



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química

Gabriela Juliana Ferraz

Fotodegradação de antiparasitários veterinários em solos

Campinas

2018

Gabriela Juliana Ferraz

Fotodegradação de antiparasitários veterinários em solos

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Química na área de Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DEFENDIDA PELA ALUNA GABRIELA JULIANA FERRAZ E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SUSANNE RATH.

**Campinas
2018**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

F413f Ferraz, Gabriela Juliana, 1992-
Fotodegradação de antiparasitários veterinários em solos / Gabriela Juliana Ferraz. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Susanne Rath.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fotodegradação. 2. Antiparasitários. 3. Solos. 4. Dissipação de fármacos veterinários. 5. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM-EM). I. Rath, Susanne, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Photodegradation of antiparasitic veterinary drugs in soils

Palavras-chave em inglês:

Photobleaching

Antiparasitic agents

Soils

Dissipation of veterinary drugs

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Área de concentração: Química Analítica

Títuloção: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Susanne Rath [Orientador]

Eny Maria Vieira

José Roberto Guimarães

Data de defesa: 26-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Susanne Rath (Orientadora)

Profa. Dra. Eny Maria Vieira (IQ-USP-São Carlos)

Prof. Dr. José Roberto Guimarães (FEC-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo(a) aluno(a) GABRIELA JULIANA FERRAZ, aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de fevereiro de 2018.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Susanne Rath pelo acolhimento e pela oportunidade de desenvolver meu trabalho, por toda confiança, paciência, esforço e dedicação que levarei sempre como exemplo.

À minha família, em especial minha mãe Maria Luiza, pelo apoio, incentivo, dedicação e por sempre acreditar nas minhas vitórias.

Ao Gabriel por sempre me mostrar que eu poderia ir mais longe e por caminhar ao meu lado em todos os desafios. Por toda a cumplicidade, compreensão e carinho.

Aos amigos e companheiros de laboratório por compartilharem os objetivos, as discussões e o aprendizado e pelas amizades que nasceram dessa jornada.

Aos professores que auxiliaram a realização dos experimentos e que participaram das bancas examinadoras contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Instituto de Química pela disponibilização da infraestrutura necessária. À comissão de pós graduação por todo o apoio oferecido.

Às agências de fomento Fapesp, CNPq e Capes pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu Profundo Agradecimento.

RESUMO

A abamectina (ABA) e a moxidectina (MOX) são fármacos veterinários da família das avermectinas e milbemicinas, respectivamente, amplamente utilizados na medicina veterinária no combate a ecto e endoparasitas. A ABA também é usada como agrotóxico para o controle de pragas na agricultura. Esses insumos farmacêuticos podem entrar no ambiente através das excretas dos animais tratados ou de forma direta da aplicação na lavoura. Esses compostos apresentam baixa mobilidade em solos característicos do Estado de São Paulo, podendo prejudicar a microbiota do solo e até mesmo levar ao desenvolvimento de microrganismos resistentes. O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial de fotodegradação da ABA e MOX em dois solos, um de textura argilosa (LVe, Latossolo Vermelho eutrófico) e outra arenosa (RQo, Neossolo Quartzarênico órtico). Os estudos foram realizados em câmara climática a uma temperatura de 25 ± 2 °C usando duas lâmpadas de luz negra com máximo de emissão em 365nm ($0,8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Os solos foram fortificados com 100 ng g^{-1} de cada fármaco e o mesmo foi espalhado em uma placa de Petri formando uma camada fina de 2 mm de espessura. Em tempos determinados e não mais do que 14 dias os solos foram removidos da câmara e analisados. A extração de ABA e MOX dos solos foi realizada com metanol e a quantificação dos analitos foi feita por cromatografia líquida de ultra alta eficiência associada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). A fonte de eletronebulização foi operada no modo positivo (ESI+). Para a separação dos analitos foi utilizada uma coluna Acquity BEH C18 $1,7 \mu\text{m}$ (Waters) e fase móvel composta de acetonitrila: solução aquosa de acetato de amônia 5 mmol L^{-1} (10:90 v/v). Como padrão interno foi usada a eprinomectina. O método proposto apresentou linearidade superior a 0,99 na faixa de concentração de 5 a 125 ng g^{-1} , com um limite de quantificação de $0,5 \text{ ng g}^{-1}$ para ambos analitos. A precisão intra-dias foi menor do que 8% e a inter-dias menor do que 17% para os dois solos avaliados. Os dados se ajustaram bem ao modelo de pseudo-primeira ordem ($r > 0,95$) e os tempos de meia vida de dissipação (DT_{50}) calculados foram de 6 dias para a MOX e 11 dias para a ABA no solo arenoso e de 17 dias para a MOX e 41 dias para a ABA no solo argiloso. A MOX apresentou uma velocidade de degradação de aproximadamente 2 vezes maior do que a ABA nos dois solos estudados. Os tempos de meia vida para ambos os analitos foram maiores no solo argiloso em que estes apresentam maior afinidade (maior valor de K_F de sorção) indicando que a ligação mais intensa dos fármacos com as partículas do solo torna os analitos menos susceptíveis à ação da radiação.

Palavras-Chave: antiparasitários veterinários, fotodegradação, solos, dissipação, UHPLC-MS/MS.

ABSTRACT

Abamectin (ABA) and moxidectin (MOX) are veterinary drugs of the family of avermectins and milbemycins, respectively, widely used in veterinary medicine to control ecto and endoparasites. ABA is also used as a pesticide for pest control in agriculture. These drugs can reach the environment through the excreta of the treated animals or directly from the application in the crop. These compounds present low mobility in characteristic soils of the State of São Paulo, which may impair the microbiota of the soil and even lead to the development of resistant microorganisms. The objective of this work was to study the photodegradation potential of ABA and MOX in two soils, one of clayey texture (LVe, *Latossolo Vermelho eutrofico*) and one of sandy texture (RQo, *Neossolo Quartzarênico órtico*). The studies were performed in a climatic chamber at a temperature of 25 ± 2 °C using two lamps with maximum emission at 365 nm ($0.8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). The soils were fortified with 100 ng g^{-1} of each drug and it was spread on a Petri dish forming a thin layer of 2 mm thickness. At fixed times and no more than 14 days the soils were removed from the chamber and analyzed. The extraction of ABA and MOX from the soils was performed with methanol and the quantification of the analytes was done by ultra-high performance liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The electrospray ionization source was operated in the positive mode (ESI+). For the separation of the analytes, an Acquity BEH C18 $1.7 \mu\text{m}$ column (Waters) and mobile phase composed of acetonitrile: aqueous ammonium acetate solution 5 mmol L^{-1} (10:90 v/v) was used. Eprinomectin was used as internal standard. The proposed method presented linearity higher than 0.99 in the concentration range of 5 to 125 ng g^{-1} , with a limit of quantification of 0.5 ng g^{-1} for both analytes. Intra-day precision was lower than 8% and the inter-day was less than 17% for both evaluated soils. The data adjusted well to the pseudo-first-order model ($r > 0.95$). The calculated dissipation half-life times (DT_{50}) were 6 days for MOX and 11 days for ABA in the sandy soil RQo and 17 days for MOX and 41 days for ABA in the clay soil LVe. MOX showed a degradation rate of approximately 2-fold higher than ABA in the two evaluated soils. The half-life times for both analytes were higher in the clay soil where the analytes have a higher affinity (higher sorption KF value) indicating that the more intense binding of the drugs with the soil particles reduces the susceptibility to photo degradation.

Keywords: antiparasitic veterinary drugs, photodegradation, soils, dissipation, UHPLC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do faturamento anual da indústria de medicamentos veterinários por classe terapêutica entre 2011 e 2016 (adaptado de SINDAN, 2016).....	19
Figura 2. Estruturas moleculares da abamectina e moxidectina.	21
Figura 3. Diversidade de tipos de climas no mundo segundo a classificação de Köppen (Adaptado de Peel et al, 2007)	26
Figura 4. Diversidade de tipos e solos no mundo segundo a classificação do departamento de agricultura dos Estados Unidos USDA (<i>United States Department of Agriculture</i>) (Adaptado de USDA, 2005).....	27
Figura 5. Diagrama de transição de elétrons mostrando as possíveis reações de absorção e liberação de energia (Adaptado de Moore, 1976).....	30
Figura 6. Proporção dos componentes do solo (adaptado de Nunes & Rezende, 2015).....	34
Figura 7. Classes texturais de solos de acordo com as frações de argila, silte e areia (IBGE, 2007).	35
Figura 8. Mapa pedológico do Estado de São Paulo com os principais tipos de solo (Adaptado de Oliveira, 1999).....	37
Figura 9. Cromatogramas (SRM) das amostras branco de solo RQo fortificadas com solução de ABA e MOX em acetonitrila, na concentração de 50 ng g ⁻¹ , empregando coluna cromatográfica Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm; 2,1 x 50 mm, fase móvel ACN: NH ₄ Ac 0,1% em água, 90:10 (v/v) em modo isocrático, vazão de 0,5 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 2 µL.....	59

Figura 10. Curva analítica utilizando o solo RQo branco fortificado em seis níveis de concentração para MOX e seu respectivo gráfico de resíduos.	60
Figura 11. Curva analítica utilizando o solo RQo branco fortificado em seis níveis de concentração para ABA e seu respectivo gráfico de resíduos.	60
Figura 12. Curva analíticas utilizando o solo LVe branco fortificado em seis níveis de concentração para MOX e seu respectivo gráfico de resíduos.	61
Figura 13. Curva analítica utilizando o solo LVe branco fortificado em seis níveis de concentração para ABA e seu respectivo gráfico de resíduos.	61
Figura 14. Espectro de emissão das lâmpadas UVA.	63
Figura 15. Foto da câmara climática com o trocador de calor e as lâmpadas fixadas na prateleira superior.	64
Figura 16. Áreas registradas nos cromatogramas para a MOX e ABA pela área do padrão interno nas amostras de solo RQo fortificadas com 100 ng g ⁻¹ nos tempos 0 e 24 horas anteriores ao início dos ensaios. Exposição à radiação por 24 horas.	65
Figura 17. Áreas registradas nos cromatogramas para a MOX e ABA em amostras de solo RQo fortificadas imediatamente antes do início dos ensaios e extraídas em diferentes tempos (0, 24 e 48 horas) e temperaturas (temperatura ambiente e sob refrigeração). A=extração imediata após retirada da câmara, B=extração após 24 horas a temperatura ambiente, C=extração após 24 horas sob refrigeração, D=extração após 48 horas a temperatura ambiente e E=extração após 48 horas sob refrigeração. A barra de erros é referente aos valores máximo e mínimo dos resultados das duplicatas.	66

Figura 18. Recuperação de MOX e ABA a partir de lavagens das placas de Petri com acetonitrila e acetato de etila após 72 horas de contato com o solo fortificado.....	67
Figura 19. Perfil de dissipação de MOX no solo RQo exposto à radiação UV por 160 horas. Concentração inicial de MOX 100 ng g ⁻¹ . Temperatura de 25 ± 2 °C.	68
Figura 20. Perfil de dissipação de ABA no solo RQo exposto à radiação UV por 160 horas. Concentração inicial de MOX 100 ng g ⁻¹ . Temperatura de 25 ± 2 °C.	69
Figura 21. Comparação dos perfis de degradação de MOX em amostras de solo RQo expostas à radiação UV (amarelo) e amostras protegidas da radiação UV (azul) provenientes do Ensaio 2 com duração de 288 horas. Concentração inicial de MOX 100 ng g ⁻¹ . Temperatura de 25 ± 2 °C.....	70
Figura 22. Comparação dos perfis de degradação de ABA em amostras de solo RQo expostas à radiação UV (amarelo) e amostras protegidas da radiação UV (azul) provenientes do Ensaio 2 com duração de 288 horas. Concentração inicial de ABA 100 ng g ⁻¹ . Temperatura de 25 ± 2 °C.....	70
Figura 23. Comparação dos perfis de degradação de MOX em amostras de solo RQo esterilizado (azul) e não esterilizado (laranja) expostas à radiação UV provenientes do Ensaio 2 com duração de 288 horas. Concentração inicial de MOX 100 ng g ⁻¹ . Temperatura de 25 ± 2 °C.....	71
Figura 24. Comparação dos perfis de degradação de ABA em amostras de solo RQo esterilizado (azul) e não esterilizado (laranja) expostas à radiação UV provenientes do Ensaio 2 com duração de 288 horas. Concentração inicial de ABA 100 ng g ⁻¹ . Temperatura de 25 ± 2 °C.....	72

Figura 25. Comparação dos perfis de degradação de MOX em amostras de solo RQo não esterilizado expostas à radiação UV no Ensaio 1 (160 horas) e no Ensaio 2 (288 horas). Concentração inicial de MOX 100 ng g ⁻¹ . Temperatura de 25 ± 2 °C.	73
Figura 26. Comparação dos perfis de degradação de ABA em amostras de solo RQo não esterilizado expostas à radiação UV no Ensaio 1 (160 horas) e no Ensaio 2 (288 horas). Concentração inicial de ABA 100 ng g ⁻¹ . Temperatura de 25 ± 2 °C.	74
Figura 27. Linearização dos perfis de degradação para MOX e ABA em solo RQo não esterilizado a partir do modelo de pseudo-primeira ordem.	75
Figura 28. Comparação dos perfis de degradação de MOX a partir das amostras de solo LVe expostas à radiação e amostras protegidas da radiação em ensaio de 280 horas de duração.	76
Figura 29. Comparação dos perfis de degradação de ABA a partir das amostras de solo LVe expostas à radiação e amostras protegidas da radiação em ensaio de 280 horas de duração.	77
Figura 30. Comparação dos perfis de degradação de MOX e ABA a partir das amostras de solo LVe esterilizadas e não esterilizadas em ensaio de 280 horas de duração.	78
Figura 31. Comparação dos perfis de degradação de MOX e ABA a partir das amostras de solo LVe esterilizadas e não esterilizadas em ensaio de 280 horas de duração.	78
Figura 32. Linearização dos perfis de degradação para MOX e ABA em solo LVe não esterilizado a partir do modelo de pseudo-primeira ordem.	79
Figura 33. Estrutura da ABA e MOX.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da abamectina e moxidectina (Boisseau, 1995; EPA, 2017; Shoop <i>et al.</i> , 1995).	22
Tabela 2. Condições experimentais de aparatos para fotodegradação reportados na literatura.	32
Tabela 3. Condições utilizadas na quantificação de fármacos em matrizes ambientais	40
Tabela 4. Características das amostras de solo utilizadas.	47
Tabela 5. Parâmetros analíticos de quantificação de ABA e MOX.	49
Tabela 6. Parâmetros de monitoramento de íons m/z no espectrômetro de massas.....	50
Tabela 7. Parâmetros analíticos obtidos para os analitos MOX e ABA no solo RQo.....	60
Tabela 8. Parâmetros analíticos obtidos para os analitos MOX e ABA no solo LVe.....	61
Tabela 9. Correlação entre os tempos de meia vida e os valores de sorção para os analitos ABA e MOX em solo arenoso e argiloso.....	80
Tabela 10. Compilação dos dados obtidos para MOX e ABA.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Abamectina
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ACN	Acetonitrila
CMV	Comitê de Medicamentos Veterinários
CPV	Compêndio de Produtos Veterinários
CV	Coeficiente de Variação
DT₅₀	Tempo de Dissipação de 50% da Concentração Inicial (<i>Dissipation Time</i>)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMA	Agência Europeia de Medicamentos (<i>European Medical Agency</i>)
EMEA	Agência Europeia para a Avaliação de Produtos Medicinais (<i>European Agency for the Evaluation of Medical Products</i>)
EPA	Agência de proteção Ambiental dos Estados Unidos (<i>Environmental Protection Agency</i>)
EPR	Eprinomectina
ERA	Avaliação de Risco Ambiental (<i>Environmental Risk Assessment</i>)
FDA	Agência Norte Americana de Administração de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
ICH	Comitê Internacional de Harmonização (<i>International Council for Harmonization</i>)
LC₅₀	Concentração Letal para 50% da população estudada (<i>Lethal Concentration</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MOX	Moxidectina

OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>)
PAH	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>)
PLE	Extração por líquido pressurizado (<i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
THF	Tetraidrofurano
VICH	Cooperação Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Medicamentos Veterinários (<i>International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products</i>)
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência associada ao detector de massas sequencial (<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography with sequential mass detection</i>)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	17
I.1 A Produção Agropecuária e o Mercado de Medicamentos Veterinários ..	18
I.2 Avermectinas e Milbemicinas.....	20
I.3 Entrada e Disseminação de Fármacos Veterinários no Ambiente e Seus Impactos	23
I.4 Estudos de Estabilidade x Degradação	25
I.5 Princípios da Fotodegradação	28
I.6 Método da Camada Fina.....	30
I.7 Solo.....	33
I.8 Métodos Analíticos para Avaliar a Fotodegradação de Fármacos	37
CAPÍTULO II - OBJETIVOS	42
CAPÍTULO III - PARTE EXPERIMENTAL.....	44
III.1 Padrões, reagentes e solventes.....	45
III.2 Materiais	45
III.3 Equipamentos	45
III.4 Amostras de solo	46
III.5 Soluções Padrão.....	47
III.6 Método analítico.....	48
III.6.1 Preparo de amostra de solo.....	48
III.6.2 Curva analítica.....	48
III.6.3 Quantificação de abamectina e moxidectina em solos por UHPLC-MS/MS.....	49
III.6.4 Validação do método	50
III.7 Estudo da fotodegradação	51
III.8 Otimização das condições experimentais	52
III.9 Avaliação da fotodegradação.....	54
1º Ensaio – Solo RQo 160 horas	54
2º Ensaio – Solo RQo 288 horas	54
3º ensaio – Solo LVe 280 horas.....	55
CAPÍTULO IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
IV.1 Métodos analíticos.....	57

IV.2 Adaptação da câmara climática.....	62
IV.3 Estudos preliminares	64
IV.4 Fotodegradação.....	68
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES.....	85
CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1 A Produção Agropecuária e o Mercado de Medicamentos Veterinários

O Brasil desempenha um importante papel no agronegócio mundial sendo atualmente o maior exportador de carne bovina e de frango do mundo segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). A exportação de carnes é a terceira categoria mais rentável de exportações brasileiras, tendo rendido 12,65 bilhões de dólares em 2016 e ficando atrás apenas do comércio de grãos e minérios (MAPA, 2016; ABPA, 2017).

Em 2016 foram produzidas no Brasil 26,35 milhões de toneladas de carne e 35 bilhões de litros de leite, números que refletem um crescimento de 85% para a carne bovina e 285% para carne de frango nos últimos 22 anos. Neste ano, também foram produzidos mais de 7 milhões de toneladas de bovinos e 13 milhões de toneladas de frango (EMBRAPA, 2016).

Pesquisas genéticas, sistemas de produção especializados e o desenvolvimento de vacinas e medicamentos veterinários possibilitaram o grande crescimento na produção de proteína animal, atendendo também o rápido aumento da demanda interna e externa. Atualmente, o Brasil responde por 20% do mercado internacional de carnes, exportando produtos de origem animal para mais de 150 países (EMBRAPA, 2016).

A expansão da pecuária em nível mundial, principalmente com o aumento das criações intensivas, fez também aumentar o uso e, conseqüentemente, a produção de medicamentos veterinários, para fins profiláticos (administrados aos animais como forma de prevenção), metafiláticos (administrados a todos os animais de um lote quando alguns estão doentes) e terapêuticos (usados no tratamento de animais doentes), possibilitando a obtenção em larga escala de produtos de origem animal competitivos no mercado interno e externo (Boxall *et al.*, 2003; Díaz-Cruz *et al.*, 2003).

Apesar da importância do uso desses medicamentos para assegurar a produtividade e competitividade do setor, os resíduos gerados pela produção e descarte, muitas vezes feito de forma não apropriada dos medicamentos, e a partir de dejetos dos animais tratados podem impactar negativamente o ambiente (Boxall, 2004; Capleton *et al.*, 2006).

A indústria brasileira de medicamentos veterinários movimentou 5 bilhões de reais no ano de 2016, o que representa um crescimento de 72% quando considerado o período desde 2010. Desses, 31% representam o comércio de antiparasitários, 21% o de moléculas biológicas, 15% representam os agentes terapêuticos, 14% os antimicrobianos e 8% os suplementos (SINDAN, 2017). A Figura 1 mostra a distribuição das vendas de medicamentos veterinários por classe terapêutica no Brasil entre os anos de 2011 e 2016.

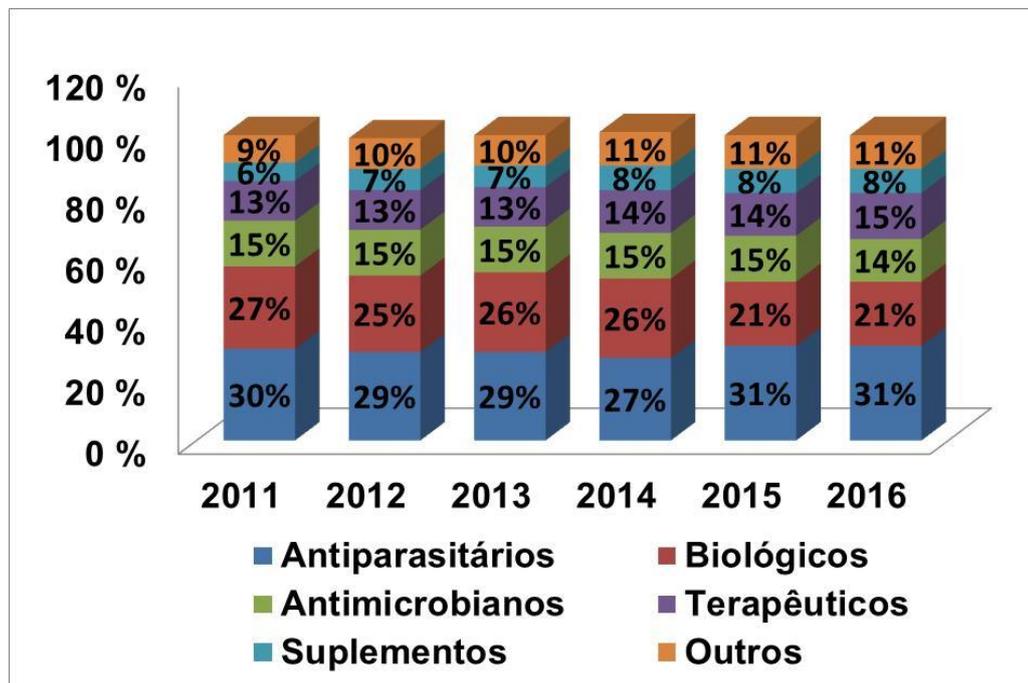


Figura 1. Distribuição do faturamento anual da indústria de medicamentos veterinários por classe terapêutica entre 2011 e 2016 (adaptado de SINDAN, 2016).

Os antiparasitários representam a classe de fármacos com a maior participação comercial no Brasil. O uso cada vez maior desses agentes terapêuticos se deve ao fato de que os parasitas não só reduzem a produtividade do setor pecuário como também aumentam a susceptibilidade dos animais a outras doenças causando um prejuízo de quase 18 bilhões de dólares anuais (EMBRAPA, 2013b).

As principais classes de fármacos utilizados como antiparasitários são os benzimidazóis, as pirimidinas e as lactonas macrocíclicas. As lactonas macrocíclicas, que compreendem as avermectinas e milbemicinas, representam o principal grupo de fármacos veterinários utilizados como endectocidas (antiparasitários que agem sobre parasitas internos e externos) no Brasil, já que

mais de 85% das formulações de endectocidas registradas no Compêndio de Produtos Veterinários (CPV) do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN) se referem a compostos contendo avermectinas (SINDAN, 2017).

