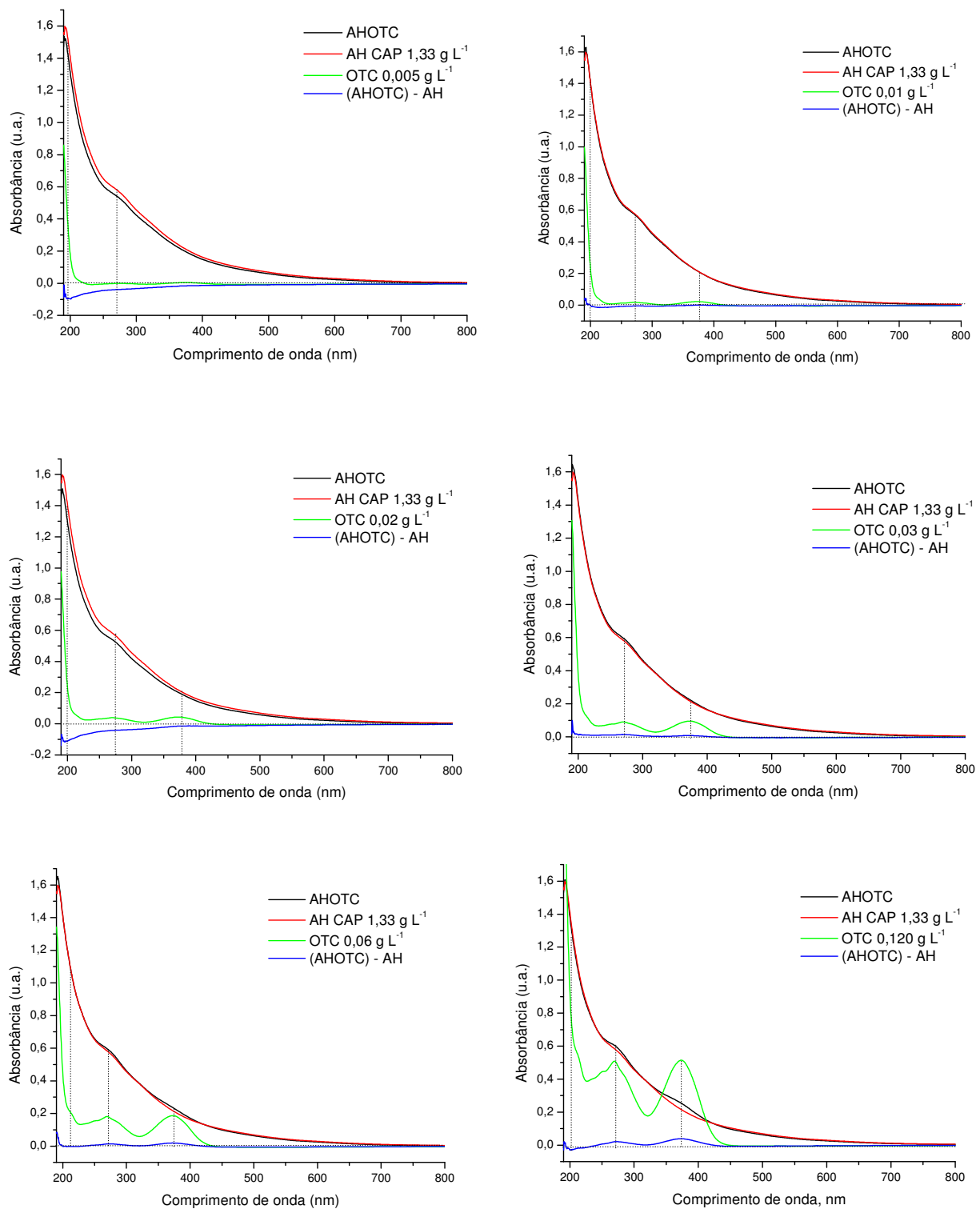


Figura 50. Espectros de UV-Visível de AH CAP, OTC, AHOTC e a subtração de AHOTC - AH em pH 8,3 e para 24 h de interação.

Uma melhor interpretação dos resultados apresentados nas Figuras 48 a 50 é que em pH 8,3, ao contrário dos valores de pH 3,1 e 4,8, não foi mais observado o perfil espectral da OTC quando em contato com o AH (claramente observado no espectro AH-OTC e também na subtração). Este é um indicativo de que o espectro AH-OTC não é apenas uma somatória dos espectros separados de AH e OTC, mas sim um espectro que representa um tipo de interação a qual modificou as propriedades eletrônicas do conjunto, principalmente da OTC.

Observação de Solvatocromismo

As medidas para observação de solvatocromismo também foram importantes para demonstrar a variação do perfil espectral da OTC a partir da variação dos solventes, de acordo com as Figuras 51 e 52.

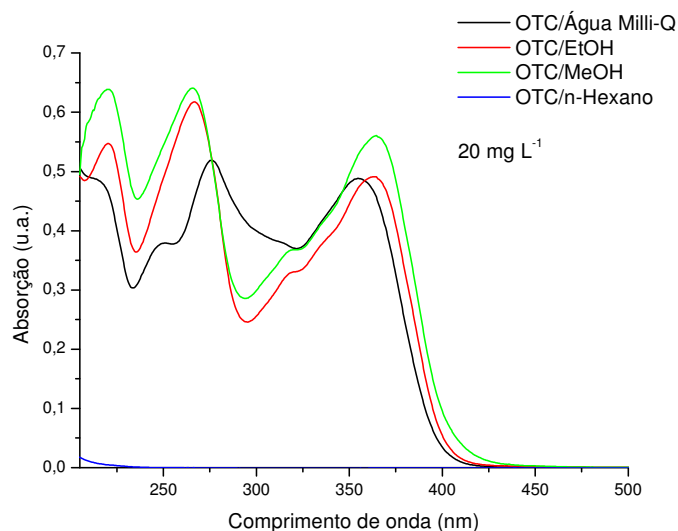


Figura 51. Sobreposição de espectros de absorção da OTC em diferentes solventes na região do UV.

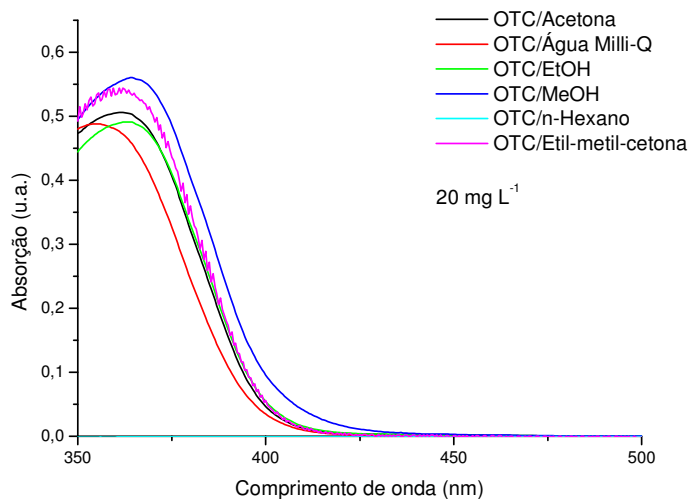


Figura 52. Sobreposição de espectros de absorção da OTC em diferentes solventes na região limite entre o UV e o Visível.

Observou-se que a OTC interagiu com todos os solventes testados em todos os comprimentos de onda, exceto com o n-hexano no qual é insolúvel, e que estas interações possivelmente se deram via ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica - a partir da definição conceitual de cada uma ^[76]. Esta interação produziu um deslocamento batocrômico, tendo-se a água Milli-Q como meio solvente de referência, pois esta interação facilitou principalmente a transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ de C=O ^[79], com as bandas se deslocando para maiores comprimentos de onda. Um efeito hipersocrômico também foi produzido, com um aumento da intensidade da absorção, e possivelmente do comprimento de onda das bandas, decorrente da presença de grupamentos CH₃, OH, R-O⁻ e NH₂, presentes em solventes *auxocrômicos* ^[79], como no caso dos solventes utilizados.

Para a avaliação desta interação a partir das características polares dos solventes, a Tabela 19 apresenta as propriedades físicas relacionadas a cada molécula e as possibilidades de interação.

Tabela 19. Propriedades físicas dos solventes relacionadas à polaridade de suas moléculas e as possíveis interações com a molécula de OTC.

| Solvente | Fórmula Molecular | Permitividade Relativa ou Constante Dielétrica (ϵ_r)^a | Momento Dipolo Molecular (μ)^a | Tipos de Interação com a OTC^b |
|-------------------|---|---|--|--|
| Acetona | (CH ₃) ₂ CO | 20,7 | 2,88 | Aceptor para ligação de hidrogênio |
| Água | H ₂ O | 78,5 | 1,85 | Aceptor e doador para ligação de hidrogênio |
| Etanol | CH ₃ CH ₂ OH | 24,5 | 1,69 | Aceptor e doador para ligação de hidrogênio Interação hidrofóbica |
| Etil-metil-cetona | CH ₃ CH ₂ -CO- CH ₃ | - | - | Aceptor para ligação de hidrogênio Interação hidrofóbica |
| Metanol | CH ₃ OH | 32,7 | 1,70 | Aceptor e doador para ligação de hidrogênio Interação hidrofóbica |
| n-Hexano | CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃ | 1,886 | 0,00 | Interação hidrofóbica |

Fonte: (a) adaptado de Almanac Bruker (2004)^[137] e (b) determinado a partir das características estruturais e de distribuição de densidade eletrônica de cada molécula de solvente.

