



# UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDO DE INTERAÇÃO DE FRAÇÕES DA MATÉRIA ORGÂNICA DE TURFA  
COM FÁRMACOS DE USO VETERINÁRIO: TETRACICLINA E  
SULFAQUINOXALINA**

**SHENIA DE OLIVEIRA SOUZA**

**Universidade Federal de Alagoas  
Campus A. C. Simões  
Tabuleiro dos Martins  
57072-970 Maceió-AL**

**ESTUDO DE INTERAÇÃO DE FRAÇÕES DA MATÉRIA ORGÂNICA DE TURFA  
COM FÁRMACOS DE USO VETERINÁRIO: TETRACICLINA E  
SULFAQUINOXALINA**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito para obtenção do grau de doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Wander Gustavo Botero

Coorientador: Prof. Dr. Josué C. Caldas Santos

Maceió – AL

Dezembro, 2018

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S729e Souza, Shenia de Oliveira.  
Estudo de interação de frações da matéria orgânica de turfa com fármacos de uso veterinário : tetraciclina e sulfaquinoxalina / Shenia de Oliveira Souza. – 2019.  
75 f. : il.

Orientador: Wander Gustavo Botero.  
Co-orientadora: Josué Carinhanha Caldas Santos.  
Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 69-75.

1. Substâncias húmicas. 2. Adsorção. 3. Poluição ambiental. 4. Espectroscopia. 5. Turfa. 6. Drogas veterinárias. I. Título.

CDU: 615.33:619



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **SHENIA DE OLIVEIRA SOUZA** intitulada: **“Estudo da interação de frações da matéria orgânica de turfa com fármacos de uso veterinário: tetraciclina e sulfaquinoxalina”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 19 de dezembro de 2018, às 13h30, na sala de reuniões do IQB/UFAL.

### COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Wander Gustavo Botero  
(Orientador – PPGQB/UFAL)

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos  
(Coorientador – PPGQB/IQB/UFAL)

Profa. Dra. Luciana Camargo de Oliveira  
(UFSCAR - Sorocaba)

Profa. Dra. Isis Martins Figueiredo  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Profa. Dra. Daniela Santos Anunciação  
(PPGQB/IQB/UFAL)

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho a DEUS, que permitiu que eu iniciasse essa jornada no doutorado. Guiando-me e me iluminando quando muitas vezes parecia impossível, mas aqui me foi permitido chegar. Só a ELE devo toda honra e toda a glória.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu **Senhor Jesus Cristo**, meu Deus e Salvador, nada disso iria acontecer sem a permissão DELE, o maior Mestre de todos.

À **minha amada mãe, Sônia Vera de Oliveira**, que em todos os dias me estimulou a estudar, acreditando que a melhor herança que ela podia deixar é a educação. A ela, sou grata por ter me apresentado com o MELHOR. Sou grata por sempre acreditar em mim e nos meus objetivos.

Ao meu esposo, **José Ricardo da Silva**, pela sua paciência, pois incontáveis vezes aceitou a minha ausência em sua vida, ora porque estava na Universidade ora estava ocupada dedicando-me às necessidades do doutorado. Agradeço a ele, pelo companheirismo, amizade, amor e pela fé que ela tanto depositava em mim, fazendo-me sentir forte e capaz, quando muitas vezes batia o desânimo, o cansaço e a vontade de desistir.

À minha irmã, **Sheyla de Oliveira Sousa**, que carinhosamente com seu jeito deixava sempre claro o quanto ela me admira e acredita em mim, rezando por mim e sempre pedindo a Deus para que as coisas dessem certo.

Ao meu irmão, **Diego de Oliveira Souza**, que me incentivou a concluir essa etapa na vida acadêmica, e que fazia questão de deixar claro que eu era exemplo para ele de garra e determinação... Iniciamos mestrado e doutorado praticamente no mesmo período, cada um na sua área, e sua dedicação e excelência foram exemplos para que da mesma forma eu também fosse durante todo meu estudo.