Dos 159 produtos utilizados para o controle de parasitas internos e externos registrados no SINDAN atualmente, 137 correspondem a formulações contendo compostos da classe das avermectinas como a ivermectina, abamectina, eprinomectina, doramectina e selamectina, além da milbemicina moxidectina. Esses produtos são fabricados por 48 empresas e compreendem formulações de curta e longa duração podendo ser administrado aos animais por via oral, tópica ou intravenosa.

I.2 Avermectinas e Milbemicinas

As avermectinas e milbemicinas são lactonas macrocíclicas semissintéticas produzidas naturalmente no solo, a partir da nemadectina, um produto da fermentação realizada por microrganismos do gênero *Streptomyces*. Esses compostos são altamente eficazes contra espécies de nematóides e artrópodes atuando no sistema nervoso, através da inibição de neurotransmissores (Awasthi *et al.*, 2012; Gerenutti & Spinosa, 1997; Ômura, 2008; Shoop *et al.*, 1995). O mecanismo de ação das avermectinas tem sido estudado desde sua descoberta e, embora não seja ainda totalmente elucidado, sabe-se que se relaciona ao aumento da liberação do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico) nas células do sistema nervoso, além de se ligar nos canais de cloro ativados por glutamato aumentando a permeabilidade desses íons nas células nervosas e musculares. Nos dois casos, os sinais neurais são bloqueados levando à paralisia e subsequente morte dos parasitas vertebrados e invertebrados.

As avermectinas são produzidas em conjunto a partir da fermentação realizada pelo microrganismo *Streptomyces avermitilis* e seus principais representantes são a ivermectina, abamectina, eprinomectina, doramectina e selamectina. Já as milbemicinas são produtos dos microrganismos *Streptomyces hygroscopicus* ou *Streptomyces cyaneogriseus* e seu principal representante é a moxidectina.

As milbemicinas foram descobertas em 1973, porém seu potencial como inseticida e nematocida só foi totalmente conhecido após a descoberta das avermectinas e sua eficiente atividade contra insetos, ácaros e nematóides, em 1975 (Shoop *et al*, 1995).

As avermectinas foram introduzidas no mercado veterinário em 1981 e, em 1985, alguns de seus representantes, principalmente a abamectina, passaram a ser empregados também como agrotóxicos (Gerenutti & Spinosa, 1997). A descoberta da primeira avermectina e seus derivados rendeu, em 2015, o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia aos cientistas William C. Campbell e Satoshi Ōmura (Nobel Prize, 2015).

Entre os representantes dessa classe destaca-se a abamectina (ABA) (Figura 2a) que também tem sido amplamente usada como agrotóxico, e a moxidectina (MOX) (Figura 2b) que, apesar de estar no grupo das milbemicinas, possui características e comportamento muito semelhante às avermectinas.

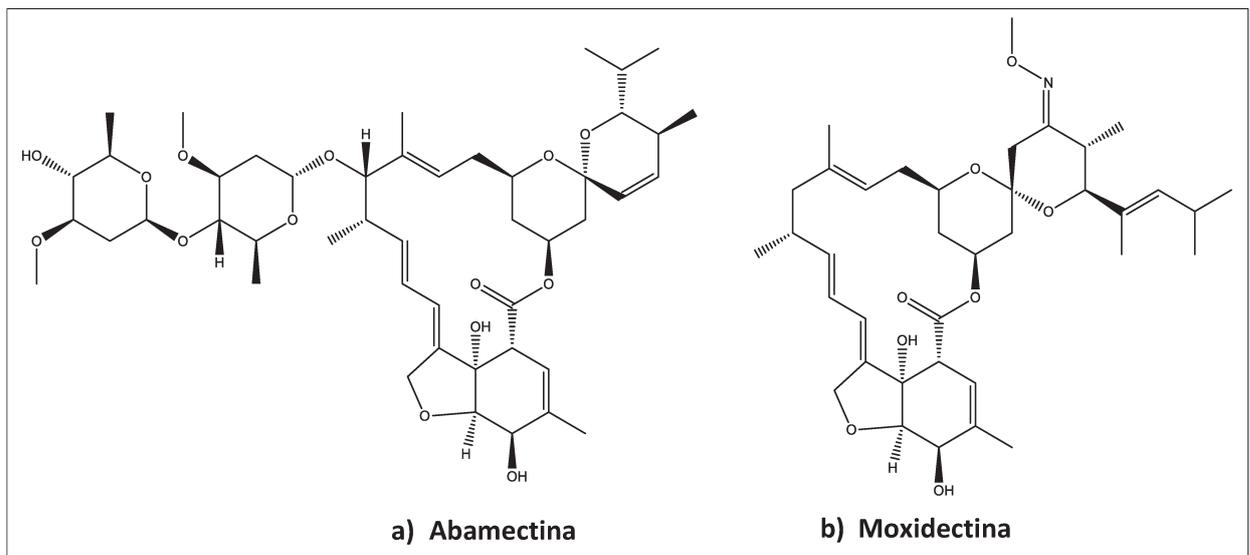


Figura 2. Estruturas moleculares da abamectina e moxidectina.

A moxidectina e a abamectina são compostos com amplo espectro de ação antiparasitária utilizada no controle de parasitas internos e externos em diversas espécies animais como gado, ovelhas e cães. Suas propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da abamectina e moxidectina (Boisseau, 1995; EPA, 2017; Shoop *et al.*, 1995).

	Abamectina	Moxidectina
Massa molar (g mol⁻¹)	873,1	639,8
Fórmula estrutural	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	C ₃₇ H ₅₃ NO ₈
pKa	Não descrito para 1 < pH < 12	<2
Coefficiente de partição n-octanol/água (log K_{ow})	4,4	6,4
Ponto de fusão (°C)	161,8 - 169,4	145 - 154
Pressão de vapor (torr)	5,8 x 10 ⁻¹¹	3,43 x 10 ⁻¹¹
Solubilidade em água (mg L⁻¹)	1,21	0,51

Além de ser um importante endectocida, administrado principalmente a bovinos, a abamectina é também amplamente utilizada como agrotóxico de aplicação foliar com a função de inseticida e acaricida em diversas culturas, como algodão, batata, ervilha, feijão e tomate, sendo a única avermectina registrada como agrotóxico no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esta pode ser comercializada nas formas de concentrado emulsionável, suspensão concentrada ou granulado dispersível.

Estudos farmacocinéticos mostraram que a MOX, quando aplicada a bovinos, se liga fortemente à gordura abdominal, rim e fígado desses animais, podendo ser encontrada nesses tecidos na sua forma inalterada até 28 dias após injeção subcutânea. Seus principais metabólitos são compostos mono- ou di-hidroxilados, porém até 90% dos resíduos encontrados na gordura de animais como bois, ovelhas e cavalos correspondem ao composto original inalterado (Awasthi *et al.*, 2013).

Da mesma forma, estudos da Agência Europeia para a Avaliação de Produtos Medicinais (EMA, *European Agency for the Evaluation of Medical Products*) mostraram que mais de 90% dos resíduos de ABA encontrados em fígado e rins de ovelhas se encontram na sua forma inalterada (EMA, 1999).

Após excretados no ambiente pelos animais tratados, as avermectinas e milbemicinas se ligam fortemente a solos, tanto argilosos como arenosos, devido ao seu alto valor de K_{oc}, apresentando baixa mobilidade na interface solo-água (Dionisio

& Rath, 2016; Ferreira *et al.*, 2016). A alta permanência desses compostos no solo pode afetar organismos não-alvo da fauna eudáfica como insetos e minhocas, e prejudicar a biota do solo (Awasthi *et al.*, 2012; Beynon, 2012; Diao *et al.*, 2007).

Ambos compostos podem ser degradados naturalmente no solo com um tempo de meia vida de até 2 meses produzindo vários metabólitos que são encontrados em baixas quantidades (menos de 10% em relação à quantidade do composto inicial).

Em ambiente laboratorial, experimentos com filmes finos de ABA e MOX mostraram que essa degradação pode ser acelerada em condições ácidas ou básicas, apresentando rotas diferentes dependendo do tratamento pelo qual são submetidas. Esses experimentos mostraram ainda, que filmes finos de ABA e MOX podem ser degradados na presença de luz, solar ou artificial, atingindo uma concentração de 20% em relação à concentração inicial em até 14 horas de exposição. Tal efeito é justificado pelo fato de que ambas as moléculas apresentam elevada taxa de absorção de radiação em comprimentos de onda menores do que 300 nm (Awasthi *et al.*, 2013; Fort Dodge, 1997).

I.3 Entrada e Disseminação de Fármacos Veterinários no Ambiente e Seus Impactos

Resíduos de fármacos veterinários podem atingir ambientes terrestres e aquáticos por diversas formas, a começar pelos resíduos gerados na sua produção e/ou estocagem quando indevidamente praticados, ou pela excreção dos animais tratados.

No caso da aquicultura, os fármacos são muitas vezes aplicados diretamente na água, causando contaminação direta, já que grandes quantidades são aplicadas a fim de garantir que todos os animais terão acesso à dose indicada para o tratamento. Outro método de administração de fármacos na aquicultura é mediante ração medicada. Na maioria dos casos o fármaco é disperso em um veículo oleoso e espalhada na ração já peletizada (processo de *top coating*). Em consequência o fármaco pode ser lixiviado da ração para a água, levando a contaminação do meio.

Quanto à criação de animais terrestres, os resíduos dos fármacos introduzidos no ambiente dependem da forma de aplicação, das características físico-químicas das moléculas, da espécie animal, do tipo e tempo de tratamento. O uso de esterco proveniente de animais medicados, para fins de adubação representa uma fonte

direta de introdução de fármacos no solo, levando assim a contaminação do mesmo. Os fármacos que são utilizados também como agrotóxicos, como no caso da abamectina, atingem diretamente o solo através da pulverização das plantações e podem ser transportados para águas superficiais através da ação das chuvas e vento, impactando o ambiente em vários compartimentos (Boxall *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2009).

Uma vez presentes no solo, os compostos podem ser lixiviados para corpos aquáticos ficando dissolvidos ou incorporados aos sedimentos (Regitano & Leal, 2010) ou podem ser degradados formando compostos que são geralmente menos tóxicos do que o composto original. No entanto, em alguns casos podem ser formados produtos de degradação mais tóxicos, como o caso da tetraciclina, cujos produtos de degradação podem ser tão ou até mesmo mais tóxicos que o composto original (Boxall, 2004; Halling-Sørensen *et al.*, 1998). Desta forma, destaca-se a importância da realização de estudos de degradação de fármacos para avaliação do impacto ambiental.

A avaliação do impacto ambiental requer, entre outros, estudos de toxicidade aguda e crônica, que devem ser conduzidos conforme procedimentos padronizados e descritos em Guias da OECD.

Ensaio de toxicidade aguda para abamectina e moxidectina foram realizados em diferentes espécies. Para a abamectina foi calculada uma concentração letal 50 (LC₅₀) de 15 µg kg⁻¹ de peso corporal para a espécie *Cyprinodon variegates* e de 0,25 µg L⁻¹ para *Daphnia magna* (Tišler & Eržen, 2006). Além disso, foi reportado que concentrações de abamectina menores que 8 µg kg⁻¹ de peso corporal interferem na reprodução de espécies de moscas e besouros que habitam solos contendo estrume (Lumaret *et al.*, 2012). A reprodução e o crescimento de minhocas da espécie *Eisenia fetida* é afetada por concentrações abaixo de 5 mg kg⁻¹ (Jensen *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2005), enquanto que espécies diferentes de camarão apresentam valores de LC₅₀ entre 0,022 e 430 µg kg⁻¹ (Lumaret *et al.*, 2012).

Para a moxidectina foram calculados valores de LC₅₀ de 37,2 mg kg⁻¹ para *Eisenia fetida* e 0,03 µg L⁻¹ para a *Daphnia magna* (Fort Dodge, 1997). Para a espécie *Onchorhynchus mykiss* (truta arco-íris) a LC₅₀ foi de 0,2 µg kg⁻¹ (FortDodge, 1997) não apresentando efeito tóxico para a maioria das moscas e besouros coprófagos estudados (Lumaret *et al.*, 2012).

Além da possibilidade de afetar os organismos não-alvo, outra crescente preocupação do aumento do uso de fármacos veterinários é o possível desenvolvimento de resistência por parte de bactérias e demais parasitas. Mesmo o uso de pequenas doses em tratamentos de longos períodos pode levar ao desenvolvimento de resistência. Por esse motivo, em 2006, foi proibido na Comunidade Europeia o uso de antimicrobianos veterinários administrados juntamente com a ração aos animais como promotores de crescimento.

I.4 Estudos de Estabilidade x Degradação

Para o registro de novos fármacos de uso humano e veterinário junto aos órgãos regulatórios são necessários estudos de estabilidade visando sua eficácia e segurança. Estes estudos envolvem as etapas entre a fabricação e o consumo, ou seja, a produção, o estoque e o transporte, expondo o fármaco a fatores como o calor, umidade, luz, e mudanças de pH seguindo parâmetros estabelecidos pelo Comitê Internacional de Harmonização (ICH) e pela agência responsável pela vigilância sanitária nos Estados Unidos - *Food and Drug Administration* (FDA).

Na Comunidade Europeia, além dos estudos de estabilidade, a avaliação do risco ambiental para a introdução de um novo medicamento veterinário no mercado tem sido discutida desde meados dos anos 90 e um primeiro documento de orientação sobre como realizar a avaliação de risco ambiental (ERA) de um novo medicamento foi preparado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) através do seu Comitê dos Medicamentos Veterinários (CMV) em 1997 (EMA, 1997). Após a versão final da EMA, uma harmonização internacional entre a Comunidade Europeia, os Estados Unidos e Japão, foi iniciada pela Cooperação Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Medicamentos Veterinários (VICH, *International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products*). Em 2004, foi publicada a Diretiva 2004/28/EC (EU, 2004) que define que as aplicações para novas autorizações precisam incluir uma avaliação de risco ambiental (exposição e ecotoxicidade) (Kools *et al.*, 2008).

No Brasil, porém, os estudos de estabilidade são obrigatórios apenas na fase de desenvolvimento de novos fármacos. Não é obrigatório que sejam estudados os efeitos de seus resíduos após a excreção, seu comportamento e efeitos no

ambiente. Para fármacos veterinários existem recomendações sobre os limites máximos de resíduos em produtos alimentícios como carne, leite e ovos a fim de assegurar a saúde do consumidor. Não existe, porém, legislação que estabeleça limites específicos para a concentração de fármacos no solo. Em 2001, a EMA determinou um limite genérico de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fármacos veterinários em solo, valor que foi estabelecido com base em estudos toxicológicos realizados com os princípios ativos autorizados nos Estados Unidos e está abaixo dos níveis prejudiciais observados em vários tipos de organismos.

A avaliação de risco ambiental envolve como uma de suas primeiras etapas os estudos físico-químicos e toxicológicos dos fármacos os quais incluem os estudos de sorção e dessorção do fármaco no solo, fotólise, hidrólise, biodegradação e efeitos causados a diversos tipos de organismos. Esses estudos, porém, têm sido realizados em países da América do Norte e Europa nos quais os tipos de solo e o clima possuem características distintas daquelas encontradas no Brasil, como é mostrado na Figura 3 e Figura 4.

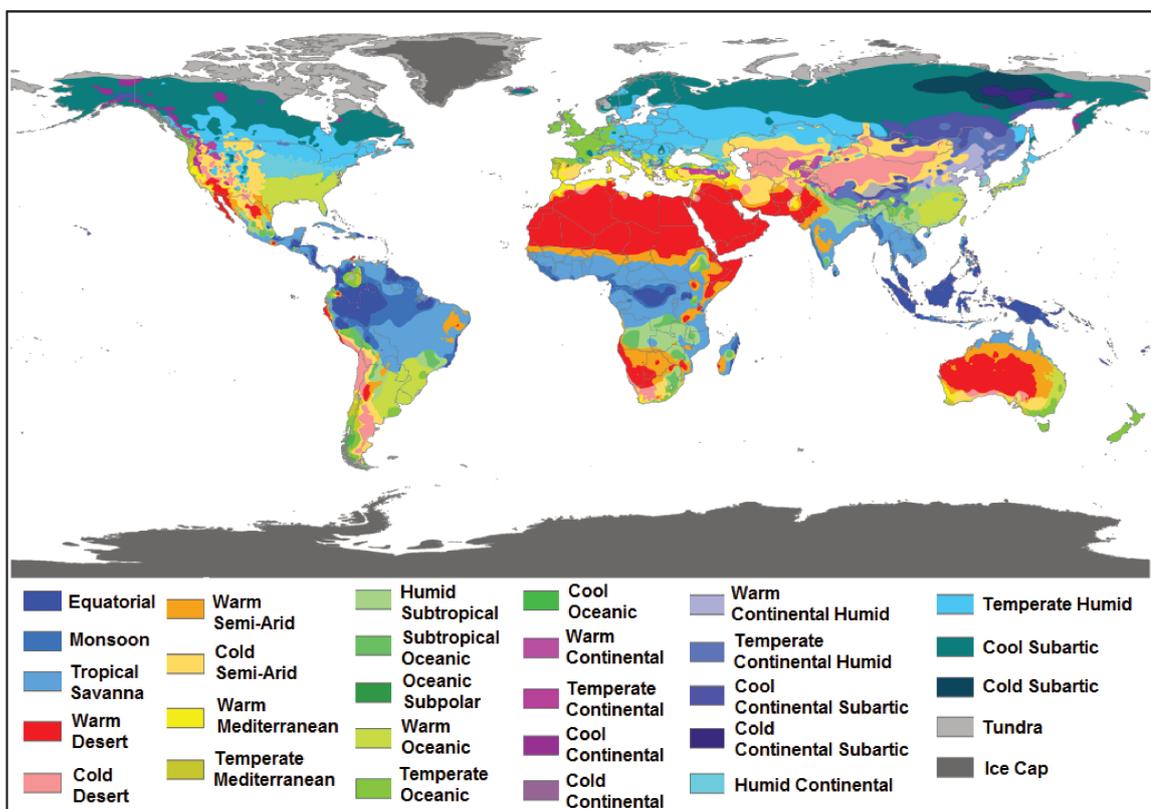


Figura 3. Diversidade de tipos de climas no mundo segundo a classificação de Köppen (Adaptado de Peel et al, 2007).

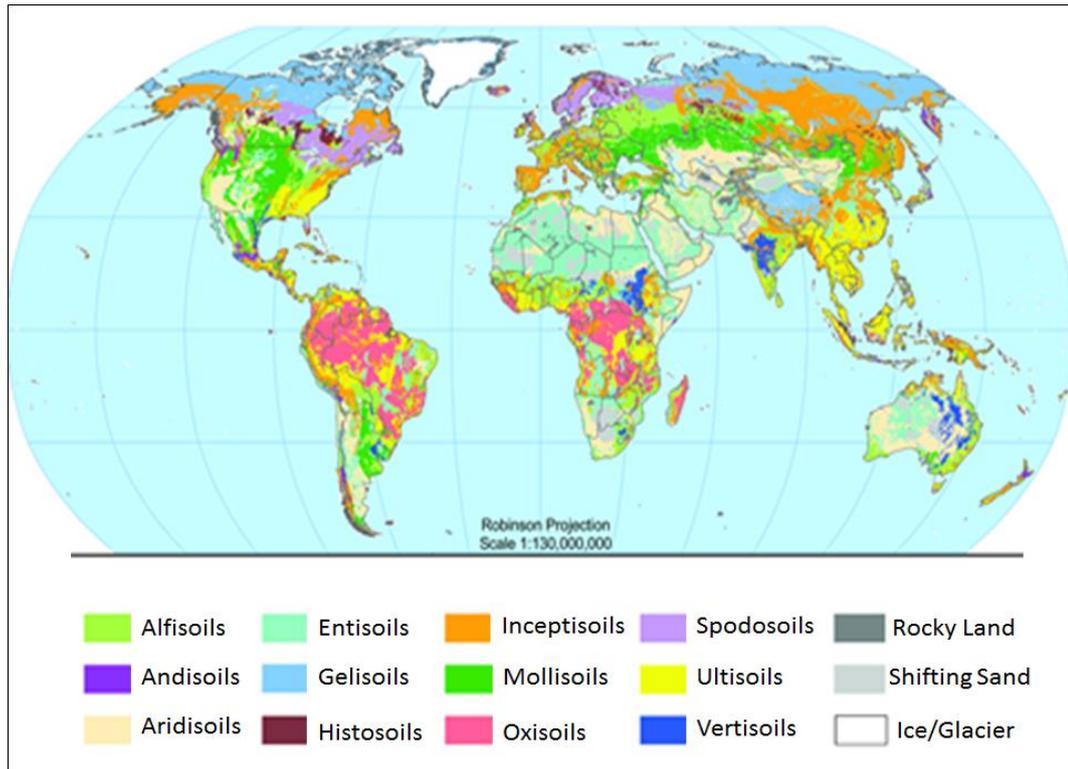


Figura 4. Diversidade de tipos e solos no mundo segundo a classificação do departamento de agricultura dos Estados Unidos USDA (*United States Department of Agriculture*) (Adaptado de USDA, 2005).

Nos países que seguem as recomendações do ICH predominam as pradarias e os solos podzólicos (atualmente chamados de argissolos) também presentes no Brasil, porém em menor quantidade, enquanto que no Brasil predominam os latossolos e as florestas tropicais.

Além disso, a grande exposição do território brasileiro à luz solar indica que a possibilidade da ocorrência de fotodegradação é muito grande havendo a necessidade de se conhecer seus mecanismos e consequências. Segundo o Atlas Brasileiro de Energia Solar, a média de incidência solar diária no país é de 4.500 Wh/m² a 6.300 Wh/m² dependendo da região considerada. A média anual brasileira (1.500-2.500 kWh/m²) é superior aos valores da maioria dos países da União Europeia, como Alemanha (900-1.250 kWh/m²), França (900-1.650 kWh/m²) e Espanha (1.200-1.850 kWh/m²) (Martins et al, 2008).

Os estudos de degradação em geral, são conduzidos em meio aquoso devido à maior facilidade de condução dos experimentos, da obtenção de amostras e da preocupação com a contaminação de água potável e possível prejuízo à saúde

humana. Alguns fármacos, porém, devido às suas características físico-químicas se ligam fortemente ao solo e/ou sedimentos, não sendo lixiviados e não podendo, portanto, ser encontrados em ambientes aquáticos, como no caso das avermectinas que apresentam baixa mobilidade no solo mostrada através de seu alto coeficiente de partição.

No entanto, poucos estudos em relação ao seu comportamento, à degradação e à presença de possíveis metabólitos e seus efeitos no solo são encontrados na literatura atualmente.

I.5 Princípios da Fotodegradação

Processos fotoquímicos ocorrem quando a radiação eletromagnética é absorvida e em seguida dissipada de alguma forma. A energia de ligação da grande maioria dos compostos orgânicos é semelhante à energia de fótons correspondentes à radiação ultravioleta numa faixa próxima de 300 nm, o que indica que esses compostos podem participar de reações fotoquímicas, sendo capazes de absorver energia necessária para clivar ligações levando à sua degradação. O espectro de absorção de cada molécula irá determinar a faixa de comprimentos de onda na qual ela é sensível (Tønnesen, 2004).

A presença de aromaticidade e ligações conjugadas em compostos orgânicos são geralmente associadas à capacidade de absorver energia eletromagnética, sendo que compostos coloridos absorvem comprimentos de onda na faixa do visível, apresentando coloração complementar à radiação absorvida e compostos brancos geralmente absorvem na faixa do ultravioleta (Ahmad *et al.*, 2016; Tønnesen, 2004).