Conforme os perfis espectrais das Figuras 51 e 52 puderam demonstrar, e considerando-se os tipos de interação reportados na Tabela 19, foi possível comprovar:

- a) A presença de interação entre a OTC e os solventes, o que levou a uma alteração no formato das bandas de absorção na região do UV-Visível em consequência de alteração nas propriedades eletrônicas dos sistemas soluto-solvente;
- b) A suscetibilidade da molécula de OTC à formação de interações intermoleculares com o ambiente, refletida nos efeitos auxocrômicos já comentados e facilitada pela formação de ligação de hidrogênio, a qual foi favorecida pelos solventes próticos com maior valor da constante dielétrica ϵ_r , como no caso da água e do metanol; porém, tal suscetibilidade também foi notada para o solvente aprótico etil-metil-cetona no Visível, não se restringindo a grupo doador ou aceptor para ligação de hidrogênio, ou para transferência de próton.

Ao considerar-se a água como solvente que proporcionou o meio de maior característica polar e o n-hexano o que proporcionou o meio de maior característica não-polar, e correlacionando-se tal consideração com o comportamento dos resultados de subtração espectral das Figuras 48 a 50, foi possível comprovar também:

- a) As subtrações espectrais seguiram o comportamento da OTC em água, o que aponta para interação por ligação de hidrogênio e transferência

de próton, que são as interações típicas entre sistemas ricos em –OH e –NH, pois estes possuem agrupamentos doadores e aceptores de prótons, conforme descrito na Tabela 19, e caracterizam uma interação fraca (fisiosorção), já que a força de ligação é cerca de 20 kJ mol^{-1} e próxima à daquela para a interação hidrofóbica, quando comparada à força de uma ligação forte, como a covalente (quimisorção), que é de 200 kJ mol^{-1} [76];

- b)** Não foi observado o comportamento da subtração espectral que refletisse o perfil espectral da OTC em meios menos polares do que a água (EtOH e MeOH) e mais não-polares que a água (n-hexano e etilmetil-cetona), não sendo possível inferir sobre a ausência ou presença de interações hidrofóbicas ou por sobreposição de sistemas π , este último caso por não terem sido testados solventes aromáticos.

5.4.2 Espectroscopia de Fluorescência na Região do Ultravioleta-Visível

Os espectros obtidos são apresentados nas Figuras 53 a 56.

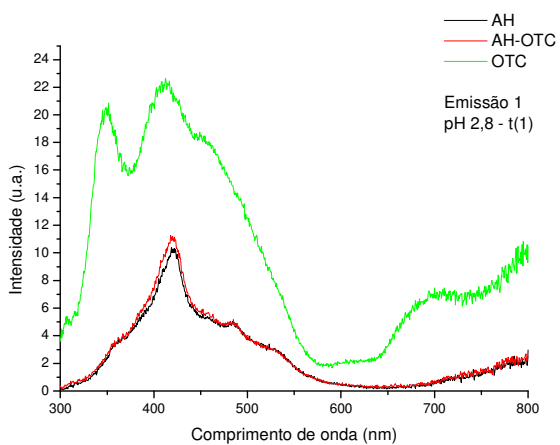
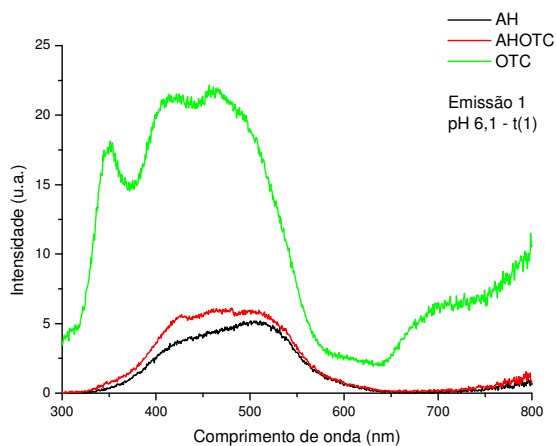
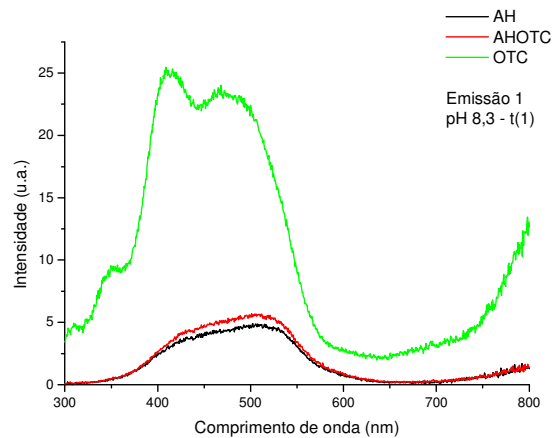


Figura 53. Sobreposição de espectros de Fluorescência no UV-Visível obtidos no modo de emissão, com ajuste de pH após período de interação de 24 h, com uma excitação em 240 nm.

Relação 30AH : 1OTC (m/v).

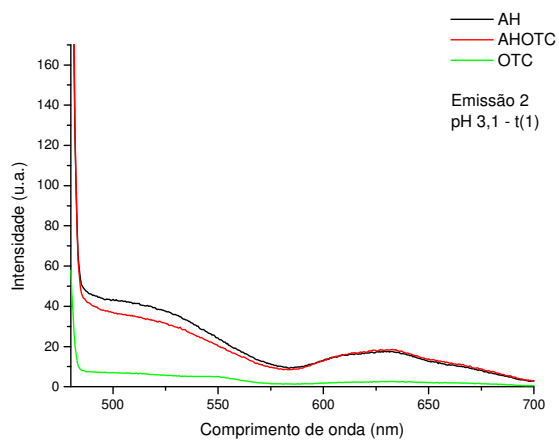
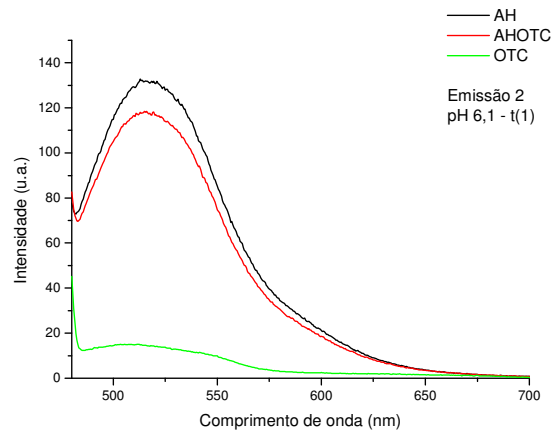
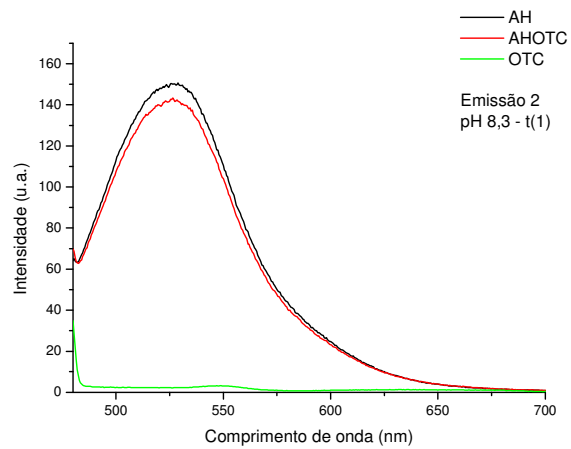


Figura 54. Sobreposição de espectros de Fluorescência no UV-Visível obtidos no modo de emissão, com ajuste de pH após período de interação de 24 h, com uma excitação em 465 nm.

Relação 30AH : 1OTC (m/v).

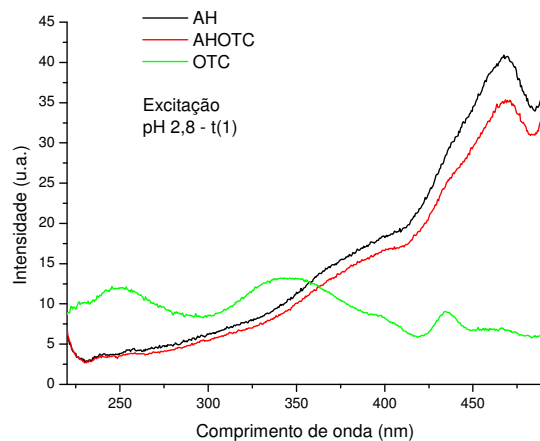
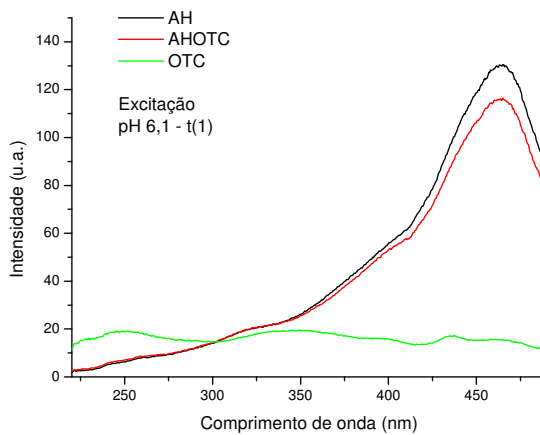
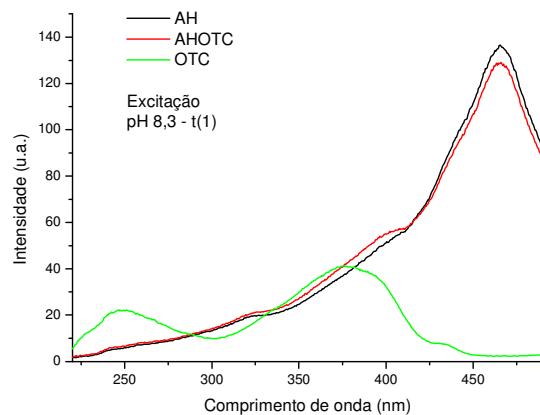


Figura 55. Sobreposição de espectros de Fluorescência no UV-Visível obtidos no modo de excitação, com ajuste de pH após período de interação de 24 h, com uma emissão em 510 nm.