Aos meus familiares de forma geral, e em especial a Tia Elania e a minha prima Guanaany, que sempre ligavam ou mandavam mensagens para saber como eu estava e como estava meu doutorado.

Aos amigos, Raquel (prima), Leyllane (CEBASE). A Marina, sempre muito conselheira nos momentos que mais precisei, Amanda Luise, que me acompanhou em 75% do doutorado, realizando atenciosamente os experimentos, e a Dayanne Dantas que tive o prazer de conhecer bem no início desta etapa; essas são, como eu falo, as meninas do laboratório, em que cada uma participou, de forma singular, de momentos nas diversas fases pelas quais passei durante esses últimos anos entre o percurso Arapiraca e Maceió.

Agradecimento aos meus orientadores, Professor Dr. Wander Gustavo Botero e Professor Dr. Josué C. Caldas Santos. Obrigada professor Wander por ter me proporcionado a chance de entrar no PPGQB-UFAL, vivenciando essa experiência de Doutorado, e antes também o Mestrado... por seus ensinamentos na área de Química Analítica e em especial na

área de Química Ambiental. Agradeço também pela amizade construída, pela compreensão sempre que eu o recorria. Muito obrigada. Obrigada Professor Josué pelas inúmeras vezes que sentamos para discutir a minha pesquisa, pelos ensinamentos, pela paciência e compreensão diante de muitas dificuldades que passei. Muitas vezes o senhor fez papel de orientador, uma vez que uma parte do meu doutorado foi desenvolvida com uma das técnicas muito utilizada em suas pesquisas, fluorescência. Seus ensinamentos foram fantásticos, aprendi muito mesmo, pontos que com certeza sozinha não teria aprendido, e portanto não teria a mesma visão que hoje tenho. Grata sou aos dois por me proporcionarem, em suas competências, a oportunidade de ser mais uma aluna de pós-graduação, por serem professores jovens e motivadores e acreditarem nos sonhos de seus alunos. Obrigada!!!

## RESUMO

Uma das preocupações, que se tem mostrado um desafio para a comunidade analítica, é a crescente contaminação do solo e da água com resíduos oriundos de antibióticos de uso veterinário. Este trabalho mostra as interações que podem ocorrer com os antimicrobianos tetraciclina e sulfaquinoxalina e frações da matéria orgânica do solo. Neste trabalho, empregou-se substâncias húmicas oriunda de turfa da região do rio Mogi (Ribeirão Preto-SP). Uma amostra de turfa foi submetida à extração e fracionamento a partir de procedimentos adotados pela Sociedade Internacional de substâncias húmicas. A partir do processo de caracterização, foi identificada a composição elementar e o teor de matéria orgânica. O maior valor para razão  $E_4/E_6$  foi de 3,67 para a turfa, enquanto que a humina apresentou 1,15. Na análise dos grupos funcionais, empregou-se RMN  $^{13}\text{C}$  indicando a presença majoritária de carbono aromático na turfa, substâncias húmicas e ácidos fúlvicos. Estudos de adsorção e capacidade de complexação foram efetuados, visando avaliar a afinidade da substância húmica e suas frações com a tetraciclina simulando condições ambientais. Os resultados obtidos permitiram inferir que a interação mais forte ocorreu entre a humina e a tetraciclina com capacidade de complexação igual  $59,19 \text{ mg g}^{-1}$ , em pH 5. Para o sistema com a turfa e a tetraciclina, o modelo cinético que melhor descreveu o processo de interação foi de pseudo-segunda ordem, enquanto que para as isotermas de adsorção o modelo que melhor se ajustou aos resultados experimentais foi o de Freundlich em pH 5. Quando se utilizou a humina (pH 5) os resultados quanto aos modelos cinéticos e de adsorção indicaram que, assim como avaliado para o sistema turfa e tetraciclina, o modelo da isoterma de Freundlich é o que descreve melhor o sistema. Em seguida, estudos por fluorescência molecular explorando a fluorescência intrínseca da substância húmica com sulfaquinoxalina, em diferentes temperaturas, foram realizados visando propor o possível mecanismo de interação. A constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) diminuiu gradualmente com a elevação da temperatura, indicando que o processo preferencial de *quenching* foi estático, e os estudos por ultravioleta-visível confirmaram. Com base nos parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ ), as forças preferenciais na interação substâncias húmicas e sulfaquinoxalina são hidrofóbicas, sendo o valor da constante de interação ( $K_b$ ) em pH 5 de  $2,04(\pm 0,01) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ . A variação da força iônica do meio indicou que houve um aumento de 69% da constante de ligação  $K_b$ . Os estudos por fluorescência em 3D e fluorescência sincronizada permitiram concluir a presença de um pico de emissão entre 357 – 365 nm, e que após a adição de sulfaquinoxalina ocorreu a diminuição da intensidade de fluorescência nessa região de emissão que é específica para ácido húmico. A presença de possíveis competidores (cátions e ânion) indicaram que houve interação efetiva para as espécies iônicas Mg(II), Al(III), Cr(III) e Cr(VI), pois  $K_{\text{competidores}}/K_{SH} > 1$ , assim indicativo de mudança conformacional da macromolécula. Assim, este trabalho pode contribuir para entender o comportamento de resíduos gerados a partir de fármacos veterinários, buscando formas de minimizar a mobilidade e disponibilidade desses poluentes no meio, contribuindo assim para a redução de resíduos e danos ambientais.