Para os processos fotoquímicos, a faixa de radiação mais efetiva é a radiação UV, que pode ser dividida em três faixas: UVA, UVB e UVC (Moore, 1987).

- UVA é a faixa mais longa e mais próxima do espectro visível, compreendendo os comprimentos de onda entre 320 e 400 nm. É também a principal faixa de UV que chega à superfície terrestre e está relacionada com processos que envolvem a absorção direta de energia.

- UVB corresponde aos comprimentos de onda entre 280 e 320 nm. A intensidade de radiação UVB que atinge a superfície terrestre é muito pequena, porém é responsável pelas reações fotoquímicas de muitas moléculas.

- UVC é a faixa da radiação UV que é quase totalmente absorvida pelas camadas superiores da atmosfera. A incidência de radiação solar abaixo de 300 nm corresponde aproximadamente a 10 % do total de radiação do espectro solar, porém tem importante papel na fotoquímica devido aos danos causados em moléculas biológicas (Tønnesen, 2004)

Os processos de fotodegradação podem ocorrer a partir da absorção de radiação eletromagnética pela molécula alvo que é posteriormente degradada, ou a partir da absorção de radiação por outra molécula que seja capaz de absorver energia nas condições às quais estão expostas, denominada de fotossensibilizador, e que transfere a energia absorvida para a molécula alvo sendo ou não alterada no processo (Tønnesen, 2004).

Processos fotoquímicos são complexos e envolvem muitas reações que competem entre si e ocorrem muito rapidamente, nas quais o oxigênio desempenha um importante papel na transferência de elétrons. Esses processos se iniciam com absorção de fótons pela molécula ou agente sensibilizador, passando do estado fundamental para o estado excitado (Reação 1). O decaimento da energia absorvida pode ocorrer por diversos processos como descrito pelas reações 2 a 7 e representado pela Figura 5 (Ahmad *et al.*, 2016; Tønnesen, 2004; Moore, 1987).

Absorção	$D_0 + hv \rightarrow {}^1D$	(Reação 1)
Conversão interna	${}^1D \rightarrow D_0$	(Reação 2)
Fluorescência	${}^1D \rightarrow D_0 + hv'$	(Reação 3)
Fotoionização	${}^1D \rightarrow D^+ + e^-$	(Reação 4)
Cruzamento intersistemas ₁	${}^1D \rightarrow {}^3D$	(Reação 5)
Cruzamento intersistemas ₂	${}^3D \rightarrow D_0$	(Reação 6)
Fosforescência	${}^3D \rightarrow D_0 + hv''$	(Reação 7)

A partir da absorção da radiação, a molécula no seu estado fundamental passa para um nível de maior energia no qual os elétrons ocupam o primeiro nível superior disponível correspondendo ao primeiro estado excitado. Como o estado excitado é muito instável, a molécula tende a voltar ao seu estado fundamental rapidamente através da dissipação de energia (Ahmad *et al.*, 2016; Doll & Frimmel, 2003; Moore, 1987), um processo que geralmente ocorre em nanosegundos, durante o qual o

elétron excitado tem maior facilidade de ser removido e a molécula pode interagir com moléculas vizinhas. Esse processo, também chamado fotoionização, ocorre com maior facilidade quando maiores energias (menores comprimentos de onda) são absorvidas (Tønnesen, 2004).

A Figura 5 mostra os processos de dissipação de energia que ocorrem com elétrons em seu estado excitado. Essas reações competem entre si e ocorrem em nanossegundos. As características da molécula e do sistema em que ela se encontra determinarão a conversão preferencial.

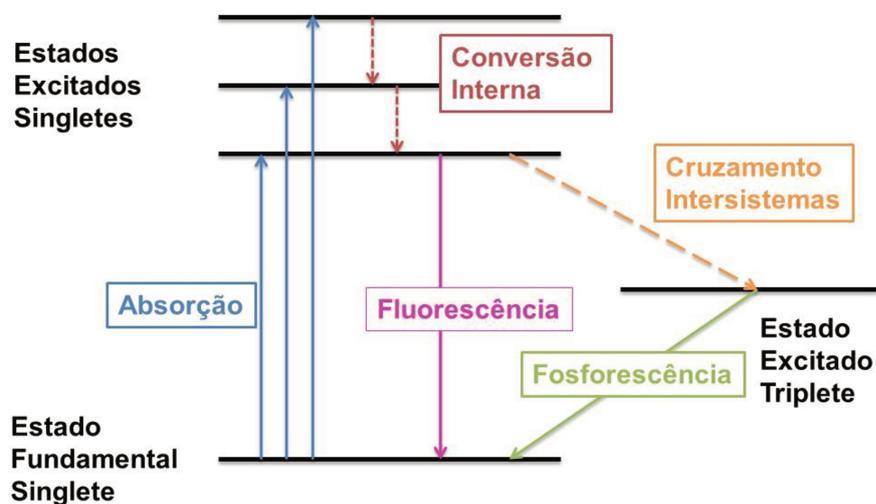


Figura 5. Diagrama de transição de elétrons mostrando as possíveis reações de absorção e liberação de energia (Adaptado de Moore, 1976).

Atualmente existem guias publicados por órgãos internacionais (EPA, 2008; OECD, 2002) com o intuito de padronizar e regulamentar testes de fotodegradação de fármacos em matrizes ambientais, avaliando o impacto não só de fármacos de uso humano, como também de uso veterinário no ambiente.

1.6 Método da Camada Fina

O método mais usado para realizar testes de fotodegradação de compostos em solo é o método da camada fina, no qual uma amostra de solo contendo o composto alvo é espalhada sobre uma superfície criando uma fina camada que é exposta à

radiação. Em tempos definidos, as amostras são analisadas quanto a concentração remanescente do composto no solo (Xu *et al.*, 2013).

De modo geral, moléculas que possuem ligações conjugadas e átomos aceptores de elétrons, são susceptíveis à fotólise. A maioria dos estudos reportados na literatura é referente à fotodegradação de agrotóxicos em solos. Foi demonstrado que as constantes de degradação do herbicida trifluralina são dependentes da espessura da camada de solo e da concentração inicial do analito (Balmer *et al.*, 2000).

Estudos realizados com solos com diferentes conteúdos de matéria orgânica levaram a tempos de meia vida da ordem de minutos para a atrazina (Gong *et al.*, 2001), enquanto que tempos de meia vida de até 18 dias foram relatados para a degradação de triadimefon através da exposição direta à luz solar (Nag & Dureja, 1996).

A fim de seguir os parâmetros estabelecidos pelas normas existentes, os experimentos de fotodegradação geralmente são realizados em câmaras de fotoestabilidade, na qual é possível manter umidade, temperatura e radiação controladas, simulando o ambiente externo. Existem modelos comerciais de câmara de fotoestabilidade certificadas, porém diversas configurações experimentais são usadas de acordo com os instrumentos disponíveis, segundo mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Condições experimentais de aparatos para fotodegradação reportados na literatura.

Lâmpada	Intensidade	Potência	Temperatura	Aparato	Umidade	Distância lâmpada - amostra	Diâmetro da placa	Espessura da camada de solo	Referência
Mercúrio	2790 $\mu\text{W cm}^{-2}$	1000 W	28 \pm 2 °C	Agitador	-	15 cm	8,7 cm	0,2 – 0,5 mm	Gong et al., 2001
UVA (253,7 nm)	119 – 357 $\mu\text{W cm}^{-2}$	20 W	25 °C	Câmara de fotodegradação anaeróbica	10 – 20%	45 cm	-	-	Xu et al., 2013
UVA (254 nm)	-	-	25 – 30 °C	-	-	30 cm	5 cm	2 mm	Nag et al., 1996
Xenônio (295 – 400 nm)	-	-	20 \pm 2 °C	-	75% da capacidade de campo	-	4 cm	2 mm	OECD, 2002
Xenônio (300 – 800 nm)	0,6 kW m ⁻²	1300 W	28 \pm 2 °C	Placas retangulares sobrepostas	50%	-	8 cm	0,01 – 0,45 mm	Balmer et al., 2000

Um dos fatores mais importantes é o controle da radiação incidida sobre as amostras, o que pode ser verificado com o uso de radiômetros, dispositivos fotocelulares que geram uma corrente elétrica quando incididos por fótons. A resposta depende do comprimento de onda da radiação incidente, porém o dispositivo pode ser construído e calibrado para determinado comprimento de onda a partir do filtro correspondente (Tønnesen, 2004).

Para a luz visível são utilizados luxímetros, dispositivos que medem a radiação percebida pelo olho humano, em unidades de iluminância. Para os testes de fotodegradação, é recomendado o uso de uma lâmpada internacionalmente reconhecida como um padrão que simula a radiação solar (ICH, 1996; ISO18909-2006), abrangendo todo o espectro UV e visível. No entanto, como a maioria dos fármacos absorvem apenas comprimentos de onda na região do UV (Ahmad *et al.*, 2016; Tønnesen, 2004), muitos trabalhos utilizam lâmpadas que emitem nesta região.

I.7 Solo

O solo é, por definição, a camada superficial da crosta terrestre. É formado pela ação do intemperismo sobre um material de origem cujas características finais dependem de fatores como o clima, o relevo, o tempo e ação de microrganismos.

É considerado um corpo não consolidado, constituído de três fases: sólida, líquida e gasosa. A fase sólida é composta por minerais e matéria orgânica e representa, em geral, a maior porcentagem em sua composição. A fase líquida é também chamada solução do solo e é constituída de água e sais solúveis. A fase gasosa é composta principalmente pelo ar atmosférico (Jenny, 1994; Schaetzl & Anderson, 2005). A Figura 6 mostra as proporções aproximadas desses componentes encontrados geralmente no solo.

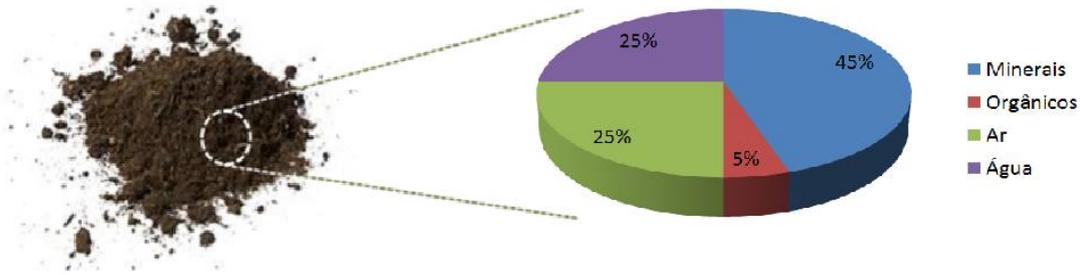


Figura 6. Proporção dos componentes do solo (adaptado de Nunes & Rezende, 2015).

O intemperismo sofrido por diferentes materiais resultam na formação de diferentes tipos de solo, cujas proporções de seus componentes influenciam suas características e propriedades.

De modo geral, o solo é composto por quatro camadas principais. A primeira é rica em matéria orgânica e mais adequada para o desenvolvimento de plantas devido à presença de água e sais minerais. A segunda camada é composta por sais minerais (calcário, argila e areia) e é a mais abundante em relação às demais. A terceira camada corresponde às rochas em decomposição e a quarta camada corresponde às rochas precursoras, chamadas rocha matriz (Lepsch, 2010).

O solo tem como principais funções o fato de servir como substrato para o crescimento das plantas, habitat de microrganismos e da fauna coprófaga, além do controle do fluxo de água e de sua qualidade.

A classificação dos solos pode ser feita a partir de sua granulometria, que é determinada pelas proporções de areia, silte e argila em sua composição. Essa classificação é feita a partir de diferentes classes texturais, conforme o diagrama apresentado na Figura 7.

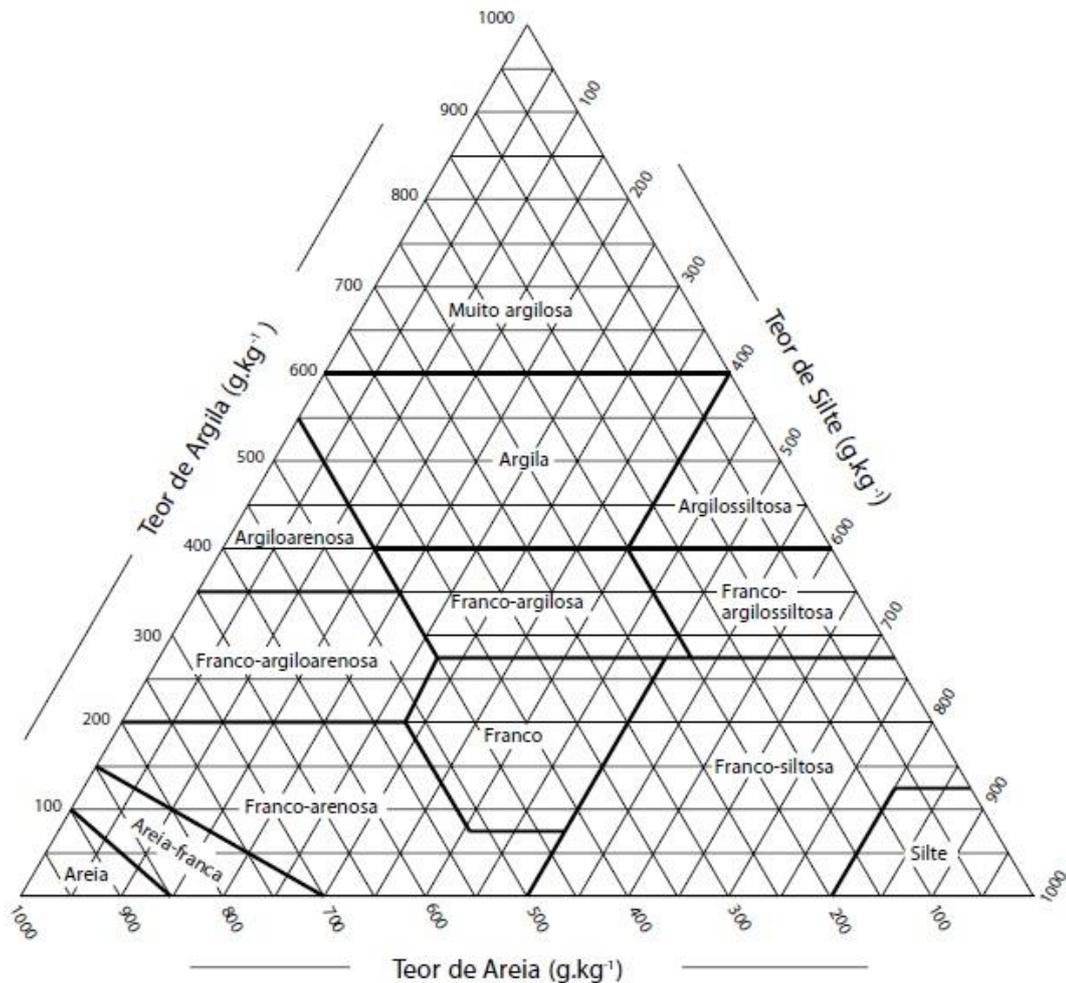


Figura 7. Classes texturais de solos de acordo com as frações de argila, silte e areia (IBGE, 2007).

Essas características influenciam na taxa de infiltração e armazenamento de água, na areação do solo e na distribuição de nutrientes, influenciando diretamente na fertilidade do solo (Nunes & Rezende, 2015).

Os solos arenosos são aqueles contém maior porcentagem da fração areia, apresentando textura granulosa. São formados principalmente por quartzo e minerais primários e são muito permeáveis à água (EMBRAPA., 2013; Nunes & Rezende, 2015).

Os solos argilosos são aqueles que têm maior porcentagem da fração argila, com partículas de tamanho menor que 0,002 mm (tamanho máximo de um colóide). Não são tão arejados, mas armazenam mais água quando bem estruturados. São geralmente menos permeáveis, embora alguns solos brasileiros muito argilosos apresentam grande permeabilidade - graças aos poros de origem biológica. São

compostos por óxidos de alumínio (gibbsita) e de ferro (goethita e hematita) (EMBRAPA, 2013; Nunes & Rezende, 2015).

Em 1999, foi publicado o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2013) revisado nas edições de 2006 e 2013 através de estudos realizados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Nesse sistema os solos são classificados em diferentes níveis de ordem, subordem, grande grupo, subgrupo, família e série de acordo com suas características físico-químicas como profundidade encontrada, granulometria, composição de areia/argila, capacidade de troca catiônica, atividade de bases, pH, entre outros.

No Brasil, segundo essa classificação, predominam os Latossolos e os Argissolos, representando respectivamente 40 e 20% da área total.

Os Latossolos são caracterizados por possuírem baixa capacidade de troca catiônica e pela presença de argilas com baixa atividade. São encontrados em camadas mais profundas em terrenos pouco acidentados e em regiões de clima tropical úmido. Esses solos tem alto grau de intemperização, são bem estruturados e muito porosos. Sua coloração amarela ou avermelhada se deve à presença de óxidos de ferro e alumínio (EMBRAPA., 2013; Nunes & Rezende, 2015).

Os Argissolos são constituídos principalmente por materiais minerais e argilas de alta atividade. Possuem baixa quantidade de matéria orgânica e grande quantidade de cascalho, resíduos de rochas resistentes ao intemperismo. Apresentam maior granulometria e são mais susceptíveis à erosão (EMBRAPA., 2013; Nunes & Rezende, 2015).

Além desses dois tipos de solo, podem ser encontrados também em grande quantidade no Brasil, solos do tipo Neossolos que são caracterizados pela presença de camadas distintas geradas em sua formação sendo bastante heterogêneos quando às suas propriedades. Possuem grande quantidade de areia e silte e assim apresenta baixa coesão e elevada permeabilidade sendo altamente susceptível à erosão (EMBRAPA, 2013; Nunes & Rezende, 2015).

A Figura 8 mostra a distribuição dos tipos de solo no Estado de São Paulo segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.

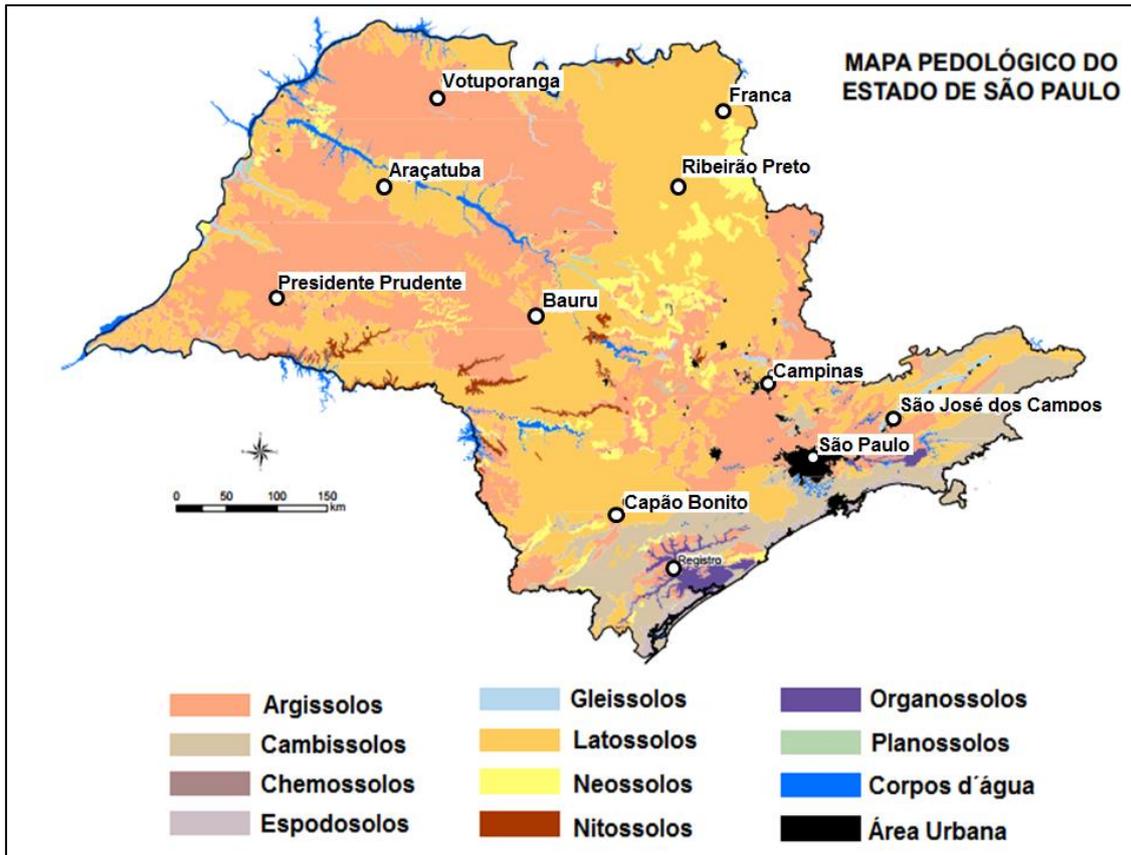


Figura 8. Mapa pedológico do Estado de São Paulo com os principais tipos de solo (Adaptado de Oliveira, 1999).

A partir do mapa mostrado na Figura 8 foi possível calcular que os argilossolos vermelho-amarelos cobrem 41,2% da superfície do Estado, os latossolos vermelhos 30,2%, os latossolos vermelho-amarelos 9,4% e os neossolos quartzarênicos 3,6% (Oliveira, 1999), sendo estes os principais tipos de solo encontrados no Estado de São Paulo.

I.8 Métodos Analíticos para Avaliar a Fotodegradação de Fármacos

A determinação dos resíduos de fármacos em solos durante o processo de fotodegradação ainda é um desafio devido às baixas concentrações dos analitos, à presença de produtos de degradação e pelo solo ser uma matriz complexa. Além disso, os testes devem ser conduzidos com uma concentração inicial em torno de 100 ng g^{-1} (Sturini *et al.*, 2012), o que requer o emprego de métodos analíticos de elevada detectabilidade e seletividade.

Diversas publicações sobre o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *high performance liquid chromatography*) para a determinação de avermectinas em matrizes ambientais podem ser encontradas na literatura (Danaher *et al.*, 2006; Dionísio & Rath, 2016; Ferreira *et al.*, 2016; Sheridan & Desjardins, 2006; Turnipseed *et al.*, 2005). Quando a técnica é associada a detectores não seletivos a análise de amostras provenientes de solo, sedimentos ou extratos vegetais, por exemplo, requer a eficiente separação entre os analitos alvos e possíveis interferentes da matriz na coluna analítica.

Devido às baixas concentrações de analitos normalmente encontradas em amostras ambientais, como solo, sedimentos ou extratos vegetais, por exemplo, estas devem passar por etapas de extração, limpeza dos extratos e uma pré concentração dos analitos antes de serem quantificados. No caso de amostras ambientais os métodos de extração mais utilizados são a extração sólido-líquido e a extração por líquido pressurizado (PLE – *Pressurized Liquid Extraction*), técnicas que garantem recuperações acima de 60% para compostos como as avermectinas (Krogh *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2012). Para os processos de limpeza (*clean-up*) e concentração dos analitos têm sido empregados procedimentos de extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) off-line (Speltini *et al.*, 2011) ou on-line (Ferreira *et al.*, 2016) ao sistema cromatográfico utilizando principalmente cartuchos ou colunas contendo como fases sorventes C8 ou C18.