Relação 30AH : 1OTC (m/v).

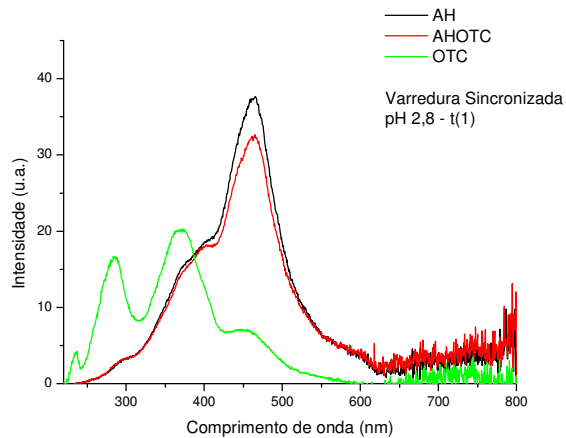
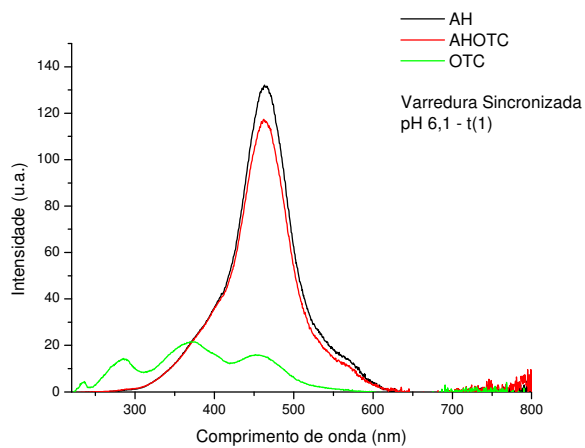
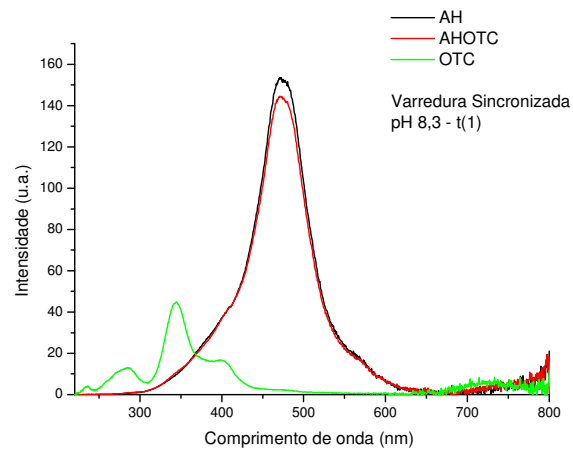


Figura 56. Sobreposição de espectros de Fluorescência no UV-Visível obtidos no modo de varredura sincronizada, com ajuste de pH após período de interação de 24 h, com um $\Delta\lambda$ de 55 nm. Relação 30AH : 1OTC (m/v).

Desta forma, pôde-se observar que o espectro de Fluorescência era fortemente dependente do pH, tanto para a emissão, quanto para a excitação e varredura sincronizada.

A técnica de Fluorescência no UV-Visível é utilizada para detectar estruturas com elétrons π , como compostos aromáticos e semiquinonas, onde estes elétrons são excitados por absorção da radiação, com uma porção da radiação espalhada quando o elétron volta ao estado fundamental, apresentando um comprimento de onda diferente daquele incidente e atraso entre o tempo de excitação e o tempo de emissão, o que pode ser aproveitado de maneira eficiente para a caracterização de AH ^[1]. Porém, assim como a Absorção no UV-Visível, a intensidade da Fluorescência de AH também é afetada pelo pH do meio e pela presença de eletrólitos e outras estruturas químicas orgânicas ^[1], o que também foi observado tanto para os comportamentos espectrais do AH, quanto da OTC e do produto de interação AH-OTC (Figuras 53 a 56). Jung et al. (2005) ^[138] utilizaram a Fluorescência no UV-Visível para caracterizar estruturas similares aos AH sintetizadas a partir de aminoácidos, além de analisarem as propriedades eletrônicas de tais compostos, e observaram que:

- A diminuição da intensidade de sinal de Fluorescência sugere a incorporação de uma estrutura molecular à outra, com uma estabilização energética se dando por ressonância eletrônica para permitir a reorganização estrutural do sistema;

- A incorporação do grupamento amino na estrutura húmica produz mudanças acentuadas nas propriedades de fluorescência das moléculas de AH.

A partir destas observações e levando-se em conta os espectros obtidos para AH-OTC nos diferentes modos de aquisição, sugere-se que a diminuição da intensidade de sinal do sistema AH-OTC, quando em comparação com o sinal de AH, pode ter se dado devido à presença do grupamento amina oriundo da OTC, bem como que a interação se dá efetivamente em níveis eletrônicos entre a molécula de AH e a molécula de OTC. Tal observação vai ao encontro dos resultados da subtração espectral no UV-Visível do Item **4.4.1** para o pH 8,3, com a alteração no perfil espectral na região típica de transição de grupamento amina (em torno de 210 nm), e sobretudo dos resultados de Absorção no Infravermelho Médio em pH 8,2 (a seguir), mesmo com um comportamento contrário da emissão decorrente de excitação em 240 nm (Figura 53) quando comparado aos demais modos de aquisição.

5.4.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier

Inicialmente, foi avaliada a mudança nos espectros da OTC em função do pH do meio, conforme apresentado na Figura 57.

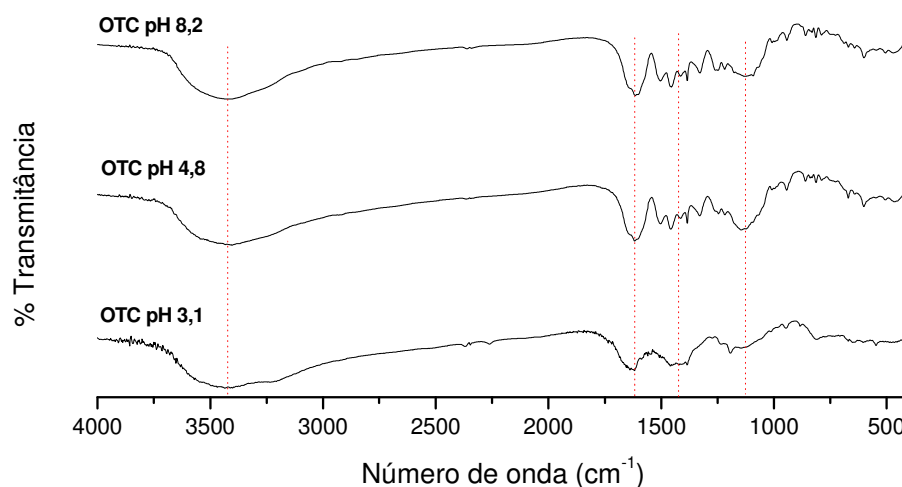


Figura 57. Espectros de Infravermelho Médio da OTC em diversos valores de pH, após 24 h de solubilização à temperatura ambiente e a uma concentração de 20 mg L⁻¹.

Uma das principais mudanças na OTC em função do pH deu-se na região de 1.600 cm⁻¹ característica do grupamento COO⁻, que é fortemente influenciado pelo pH do meio (protonação e desprotonação) havendo tanto aumento na intensidade desta banda em relação à banda de O-H e N-H, em torno de 3.400 cm⁻¹, com o aumento do pH, quanto divisão desta (pH 8,2). Esta mudança provavelmente se deu conforme a especiação da OTC, a qual varia com o pH, como pôde ser observado na Figura 7 (**Item 1.3**), o que aumentou ou diminuiu a densidade eletrônica, modificando o momento dipolo da molécula. Avaliou-se, também, o efeito da concentração hidrogenioiônica na absorção da radiação no Infravermelho Médio do AH CAP (Figuras 58 a 61), onde o estiramento de C=O em COOH, em torno de 1.750 cm⁻¹, diminuiu sua intensidade em relação à banda de deformação de O-H e o estiramento C-O de OH fenólico, em torno de 1.390 cm⁻¹, sofreu um desdobramento de picos em pH 8,2.

Para a comprovação da presença ou ausência de interação, foram comparados os espectros de AH CAP e AH-OTC (Figuras 58 a 62).