**Palavras-chaves:** substâncias húmicas, adsorção, contaminação ambiental, capacidade de complexação, técnicas espectroscópicas.

## ABSTRACT

One of the worries, which has been shown as a challenge to the analytical community, is the growing contamination of the soil and water through waste originated from veterinary antibiotics. This work shows the interactions that can happen with the antimicrobials tetracycline and sulphaquinoxaline and fractions of soil organic matter. In this work, it was used the SH from peat of the Mogi River (Ribeirão Preto-SP). A sample of peat was submitted to the extraction and fractionation based on procedures adopted by the International Society of humic substances. From the characterization process, it was identified the elemental composition and the content of organic matter. The highest value for  $E_4/E_6$  ratio was 3,67 to the peat, whereas the humin presented 1,15. In the analysis of the functional groups was used RMN  $^{13}\text{C}$  indicating the major presence of aromatic carbon in Peat, humic substances and fulvic acid. Adsorption studies and complexing ability were done, aiming to evaluate the affinity of the humic substance and its fractions with the tetracycline simulating environmental conditions. The results obtained permitted to infer that the strongest interaction occurred between the humin and the tetracycline with complexation capacity equal to  $59,19 \text{ mg g}^{-1}$ , in pH 5. For the system with the Peat and the tetracycline the kinetic model that best described the interaction process was of pseudo-second order, while for the isotherms of adsorption the model that best fit to the experimental results was that of Freundlich in pH 5. When it was used the humin (pH 5), the results about the kinetic models and adsorption indicated that, as well as evaluated to the Peat and tetracycline system, the Freundlich isotherm model is the one that best describes the system. Then, studies through molecular fluorescence exploring the intrinsic fluorescence of the humic substance with sulphaquinoxaline, in different temperatures, were carried out aiming to propose the possible mechanism of interaction. The Stern-Volmer constant ( $K_{SV}$ ) gradually decreases with the elevation of the temperature, indicating that the preferential process of *quenching* was static, and the studies by ultraviolet visible confirmed. Based on the thermodynamic parameters ( $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ ), the preferential forces in the interaction humic substances and sulphaquinoxaline are hydrophobic, being the value of the interaction constant ( $K_b$ ) in pH 5 of  $2,04(\pm 0,01) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ . The variation of the ionic strength of the medium indicated that there was an increase of 69% of the connection constant  $K_b$ . The studies through 3D fluorescence and synchronized fluorescence permitted to conclude the presence of an emission peak between 357 – 365 nm, and that, after an addition of sulphaquinoxaline, there was the decrease of the intensity of fluorescence in this emission region which is specific for humic acid. The presence of possible competitors (cations and anions) indicated that there was effective interaction to the ionic species Mg(II), Al(III), Cr(III) and Cr(VI), because  $K_{\text{competitors}}/K_{SH} > 1$ , thus indicative of conformational change of the macromolecule. Therefore, this work can contribute for the understanding of the behavior of waste generated from veterinary drugs, searching for ways to minimize mobility and availability of these pollutants in the environment, contributing, this way, to the waste reduction and environmental damage.