Detectores UV-Vis apresentam baixa sensibilidade e seletividade na análise de amostras ambientais e são pouco recomendados para a quantificação de resíduos de fármacos nestas matrizes. Já os detectores de fluorescência alcançam menores limites de detecção do que os UV-Vis e maior sensibilidade. As avermectinas, embora necessitem de reação de derivatização para inserção de um fluoróforo, podem ser quantificadas por cromatografia líquida com detector de fluorescência com alta seletividade. As reações de derivatização, porém, podem introduzir interferentes na análise que podem co-eluir com os analitos de interesse e influenciar na identificação e quantificação dos compostos (Berendsen *et al.*, 2007).

O uso da espectrometria de massas associada à cromatografia líquida se mostra como uma ferramenta altamente eficiente na identificação e quantificação de avermectinas e milbemicinas. A separação dos analitos na coluna analítica e o monitoramento do íon precursor e íons produtos em um analisador do tipo triplo

quadrupolo permite a quantificação e confirmação de identidade dos analitos mesmo quando presente em baixas concentrações.

A separação de analitos apolares como no caso das avermectinas é realizada através da cromatografia de fase reversa, na qual os solventes mais utilizados são o metanol e a acetonitrila combinados com água contendo um aditivo a fim de promover a ionização dos analitos quando utilizado um detector de massas (Tišler & Eržen, 2006).

Devido à complexidade das matrizes ambientais as maiores dificuldades enfrentadas são a eficiência da extração dos analitos, já que é necessário extrair a maior quantidade possível do analito sem extrair os demais componentes da matriz e o efeito causado por esses componentes (efeito matriz) no qual a coeluição de interferentes com os analitos de interesse influencia na intensidade do pico obtido tornando-o menos ou mais intenso do que quando puro. O uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas é capaz, porém, de minimizar essas dificuldades promovendo resultados com alta sensibilidade e confiabilidade. Durden alcançou limites de detecção de até $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ na análise de avermectinas em amostras de leite utilizando esta técnica (Durden, 2007), já Brewer e colaboradores conseguiram minimizar o efeito matriz e obter uma sensibilidade oito vezes maior utilizando a espectrometria de massas sequencial em relação ao detector por UV Vis (Brewer *et al.*, 2004).

A Tabela 3 mostra as condições utilizadas na quantificação de fármacos em matrizes ambientais encontradas em trabalhos da literatura e os limites de detecção e quantificação obtidos.

Tabela 3. Condições utilizadas na quantificação de fármacos em matrizes ambientais.

Analito	Coluna	Fase Móvel	Aditivo	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Referência
Abamectina	C18	H ₂ O:ACN:THF 14:80:6 (v/v/v)	-	0,1 µg L ⁻¹	0,2 µg L ⁻¹	Novelli <i>et al</i> , 2012
Abamectina	C18	MeOH:ACN:H ₂ O 475:475:60 (v/v/v)	-	0,25 ng mL ⁻¹	-	Tišler & Eržen, 2006
Avermectinas	C8	MeOH:H ₂ O 1:3 (v/v)	Ácido fórmico	-	2,5 ng L ⁻¹ 0,5 ng g ⁻¹	Krogh <i>et al.</i> , 2008
Avermectinas/ Milbecinas	C18	H ₂ O:ACN 75:25 (v/v)	Ácido fórmico	0,06 ng g ⁻¹	0,18 ng g ⁻¹	Durden, 2007
Rotenona	C18	H ₂ O:ACN	Ácido trifluoroacético	0,01 mg L ⁻¹	0,015 mg L ⁻¹	Cavoski <i>et al</i> , 2007
Avermectinas/ Milbecinas	C18	H ₂ O:ACN	Acetato de amônio	0,5 ng mL ⁻¹	0,1 ng g ⁻¹	Ferreira <i>et al</i> , 2017

Motivação do Trabalho

Este trabalho visa contribuir com a elucidação dos processos que ocorrem com os resíduos de medicamentos veterinários após a deposição no solo avaliando o grau de degradação de compostos pertencentes a duas das principais classes de medicamentos utilizados como antiparasitários no manejo de animais.

Os compostos escolhidos apresentam alta sorção no solo devido à sua hidrofobicidade sendo, dessa forma, mais susceptíveis a transformações por fatores biológicos ou climáticos enquanto ligados ao solo. Os tipos de solos utilizados no trabalho são representativos do estado de São Paulo, onde se encontra grande parte da produção animal no Brasil.

A dissipação de avermectinas em solos característicos do Estado de São Paulo já foi realizada em trabalhos anteriores, nos quais foram estimados valores de DT_{50} de 3,5 dias para um solo arenoso e 1,1 dias para um solo argiloso (Dionisio & Rath, 2016).

No entanto, não existem informações sobre a influência da radiação sobre a degradação destes antiparasitários nos solos. Fato esse, que motivou o desenvolvimento deste trabalho.

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a avaliação da influência da radiação UV no processo de dissipação de antiparasitários da família das avermectinas e milbemicinas em solos característicos do estado de São Paulo.

Os objetivos específicos compreenderam:

- Adaptação de uma câmara climática para os estudos de fotodegradação.
- Otimização e validação de método para a determinação de resíduos dos fármacos em estudo nos solos, empregando, para tanto, a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial.
- Realização dos estudos de fotodegradação de abamectina e moxidectina em dois tipos de solos: arenoso e argiloso.
- Construção de curvas de dissipação e estabelecimento do tempo de meia vida (DT_{50}) dos dois compostos nos dois tipos de solo.

CAPÍTULO III - PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Padrões, reagentes e solventes

- Padrão de moxidectina (97,1%, Sigma-Aldrich, Alemanha)
- Padrão de abamectina B1a (98,7%, Fluka, Alemanha)
- Padrão de eprinomectina (96,8%, Sigma-Aldrich, Alemanha)
- Acetato de amônio (Merck, Alemanha)
- Acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich, China)
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker, Trinidad e Tobago)
- Ácido fórmico P.A. (Merck, Alemanha)

III.2 Materiais

- Lâmpada tubular negra LTTB-20 W (Lightex, China)
- Coluna cromatográfica Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm; 2,1 x 50 mm (Waters, Irlanda)
- Filtros de seringa 0,2 µm (Sartorius, Alemanha)
- Vials de 2 mL

III.3 Equipamentos

- Balança analítica modelo XT 220A com precisão de $\pm 0,1$ mg (Precisa, Suíça)
- Balança analítica modelo CPA 225D com precisão de $\pm 0,01$ mg (Sartorius, Brasil)
- Balança analítica modelo BG 1000 (Gehaka, Brasil)
- Banho de ultrassom modelo 1450 (Unique, Brasil)
- Bomba de vácuo modelo 089-CAL (Fanem, Brasil)
- Purificador de água modelo Milli-Q Academic (Millipore, EUA)
- Agitador de soluções tipo vórtex, modelo AP56 (Phoenix Luferco, Brasil)
- Centrífuga de bancada Rotofix 32 A (Hettich, Alemanha)
- Autoclave vertical modelo AV -75 (Phoenix Luferco, Brasil)
- Câmara Climática MA 835/UR (Marconi, Brasil)
- Radiômetro Serie 9811 (Cole-Parmer, EUA)

- Cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (UPLC-MS/MS) ACQUITY (Waters, EUA), equipado com um sistema de bombas binário, injetor automático, acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo Xevo TQD (Waters, EUA), com interface de ionização por eletronebulização (ESI). Os dados foram adquiridos e processados utilizando o programa computacional MassLynx (Waters, EUA).

III.4 Amostras de solo

Neste trabalho foram utilizados dois tipos de solo com características distintas. O primeiro foi um Neossolo Quartzarênico órtico (RQo), principal solo de textura arenosa encontrado no estado de São Paulo, e o segundo foi um Latossolo Vermelho eutrófico (LVe), solo argiloso com elevado teor de matéria orgânica e que cobre 30% do território do estado.

As amostras de solo RQo foram coletadas no município de Piracicaba – SP (latitude: 22° 33' 53,52" S, longitude: 47° 52' 06,32" O) e as amostras de solo LVe foram coletadas no município de Campinas – SP (latitude: 22° 51' 37.55" S, longitude: 47° 04' 34.30" O). Os solos foram coletados a uma profundidade de até 20 cm, secas, peneiradas em peneira de 2 mm de abertura da malha e armazenadas a temperatura ambiente até o momento de seu uso. As propriedades físico-químicas dos solos foram determinadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Características das amostras de solo utilizadas.

	RQo	LVe
pH	4	5
Matéria orgânica (g dm ⁻³)	13	32
Capacidade de troca catiônica – CTC (mmolc dm ⁻³)	24,2	66,4
Alumínio trocável (mmolc dm ⁻³)	5	0
Acidez total (mmolc dm ⁻³)	23	31
Soma de bases (mmolc dm ⁻³)	1,2	35,4
Granulometria		
Areia (%)	93,2	27,4
Silte (%)	1,7	12,4
Argila (%)	5,1	60,2
Micronutrientes		
Enxofre (mg dm ⁻³)	3	19
Cobre (mg dm ⁻³)	0,3	7,4
Ferro (mg dm ⁻³)	53	12
Zinco (mg dm ⁻³)	0,7	2,3

III.5 Soluções Padrão

Foram preparadas soluções estoques de MOX e ABA na concentração de 1000 µg mL⁻¹, pela dissolução dos respectivos padrões em acetonitrila. A partir destas soluções foram preparadas soluções padrão intermediárias, na concentração de 100 µg mL⁻¹, pela diluição da solução estoque em acetonitrila. As soluções de trabalho, na concentração de 10 µg mL⁻¹, foram preparadas pela diluição da solução intermediária em acetonitrila.

Da mesma forma foram preparadas três soluções do composto eprinomectina (EPR), nas mesmas concentrações a fim de se utilizar como padrão interno para as análises.

A estabilidade das soluções foi avaliada em trabalho anterior (Ferreira *et al.*, 2016). Todas as soluções foram mantidas em fracos âmbar sob refrigeração. As soluções estoque foram armazenadas a -18 °C por um período máximo de um ano;

as soluções intermediárias e de trabalho foram estocadas em geladeira (4 °C) por um período máximo de dois meses e duas semanas, respectivamente.

III.6 Método analítico

III.6.1 Preparo de amostra de solo

O preparo de amostras foi baseado em um procedimento já descrito em trabalho anterior desenvolvido no grupo de pesquisa (Ferreira *et al.*, 2016). Em resumo, uma quantidade de 5 g de solo branco (livre dos analitos em estudo) seco e peneirado, foi transferida para tubo Falcon de vidro e fortificada com 1 mL de uma solução contendo MOX e ABA preparadas em acetonitrila. A mistura foi agitada em vórtex por 1 min e deixada em repouso por 24 horas para incorporação dos analitos na matriz e evaporação do solvente.

A extração dos analitos foi realizada pela adição de 10 mL de metanol ao solo previamente fortificado, agitação em vórtex por 30 segundos, seguida de centrifugação por 5 min a 1046 *g*. O sobrenadante foi removido e transferido para outro tubo e o processo de extração foi repetido com uma nova adição de 5 mL de metanol. Os sobrenadantes foram combinados e o solvente foi removido sob fluxo de N₂ e aquecimento em banho de água a 60 °C.

Por fim, o resíduo foi resuspenso em 1 mL de acetonitrila, agitado em vórtex e filtrado (0,2 µm) diretamente para o vial. A quantificação foi realizada por curva na matriz usando EPR como padrão interno, sendo este adicionado sempre na concentração de 75 ng g⁻¹ antes do início do processo de extração.

III.6.2 Curva analítica

A curva analítica foi construída mediante fortificação das amostras de solo branco com os analitos (ABA e MOX) em seis níveis de concentração: 5, 25, 50, 75, 100 e 125 ng g⁻¹. A concentração do padrão interno (EPR) foi de 75 ng g⁻¹. O volume de solução contendo os padrões dos analitos assim como o volume de padrão interno adicionado foi de 500 µL para 5 g de solo. Todos os pontos foram preparados em duplicatas independentes. A extração dos analitos foi realizada conforme descrito no item III.6.1 e a quantificação conforme item III.6.3.

III.6.3 Quantificação de abamectina e moxidectina em solos por UHPLC-MS/MS

As condições utilizadas para a separação e detecção dos analitos no sistema UHPLC-MS/MS estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros analíticos de quantificação de ABA e MOX.

Condições cromatográficas	
Coluna analítica	Acquity UPLC ® BEH C18
Temperatura da coluna	40 °C
Volume de Injeção	2 µL
Fase móvel	Acetonitrila: acetato de amônio 5 mmol L ⁻¹ 70:30 (v/v)
Eluição	Modo isocrático
Vazão da fase móvel	0,5 mL min ⁻¹
Condições no espectrômetro de massas	
Vazão do gás de dessolvatação	N ₂ , 900 L h ⁻¹
Vazão do gás de ionização	N ₂ , 100 L h ⁻¹
Pressão do gás de colisão	Ar, 3,7x10 ⁻³ mbar
Temperatura da fonte	150 °C
Temperatura de dessolvatação	400 °C
Energia do capilar	3,5 kV

As condições utilizadas para monitorar a transição dos íons de interesse são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros de monitoramento de íons m/z no espectrômetro de massas.

Analito	Forma de ionização	Íon precursor (m/z)	Íons Produto (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (V)
Abamectina	[M+NH ₄] ⁺	890,5	567,4	24	14
			305,3	24	26
Moxidectina	[M+H] ⁺	640,4	528,3	23	9
			498,3	23	10
Eprinomectina	[M+H] ⁺	914,5	186,1	20	20
			330,2	20	14

III.6.4 Validação do método

O método para determinação de ABA e MOX em amostras de solo provenientes dos ensaios de degradação foi validado mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear de trabalho, linearidade, precisão intra- e inter-dias, exatidão, efeito matriz e limite de quantificação (LOQ).

A faixa linear e a linearidade foram estabelecidas por meio de curva analítica, em duplicata, em seis níveis de concentração (5, 25, 50, 75, 100 e 125 ng g⁻¹) a partir de amostras branco de solo fortificadas com os analitos ABA e MOX. Após avaliação da presença de possíveis valores extremos (*outliers*) pelo método dos resíduos padronizados e análise dos resíduos foi estabelecida a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados ordinários. A linearidade é expressa pelo coeficiente de correlação linear.

Para a avaliação da precisão foram efetuadas análises em replicatas do ponto médio da curva analítica na matriz branco do solo fortificada na concentração de 75 ng g⁻¹. A precisão intra-dias foi realizada pela análise da amostra fortificada, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento, em sextuplicata no mesmo dia e a precisão inter-dias em três dias diferentes, sendo sextuplicata no primeiro dia e triplicata nos outros dois dias. Os resultados foram expressos pelos coeficientes de variação (CV).

A exatidão foi avaliada pelo ensaio de recuperação a partir da fortificação de amostras branco do solo no ponto médio da curva analítica (75 ng g⁻¹). As análises

foram realizadas no mesmo dia e os resultados foram expressos pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a Equação 1.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Para avaliar o efeito matriz foram construídas duas curvas analíticas, uma com os analitos no solvente (acetonitrila) e outra pela fortificação do extrato (após extração sólido-líquido) do solo branco. Ambas as curvas foram feitas nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente e o efeito matriz (%) foi calculado para cada um dos analitos através da comparação das inclinações das duas curvas como descrito na Equação 2.

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \left(\frac{\text{inclinação da reta no extrato da matriz}}{\text{inclinação da reta no solvente}} - 1 \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

O limite de quantificação (LOQ) nos dois tipos de solo foi determinado através da fortificação de alíquotas de 5 g de solo da mesma forma como descrito no item III.6.1 porém utilizando concentrações decrescentes dos analitos até atingir a concentração na qual é observado no cromatograma da amostra um valor de relação sinal/ruído próximo a 10. Para avaliar o limite de quantificação foram utilizados 1 mL de solução de ambos os analitos (ABA e MOX) nas concentrações de 0,5 e 0,1 ng g⁻¹ para a fortificação de 5 g de solo.

III.7 Estudo da fotodegradação

Para realizar os testes de fotodegradação, foi utilizada uma câmara climática modelo MA 835/UR com controle de temperatura e umidade, no interior da qual foram acopladas duas lâmpadas tubulares negras LTTB-20 W com máximo do comprimento de onda de emissão em 365 nm (região do UVA). As lâmpadas foram dispostas horizontalmente na parte inferior da prateleira mais alta da câmara, fazendo com que a radiação incidisse sobre a prateleira logo abaixo, a qual foi utilizada para posicionar as amostras. A distância entre as lâmpadas e as amostras

foi de 15 cm. A prateleira acima das lâmpadas foi utilizada para avaliação da degradação dos analitos na ausência de luz.

Devido ao aumento da temperatura no interior da câmara causado pelo funcionamento contínuo das lâmpadas foi necessária a instalação de um trocador de calor na forma de uma serpentina de cobre acoplada a um banho de resfriamento a fim de manter a temperatura próxima à temperatura ambiente.

A intensidade de radiação incidida sobre cada região do interior da câmara foi medida usando um radiômetro. A câmara foi mapeada em relação à radiação e as amostras posicionadas nos locais onde foi verificada maior homogeneidade.

Para os estudos de fotodegradação foram utilizadas placas de Petri de 9cm de diâmetro sobre as quais, alíquotas de 5 g do solo em estudo, seco e peneirado, foram espalhados formando uma camada de, no máximo, 2 mm de espessura. A cada placa foram adicionados 700 μL de água nos experimentos com o solo RQo e 1,1 mL com o solo LVe a fim de atingir o valor de 55% da capacidade de retenção de água destes solos, segundo descrito no Guia OECD 307 (OECD, 2002). As amostras de solo foram, então, fortificadas utilizando 100 μL das soluções dos analitos estudados (MOX e ABA) para resultar em uma concentração de 100 ng g^{-1} . Os solos fortificados foram homogeneizados manualmente com uso de espátulas metálicas e compactadas a fim de formar uma camada homogênea sobre a placa.

Após serem expostas à radiação a temperatura de 25 ± 2 °C pelo período determinado dos experimentos, as amostras foram retiradas da câmara, envolvidas em papel alumínio e armazenadas em geladeira (aproximadamente 8 °C) até serem analisadas. Para a realização do procedimento de extração as amostras foram transferidas para tubos Falcon de vidro e fortificadas com 500 μL da solução padrão interno (EPR) na concentração de 75 ng g^{-1} . A extração dos analitos foi realizada conforme descrito em III.6.1 e a quantificação conforme item III.6.3.

III.8 Otimização das condições experimentais

Antes de começar o experimento de fotodegradação foram avaliados alguns fatores que poderiam influenciar os resultados: i) tempo de fortificação dos solos com os analitos alvos anterior aos ensaios de fotodegradação, ii) condições de armazenamento das amostras após a retirada da câmara e antes da análise

cromatográfica, iii) possível sorção dos analitos na superfície de vidro da placa de Petri. Os testes foram executados utilizando o solo RQo fortificado com os analitos do mesmo modo como já descrito anteriormente.

i) Tempo de fortificação anterior aos ensaios de fotodegradação: foram avaliados dois tempos de fortificação das amostras de solo antes de serem expostas à radiação, 0 e 24 horas. Para isso, alíquotas de 5 g de solo seco e peneirado foram espalhadas sobre placas de Petri de 9 cm de diâmetro, acrescidas de 700 μL de água purificada em sistema Mili-Q e fortificadas com 100 μL da solução de MOX e ABA em acetonitrila de modo que a concentração dos analitos fosse de 100 ng g^{-1} . As amostras foram homogeneizadas manualmente e espalhadas sobre a placa de Petri. As amostras que foram fortificadas 24h antes da realização dos ensaios foram deixadas em repouso a temperatura ambiente e envolvidas em papel alumínio. Em seguida, as amostras foram expostas à radiação por 24 horas. A extração dos analitos foi realizada conforme descrito em III.6.1 e a quantificação conforme item III.6.3.

ii) Condições de armazenamento das amostras após a retirada da câmara e anterior a análise cromatográfica: foram avaliados dois tempos e duas temperaturas: 24 e 48 horas a temperatura ambiente e 24 e 48 horas a 8 °C. Para isso, alíquotas de 5 g de solo seco e peneirado foram espalhadas sobre placas de Petri de 9 cm de diâmetro, acrescidas de 700 μL de água purificada em sistema Mili-Q e fortificadas com 100 μL da solução de MOX e ABA em acetonitrila. As amostras foram homogeneizadas manualmente e espalhadas sobre a placa de Petri. As amostras foram expostas à radiação por 24 horas, retiradas da câmara climática, envolvidas em papel alumínio e mantidas em repouso nas diferentes condições descritas. Os experimentos foram feitos em duplicata, sendo duas amostras extraídas imediatamente após a retirada da câmara para fins de comparação. A extração dos analitos foi realizada conforme descrito em III.6.1 e a quantificação conforme item III.6.3.

iii) Sorção dos analitos na superfície de vidro da placa de Petri: duas alíquotas de 5 g de solo seco e peneirado foram espalhadas sobre placas de Petri de 9 cm de

diâmetro, acrescidas de 700 μL de água filtrada em sistema Mili-Q e fortificadas com 100 μL da solução de MOX e ABA em acetonitrila. As amostras foram homogeneizadas manualmente, espalhadas sobre a placa de Petri, envoltas em papel alumínio e deixadas em repouso ao abrigo de luz por 72 horas. Todo o solo foi retirado e as placas de Petri foram lavadas com 2 volumes de 5 mL de acetonitrila e, em seguida, com 2 volumes de 2,5 mL de acetato de etila. Os solventes foram recolhidos separadamente, filtrados e analisados da mesma forma que as demais amostras. O solo foi transferido para tubos Falcon de vidro e a extração dos analitos foi realizada conforme descrito em III.6.1 e a quantificação conforme item III.6.3.

III.9 Avaliação da fotodegradação

1º Ensaio – Solo RQo 160 horas

A fim de se estudar a dissipação dos analitos na presença da radiação, foram preparadas 24 amostras de solo RQo branco fortificadas com os analitos na concentração de 100 ng g^{-1} . As amostras foram posicionadas na região de maior homogeneidade de incidência de radiação na câmara climática e incubadas a 25 ± 2 °C e 75% de umidade por 160 horas, sendo retiradas, em duplicata, nos tempos 15, 23, 39, 46, 53, 64, 70, 76, 86, 94, 110, 140 e 160 horas. As amostras foram analisadas por UHPLC-MS/MS conforme procedimento anteriormente descrito. Durante o período de permanência das amostras na câmara climática, a água perdida por evaporação foi repostada manualmente através de um borrifador.

2º Ensaio – Solo RQo 288 horas

Um segundo ensaio foi realizado incluindo amostras de solo RQo estéril. A esterilização do solo foi realizada em autoclave por 30 min a 121 °C.

Os ensaios foram feitos da mesma forma como no item anterior, porém usando o solo esterilizado e não esterilizado. As amostras foram incubadas da mesma forma como descrito anteriormente, porém por um período total de 288h (~14 dias) a fim de verificar o perfil de degradação por um período de tempo maior sendo retiradas, em duplicata, nos tempos 48, 96, 144, 192, 240 e 288 horas. Amostras de solo estéril e não estéril usadas como controle foram dispostas na região acima das lâmpadas, no

interior de caixas de papelão para que não recebessem incidência da radiação. Estas amostras controle também foram retiradas em intervalos de tempo determinados. O procedimento de extração e quantificação foi realizado conforme descrito nos itens III.6.1 e III.6.3.

3º Ensaio – Solo LVe 280 horas

O terceiro ensaio consistiu em repetir o mesmo procedimento realizado anteriormente utilizando desta vez, o solo LVe como substrato. Foram preparadas 24 amostras da mesma forma como descrito anteriormente sendo estas incubadas por um período total de 280 horas. As amostras foram retiradas em duplicatas nos tempos 24, 90, 138, 190, 240 e 280 horas. Foram incubadas também amostras de solo estéril e não estéril ao abrigo de luz, sendo estas também retiradas em intervalos de tempo determinados e analisadas como já descrito.