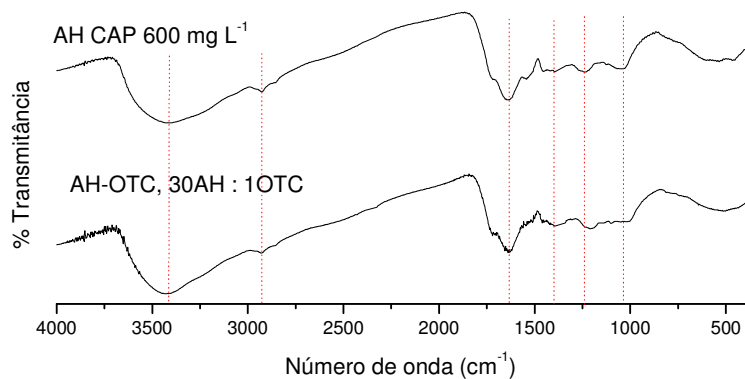


Figura 58. Comparação de espectros de Infravermelho Médio em pH 3,1 (ROTA 2).

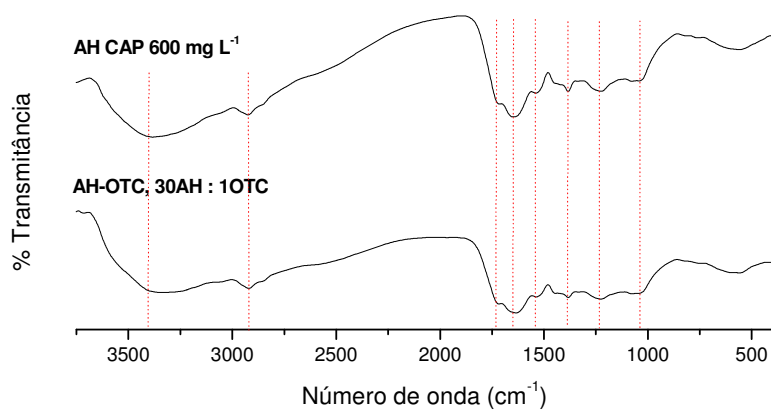


Figura 59. Comparação de espectros de Infravermelho Médio em pH 4,8 (ROTA 2).

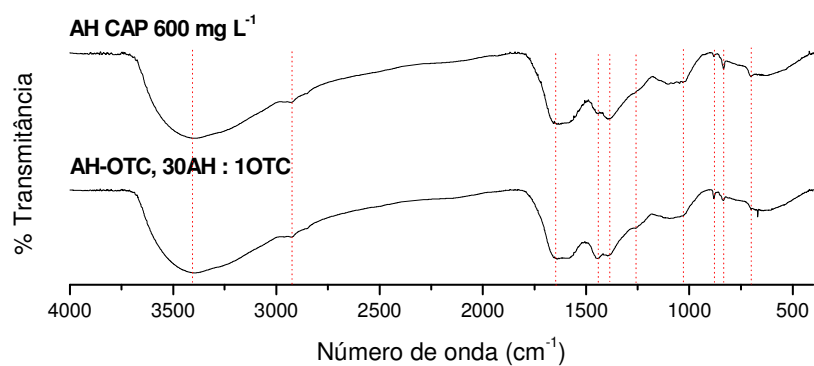


Figura 60. Comparação de espectros de Infravermelho Médio em pH 8,2 (ROTA 2).

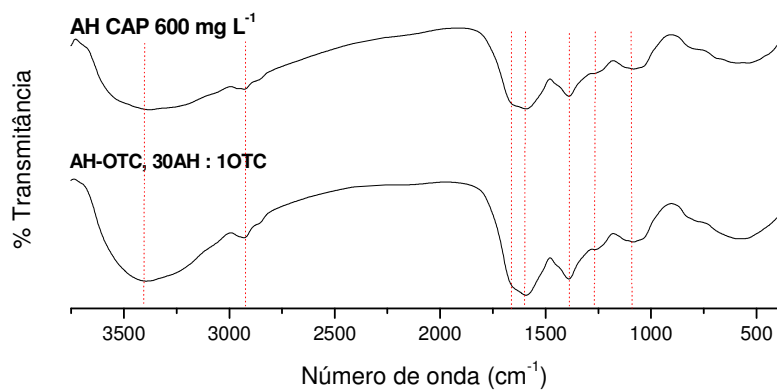


Figura 61. Comparação de espectros de Infravermelho Médio em pH 11,5 (ROTA 2).

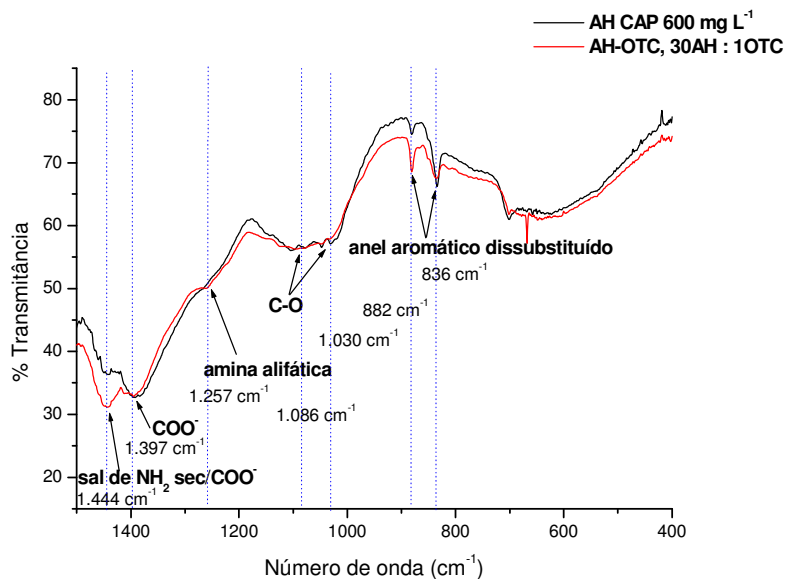


Figura 62. Sobreposição de espectros de Infravermelho Médio em pH 8,2 (detalhe de região da Figura 60).

Não foi observada nenhuma mudança significativa entre AH e AH-OTC para os valores de pH 3,1 (Figura 58), 4,8 (Figura 59) e 11,5 (Figura 61), ressaltando-se que acima de pH 11 a OTC é instável ^[50], com este fato devendo-se refletir nos espectros obtidos para este valor de pH e interferindo em qualquer observação mais detalhada da interação no Infravermelho Médio. Em pH 3,1 foi observado pequeno deslocamento para maior número de onda da banda em 1.250 cm⁻¹, atribuída à deformação de O-H em COOH, como possível evidência de que fosse devido à efeito de protonação via transferência de próton entre OTC e AH. No entanto, foi melhor observada alteração nas bandas de AH-OTC em comparação com as do AH no pH 8,2 (Figura 60) e que pôde ser visualizada no detalhe da região entre 1.500 a 400 cm⁻¹ (Figura 62), cabendo-se destacar:

- a) Aumento de intensidade decorrente de aumento de assimetria da banda em 1.440 cm^{-1} em região característica de sal de amina secundária e carboxilato;
- b) Deslocamento de banda em 1.257 cm^{-1} em região característica de amina alifática;
- c) Aumento de intensidade da banda em 836 cm^{-1} em região característica de anel aromático dissubstituído e dímero de ácido carboxílico.

Desta forma, (a) e (b) apontaram para a contribuição do grupamento amina para a interação neste valor de pH, o que foi ao encontro dos resultados obtidos via subtração espectral na região do UV-Visível para o pH 8,3 (**Item 4.4.1**), além de indicar uma possível interação via sobreposição de sistemas π - π , com o anel aromático dissubstituído atuando como doador de elétrons, e modificação conformacional no AH via dimerização de ácido carboxílico desprotonado ligado a anel aromático, sendo este último pouco provável devido à repulsão eletrostática, inferindo que a interação alterou não só as propriedades elétricas do sistema AH-OTC, mas também as propriedades vibracionais decorrentes de deslocamentos de densidade eletrônica. Ou seja, a interação influenciou o sistema tanto em nível energético superior (eletrônico) quanto em nível energético inferior (vibracional).

5.4.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Próximo

As Figuras 63 e 64 apresentam a variação no perfil espectral de AH e OTC em função do pH do meio.

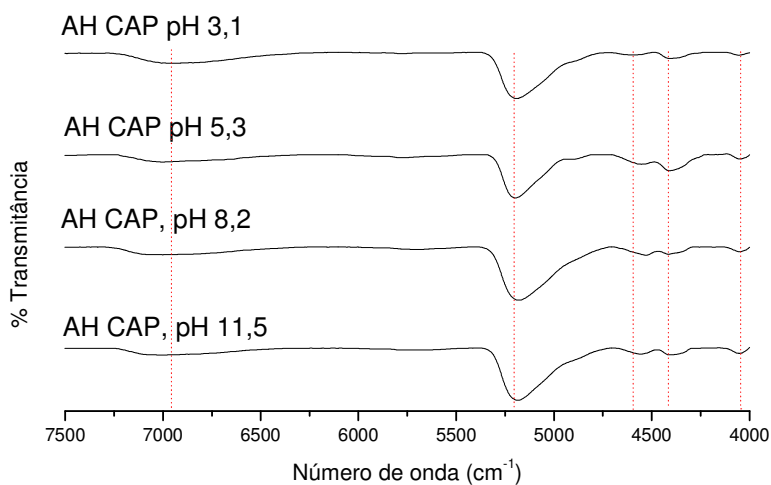


Figura 63. Efeito do pH no perfil dos espectros no Infravermelho Próximo de AH CAP (600 mg L⁻¹).