**Keywords:** humic substances, adsorption, environmental contamination, complex capacity, spectroscopic techniques.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grupos funcionais da tetraciclina e associação com os valores de pKa.....	16
Figura 2 - Fórmula estrutural da sulfaquinoxalina.....	17
Figura 3 - Esquema do procedimento analítico utilizado para estudo de complexação entre substâncias húmicas de turfa e TC. Condições: sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial, equipado com membrana de porosidade 1 kDa e 47 mm de diâmetro (polietersulfônica, Gelman Pall-Filtron).....	25
Figura 4 - a) Tempo de equilíbrio entre tetraciclina e substâncias húmicas extraídas de amostras de turfa. b) Curva de capacidade de complexação para SH, AF, AH e HUM com TC utilizando a técnica de UF-FT. Concentração da amostra: 20 mg L <sup>-1</sup> a pH 5 e concentração máxima de TC avaliada de 10 mg L <sup>-1</sup> .....	34
Figura 5 - a) Estrutura da TC com os valores das suas constantes de acidez; b) Gráfico da distribuição de espécies em solução em função da variação do pH.....	37
Figura 6 - Proposta do tipo de interação que pode ocorrer entre os grupos funcionais presente nas SH e TC (pH = 5).....	38
Figura 7 - Influência do pH no processo de adsorção de TC e turfa.....	39
Figura 8 - Valor do pH <sub>pzc</sub> em turfa <i>in natura</i> .....	40
Figura 9 - a) Isotermas de adsorção para o sistema TC em turfa <i>in natura</i> em função do tempo. b) Isotermas para o modelo de Langmuir. c) Isotermas para o modelo de Freundlich.....	43
Figura 10 - Isoterma de adsorção para o sistema tetraciclina e humina.....	45
Figura 11 - Valor do pH <sub>PZC</sub> determinado na humina.....	46
Figura 12 - Espectros de fluorescência de SH a 20 mg L <sup>-1</sup> na ausência e na presença de SQX (0-250 μM), pH 6, identificando-se a presença em λ <sub>em</sub> = 410 nm a existência do ponto isobéstico.....	51
Figura 13 - Gráfico do comportamento de K <sub>b</sub> em função do aumento da concentração da macromolécula no meio.....	52
Figura 14 - Distribuição de espécies de SQX. Estudo da SH na presença de SQX em função do pH (5, 6 e 7).....	53
Figura 15 - Gráfico da constante de ligação K <sub>b</sub> da SH (20 mg L <sup>-1</sup> ) em função de três valores de pH, 5 a 7.....	53