CAPÍTULO IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o perfil de fotodegradação da MOX e ABA nos solos arenoso e argiloso foi necessária a implementação e validação de um método analítico para a quantificação dos analitos nos solos e adaptação de uma câmara climática para desenvolver os estudos de fotólise.

O método analítico empregado neste trabalho foi baseado em um trabalho já desenvolvido anteriormente, que visava a determinação de abamectina, ivermectina, doramectina, eprinomectina e moxidectina em solos (Ferreira *et al.*, 2016). O método foi adaptado, uma vez que, neste trabalho, apenas foram quantificadas a abamectina e moxidectina. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos a seguir.

IV.1 Métodos analíticos

Devido às características físico-químicas da ABA e MOX, a complexidade da matriz e dos níveis de concentração a serem avaliados, a técnica de escolha foi a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência associada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS).

A extração de abamectina, ivermectina, doramectina, eprinomectina e moxidectina em três tipos de solo havia sido avaliada em trabalho anterior no grupo de pesquisa. Entre os solventes avaliados (acetato de etila, acetonitrila, acetona, diclorometano e metanol), o metanol foi o mais indicado, levando a recuperações superiores a 72% (Ferreira *et al.*, 2016). Sendo assim, neste trabalho o procedimento adotado foi baseado na extração da ABA e MOX com metanol, conforme o procedimento descrito item III.6. Não foi realizado *clean-up* adicional do extrato já que foi observada baixa influência de efeito matriz e este ainda é minimizado pelo uso da espectrometria de massas sequencial. O extrato foi apenas seco e ressuspenso em acetonitrila e injetado diretamente no sistema UHPLC-MS/MS.

A composição da fase móvel, bem como o uso dos aditivos e os parâmetros utilizados na detecção dos compostos também já haviam sido previamente estudados (Ferreira *et al.*, 2016). Foi verificado que o uso de metanol como fase móvel levava a um alargamento dos picos. Já com o uso de acetonitrila a intensidade do sinal analítico e o formato dos picos eram melhorados. Além disso, é

necessário o uso de um aditivo na fase móvel a fim de proporcionar a ionização dos analitos. As avermectinas, de modo geral, apresentam problemas na ionização usando a fonte de eletronebulização e posterior fragmentação na câmara de colisão, em particular quando adutos de sódio são formados. Na literatura são descritos, entre outros, o uso de aditivos como ácido fórmico (Pozo *et al*, 2006), formiato de amônio e acetato de amônio (Lorenzo *et al*, 2012) a fim de evitar a formação de adutos metálicos, o que poderia dificultar a fragmentação das moléculas no espectrômetro de massas e, portanto, interferir na sua detecção além de evitar a formação de adutos a partir de resíduos ionizados da matriz, evitando assim as interferências na quantificação dos analitos.

Para a ABA foi observada maior sensibilidade quando utilizado acetato de amônio, em comparação com ácido fórmico na presença de acetonitrila. Sendo assim, para a ABA foi monitorado o aduto de amônio. Para os outros dois analitos, a MOX e a EPR, foram monitorados os íons protonados.

A separação dos analitos foi conduzida em uma coluna de fase reversa C18 utilizando como fase móvel uma mistura de solução aquosa de acetato de amônio 0,1% m/v e acetonitrila. A quantificação foi realizada através do monitoramento de reações selecionadas (SRM), usando uma transição de quantificação e outra de confirmação de identidade. As transições monitoradas estão apresentadas na Tabela 5 no item III.6.3.

Um cromatograma característico da análise do solo RQo fortificado com ABA e MOX na concentração de 50 ng g⁻¹ está apresentado na Figura 9. A eprinomectina foi empregada como padrão interno e se mostrou adequada para essa finalidade.

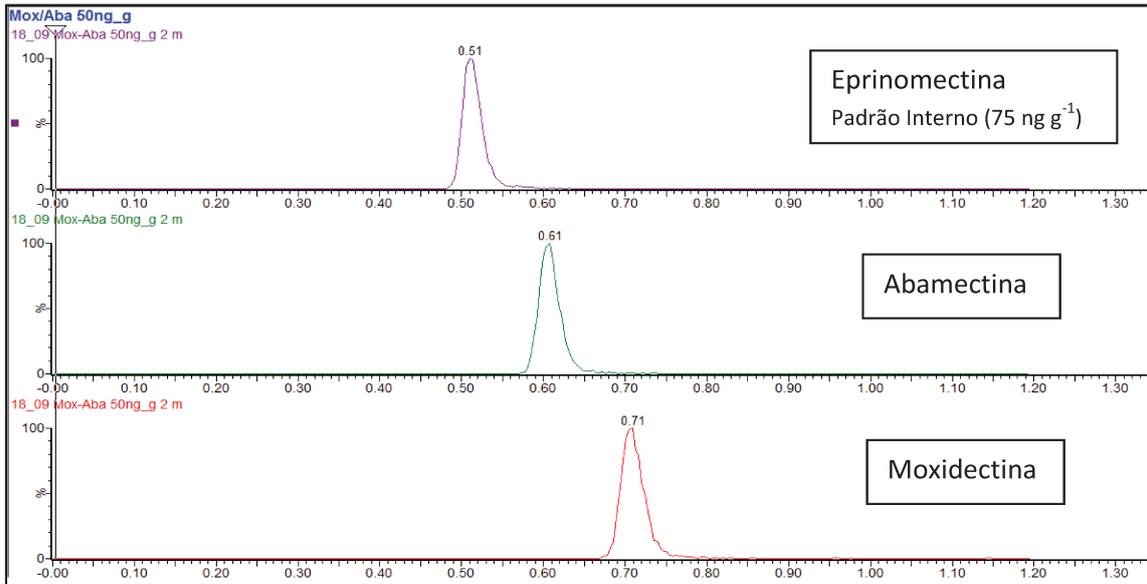


Figura 9. Cromatogramas (SRM) das amostras branco de solo RQo fortificadas com solução de ABA e MOX em acetonitrila, na concentração de 50 ng g^{-1} , empregando coluna cromatográfica Acquity UPLC® BEH C18 $1,7 \mu\text{m}$; $2,1 \times 50 \text{ mm}$, fase móvel ACN: NH_4Ac 0,1% em água, 90:10 (v/v) em modo isocrático, vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $2 \mu\text{L}$.

Não existe uma definição do nível de concentração que deve ser empregado para estudos de fotodegradação de fármacos veterinários em solos. No entanto, uma concentração genérica de 100 ng g^{-1} tem sido adotada seguindo a recomendação da EMEA para o limite máximo de resíduos de fármacos veterinários em solos (EMEA, 2008). Considerando que teores de 1 a 10% do teor inicial do fármaco teste deveriam ser passíveis de ser quantificados nos solos, curvas analíticas de 5 a 125 ng g^{-1} foram construídas para avaliar a linearidade nesta faixa de concentração. Devido ao inerente efeito matriz e neste caso supressão de sinal, as curvas foram todas construídas mediante fortificação da matriz branca do solo. Para avaliar a ausência dos analitos nos solos coletados estes foram preliminarmente analisados. Como padrão interno foi empregado a EPR. Na Figura 10 e Figura 11 são mostradas as curvas analíticas da ABA e da MOX obtidas para o solo RQo utilizando a EPR como padrão interno e seus respectivos gráficos de resíduos.

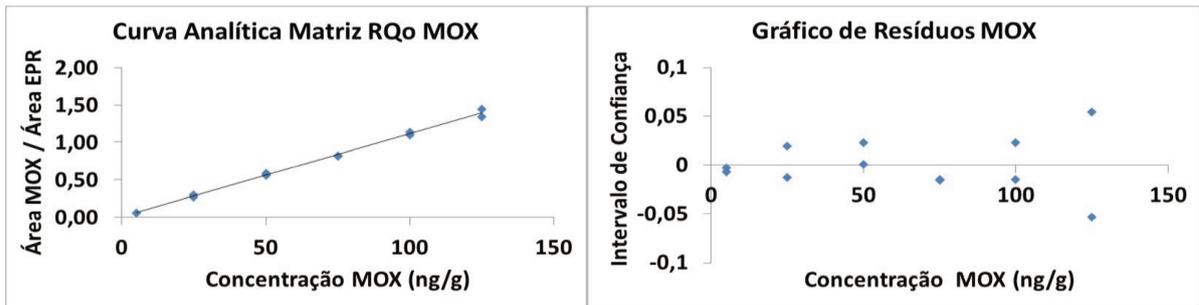


Figura 10. Curva analítica utilizando o solo RQo branco fortificado em seis níveis de concentração para MOX e seu respectivo gráfico de resíduos.

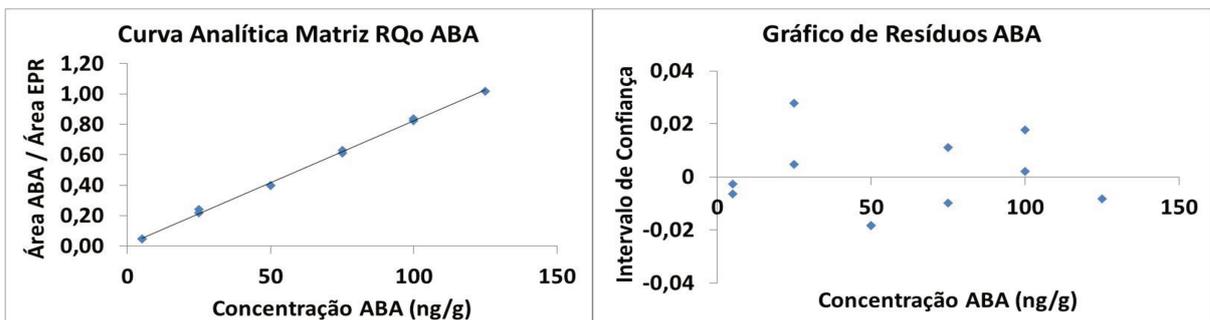


Figura 11. Curva analítica utilizando o solo RQo branco fortificado em seis níveis de concentração para ABA e seu respectivo gráfico de resíduos.

Os valores de faixa linear, coeficiente angular (sensibilidade) e coeficiente de correlação linear (linearidade, r) são mostrados na Tabela 7, assim como os demais parâmetros de validação do método.

Tabela 7. Parâmetros analíticos obtidos para os analitos MOX e ABA no solo RQo.

		Moxidectina	Abamectina
Faixa linear de trabalho		5 -125 ng g ⁻¹	5 -125 ng g ⁻¹
Coeficiente angular (s_b)		0,0111 (0,0002)	0,0084 (0,0001)
Coeficiente linear (s_a)		0,01 (0,01)	0,010 (0,008)
Linearidade (r)		0,9983	0,9971
Precisão	Intra-dias, n=6	8,4%	1,5%
	Inter-dias, n=12	16,7%	2,4%
Exatidão		113%	90%
Efeito Matriz		16%	5%
Limite de quantificação		0,5 ng g ⁻¹	0,5 ng g ⁻¹

s: estimativa do desvio padrão.

O mesmo procedimento foi realizado empregando o solo LVe. As curvas analíticas obtidas para ABA e MOX e seus gráficos de resíduos são mostrados nas Figura 12 e Figura 13 os parâmetros de validação na Tabela 8. Parâmetros analíticos obtidos para os analitos MOX e ABA no solo LVe.

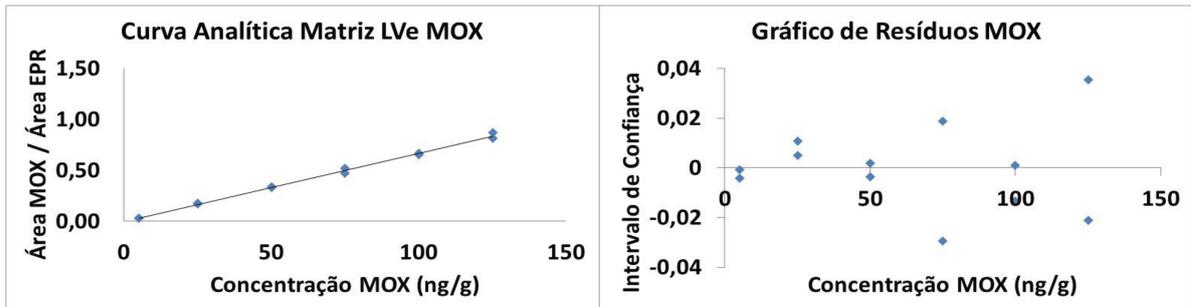


Figura 12. Curva analíticas utilizando o solo LVe branco fortificado em seis níveis de concentração para MOX e seu respectivo gráfico de resíduos.

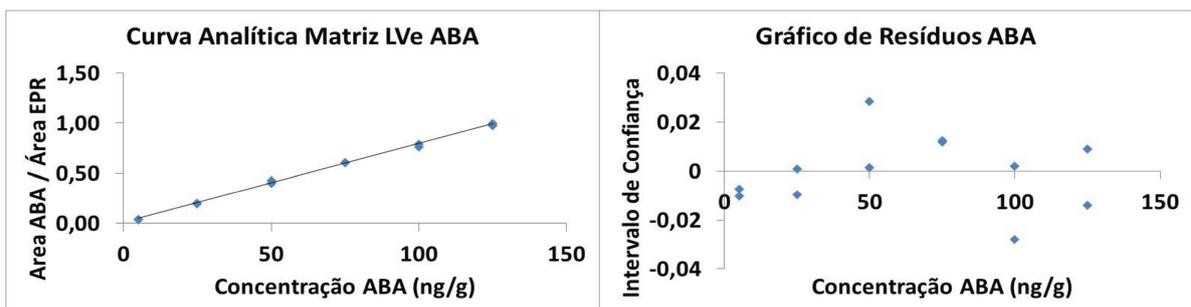


Figura 13. Curva analítica utilizando o solo LVe branco fortificado em seis níveis de concentração para ABA e seu respectivo gráfico de resíduos.

Tabela 8. Parâmetros analíticos obtidos para os analitos MOX e ABA no solo LVe.

		Moxidectina	Abamectina
Faixa linear de trabalho		5 -125 ng g ⁻¹	5 -125 ng g ⁻¹
Coeficiente angular (s _b)		0,0067 (0,0001)	0,0078 (0,0001)
Coeficiente linear (s _a)		0,0002 (0,0009)	0,0117 (0,0082)
Linearidade (r)		0,9982	0,9990
Precisão	Intra-dias, n=6	3,9%	4,3%
	Inter-dias, n=12	3,2%	3,4%
Exatidão		109%	111%
Efeito Matriz		18%	5%
Limite de quantificação		0,5 ng g ⁻¹	0,5 ng g ⁻¹

s: estimativa do desvio padrão.

Os coeficientes de correlação linear (r) resultaram em valores acima de 0,99 para ambos os analitos nos dois solos estudados e os gráficos de resíduos mostram uma distribuição aleatória dos resíduos sem evidência de tendências. A precisão do método, avaliada pela análise de replicatas em um mesmo dia e dias diferentes, com amostras branco de solo fortificadas com ABA e MOX a um nível de concentração de 75 ng g^{-1} , foi menor do que 17% e pode ser considerada aceitável para o nível de concentração avaliado, a complexidade da matriz e os objetivos pretendidos. Pela equação de Horwitz, o coeficiente de variação para a precisão interlaboratorial aceitável para a faixa de concentração de 10 e 100 ng g^{-1} é de até 20%.

A exatidão do método, calculada pelo teste de recuperação e expressa pela porcentagem de recuperação média ($n = 6$) de solo branco fortificado com os analitos a uma concentração de 75 ng g^{-1} , foi de 113% para a MOX e 90% para a ABA no solo RQo e 109% para a MOX e 111% no solo LVe.

A partir das curvas analíticas utilizando o solvente e o extrato da matriz fortificado, foi possível calcular o efeito matriz, obtendo-se os valores de 16% para a MOX e 5% para a ABA no solo RQo e 18% para a MOX e 5% para a ABA no solo LVe. Esses resultados indicam que a coextração de substâncias da matriz que pudessem afetar a ionização dos analitos na fonte de eletronebulização foi baixa.

IV.2 Adaptação da câmara climática

Para os processos fotoquímicos, a faixa de radiação mais efetiva é a radiação UV, que pode ser dividida em três faixas: UVA, UVB e UVC, sendo que UVA é a faixa mais longa e mais próxima do espectro visível, compreendendo os comprimentos de onda entre 320 nm e 400 nm. Essa faixa espectral, também, é a principal faixa de radiação UV que chega à superfície terrestre e está relacionada com processos que envolvem a absorção direta de energia (Moore 1987). Radiação UVB e UVC, apesar de serem mais energéticas e, portanto, mais passíveis de realizar fotólise, consistem em apenas 10% da faixa de radiação que atinge a superfície terrestre. Dessa forma, no presente experimento, foram utilizadas duas lâmpadas negras de 20 W com máximo de emissão em 365 nm (região do UVA).

O espectro de emissão das lâmpadas utilizadas foi obtido através de um espectrômetro do tipo S2000. A Figura 14 mostra o pico de emissão da radiação UV em 365 nm.

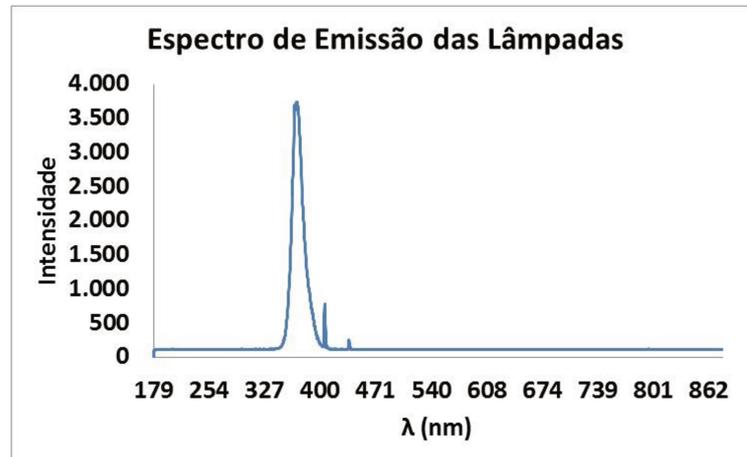


Figura 14. Espectro de emissão das lâmpadas UVA.

As lâmpadas foram posicionadas na parte superior interna da câmara climática como mostrado na Figura 15. O funcionamento contínuo das lâmpadas fez aumentar a temperatura no interior da câmara, e a mesma não foi capaz de manter constante a temperatura durante os estudos. Dessa forma, foi inserido um trocador de calor na forma de uma serpentina de cobre acoplado a um banho de resfriamento, o qual foi programado nas condições que pudesse manter a temperatura interna da câmara em 25 ± 2 °C. Durante os experimentos a temperatura foi medida em tempos regulares por um termômetro inserido na prateleira no nível em que foram posicionadas as amostras durante o experimento.

Foi realizado um mapeamento das intensidades de radiação obtidas no interior da câmara utilizando um radiômetro. Foi obtida uma média de intensidade de $0,8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ na região logo abaixo e entre as lâmpadas. Esses locais foram escolhidos para o posicionamento das amostras, ficando estas a uma distância de 15 cm das lâmpadas.



Figura 15. Foto da câmara climática com o trocador de calor e as lâmpadas fixadas na prateleira superior.

IV.3 Estudos preliminares

Para avaliar a fotodegradação dos antiparasitários no solo é necessário fortificar o mesmo previamente com os analitos a fim de que ocorra a incorporação destes na matriz, porém não deve ocorrer durante este tempo de degradação dos mesmos devido a fatores como a presença de microrganismos, ou temperatura. Sendo, assim, foram realizados ensaios preliminares para definir as condições experimentais e garantir a confiabilidade dos resultados.

Foi avaliado o tempo de fortificação das amostras de solo com ABA e MOX antes do início dos ensaios de fotodegradação a fim de verificar se ocorreria degradação dos analitos devido à ação de microrganismos ou calor durante o tempo de repouso, confirmando assim a possibilidade de as amostras serem fortificadas 24 horas antes de serem dispostas na câmara.

Foram avaliadas também condições de armazenamento das amostras após a retirada da câmara a fim de avaliar a possibilidade de ocorrência de degradação dos analitos quando armazenadas por até 48 horas, confirmando também a possibilidade de as amostras serem armazenadas por 48 horas antes de serem analisadas.

O último teste avaliou a possibilidade de ocorrer a adsorção dos analitos na superfície da placa de Petri já que as avermectinas apresentam alta afinidade por

superfícies poliméricas como demonstrado por Dionísio e Rath, que observaram que até 90% da quantidade inicial de ABA pode ficar retida em superfícies de polipropileno ou politetrafluoroetileno (Dionísio & Rath, 2016). Dessa forma foi necessário garantir que não haveria perdas dos analitos por adsorção nas placas de Petri durante o ensaio.

Os resultados dos testes são apresentados e discutidos a seguir.

1. Tempo de fortificação das amostras de solo com ABA e MOX anterior aos ensaios de fotodegradação: foram avaliados dois tempos de fortificação dos solos (100 ng g^{-1}) antes das amostras serem colocadas na câmara: 0 e 24 horas. Após esse período as amostras foram expostas a radiação por um tempo de 24 horas, retiradas da câmara e analisadas por UHPLC-MS/MS. Como padrão interno para a quantificação foi empregada a EPR que foi adicionada na concentração de 75 ng g^{-1} após a retirada das amostras da câmara. Para fins de comparação os resultados foram apresentados como a razão da área do analito pela área do padrão interno e estão mostrados na Figura 16.

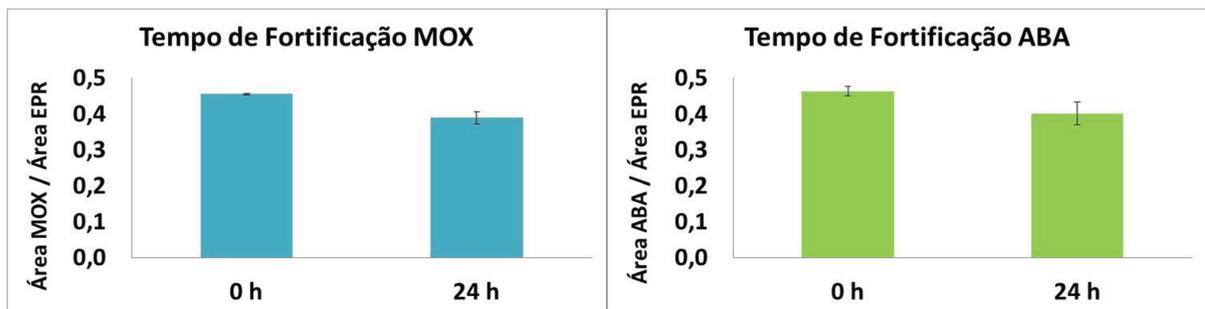


Figura 16. Razão entre as áreas registradas nos cromatogramas para a MOX e ABA e a área do padrão interno para as amostras de solo RQo fortificadas com 100 ng g^{-1} nos tempos 0 e 24 horas anteriores ao início dos ensaios. Exposição à radiação por 24h.

É possível observar que após 24 horas houve uma pequena diminuição da concentração dos analitos nos solos. No entanto, essa diminuição se encontra dentro da margem de precisão do método analítico para análises realizadas em dias diferentes (em torno de 20%), podendo ser considerada estatisticamente não significativa. Mesmo assim, por questões práticas, os ensaios posteriores foram

realizados a partir da fortificação das amostras imediatamente antes do início dos experimentos.