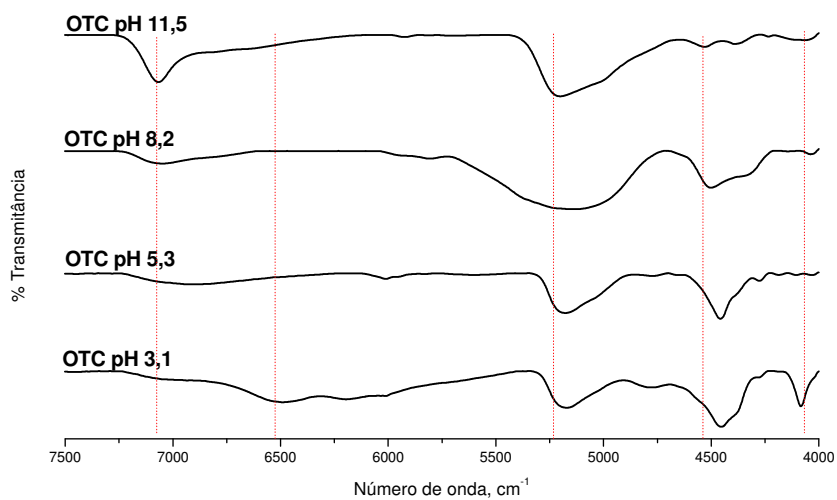


Figura 64. Efeito do pH no perfil dos espectros no Infravermelho Próximo de OTC (20 mg L⁻¹).

Observou-se que tanto o AH quanto a OTC sofreram influência do pH durante o processo de absorção da radiação no Infravermelho Próximo. No AH isto é mais claramente notado para as bandas em torno de 4.588 cm^{-1} (combinação C-C e N-H) e 4.395 cm^{-1} (combinação C-H + C-H) ^[98, 137], com acentuada diminuição na intensidade relativa da última banda devido ao aumento do pH, ou seja, a desprotonação diminuiu a formação destas bandas de combinação. O espectro em pH 8,2 demonstrou tal influência com o aparecimento de uma banda de combinação CHO em torno de 4.500 cm^{-1} .

A OTC mostrou-se mais suscetível à influência do pH para a absorção da radiação nesta região do Infravermelho: aparecimento de banda de segundo sobretom de OH-arila em torno de 7.100 cm^{-1} para o maior valor de pH, desaparecimento de banda de primeiro sobretom de RNH₂ em torno de 6.600 cm^{-1} com o aumento do pH, deslocamento dos picos máximos do primeiro sobretom de OH da água em torno de 5.200 cm^{-1} , deslocamento e mudança de intensidade de banda de combinação CHO em torno de 4.500 cm^{-1} e desaparecimento de banda de combinação C-C e C-H em torno de 4.100 cm^{-1} , também com o aumento do pH. Provavelmente, tais mudanças ocorreram em função da dissociação crescente da molécula, modificando o momento dipolo.

Já a comparação de AH CAP, OTC e AH-OTC para cada valor de pH forneceu os espectros mostrados nas Figuras 65 a 68.

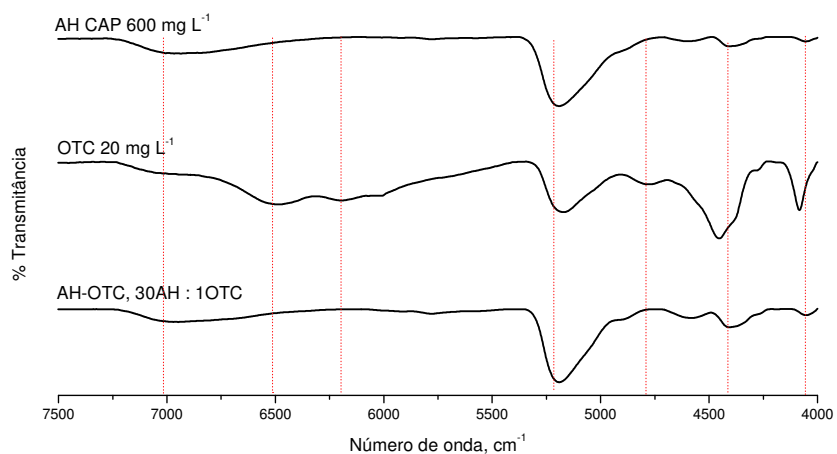


Figura 65. Comparação de espectros no Infravermelho Próximo de AH CAP, OTC e AH-OTC em pH 3,1.

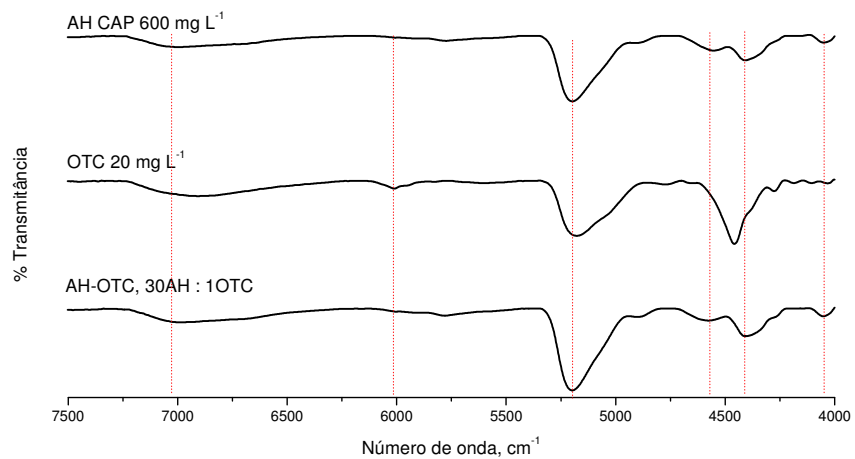


Figura 66. Comparação de espectros no Infravermelho Próximo de AH CAP, OTC e AH-OTC em pH 5,3.

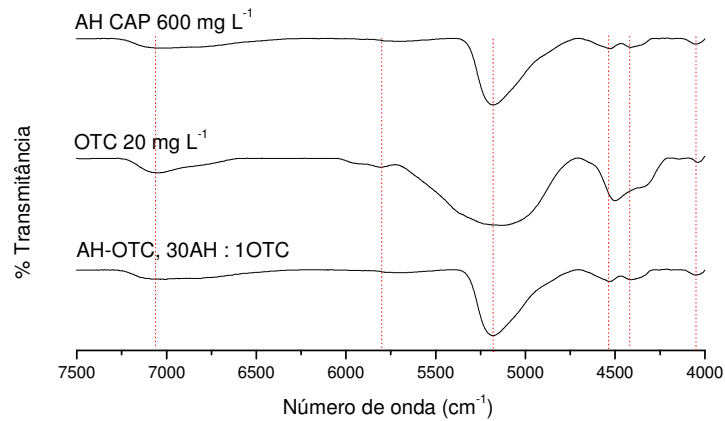


Figura 67. Comparação de espectros no infravermelho próximo de AH CAP, OTC e AH-OTC em pH 8,2.

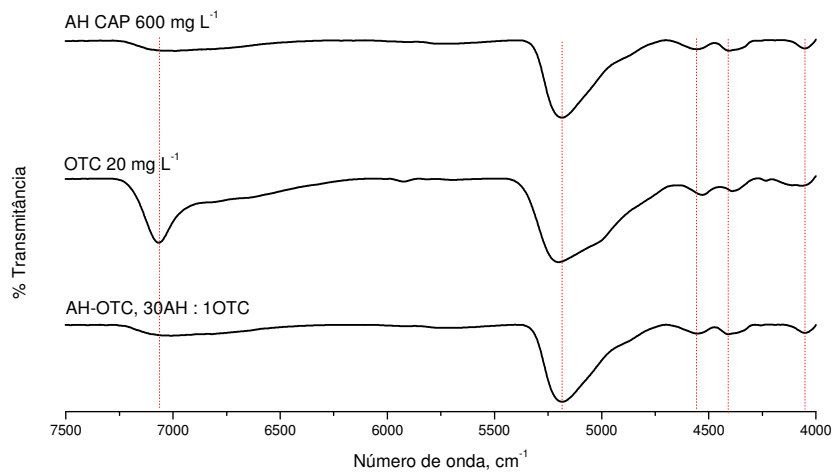


Figura 68. Comparação de espectros no infravermelho próximo de AH CAP, OTC e AH-OTC em pH 11,5.

Em pH 3,1 (Figura 65) excetuando-se a banda em 5.190 cm^{-1} do primeiro sobretom de O-H da água ^[98, 137], todas as demais bandas da OTC mostraram-se diferentes em posição e em intensidade de absorção em comparação a AH e AH-OTC. As bandas em 6.980 cm^{-1} (segundo sobretom de O-H da água) e 4.588 cm^{-1} (combinação C-C e N-H) ^[98, 137] não sofreram deslocamento nem

alteração em suas intensidades relativas quando comparado AH com AH-OTC; foi observado pequeno aumento na intensidade relativa da banda de combinação C-H + C-H em 4.250 cm^{-1} [137] em AH-OTC, o que pode ser interpretado como indicativo de interação hidrofóbica.

Em pH 5,3 (Figura 66) repetiu-se o mesmo perfil do pH 3,1 e novamente foi observado pequeno aumento na intensidade relativa da banda de combinação C-H + C-H em 4.250 cm^{-1} em AH-OTC, provavelmente em decorrência da interação hidrofóbica.

Em pH 8,2 (Figura 67) também não houveram alterações significativas de intensidade ou deslocamentos de banda entre AH e OTC.

Em pH 11,5 (Figura 68) a banda de segundo sobretom de OH-arila em torno de 7.100 cm^{-1} [137] desapareceu completamente após a interação com o AH, indicando que a interação entre AH e OTC foi favorecida em meio básico por ligação de hidrogênio. Porém, é possível também que esta alteração seja devido a presença de produto da decomposição da OTC neste valor de pH [50].

6 CONCLUSÕES

A partir da caracterização de dois solos do Estado de São Paulo com diferentes teores de MO, verificou-se a sorção da OTC a solos brasileiros, onde esta é dependente do conteúdo de MO presente, apresentando um risco potencial ao meio ambiente, decorrentes de sua capacidade de sorção forte a tais solos, o que dificulta o transporte por lixiviação e, conseqüente, menor aporte do antibiótico em águas subterrâneas. Estas observações também fornecem subsídios para posterior avaliação de risco químico do antibiótico para os microorganismos e atividade do solo.

Tanto a sorção da OTC aos solos, quanto sua sorção aos AH obedeceram à isoterma de Freundlich (tipo S e L). Tais isotermas apresentaram uma sorção de característica homogênea para os solos e para AH PD, e de característica heterogênea para AH CAP, demonstrando a influência da constituição química dos AH sob a sorção.

Quanto aos mecanismos de interação molecular entre a OTC e os AH, estes foram atribuídos à ligação de hidrogênio, além de uma possível contribuição por transferência de prótons e interação hidrofóbica, caracterizando a fisiosorção, havendo também indícios não comprovados de transferência de elétrons, o que demonstra a versatilidade da interação, e com esta interação sendo afetada pela composição química estrutural dos AH, refletindo no comportamento das isotermas de Freundlich para as formas observadas de sorção. Foi notado também que em um mesmo pH é possível haver mais de um mecanismo de interação envolvido, o que refletiu mais uma

vez o comportamento decorrente da heterogeneidade estrutural dos AH e da OTC.

Baseando-se nestas conclusões é pertinente afirmar que as agências ambientais e os órgãos legisladores brasileiros devem oferecer maior atenção à presença de antibióticos em matrizes ambientais, o que leva à necessidade de mais estudos relacionados ao tema que possam produzir dados que permitam estipularem os valores máximos permitidos para a presença do antibiótico em solo.

7 PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE

As seguintes propostas são indicadas como perspectivas que visam dar continuidade a este Estudo:

- Avaliar o comportamento da OTC frente a outros tipos de solos e AH brasileiros, para melhor correlacionar as constantes de Freundlich observadas com as características físico-químicas dos solos e AH;
- Confirmar quais os mecanismos moleculares relacionados, utilizando outros métodos químicos e espectroscópicos, como CLAE acoplada a Espectrometria de Massas, Análise Elementar, RMN e RPE;
- Compreender melhor o efeito do pH nas interações AH-OTC;
- Elaborar novos estudos de sorção com outros antibióticos agropecuários, principalmente os tetraciclínicos, visando melhor compreensão das interações.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reaction.** (2nd Ed.) New York: Willey, 1994.
2. CLAPP, C.E.; HAYES, M.H.B.; SENESI, N.; BLOOM, P.R.; JARDINE, P.M. (Eds.) **Humic substances and chemical contaminants.** Madison: Soil Society of America, 2001.
3. EUROPEAN AGENCY FOR EVALUATION FOR MEDICINAL PRODUCTS. **Environmental risk assessment for veterinary medical products other than GMO-containing and immunological products.** London: European Agency for Evaluation for Medicinal Products, 1996 (Note for Guidance - EMEA/CVMP/055/96).
4. PERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. **Soil and environmental quality.** (3th Ed.) Boca Ranton: CRC Taylor & Francis, 2005.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 518, de 25 de Março de 2004.
6. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. IBAMA. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos.** Brasília: IBAMA, 1990.
7. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo.** São Paulo: CETESB, 2005.
8. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Procedimento para gerenciamento de áreas contaminadas.** São Paulo: CETESB, 2007.

9. JENKINSON, E.J.; ADAMNS, D.E.; WILD, A. Model estimates of CO₂ emissions from soil in response to global warming. *Nature*, v. 351, p. 304-306, 1991.
10. TATZBER, M.; STEMMER, M.; SPIEGEL, H.; KATZLBERGER, C.; HANERNHAUER, G.; GERZABEK, M.H. Impact of different tillage practices on molecular characteristics of humic acids in a long-term field experiment - An application of three different spectroscopic methods. *Science of the Total Environment*, v. 406, p. 256-268, 2008.
11. SWIFT, R.S. Macromolecular properties of soil humic substances: fact, fiction, and opinion. *Soil Science*, v. 164, p. 760-802, 1999.
12. PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, v. 166, p. 810-832, 2001.
13. BURDON, J. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? *Soil Science*, v. 166, p. 752 -769, 2001.
14. SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environmental Science & Technology*, v. 39, n. 23, p. 9009 – 9015, 2005.
15. MARTÍN-NETO, L.; TRAGGHETTA, D.G.; VAZ, C.M.P.; CRESTANA, S.; SPOSITO, G. On the interaction mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances. *Journal of Environmental Quality*, v. 30, p. 520-525, 2001.
16. SHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M. 3-Dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften*, v. 82, p. 487-498, 1995.
17. SAPARPAKORN, P.; KIM, J.H.; HANNONGBUA, S. *Molecules*, v. 12, p. 703-715, 2007.

18. DIALLO, M.S.; SIMPSON, A.; GASSMAN, P.; FAULON, J.L.; JOHNSON-JR., J.H.; GODDARD, W.A.; HATCHER, P.G. 3-D structural modeling of humic acids through experimental characterization, computer assisted structure elucidation and atomistic simulations. 1. Chelsea soil humic acid. ***Environmental Science & Technology***, v. 37, p. 1783-1793, 2003.
19. SENESI, N.; RIZZI, F.R.; DELLINO, P.; ACQUAFREDDA, P. Fractal dimension of humic acids in aqueous suspension as a function of pH and time. ***Soil Science of America Journal***, v. 60, p. 1773 – 1780, 1996.
20. HAYES, P.L.; GIBBS-DAVIS, J.M.; MUSORRAFITI, M.J.; MIFFLIN, A.L.; SCHEIDT, K.A.; GEIGER, F.M. Environmental biogeochemistry studied by second-harmonic generation: a look at the agricultural antibiotic oxytetracycline. ***Journal of Physical Chemistry-C***, v. 111, p. 8796-8804, 2007.
21. MASEL, R.I. **Principles of adsorption on solid surfaces**. New York: Wiley, 1996, p. 108 - 336.
22. SOMORJAY, G.A. **Introduction to surface chemistry and catalysis**. New York: Wiley, 1994.
23. WERSHAW, R.L. Molecular aggregation of humic substances. ***Soil Science***, v. 164, p. 803 - 813, 1999.
24. MARTINEZ, J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. ***Environmental Pollution***, v. 157, p. 2893-2902, 2009.
25. KÝMMER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. ***Chemosphere***, v. 75, p. 417 – 434, 2009.

26. MEYER, M.T.; BUMGARNER, J.E.; VARNS, J.L.; DAUGHTRIDGE, J.V.; THURMAN, E.M.; HOSTELER, K.A. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry. ***Science of the Total Environment***, v. 248, p. 181-187, 2000.
27. YANG, S.-S.; YUEH, C.-Y. Oxytetracycline production by immobilized *Streptomyces rimosus*. ***Journal of Microbiology, Immunology and Infectious***, v. 34, p. 235-242, 2001.
28. WALKER, T.S. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002, p. 76-107.
29. WANG, Q.; YATES, S.R. Laboratory study of oxytetracycline degradation kinetics in animal manure and soil. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 56, 1683-1688, 2008.
30. VERVALKE, I.J.; DECUYPAE, J.A.; DIERICK, N.A.; HENDERICKX, H.K. Quantitative *in Vitro* evaluation of the energy metabolism influenced by virginiamycin and spiramycin used as growth promoters in pig nutrition. ***Journal of Animal Science***, v. 49, p. 846-856, 1979.
31. SANTOS, D.M.S.; BERCHIERY-JR., A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v. 20, p. 39-42, 2000.
32. RUTZ, F.; LIMA, G.J.M.M. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE AVES. Porto Alegre, 2001.
33. CHEE-SANDFORD, J.C.; AMINOV, R.I.; KRAPAC, I.J.; GARRIGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R.I. Occurrence and diversity of tetracycline

- resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 67, p. 1494-1502, 2001.
34. LIOU, F.; YING, G.-G.; TAO, R.; ZHAO, J.-L.; YANG, J.-F.; ZHAO, L.-F. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. ***Environmental Pollution***, v. 157, p. 1636-1642, 2009.
35. BOXALL, A.B.A.; JOHNSON, P.; SMITH, E.J.; SINCLAIR, C.J.; STUTT, E.; LEVY, L.S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 54, p. 2288-2297, 2006.
36. VENGLOVSKY, J.; SASAKOVA, N.; PLACHA, I. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. ***Bioresource Technology***, v. 100, p. 5386-5391, 2009.
37. MARTÍNEZ-CABALLO, E.; GONZÁLES-BARREIRO, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. ***Environmental Pollution***, v. 148, p. 570-579, 2007.
38. ANDRADE, A.N. Mitos e verdades sobre o uso de antibióticos nas rações. ***Jornal do Conselho Regional de Medicina Veterinária - RJ***, v. 186, p. 4-5, 2007.
39. PESSANHA, R.P.; GONTIJO-FILHO, P.P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. ***Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia***, v. 53, p. 111-115, 2001.