- Condições de armazenamento das amostras após a retirada da câmara e anterior a análise cromatográfica: foram avaliados também, dois tempos e duas temperaturas de armazenamento após a retirada das amostras da câmara: 24 e 48 horas a temperatura ambiente e 24 e 48 horas sob refrigeração (4 °C). Esses resultados são importantes para definir como as amostras devem ser armazenadas e por quanto tempo podem ser mantidas após a realização dos ensaios de fotodegradação sem que haja uma pós-degradação dos analitos na matriz. Os resultados são mostrados na Figura 17.

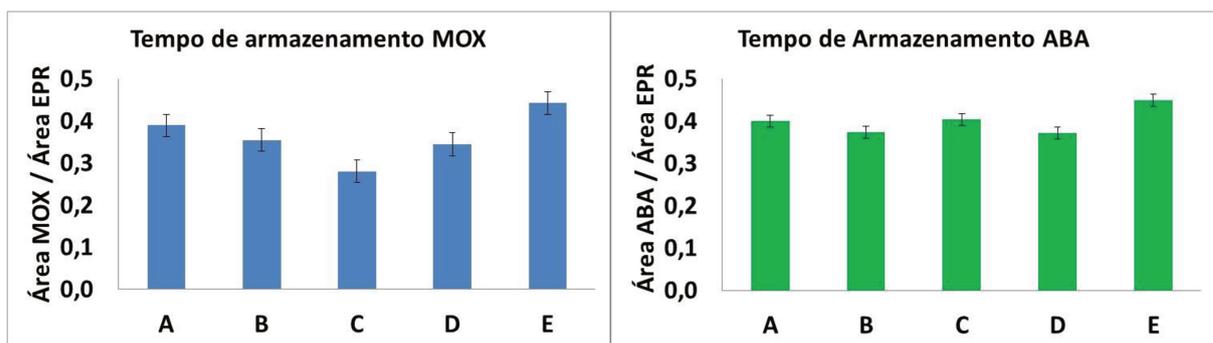


Figura 17. Razão entre as áreas registradas nos cromatogramas para a MOX e ABA e a área do padrão interno para as amostras de solo RQo fortificadas imediatamente antes do início dos ensaios e extraídas em diferentes tempos (0, 24 e 48 horas) e temperaturas (temperatura ambiente e sob refrigeração). A=extração imediata após retirada da câmara, B=extração após 24 horas a temperatura ambiente, C=extração após 24 horas sob refrigeração, D=extração após 48 horas a temperatura ambiente e E=extração após 48 horas sob refrigeração. As áreas estão representadas segundo a razão área do analito/área do padrão interno (EPR). A barra de erros é referente aos valores máximo e mínimo dos resultados das duplicatas.

As diferenças entre os valores observados nos gráficos são devidas às variações intrínsecas do método e se encontram dentro da margem de precisão para análises realizadas em dias diferentes. Dessa forma, é possível inferir a partir dos

dados obtidos que não há pós-degradação significativa dos analitos no solo após exposição à radiação por 24 horas, quando armazenadas a temperatura ambiente ou geladeira por um período máximo de 48 horas. Sendo assim, todas as amostras provenientes dos ensaios de fotodegradação sempre foram analisadas em período menor do que 48 horas sendo sempre armazenadas em geladeira.

3. Sorção dos analitos na superfície de vidro da placa de Petri: a possibilidade da adsorção dos analitos na superfície de vidro da placa de Petri foi avaliada a partir da realização de lavagens da placa com acetonitrila e acetato de etila após 72 horas de contato com o solo fortificado com os analitos na concentração de 100 ng g^{-1} . Os dois solventes foram selecionados por apresentarem polaridades diferentes, sendo a acetonitrila polar e o acetato de etila de polaridade média, e assim garantir a total extração dos analitos a partir da superfície das placas. Para garantir a confiabilidade dos resultados, foi realizado um balanço de massas, mediante a análise também dos solos. As porcentagens de recuperação dos analitos no solo, na solução de lavagem com acetonitrila e acetato de etila estão apresentadas na Figura 18.

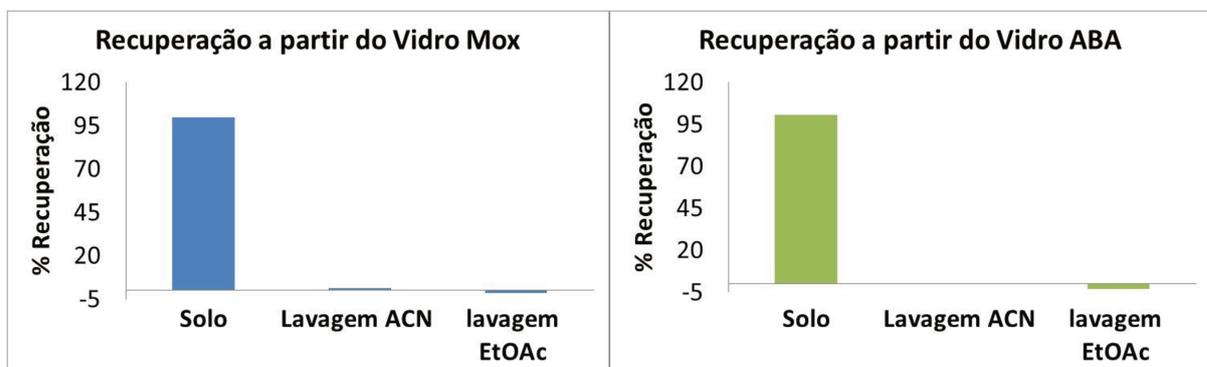


Figura 18. Recuperação de MOX e ABA a partir de lavagens das placas de Petri com acetonitrila e acetato de etila após 72 horas de contato com o solo fortificado.

Os resultados mostram que não ocorre adsorção relevante dos analitos na superfície do vidro durante o tempo e condições experimentais empregadas.

Foi ainda avaliada a perda de água em função do tempo de permanência das amostras na câmara climática. A umidade do solo foi mantida em um valor entre 40 e 60% em relação à sua capacidade de retenção de água para possibilitar a

interação dos analitos com o solo, facilitando a difusão das moléculas alvo através dos poros das partículas de solo.

Foi observado, porém, que após 24 horas praticamente toda a massa de água adicionada no início do experimento era perdida. Considerando que as placas de Petri apenas poderiam ser cobertas com um material que não absorvesse a radiação, ou seja, quartzo, e essa proposta não seria viável neste trabalho, optou-se por repor a água evaporada em intervalos de tempo, usando um borrifador.

IV.4 Fotodegradação

Depois da otimização de todos os parâmetros experimentais, foram realizados os estudos de fotodegradação, que consistiram em três ensaios. No primeiro ensaio (Ensaio 1) foi avaliada a fotodegradação dos analitos ABA e MOX no solo RQo durante um período de 160 horas. As amostras foram retiradas da câmara em duplicata após 15, 23, 39, 46, 53, 64, 70, 76, 86, 94, 110, 140 e 160 horas e os analitos foram quantificados através do método UHPLC-MS/MS previamente estabelecido e validado. As concentrações da MOX e ABA foram plotadas em função do tempo e os resultados estão apresentados na Figura 19 e Figura 20.

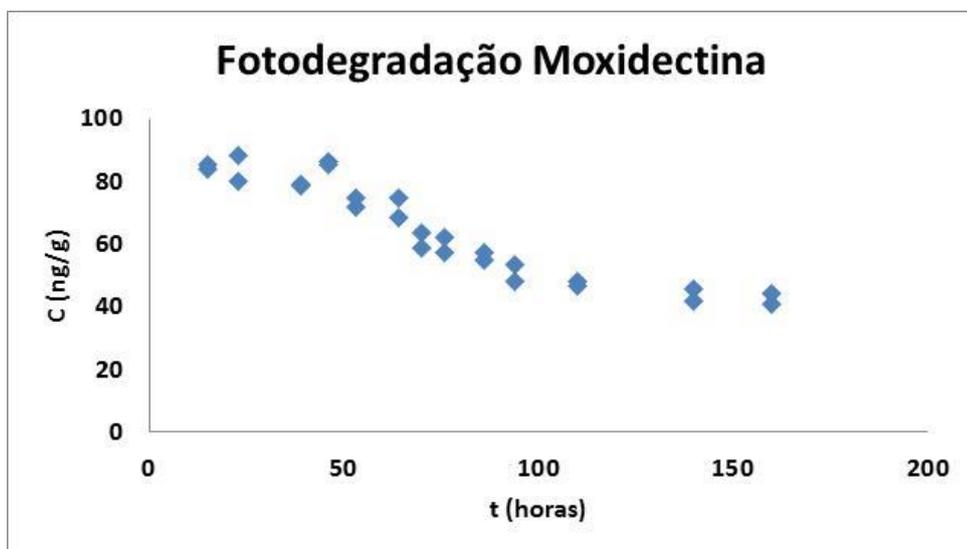


Figura 19. Perfil de dissipação de MOX no solo RQo exposto à radiação UV por 160 horas. Concentração inicial de MOX 100 ng g^{-1} . Temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

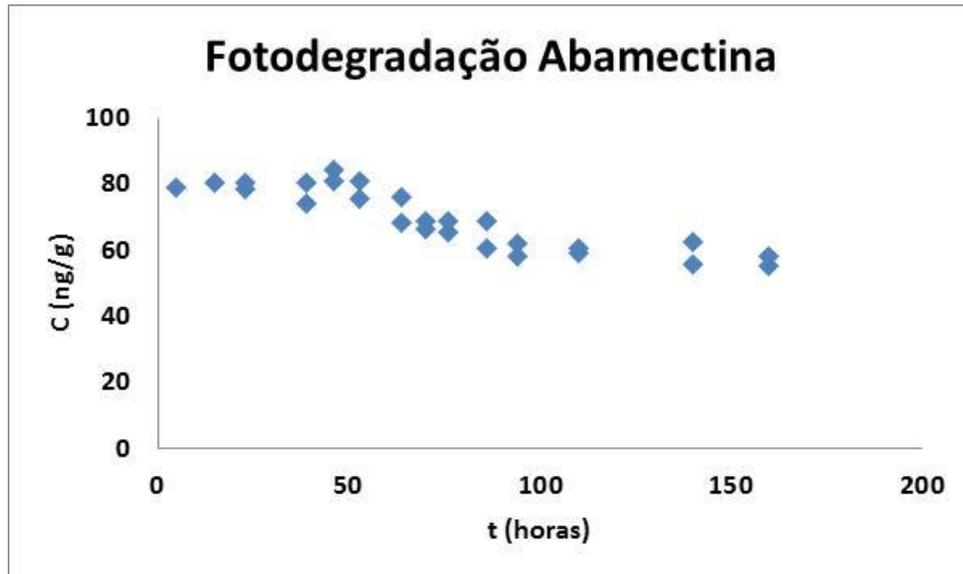


Figura 20. Perfil de dissipação de ABA no solo RQo exposto à radiação UV por 160 horas. Concentração inicial de MOX 100 ng g^{-1} . Temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os gráficos mostram que há um decaimento mais acentuado da concentração de ABA e MOX nas primeiras 100 horas de exposição à radiação e um decaimento mais lento no tempo subsequente (após 100h). A MOX apresentou uma diminuição na sua concentração de 50% e a ABA de 40% em relação à concentração inicial após exposição à radiação por 160 horas.

Como a degradação máxima obtida com o experimento de 160 horas foi de apenas 50%, um segundo ensaio foi conduzido a fim de avaliar os perfis de degradação de ABA e MOX por um período de tempo maior.

O segundo ensaio (Ensaio 2) consistiu em repetir o procedimento do Ensaio 1, porém avaliando a degradação dos analitos por um período de 288 horas. Duplicatas das amostras foram retiradas da câmara nos tempos 48, 96, 144, 192, 240 e 288 horas. Este ensaio incluiu também amostras de solo esterilizado em autoclave e amostras protegidas da luz a fim de avaliar uma possível contribuição dos microrganismos presentes no solo para a degradação dos analitos e comparar os resultados com os obtidos com as amostras controle.

Em ambos os experimentos foram adicionados MOX e ABA ao solo RQo na concentração de 100 ng g^{-1} e a temperatura da câmara foi mantida em $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

A fim de avaliar a ocorrência da fotodegradação dos analitos, foram comparados os perfis de degradação obtidos para MOX e ABA a partir das amostras de solo RQo não estéril que foram expostas à radiação e daquelas que ficaram protegidas da luz

UV no experimento com duração de 288 horas. Os resultados para a degradação da MOX e ABA são apresentados na Figura 21 e Figura 22, respectivamente.

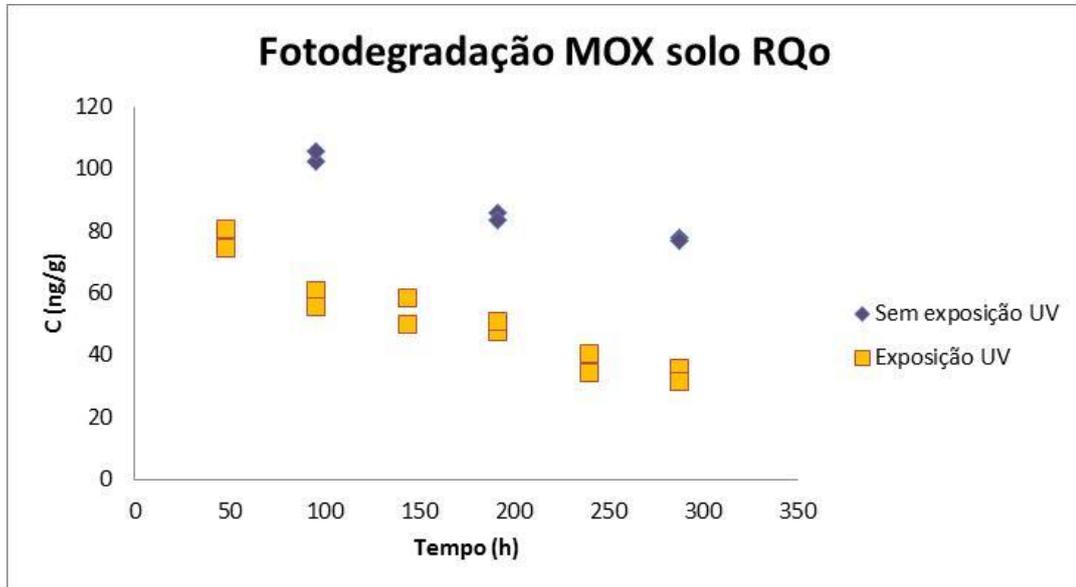


Figura 21. Comparação dos perfis de degradação de MOX em amostras de solo RQo expostas à radiação UV (amarelo) e amostras protegidas da radiação UV (azul) provenientes do Ensaio 2 com duração de 288 horas. Concentração inicial de MOX 100 ng g^{-1} . Temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

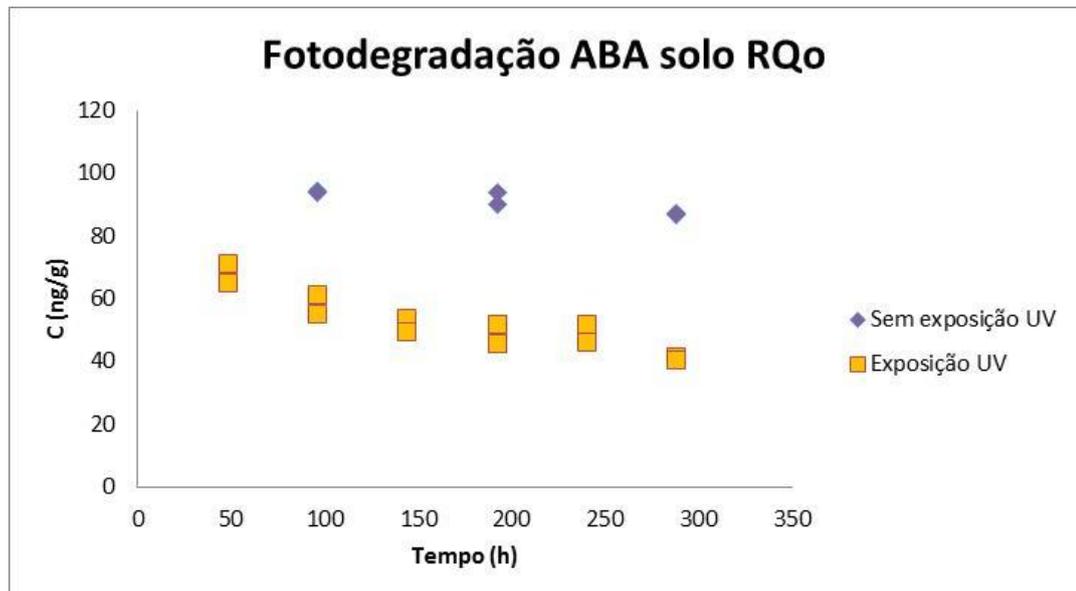


Figura 22. Comparação dos perfis de degradação de ABA em amostras de solo RQo expostas à radiação UV (amarelo) e amostras protegidas da radiação UV (azul) provenientes do Ensaio 2 com duração de 288 horas. Concentração inicial de ABA 100 ng g^{-1} . Temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

É possível observar uma diferença nas concentrações dos analitos entre as amostras de solo RQo que foram expostas à radiação UV e aquelas que ficaram protegidas da luz, indicando a ocorrência de degradação de ambos analitos por fotólise.

A fim de avaliar uma possível contribuição da degradação por ação de microrganismos durante o experimento, foram comparados os perfis de degradação de MOX e ABA obtidos a partir das amostras de solo RQo esterilizado em autoclave e não esterilizado (*in natura*), ambos expostos à radiação (Ensaio 2). Os resultados para a MOX e ABA são apresentados na Figura 23 e Figura 24 respectivamente.

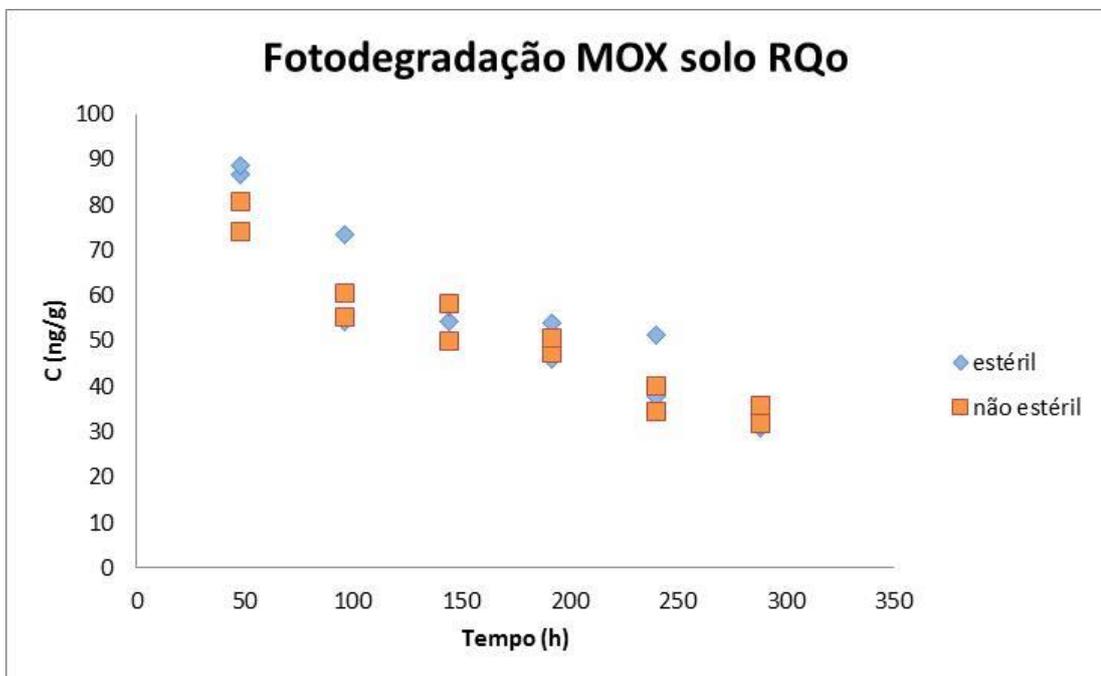


Figura 23. Comparação dos perfis de degradação de MOX em amostras de solo RQo esterilizado (azul) e não esterilizado (laranja) expostas à radiação UV provenientes do Ensaio 2 com duração de 288 horas. Concentração inicial de MOX 100 ng g^{-1} . Temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

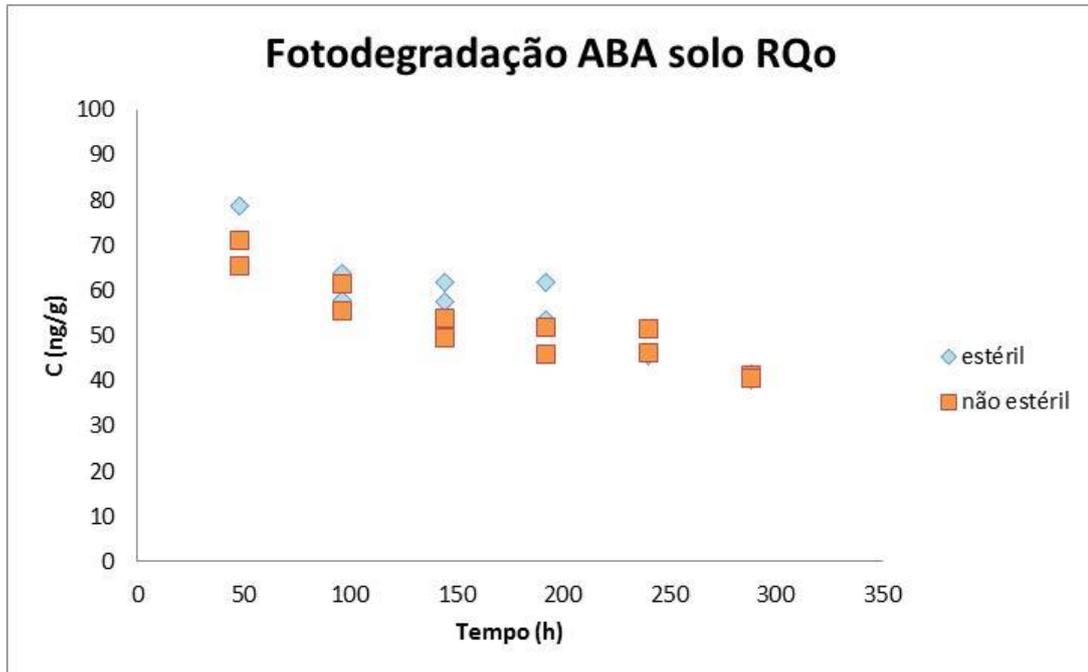


Figura 24. Comparação dos perfis de degradação de ABA em amostras de solo RQo esterilizado (azul) e não esterilizado (laranja) expostas à radiação UV provenientes do Ensaio 2 com duração de 288 horas Concentração inicial de ABA 100 ng g^{-1} . Temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Através das curvas obtidas é possível observar que as amostras de solo que foram submetidas ao processo de esterilização por autoclave antes de serem expostas à radiação, tiveram o mesmo perfil de degradação daquelas que não foram autoclavadas, não sendo possível, assim, atribuir uma degradação adicional dos analitos pela ação dos microrganismos, o que confirma que a diminuição da concentração dos analitos em função do tempo seja apenas decorrente da fotólise.

A ausência de atividade microbiana sugere que a radiação inserida sobre o solo pode ter sido responsável pela diminuição da atividade microbiana ou até mesmo levando a morte dos microrganismos presentes no solo

A presença de microorganismos nos solos pode ser confirmada pelo teste de respirometria. No entanto, pela quantidade reduzida do solo nas placas de Petri (5 g) não seria possível realizar o teste de respirometria pelo método tradicional. Além disso, já era esperado que em solos coletados em um período maior que 90 dias, e estocados secos, a atividade microbiana seja muito baixa, ou mesmo inexistente. A autoclavagem foi realizada para garantir que nenhum efeito além da radiação fosse observado no experimento.