40. BLANCO, G.; LEMUS, J.A.; GRANDE, J. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environmental Research*, v. 109, p. 405-412, 2009.
41. BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Portaria n. 10, de 08 de Março de 1985.
42. MAIA, P.P.; DA SILVA, E.C.; RATH, S.; REYES, F.G.R. Residue content of oxytetracycline applied on tomatoes grown in open field and greenhouse. *Food Control*, v. 20, p. 11-16, 2009.
43. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte no Estado do Paraná**. Curitiba: SESA/IESP, 2005. (Relatório Técnico).
44. MITSCHER, L. A. **The chemistry of the tetracycline antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1978, v. 9.
45. TAPIA, O.; BERTRÁN, J. (Ed.) **Understanding chemical reactivity: solvent effects and chemical reactivity**. New York: Kluwer Academic, 2000, v. 17.
46. US-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA-Pesticides: oxytetracycline**. New York: US-Environmental Protection Agency, 1988, 35 p. (Pc Code 006304).
47. SASSMAN, S.A.; LEE, L.S. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. *Environmental Science & Technology*, v. 39, p. 7452-7459, 2005.
48. OLESZCZUK, P.; PAN, B.; XING, B. Adsorption and desorption of oxytetracycline and carbamazepine by multiwalled carbon nanotubes. *Environmental Science & Technology*, v. 43, p. 9167 – 9173, 2009.

49. MIFFLIN, A.L.; KONEK, C.T.; GEIGER, F.M. Tracking oxytetracycline mobility across environmental interfaces by second harmonic generation. *Journal of Physical Chemistry-B*, v. 110, p. 22577-22585, 2006.
50. KULSHRESTHA, P.; GIESE, R.F.; AGA, D.S. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: insights on factors affecting its mobility in soil. *Environmental Science & Technology*, v. 38, p. 4097-4105, 2004.
51. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa da pecuária municipal 2007 – 2008**. Brasília: IBGE, 2009 (Relatório Técnico).
52. PFIZER. Disponível em: <<http://pfizersaudeanimal.com.br>>. Acesso em: 30 nov. 2009.
53. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema de recuperação automática**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 09 jan. 2010.
54. PFIZER. Disponível em: <<http://pfizersaudeanimal.com.br/agriDoencasBac.asp>>. Acesso em: 30 nov. 2009.
55. SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. Disponível em: <<http://sindan.org.br/sd/sandan/index.html>>. Acesso em: 09 jan. 2010. (Relatório Técnico).
56. SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA PARA DEFESA AGRÍCOLA. Disponível em: <<http://sindag.com.br>>. Acesso em: 09 jan. 2010. (Relatório Técnico).

57. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.
Projeções do agronegócio - Brasil - 2008/09 a 2018/19. Brasília: MAPA, 2009. (Relatório Técnico).
58. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Gold book.** Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/>>. Acesso em: 30 nov. 2009.
59. EL KORCHI; G.; PRATS, C.; ARBOIX, M.; PÉREZ, B. Disposition of oxytetracycline in pigs after i.m. administration of two long-acting formulations. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 24, p. 247-250, 2001.
60. LAVORANTE, B.R.O.; DOS SANTOS, P.M.; MENDES, P.T.S.; MENDES, E.S. Método de determinação e avaliação da depleção de oxitetraciclina em camarão marinho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, p. 738-745, 2009.
61. TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental Science & Technology*, v. 35, p. 3397-3406, 2001.
62. GLASSMEYER, S.T.; HINCHEY, E.K.; BOEHME, S.E.; DAUGHTON, C.G.; RUHOY, I.S.; CONERLY, O.; DANIELS, R.L.; LAUER, L.; MCCARTHY, M.; NETTESHEIM, T.G.; SYKES, K.; THOMPSON, V.G. Disposal practices for unwanted residential medications in the United States. *Environment International*, v. 35, p. 566-572, 2009.
63. BLACKWELL, P.A.; KAY, P.; ASHAUER, R.; BOXALL, A.B.A. Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils. *Chemosphere*, v. 75, p. 13-19, 2009.

64. ENGEMANN, C.A.; KEEN, P.L.; KNAPP, C.W.; HALL, K.J.; GRAHAM, D.W. Fate of tetracycline Resistance genes in aquatic systems: migration from the water column to peripheral biofilms. *Environmental Science & Technology*, v. 42, p. 5131–5136, 2008.
65. SETTLE, F. (Ed.) **Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry**. New Jersey: Prentice Hal PTR, 1997, p. 147-160.
66. LOKE, M.-L.; TJØRNELUND, J.; HALLING-SØRENSEN, B. Determination of the distribution coefficient ($\log K_d$) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure. *Chemosphere*, v. 48, p. 351-361, 2002.
67. LINDSAY, S. **High performance liquid chromatography**. (2nd Ed.) New York: Wiley, 1992.
68. WU, F.C.; EVANS, R.D.; DILLON, P.J.; CAI, Y.R. Rapid quantification of humic and fulvic acids by HPLC in natural waters. *Applied Geochemistry*, v. 22, p. 1598-1605, 2007.
69. BESSE-HOGGAN, P; ALEKSEEVA, T.; SANCELME, M.; DELORT, A.-M.; FORANO, C. Atrazine biodegradation modulated by clays and clay/humic acid complexes. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 2837-2844, 2009.
70. LALUMERA, G.M.; CALAMARI, D.; GALLI, P.; CASTIGLIONI, S.; CROSA, G.; FANELLI, R. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*, v. 54, p. 661 - 668, 2004.
71. SHARIATI, S.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC–UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics. *Journal of Chromatography - B*, v. 877, p. 393 - 400, 2009.

72. ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Optimization strategies for HPLC enantioseparation of racemic drugs using polysaccharides and macrocyclic glycopeptide antibiotic chiral stationary phases. *Il Farmaco*, v. 57, p. 513 – 529, 2002.
73. JOSHI, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 795 – 809, 2002.
74. SANDERSON, H.; INGERSLEV, F.; BRAIN, R.A.; HALLING-SØRENSEN, B.; BESTARI, J.K.; WILSON, C.J.; JOHNSON, D.J.; SOLOMON, K.R. Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and doxycycline using HPLC–UV and LC/MS/MS under aquatic semi-field microcosm conditions. *Chemosphere*, v. 60, p. 619 – 629, 2005.
75. FRITZ, J.W.; ZUO, Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, v. 105, p. 1297-1301, 2007.
76. ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Atkins's physical chemistry**. (8th Ed.) Oxford: Oxford University Press, 2006, p. 916 - 922.
77. GILES, C.H.; SMITH, D.; HUITSON, A. A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 47, p. 755-765, 1974.
78. HINZ, C. Description of sorption data with isotherm equations. *Geoderma*, v. 99, p. 225-243, 2001.
79. PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy**. (3th Ed.) New York: Thomson Learning, 2001, p. 13-83.
80. NARDI, S.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; BAIANO, S.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Relationship between molecular characteristics of soil humic

- fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 3138 – 3146, 2007.
81. MAIE, N.; WATANABE, A.; HAYAMIZU, K.; KIMURA, M. Comparison of chemical characteristics of type A humic acids extracted from subsoils of paddy fields and surface and soils. **Geoderma**, v. 106, p. 1 – 19, 2002.
82. UYGUNER, C. S.; BEKBOLET, M. A comparative study on the photocatalytic degradation of humic substances of various origins. **Desalination**, v. 176, p. 167–176, 2005.
83. SIMÕES, F. R.; DA SILVA, W. T. L.; SIMÕES, M. L.; MARTIN-NETO, L.; VAZ, C. M. P. Effect of humic substances on the electrochemical reduction of p-nitrophenol. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 86, p. 779–787, 2006.
84. MARIANA-LUCIO, M.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Modeling the binding of triazine herbicides to humic substances using capillary electrophoresis. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, 2006.
85. CAMPBELL, I.D.; DWEK, R.A. **Biological spectroscopy**. Menlo Park: Cumming/Benjamin, 1984.
86. KRASOVITSKII, B.M.; BOLOTIN, B.M. **Organic luminescent materials**. Weinheim: Wiley-VCH, 1987, p. 340.
87. LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. (2nd Ed.) New York: Kluwer Academic, 1999, p. 698.
88. McDONALD, S.; BISHOP, A.G.; PRENZLER, P.L.; ROBARDS, K. Analytical chemistry of freshwater humic substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 527, p. 105 – 124, 2004.

89. PROVENZANO, M.R.; D'ORAZIO, V.; JERZYKIEWICZ, M.; SENESI, N. Fluorescence behaviour of Zn and Ni complexes of humic acids from different sources. *Chemosphere*, v. 55, p. 885-892, 2004.
90. LIANG, Y.; SIMON, R.E.; DENTON, M.B. Utilization of a scientifically operated charge-coupled device detector for high-performance thin-layer chromatographic analysis of tetracyclines. *Analyst*, v. 124, p. 1577-1582, 1999.
91. NIJEGORODOV, N.; MABBS, R. The dependence of the fluorescence properties, laser properties and photochemical stability of aromatic compounds on the molecular symmetry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 56, p. 2157 – 2166, 2000.
92. CARVALHO, E. R.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D. M. B. P.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. Interactions of chlorine with tropical aquatic fulvic acids and formation of intermediates observed by fluorescence spectroscopy. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 15, p. 421 – 426, 2004.
93. PLAZA, C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N.; POLO, A. Fluorescence characterization of metal ion-humic acid interactions in soils amended with composted municipal solid wastes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 386, p. 2133 – 2140, 2006.
94. SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. (6^a Ed.) Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora, 2000.
95. BASSET, J.; DENNY, R.C.; JEFFERY, G.H.; MENDHAM, J. **Vogel - Análise inorgânica quantitativa**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1981, p. 514-574.