A curva obtida a partir das amostras não esterilizadas e expostas à radiação no experimento de 288 horas foi comparada com a curva de 160 horas a fim de avaliar a extensão da degradação dos analitos nos dois períodos e a repetibilidade dos resultados. Os resultados são apresentados na Figura 25 e Figura 26.

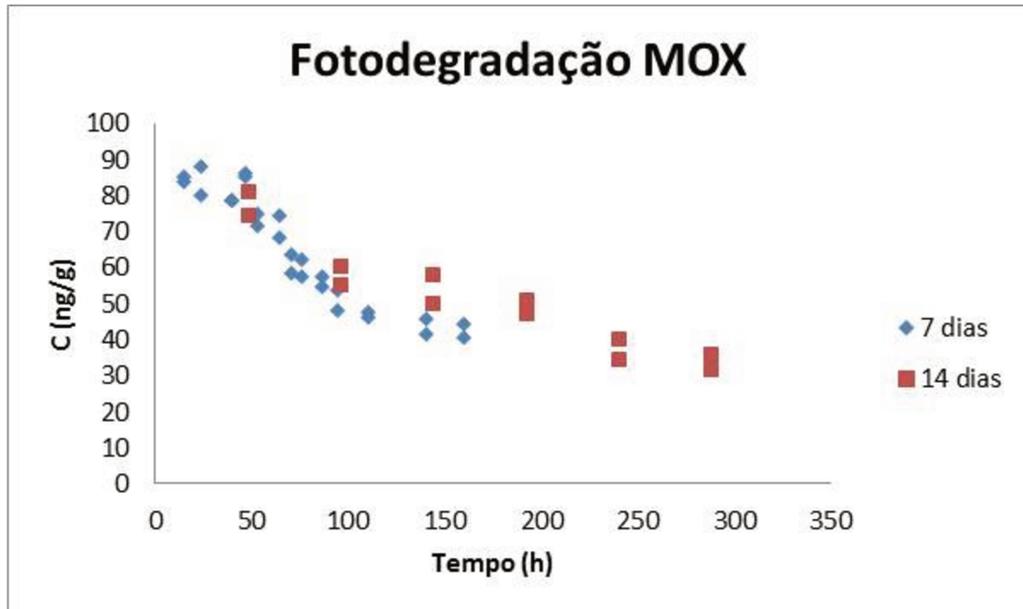


Figura 25. Comparação dos perfis de degradação de MOX em amostras de solo RQo não esterilizado expostas à radiação UV no Ensaio 1 (160 horas) e no Ensaio 2 (288 horas). Concentração inicial de MOX 100 ng g^{-1} . Temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

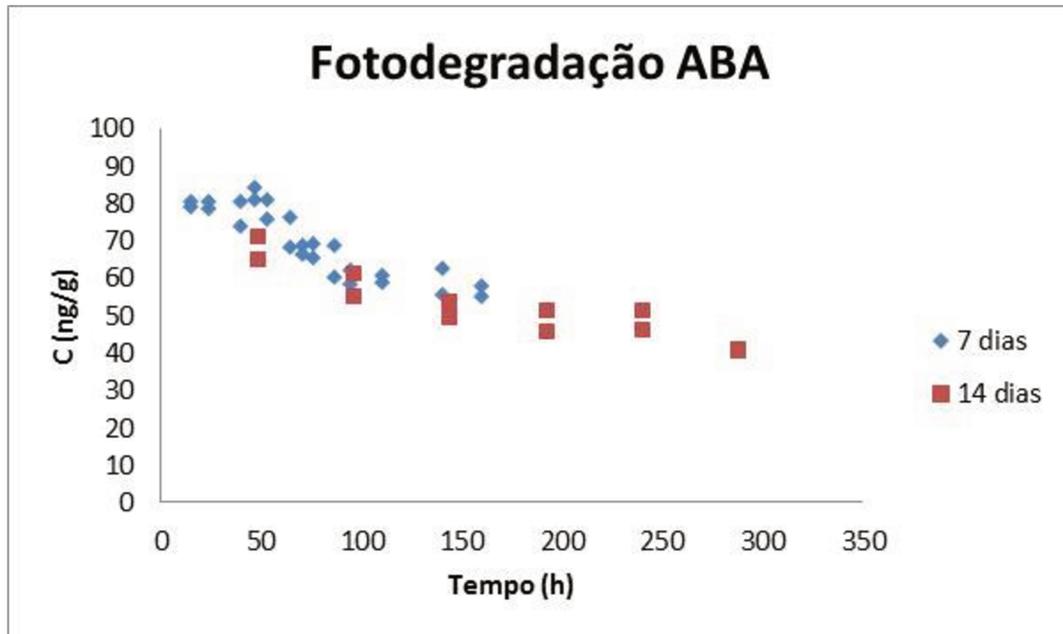


Figura 26. Comparação dos perfis de degradação de ABA em amostras de solo RQo não esterilizado expostas à radiação UV no Ensaio 1 (160 horas) e no Ensaio 2 (288 horas). Concentração inicial de ABA 100 ng g^{-1} . Temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os gráficos mostram que há um decaimento mais acentuado da concentração de ABA e MOX no início da exposição da radiação e um decaimento mais lento no tempo subsequente.

A MOX apresentou degradação de 50% e 70% em relação à concentração inicial após exposição à radiação em 160 e 288 horas respectivamente e a ABA de 40% e 60% no mesmo período. A repetibilidade dos resultados foi satisfatória, uma vez que as duas curvas apresentaram o mesmo perfil com valores próximos e pouco dispersos.

Os dados obtidos a partir da fotodegradação dos analitos no solo RQo não esterilizado no Ensaio 2 (experimento de 288 horas) foram linearizados através da Equação 4, na qual C_0 representa a concentração inicial dos analitos (100 ng g^{-1}), C é a concentração em cada tempo t e K é a constante de degradação representada pelo coeficiente angular da reta obtida. Os dados foram ajustados a um modelo de pseudo-primeira ordem com linearidade expressa pelo coeficiente de determinação de 0,99 para a MOX e 0,97 para a ABA. Os gráficos obtidos são apresentados na Figura 27 na qual pode se verificar que os dados experimentais se ajustaram bem ao modelo empregado.

$$\ln \frac{C_0}{C} = K \times t \quad (\text{Eq. 4})$$

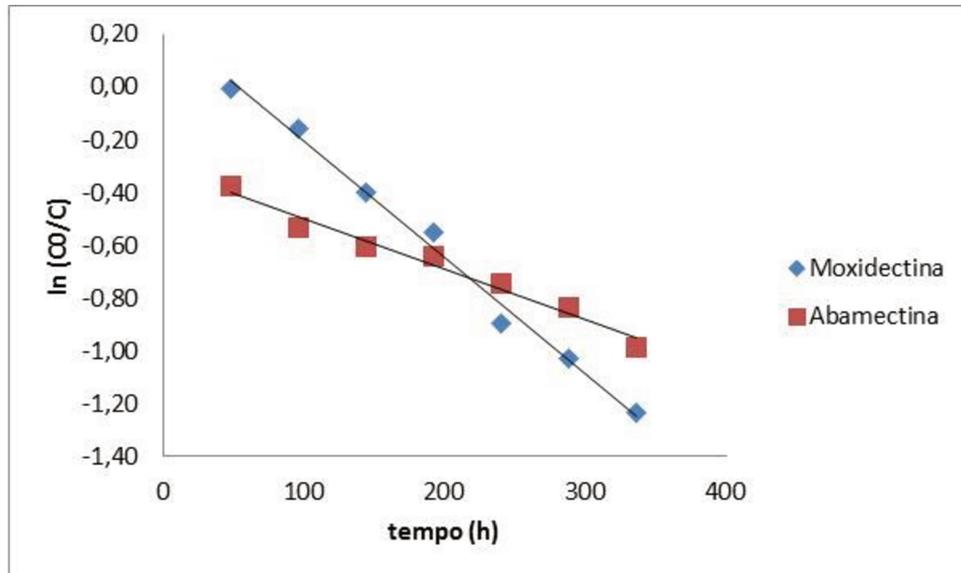


Figura 27. Linearização dos perfis de degradação para MOX e ABA em solo RQo não esterilizado a partir do modelo de pseudo-primeira ordem.

Considerando o modelo de pseudo-primeira ordem foi possível estimar um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 210 horas (~9 dias) para a MOX e 365 horas (~15 dias) para a ABA. O tempo de meia vida representa o tempo em que a concentração do analito é reduzida a 50% da concentração inicial nas condições do experimento.

A partir da linearização foi possível, também, obter os valores da constante de velocidade da fotodegradação dos analitos sendo estimados valores de $3,3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ para a MOX e $1,9 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ para a ABA, o que indica que a fotodegradação da MOX neste solo é mais acentuada.

No terceiro ensaio (Ensaio 3) foram avaliados os perfis de degradação de ABA e MOX no solo LVe. Foram reproduzidas as mesmas condições anteriores, ou seja, o solo foi fortificado com os analitos na concentração inicial de 100 ng g^{-1} e a temperatura da câmara foi mantida em $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram utilizadas amostras de solo LVe esterilizadas e não esterilizadas e foram também incluídas amostras que ficaram protegidas da radiação. Duplicatas das amostras foram retiradas da câmara nos tempos 24, 90, 138, 190, 240 e 280 horas. As concentrações de ABA e MOX em todas as amostras foram determinadas por UHPLC-MS/MS.

A Figura 28 e Figura 29 mostram a comparação entre as curvas obtidas a partir das amostras de solo LVe não estéril que foram expostas à radiação e daquelas que ficaram protegidas da luz UV no experimento com duração de 280 horas.

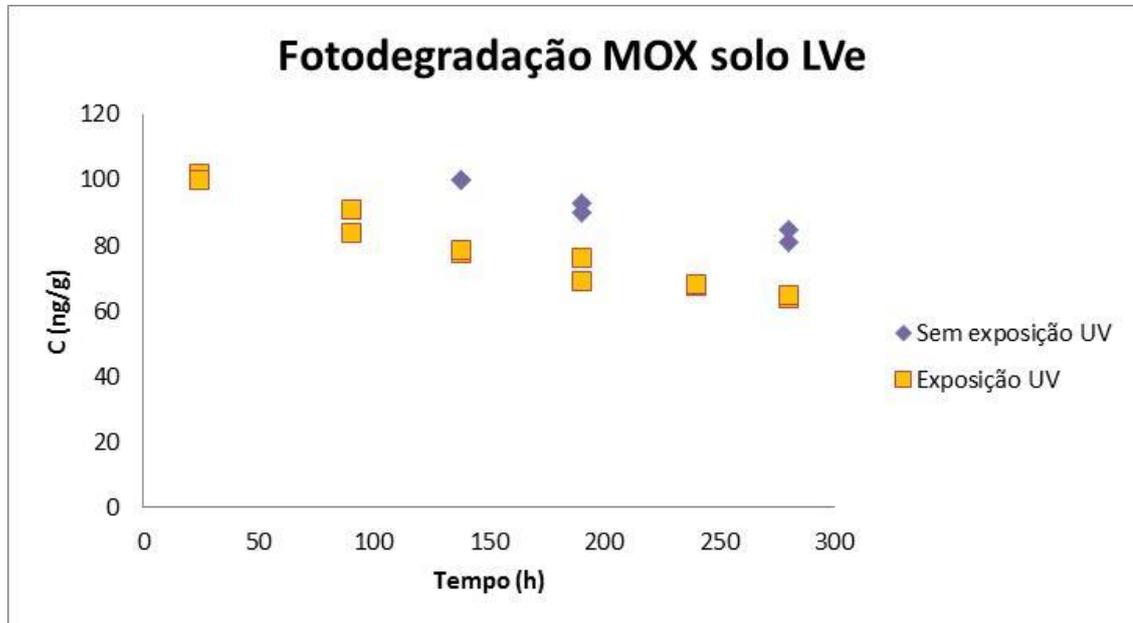


Figura 28. Comparação dos perfis de degradação de MOX a partir das amostras de solo LVe expostas à radiação e amostras protegidas da radiação em ensaio de 280 horas de duração.

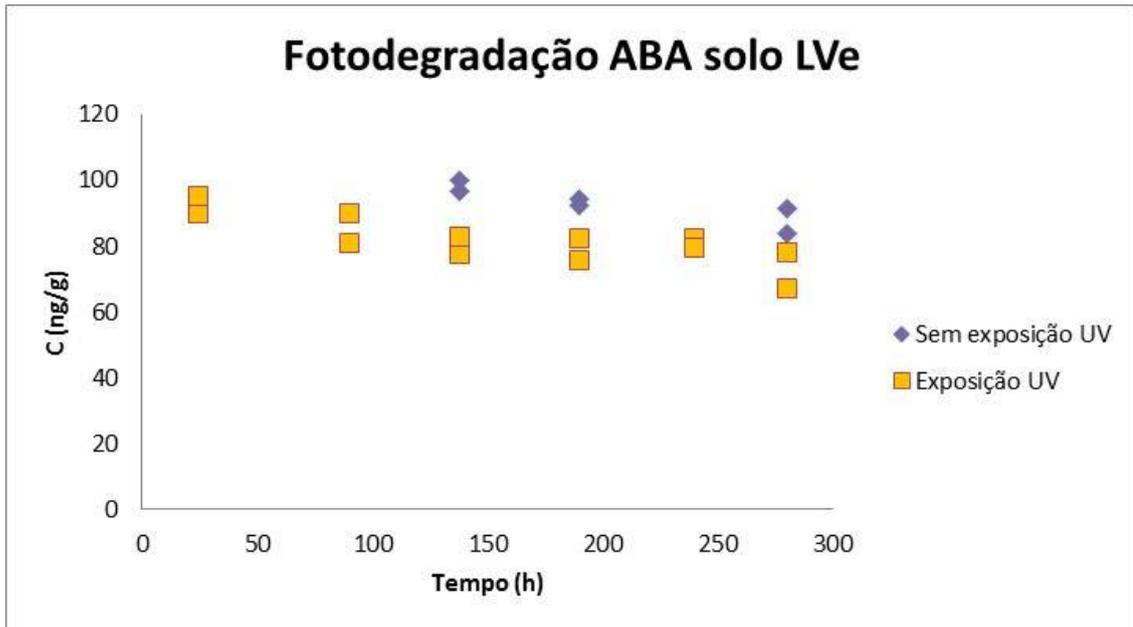


Figura 29. Comparação dos perfis de degradação de ABA a partir das amostras de solo LVe expostas à radiação e amostras protegidas da radiação em ensaio de 280 horas de duração.

A partir das curvas obtidas, foi possível observar que para este tipo de solo (LVe) houve uma diferença pequena entre os perfis de degradação obtidos para as amostras que foram expostas à radiação e aquelas que ficaram protegidas da radiação. Houve uma lenta diminuição na concentração de ambos, obtendo-se após 280 horas um total de degradação de 45% para a MOX e 40% para a ABA em relação à concentração inicial. Os resultados indicam que neste tipo de solo ambos os analitos se encontram menos disponíveis para a ação da radiação, como será mais amplamente discutido posteriormente.

Foram comparados também, os perfis de degradação dos analitos MOX e ABA obtidos a partir das amostras de solo LVe estéril e não estéril ambos expostos à radiação no experimento de 280 horas. Os resultados são apresentados na Figura 30 e Figura 31.

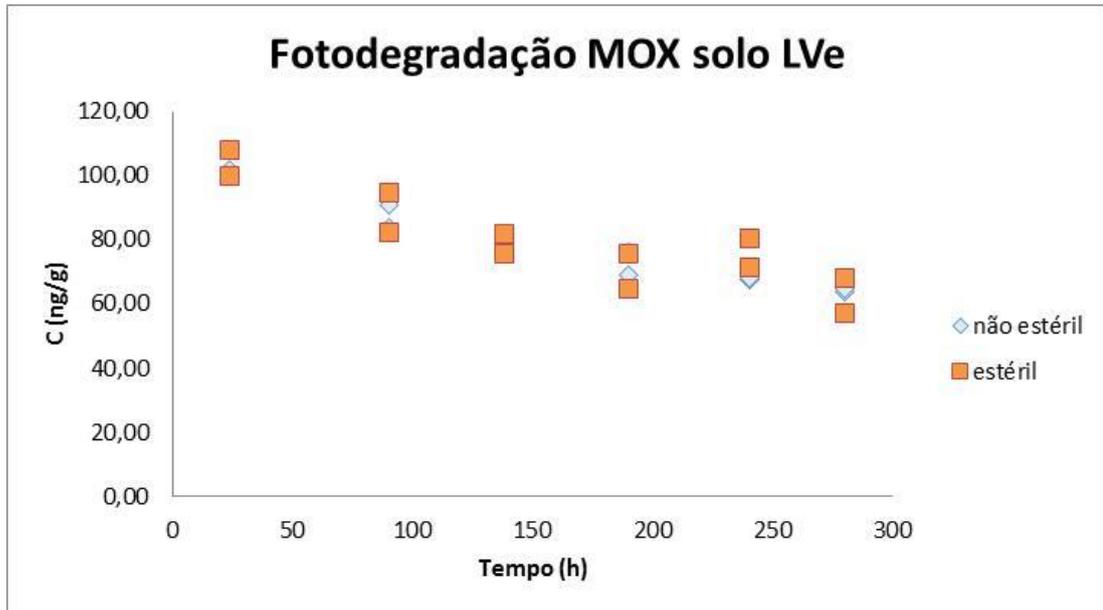


Figura 30. Comparação dos perfis de degradação de MOX e ABA a partir das amostras de solo LVe esterilizadas e não esterilizadas em ensaio de 280 horas de duração.

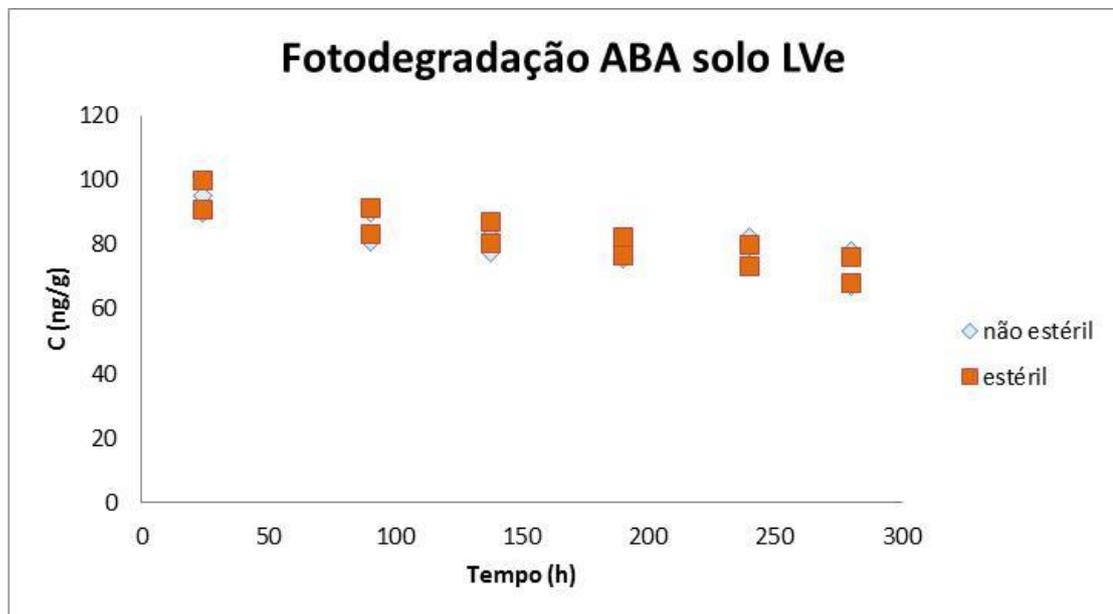


Figura 31. Comparação dos perfis de degradação de MOX e ABA a partir das amostras de solo LVe esterilizadas e não esterilizadas em ensaio de 280 horas de duração.

Foi possível observar para o solo LVe o mesmo efeito observado no solo RQo, ou seja, as amostras que foram submetidas ao processo de esterilização por autoclave, apresentaram o mesmo perfil daquelas que não foram autoclavadas. Tal

efeito já era esperado considerando que este solo também havia sido armazenado por um período superior a 90 dias, além de receber a ação da radiação durante o experimento, o que possivelmente diminuiu ou mesmo eliminou a atividade microbiana do solo.

Os dados obtidos a partir da fotodegradação dos analitos no solo LVe não esterilizado foram também linearizados através da Equação 4. Os dados foram ajustados a um modelo de pseudo-primeira ordem com linearidade expressa pelo coeficiente de determinação de 0,97 para a MOX e 0,95 para a ABA. Os gráficos obtidos são apresentados na Figura 32.

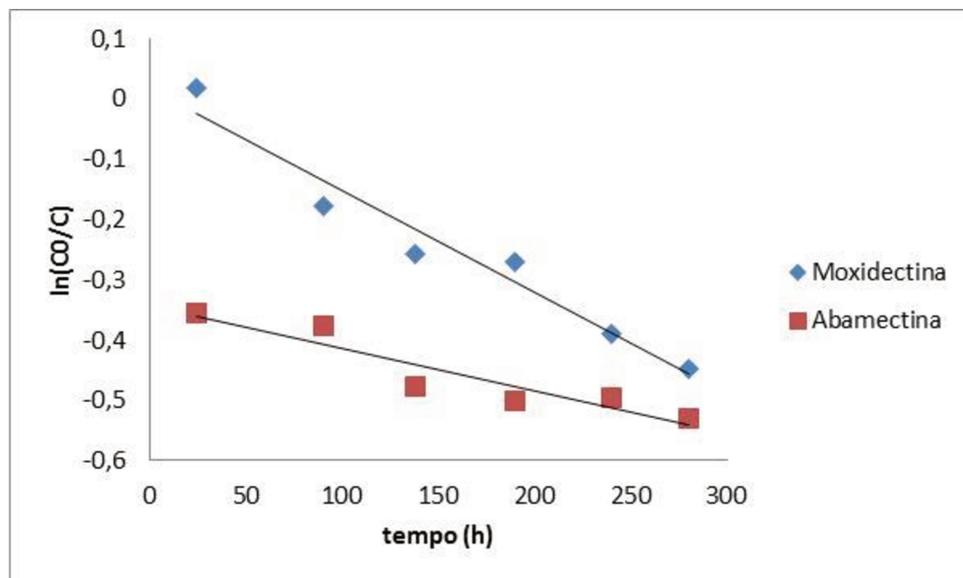


Figura 32. Linearização dos perfis de degradação para MOX e ABA em solo LVe não esterilizado a partir do modelo de pseudo-primeira ordem.

Considerando o modelo de pseudo-primeira ordem foi possível estimar um tempo de meia vida de dissipação (DT_{50}) de 407 horas (~17 dias) para a MOX e 990 horas (~41 dias) para a ABA. A partir da linearização foi possível, também, obter os valores da constante de velocidade da degradação dos analitos, sendo estimados valores de $1,7 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ para a MOX e $7 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ para a ABA.

Os perfis de degradação obtidos mostram que a degradação máxima dos analitos não supera 70% no solo RQo e 45% no solo LVe no período de 288 horas (tempo máximo avaliado). Tal resultado poderia ser explicado pela ocorrência de processos como a difusão dos analitos nos microporos do solo o que levaria à diminuição de sua acessibilidade, ficando estes menos susceptíveis à ação da

radiação. Poderia, ainda, ocorrer uma ligação irreversível do analito em sítios específicos das partículas do solo com o tempo, diminuindo, assim, a quantidade de analito passível de extração na etapa de quantificação. No entanto, tal fato não foi comprovado em ensaios de degradação realizados no mesmo solo em estudos anteriores no qual foi avaliada a degradação aeróbia por microrganismos. Nestes estudos foi verificado que a ABA apresenta um valor de DT_{50} para dissipação aeróbia de 3,5 dias para solos arenosos e 1,1 dias para solos argilosos (Dionisio & Rath, 2016) enquanto que a MOX apresentou DT_{50} de 9 dias para o solo arenoso e 13 dias para o solo argiloso (Ferreira *et al.*, 2016) o que sugere, comparando-se com os resultados obtidos neste trabalho, que a ação dos microrganismos é mais significativa do que a radiação UV na degradação dos analitos, o que se deve à sua maior disponibilidade para a degradação microbiana.

Os resultados obtidos para a extensão da degradação dos analitos pode ser correlacionada à intensidade da sorção dos mesmos nos diferentes tipos de solo. O solo argiloso, no qual foi observada menor degradação dos analitos por fotólise, é também aquele no qual as avermectinas em geral apresentam maior coeficiente de sorção (K_F), estando ligados mais fortemente às partículas do solo. A Tabela 9 correlaciona os tempos de meia vida obtidos para a ABA e a MOX nos estudos de fotodegradação com os valores de K_F obtidos por estudos anteriores nos dois tipos de solos estudados (Dionisio & Rath, 2016; Ferreira *et al.*, 2016).

Tabela 9. Correlação entre os tempos de meia vida e os valores de sorção para os analitos ABA e MOX em solo arenoso e argiloso.

Analito	$t_{1/2}$ (dias)		K_F ($\mu\text{g}^{1-1/n} \text{mL}^{1/n} \text{g}^{-1}$)	
	Solo RQo	Solo LVe	Solo RQo	Solo LVe
MOX	9	17	95	410
ABA	15	41	44	138

De modo geral a sorção das avermectinas está diretamente relacionada com o teor de argila presente no solo, apresentando menor mobilidade em solos argilosos e, assim, sugerindo que as interações por trocas iônicas com os minerais da argila sejam o principal mecanismo de interação com as partículas do solo. Além disso, solos com maior teor de matéria orgânica favorecem a interação com compostos

lipofílicos como no caso das avermectinas. Desta forma, como o solo LVe possui essas duas características (maior teor de matéria orgânica e argila), os analitos se ligam mais fortemente as partículas do solo, tornando-os imóveis e menos susceptíveis à ação da radiação.

Quanto às diferenças estruturais entre os analitos, tem-se que a MOX difere da ABA pela ausência da porção dissacarídea no carbono 13 como mostrado na Figura 33.

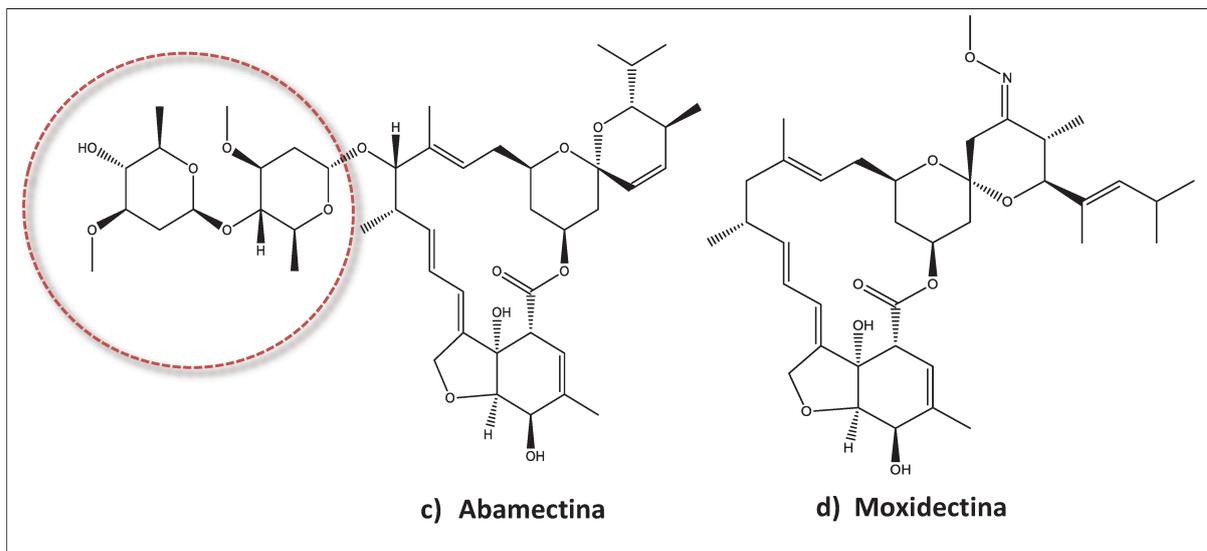


Figura 33. Estrutura da ABA e MOX.

Essa diferença estrutural pode explicar o fato da MOX se ligar mais fortemente ao solo, o que é evidenciado por seu maior valor de coeficiente de sorção, em relação ao da ABA nos dois tipos de solos estudados. Devido ao seu menor tamanho, a difusão para os microporos das partículas de argila poderia ser facilitada. No entanto, apesar de sua menor mobilidade nos dois tipos de solo, a MOX apresenta menor tempo de meia vida em relação à ABA o que pode ser justificado pela menor complexidade estrutural da molécula sendo esta capaz de absorver de forma mais eficiente a radiação, levando a uma degradação mais rápida. Na molécula de abamectina os sítios responsáveis pela absorção de radiação podem estar bloqueados, encontrando-se ligados à matéria orgânica ou aos óxidos de ferro e alumínio presentes nas partículas do solo.

Vários esforços têm sido feitos no sentido de tentar esclarecer os mecanismos de interação de fármacos com os diversos elementos das partículas do solo. Litskas e

colaboradores estudaram a sorção e dessorção de avermectinas, especialmente a EPR, em diferentes tipos de solo, mostrando a grande afinidade das lactonas macrocíclicas por solos com maior teor de matéria orgânica e argila e sugerindo que o particionamento hidrofóbico possa ser um dos mecanismos de interação mais importantes (Litskas *et al.*, 2013; Vassilis *et al.*, 2016).

A elucidação dos mecanismos de interação de moléculas orgânicas com o solo é um processo dispendioso devido à complexidade e heterogeneidade características dessa matriz e a comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos é dificultada pelo fato de que mesmo em solos com teores de argila e matéria orgânica semelhantes, a composição dessas frações pode ainda ser diferente e influenciar os resultados.

Estudos reportados na literatura apontam diferentes tempos de meia vida para fotodegradação de fármacos e pesticidas considerando diferentes tipos de solo e condições climáticas o que dificulta a comparação entre os resultados obtidos, além de serem conduzidos por meio de diferentes aparatos. Cavoski e colaboradores reportaram valores de $t_{1/2}$ para a fotodegradação de rotenona entre 5 e 7 dias para solos característicos da Itália (Cavoski *et al.*, 2007). Em solos arenosos da Arábia Saudita, EL-Saeid e colaboradores obtiveram valores de $t_{1/2}$ próximos a 4,1 dias (100 horas) para a fotodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) (El-Saeid *et al.*, 2015), enquanto que Nag e Dureja encontraram valores entre 10 e 20 horas para a degradação de triadimefon em solos da Índia (Nag & Dureja, 1996).

Em uma situação real os analitos no solo seriam expostos a radiação solar e não apenas a luz UV de uma estreita faixa de radiação. Sendo assim, seria interessante avaliar o equivalente em dias de exposição solar. Segundo o Guia da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) para fototransformação de produtos químicos em solo (OECD, 2002a) o equivalente em dias de exposição à luz solar a partir dos resultados da exposição das amostras às lâmpadas de radiação constante pode ser calculado pela Equação 3.

$$d = \frac{h \cdot r}{0,75 \cdot 12} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde d é o equivalente em dias de luz solar, h é o número de horas de exposição à lâmpada utilizada, r é a intensidade de radiação da lâmpada utilizada, 0,75 é o fator de correção para a variação diária de luz solar natural e 12 é o fator de conversão de horas para dias.

Dessa forma obteríamos valores de 13 dias para a MOX e 24 dias para a ABA no solo RQo e 37 dias para a MOX e 88 dias para a ABA no solo LVe.

Há, no entanto, um consenso de que a liberação contínua de fármacos no ambiente, mesmo que em quantidades abaixo dos níveis tóxicos, pode levar, a longo prazo, a um acúmulo desses compostos propiciando o desenvolvimento de microrganismos resistentes. Nesse sentido, os processos secundários de sorção dos analitos no solo podem reduzir a toxicidade aguda, porém aumentam seu tempo de permanência no solo já que reduzem sua acessibilidade (Jechalke *et al.*, 2014). Dessa forma se faz necessário conhecer os efeitos da disposição de pequenas quantidades de fármacos veterinários no ambiente a longo prazo.

Uma vez que compostos como as avermectinas se ligam fortemente ao solo, tendo baixo potencial de lixiviação e sua fotodegradação é altamente dificultada por sua interação com as partículas do solo, mostra-se a necessidade de uma maior atenção por parte de órgãos governamentais no sentido de criar legislações que estabeleçam limites máximos e práticas pecuárias adequadas suportadas por estudos mais aprofundados nessa temática.

A Tabela 10 mostra uma compilação dos dados obtidos neste trabalho juntamente com os obtidos para MOX e ABA em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa Paracelsus, do Departamento de Química Analítica da Unicamp (Ferreira *et al.*, 2017; Dionisio & Rath, 2016).

Tabela 10. Compilação dos dados obtidos para MOX e ABA.

	Abamectina		Moxidectina	
	Solo RQo	Solo LVe	Solo RQo	Solo LVe
DT₅₀ (dias) - fotodegradação	15	41	9	17
K_F sorção ($\mu\text{g}^{1-1/n} \text{mL}^{1/n} \text{g}^{-1}$)	10	45	95	410
K_F desorção ($\mu\text{g}^{1-1/n} \text{mL}^{1/n} \text{g}^{-1}$)	20	52	140	550
K_{oc}* (mL g^{-1})	8.083	19.469	47.587	95.985
d (Equivalente em dias de exposição solar)	24	88	13	37
DT₅₀ (Degradação aeróbia - dias)	9	10	9	13

*K_{oc}: Coeficiente de partição solo/água

CAPÍTULO V - CONCLUSÕES

O método analítico utilizado para a extração de ABA e MOX a partir de amostras de solos arenoso e argiloso e sua quantificação por UHPLC-MS/MS se mostrou eficiente (seletivo e com detectabilidade adequada) para a quantificação desses resíduos em solos para estudos de fotodegradação, com um limite de quantificação de $0,5 \text{ ng g}^{-1}$. Os parâmetros de validação foram satisfatórios para os objetivos pretendidos, ou seja, avaliar a fotodegradação destes antiparasitários em solos, partindo de uma concentração inicial de 100 ng g^{-1} . O uso da EPR como padrão interno foi adequado na etapa de quantificação.

Ensaio de estabilidade indicam que não ocorre degradação de ABA e MOX por um período de 24 horas, quando as amostras de solo branco fortificadas com os analitos são armazenadas sob proteção de luz e na ausência de microrganismos.

Os analitos ABA e MOX em solos após a fotodegradação são estáveis no solo RQo por um tempo mínimo de 48 horas quando estocadas ao abrigo da luz e sob refrigeração.

Embora as avermectinas tenham afinidade por vidro, quando presentes no solo essa adsorção é desprezível.

A ABA e a MOX sofrem fotodegradação por radiação UVA no solo arenoso RQo, apresentando DT_{50} de 15 dias e 9 dias, respectivamente. No solo argiloso LVe a degradação dos antiparasitários é mais lenta, atingindo DT_{50} em 41 dias para a ABA e 17 dias para a MOX. Os dados experimentais de fotodegradação se ajustaram bem ao modelo de pseudo-primeira ordem.

A velocidade de fotodegradação da ABA e MOX foi em torno de 3 vezes maior no solo RQo do que LVe.

A MOX apresentou uma velocidade de degradação de aproximadamente 2 vezes maior do que a ABA nos dois solos estudados.

A comparação dos tempos de meia vida de dissipação (DT_{50}) obtidos com os valores de coeficiente de sorção (K_F) dos analitos nos dois solos mostrou que a degradação por fotólise foi maior no solo no qual os analitos apresentaram menor afinidade, ou seja, menor valor de K_F (solo arenoso – RQo).

Apesar de a MOX apresentar maior K_F em relação à ABA nos dois solos estudados, seu DT_{50} foi menor nas duas condições.

CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA, 2017. Relatórios Anuais - 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>. Acesso em: 20/10/2017.

Ahmad, I., Ahmed, S., Anwar, Z., Sheraz, M. A., Sikorski, M. Photostability and Photostabilization of Drugs and Drug Products. **International Journal of Photoenergy**, p.1-19, 2016.

Awasthi, A., Razzak, M., Al-Kassas, R., Greenwood, D. R., Harvey, J., Garg, S. Isolation and characterization of degradation products of moxidectin using LC, LTQ FT-MS, H/D exchange and NMR. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, p. 2203-2222, 2012.

Awasthi, A., Razzak, M., Al-Kassas, R., Harvey, J., Garg, S. Analytical profile of moxidectin. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 38, p. 315-366, 2013.

Balmer, M. E., Goss, K.-U., Schwarzenbach, R. P. Photolytic Transformation of Organic Pollutants on Soil Surfaces An Experimental Approach. **Environmental Science Technology**, v. 34, p. 1240-1245, 2000.

Berendsen, B. J. A.; Mulder, P. P. J.; Van Rhijn, H. A. The derivatisation of avermectins and milbemycins in milk: New insights and improvement of the procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 1, p. 126-133, 2007.

Beynon, S. A. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 113-124, 2012.

Boisseau, J. Abamectin. **National Agency for Veterinary Medicinal Products**, 1995.

Boxall, A. B. A. The environmental side effects of medication. **European Molecular Biology Organization**, v. 5, p. 1110-1116, 2004.

Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Halling-Sørensen, B., Tolls, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 286-294, 2003.

Brewer, B. N., Armbrust, K. L., Mead, K. T., Holmes, W.E. Determination of abamectin in soil samples using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 1693-1696, 2004.

Capleton, A. C., Courage, C., Rumsby, P., Holmes, P., Stutt, E., Boxall, A. B. A., Levy, L.S. Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. **Toxicology Letters**, v. 163, p. 213-223, 2006.

Cavoski, I.; Caboni, P.; Sarais, G.; Cabras, P.; Miano, T. Photodegradation of Rotenone in Soils under Environmental Conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 55, p. 7069-7074, 2007.

Danaher, M., Howells, L. C., Crooks, S. R. H., Cerkvenik-Flajs, V., O'Keeffe, M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 844, p. 175-203, 2006.

Diao, X., Jensen, J., Hansen, A. D. Toxicity of the anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 148, p. 514-519, 2007.

Díaz-Cruz, M. S., de Alda, J. L., Barceló, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 340 -351, 2003.

Dionisio, A. C., Rath, S. Abamectin in soils: Analytical methods, kinetics, sorption and dissipation. **Chemosphere**, v. 151, p. 17-29, 2016.

Doll, T. E., Frimmel, F. H. Fate of pharmaceuticals—photodegradation by simulated solar UV-light. **Chemosphere**, v. 52, p. 1757-1769, 2003.

Durden, D. A. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 850, p. 134-146, 2007.

EMA, 1997. General Report on the Activities of the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Third General Report.

EMBRAPA, 2016. Carne em números. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-em-numeros>. Acesso em: 02/11/2017.

EMBRAPA., 2013. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, 3 ed, Rio de Janeiro, p. 353.

EMBRAPA, 2013b. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1490042/parasitas-causam-prejuizo-de-18-bilhoes-por-ano-a-pecuaria-brasileira>. Acesso em dezembro de 2016.

EMEA, 2008. EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1 CONSULTATION.

Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004389.pdf. Acesso em: 05/11/2017.

EPA, 2008. Fate, Transport and Transformation Test Guidelines - Photodegradation on Soil.

EPA, 2017. Chemistry Dashboard. Disponível em: <https://comptox.epa.gov/dashboard>, Acesso em: 5/11/2017.

EU, 2004. Directive 2004/28/EC of the European Parliament and of the Council - Official Journal of the European Union.

Ferreira, F. O., Rodrigues-Silva, C., Rath, S. On-line solid-phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of avermectins and milbemycin in soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1471, p. 118-125, 2016.

Fort Dodge, 1997. CYDECTIN® moxidectin 0.5% Pour-On for Cattle, Environmental assessment.

Gerenutti, M., Spinosa, H. S. Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. **Biotemas**, v. 10, p. 07-27, 1997.

Gong, A., Ye, C., Wang, X., Lei, Z., Liu, J. Dynamics and mechanism of ultraviolet photolysis of atrazine on soil surface. **Pesticide Management Science**, v. 57, p. 380-385, 2001.

Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lützhof, H. C. H., Jørgensen, S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals in the environment. A review. **Chemosphere**, v. 36, p. 357-393, 1998.

IBGE, 2007. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Manual Técnico de Pedologia. Manuais Técnicos em Geociências. 2ª edição. Rio de Janeiro, n. 4

ICH, Q1B Photostability Testing of New Drug Substances and Products - Guidance for Industry. 1996.

ISO 18909-2006, Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

Jenny, H. 1994. Factors of soil formation - A System of Quantitative Pedology. Dover Publications, New York.

Jensen, J., Diao, X., Scott-fordsmand, J. J. Sub-lethal toxicity of the antiparasitic abamectin on earthworms and the application of neutral red retention time as a biomarker. **Chemosphere**, v. 68, p. 744-750, 2007.

Kools, S. A. E., Boxall, A. B. A., Moltmann, J. F., Bryning, G., Koschorreck, J., Knacker, T. A Ranking of European Veterinary Medicines Based on Environmental Risks. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 4, p. 399–408, 2008.

Krogh, K. A., Bjorklund, E., Loeffler, D., Fink, G., Halling-Sorensen, B., Ternes, T. A. Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, p. 60-69, 2008.

Lepsch, I.F., 2010. Formação e conservação dos solos, 2 ed. Oficina dos Textos.

Litskas, V. D., Karamanlis, X. N., Batzias, G. C., Tsiouris, S. E. Are the parasiticidal avermectins resistant to dissipation in the environment? The case of eprinomectin. **Environmental International**, v. 60, p. 48-55, 2013.

Lorenzo, R. A.; Pais, S.; Racamonde, I.; García-Rodríguez, D.; Carro, A. M. Pesticides in seaweed: optimization of pressurized liquid extraction and in-cell clean-up and analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 1, p. 173-181, 2012.

Lumaret, J.-P., Errouissi, F., Floate, K., Römbke, J., Wardhaugh, K. A Review on the Toxicity and Non-Target Effects of Macrocyclic Lactones in Terrestrial and Aquatic Environments **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 1004-1060, 2012.

MAPA, 2016. Panorama do Agronegócio Brasileiro. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/relacoes-internacionais/arquivos-das-publicacoes/laminas_0-ilovepdf-compressed.pdf/view. Acesso em: 01/12/2017.

Martins, F.R.; Pereira, E. B.; Silva, S. A. B.; Abreu, S. L.; Colle, S. Solar energy scenarios in Brazil, Part one: Resource assessment. **Energy Policy**, v. 36, n. 8, p. 2853-2864, 2008.

Moore, D. E. Principles and practice of drug photodegradation studies. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 5, p. 441-453, 1987.

Moore, W.J.; Físico-Química; 4ª Ed.; Vol. 2; São Paulo; Editora Edgard Blücher, p. 705-706, 1976.

Nag, S. K., Dureja, P. Phototransformation of Triadimefon on Glass and Soil Surfaces. **Pesticide Science**, v. 48, p. 247-252, 1996.

Nobel Prize, 2015. The nobel Prize in physiology or medicine 2015. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/. Acesso em dezembro de 2016.

Novelli, A.; Vieira, B. H.; Cordeiro, D. Cappelini, L. T. D.; Vieira, E. M.; Espíndola, E. L. G. Lethal Effects of Abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis* *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 86, p. 36-30, 2012.

Nunes, R. R.; Rezende, M.O. de O. 2015. Recurso Solo - Propriedades e Usos. Cubo, São Carlos.

OECD, 2002. Guideline for Testing of Chemicals - Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil.

Oliveira, J.B.; Camargo, M.N.; Rossi, M.; Calderano Filho, B. Mapa pedológico do Estado de São Paulo: legenda expandida. Campinas, Instituto Agrônomo/EMBRAPA Solos. Campinas. 1999.

Oliveira, V. de M., Oliveira, R. de, Amorim, M. J. B., Domingues, I., Soares, A. M. V. M. Os medicamentos veterinários no meio ambiente: aplicações e implicações. **Ciência e Ambiente Para Todos**, v. 1, p. 183-192, 2009.

Ômura, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 91-98, 2008.

Peel, M. C., Finlayson, B. L., McMahon, T. A. Updated world map of the Köppen–Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, p. 1633–1644, 2007.

Pozo, O. J.; Guerrero, C.; Sancho, J. V.; Ibáñez, M.; Pitarch, E.; Hogendoorn, E.; Hernández, F. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 83-93, 2006.

Regitano, J. B., Leal, R. M. P. Comportamento e Impacto Ambiental de Antibióticos Usados na Produção Animal Brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.

Schaetzl, R. J., Anderson, S., 2005. Soils: Genesis and Geomorphology. Cambridge University Press, Cambridge.

Sheridan, R., Desjardins, L. Determination of abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, and moxidectin in milk by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists Internacional**, v. 89, p. 1088-1094, 2006.

Shoop, W. L., Mrozik, H., Fischer, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 59, p. 139-156, 1995.

SINDAN, 2017. Compêndio de Produtos Veterinários. Disponível em: <http://www.cpvsv.com.br/cpvsv/pesquisar.aspx>, Acesso em: 02/12/2017.

Speltini, A., Sturini, M., Maraschi, F., Profumo, A., Albini, A. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1337-1350, 2011.

Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Profumo, A., Pretali, L., Fasani, E., Albini, A. Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials Marbofloxacin and Enrofloxacin. **Chemosphere**, v. 86, p. 130-137, 2012.

Sun, Y., Diao, X., Zhang, Q., Shen, J. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in the earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 60, p. 699-704, 2005.

Tišler, T., Eržen, N. K. Abamectin in the aquatic environment. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 495–502, 2006.

Tønnesen, H. H., 2004. Photostability of Drugs and Drug Formulation, 2 ed. CRC Press.

Turnipseed, S. B., Roybal, J. E., Andersen, W. C., Kuck, L. R. Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, p. 159-165, 2005.

USDA, 2005. Soil Map of the World. Disponível em: https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/use/?cid=nrcs142p2_054013. Acesso outubro de 2017.

Vassilis, L. D., George, B. C., Charalampos, P. G., Athina, P. V., Xanthippos, K. N. Mobility of pharmaceutical compounds in the terrestrial environment: Adsorption kinetics of the macrocyclic lactone eprinomectin in soils. **Chemosphere**, v. 144, p. 1201-1206, 2016.

Williamson, K. K., 2005. Avermectins, in: Wexler, P. (Ed.), Encyclopedia of Toxicology, 2 ed. Elsevier Incorporation.

Xie, X., Yao, F., Wu, Y., Zhao, L. Simultaneous analysis of three avermectins in soils by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 92, p. 1417-1428, 2012.

Xu, C., Dong, D., Meng, X., Su, X., Zheng, X., Li, Y. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil surfaces under UV irradiation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, p. 569-575, 2013.