96. BAUER, M.; HEITMAN, T.; MACALADY, D.L.; BLODAU, C. Electron transfer capacities and reaction kinetics of peat dissolved organic matter. ***Environmental Science & Technology***, v. 41, p. 139 - 145, 2007.
97. FERREIRA, J.A.; MARTIN-NETO, L.; VAZ, C.M.P.; REGINATO, J.B. Sorption interactions between imazaquin and a humic acid extracted from a typical brazilian oxisol. ***Journal of Environmental Quality***, v. 31, p. 1665 - 1670, 2002.
98. BUMS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of near-infrared analysis**. (2nd Ed.) New York: Marcel Dekker, 2001.
99. VERGNOUX, A.; GUILIANO, M.; LE DRÉU, Y.; KISTER, J.; DUPUY, N.; DOUMENQ, P. Monitoring of the evolution of an industrial compost and prediction of some compost properties by NIR spectroscopy. ***Science of the Total Environment***, v. 407 p. 2390-2403, 2009.
100. BORISOVER, M.; GERSTL, Z.; BURSHEIN, F.; YARIV, S.; MINGELGRIN, U. Organic sorbate–organoclay interactions in aqueous and hydrophobic environments: sorbate–water competition. ***Environmental Science & Technology***, v. 42, p. 7201-7206, 2008.
101. ZOU, T.; DOU, Y.; MI, H.; ZOU, J.; REN, Y. Support vector regression for determination of component of compound oxytetracycline powder on near-infrared spectroscopy. ***Analytical Biochemistry***, v. 355, p. 1-7, 2006.
102. ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v. 44, p. 683-700, 2007.

103. VALVERDE, R.S.; GARCÍA, M.D.G.; GALERA, M.M.; GOICOECHEA, H.C. Determination of tetracyclines in surface water by partial least squares using multivariate calibration transfer to correct the effect of solid phase preconcentration in photochemically induced fluorescence signals. *Analytica Chimica Acta*, v. 562, p. 85-93, 2006.
104. MADARI, B. E.; REEVES, J. B.; MACHADO, P. L. O. A.; GUIMARÃES, C. M.; TORRES, E.; McCARTY, G. W. Mid- and near-infrared spectroscopic assessment of soil compositional parameters and structural indices in two ferralsols. *Geoderma*, v. 136, 245 – 259, 2006.
105. SMALL, G. W. Chemometrics and near-infrared spectroscopy: avoiding the pitfalls. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, 2006.
106. SACHS, S.; BUBNER, M.; SCHMEIDE, K.; CHOPPIN, G. R.; HEISE, K. H.; BERNHARD, G. Carbon-13 NMR spectroscopic studies on chemically modified and unmodified synthetic and natural humic acids. *Talanta*, v. 57, p. 999 - 1009, 2002.
107. ADANI, F.; GENEVINI, P.; TAMBONE, F.; MONTONERI, E. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere*, v. 65, p. 1414 - 1418, 2006.
108. WEIL, J.A.; BOLTON, J.R.; WERTZ, J.E. **Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications**. New York: Wiley, 1994, p. 568.
109. SENESI, N. Applications of ESR spectroscopy in soil chemistry. In: STEWART, B.A. (Ed.) **Advances in soil science**. New York: Springer-Verlag, p. 77-130, 1990, v. 14.

110. CHRISTOFORIDIS, K.C.; UN, S.; DELIGIANNAKIS, Y. High-field 285 GHz electron paramagnetic resonance study of indigenous radicals of humic acids. *Journal of Physical Chemistry - A*, v. 111, p. 11860 - 11866, 2007.
111. KNOWLES, F.; MARSH, D.; RATTLE, H.W.E. **Magnetic resonance of biomolecules: an introduction to the theory and practice of NMR and ESR in biological systems**. London: Wiley, 1976.
112. WERTZ, J.E.; BOLTON, J.R. **Electron spin resonance**. New York: McGraw Hill, 1972.
113. JEZIERSKI, A.; CZECHOWSKI, F.; JERZYKIEWICZ, M.; CHEN, Y.; DROZD, J. Electron paramagnetic resonance (EPR) studies on stable and transient radicals in humic acids from compost, soil, peat and brown coal. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 56, p. 379 – 385, 2000.
114. WITWICKI, M.; JASZEWSKI, A.R.; JEZIERSKA, J.; JERZYKIEWICZ, M.; JEZIERSKI, A. The pH-induced shift in the *g*-tensor components of semiquinone-type radicals in humic acids – DFT and EPR studies. *Chemical Physics Letters*, v. 462, p. 300 – 306, 2008.
115. SENESI, N.; SCHINITZER, M. Effects of pH, reaction time, chemical reduction and irradiation on ESR spectra of fulvic acid. *Soil Science*, v. 123, p. 224 – 234, 1977.
116. SOARES, G. B. **Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação do diuron e ametrina e estudos de sorção em solos sob mata e cana-de-açúcar**. 2009. 170 f. Dissertação (Mestrado em

- Química Analítica) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
117. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS.
Geoquímica de alguns solos brasileiros. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. (Relatório Técnico).
118. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS. **Análises químicas para avaliação da fertilidade do solo: métodos usados na Embrapa Solos.** Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1998. (Relatório Técnico).
119. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes.** Brasília/DF: EMBRAPA, 1999.
120. SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: SPARKS et al. (Eds.) **Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. Book Series: 5 - Soil Science Society of America.** Madison: Soil Science Society of America, p. 1018 - 1020, 1996.
121. NOVOTNY, E.H. **Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo.** 2002. 215 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
122. PUBCHEM. Disponível em:
<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=24898027>>.
Acesso em: 30 nov. 2009.
123. SIGMA-ALDRICH. Disponível em:
<<http://sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=O5875|SIGMA&N5>>

=SEARCH CONCAT PNO|BRAND KEY&F=SPEC>. Acesso em: 30 nov. 2009.

124. JONES, A.D.; BRULAND, G.L.; AGRAWAL, S.G.; VASUDEVAN, D.
Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. ***Environmental Toxicology and Chemistry***, v. 24, p. 761 – 770, 2005.
125. MARTIN-NETO, L.; VIEIRA, E.M.; SPOSITO, G. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: a spectroscopic study. ***Environmental Science & Technology***, v. 28, p. 1867-1873, 1994.
126. ALLAIRE, S.E.; DELL CASTILLO, J.; JUNEAU, V. Sorption kinetics of chlortetracycline and tylosin on sandy loam and heavy clay soils. ***Journal of Environmental Quality***, v. 35, p. 969-972, 2006.
127. BARRIQUELO, M.F.; MILORI, D.M.B.P.; NEVES, E.A.; MARTIN-NETO, L.
Fluorescence spectroscopy comparison of soil humic acids and model humic acid – type polymers. **XII International Meeting of IHSS**. São Pedro: International Humic Substances Society, p. 358 – 360, 2004.
128. RICE, J.A.; MACCARTHY, P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. ***Organic Geochemistry***, v. 17, p. 635-648, 1991.
129. STEELINK, C.; TOLLIN, G. Stable free radicals in soil humic acid.
Biochimica et Biophysica Acta, v. 59, p. 25-34, 1962.
130. MARTIN-NETO, L.; ROSSEL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperate grassland climosequence. ***Geoderma***, v. 81, p. 305-311, 1998.

131. SAAB, S.C.; MARTIN-NETO, L. Use of the EPR technique to determine thermal stability of some humified organic substances found in soil organic-mineral fractions. **Química Nova**, v. 26, p. 497-498, 2003.
132. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
133. COUTO, C.M.C.M.; MONTENEGRO, C.B.S.M.; REIS, S. Complexação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina com o catião cobre (II). Estudo potenciométrico. **Química Nova**, v. 23, p. 457-460, 2000.
134. YU, L.; FINK, G.; WINTGENS, T.; MELIN, T.; TERNES, T.A. Sorption behavior of potential organic wastewater indicators with soils. **Water Research**, v. 43, p. 951-960, 2009.
135. MITRA, S. (Ed.) Sample preparation techniques in analytical chemistry. In: WINERFORDNER, J.D. (Ed.) **Chemical analysis: a series of monographs on analytical chemistry and its applications**. Hoboken: Wiley, 2003, p. 190-193, v. 162.
136. O'CONNOR, S.; AGA, D.S. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: advances in extraction, clean-up, and quantification. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 456-465, 2007.
137. BRUKER. **Almanac bruker biospin**. Karlsruhe: Bruker, 2004, p. 44.
138. JUNG, A.-V.; FROCHOT, C.; PARANT, S.; LARTIGES, B.S.; SELVE, C.; VIRIOT, M., -L.; BERSILLON, J.-L. Synthesis of amino-phenolic humic-like substances and comparison with natural aquatic humic acids: A multi-analytical techniques approach. **Organic Geochemistry**, v. 36, p. 1252-1271, 2005.