Figura 16 – Espectros no UV-vis dos sistemas avaliados em diferentes concentrações de SQX, sendo a) SH a 5 mg L <sup>-1</sup> e SQX a 25 μM e b) SH a 20 mg L <sup>-1</sup> e SQX a 25 μM, todos os sistemas em pH 6.....	55
Figura 17 - Avaliação da força iônica na interação entre SH e SQX, gráfico de K <sub>b</sub> na ausência e na presença de solução de concentração de NaCl 100, 200, e 300 mM.....	56
Figura 18 - a) Espectro de fluorescência 3D de SH. b) Espectros de fluorescência 3D de SH na presença de SQX 125 μM.....	57
Figura 19 – Espectros de fluorescência sincronizada (Δδ = 18 nm) de amostras de SH (extraídas de turfa) com SQX 0-250 μM, λ <sub>ex</sub> = 222 nm e λ <sub>em</sub> de 240-700 nm.....	59
Figura 20 - Intensidade de fluorescência em função de valores de concentrações crescentes de sulfaquinoxalina na presença de iodeto.....	60
Figura 21 - Efeito da presença de íons metálicos no processo de interação entre SH e a SQX.....	61
Figura 22 - Espectros de RMN <sup>1</sup> H de SQX na ausência e na presença de SH em pH 6.....	63
Figura 23 - Estruturas dos antimicrobianos sulfadiazina (SDZ) e SQX apresentando os grupos fenil e pirimidina.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização do teor de matéria orgânica (MO) das amostras de turfa, Substâncias Húmicas (SH), ácido fúlvico (AF), ácido húmico (AH) e humina (HUM), razão elementar (H/C e C/O) calculada pelos dados da análise elementar, quantificação de grupos funcionais por RMN <sup>13</sup> C e razão E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub> .....	31
Tabela 2 - Capacidade de complexação (CC) para diferentes espécies comparando-se com frações de MO e TC.....	35
Tabela 3 - Relação dos parâmetros cinéticos na adsorção de tetraciclina em turfa em função da variação de pH.....	41
Tabela 4 - Parâmetros de Langmuir e Freundlich para as isotermas do sistema tetraciclina e turfa. Sendo: $q_{exp}$ a capacidade de adsorção experimental.....	43
Tabela 5 - Parâmetros de ligação e termodinâmicos resultantes do estudo de interação por fluorescência molecular da SH titulada com SQX em três valores de temperatura, 295, 303 e 311 K.....	48
Tabela 6 - Relação entre a temperatura e valores de K <sub>b</sub> em diferentes complexos estudados.....	49
Tabela 7 - Valores de intensidade de absorvância em diferentes concentrações de SH e SQX do complexo formado e do ΔA em λ = 354 nm. (1) SH (5 mg L <sup>-1</sup> ) – SQX (10 μM), (2) SH (5 mg L <sup>-1</sup> ) – SQX (25 μM), (3) SH (10 mg L <sup>-1</sup> ) – SQX (10μM), (4) SH (10 mg L <sup>-1</sup> ) SQX (25 μM).....	56
Tabela 8 - Valores de K <sub>SV</sub> obtidos por fluorescência molecular no estudo de interação SH e SQX na presença de iodeto.....	61
Tabela 9 - Deslocamento químico (δ) RMN <sup>1</sup> H na ausência e presença de SQX em diferentes proporções de massa de SH. a) SQX (0,66 mg), b) 1: 4, SQX + SH (0,17 mg), c) 1: 2, SQX + SH (0,33 mg), d) 1: 1, SQX + SH (0,66 mg) em tampão de fosfato (10 mmol L <sup>-1</sup> ) e pH 6. Volume final de 600 μL.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\delta$	Deslocamento Químico
$\Delta H$	Varição de Entalpia
$\Delta G$	Varição da Energia Livre de Gibbs
$\Delta S$	Varição de Entropia
AE	Análise Elementar
AF	Ácido Fúlvico
AH	Ácido Húmico
CC	Capacidade de Complexação
D <sub>2</sub> O	Água Deuterada
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
HMB	Hexametilbenzeno
HSA	Albumina de Soro Humano
HUM	Humina
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
K <sub>b</sub>	Constante de Ligação
K <sub>SV</sub>	Constante de Stern-Volmer
MO	Matéria Orgânica
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PC	Polarização Cruzada
pH	Potencial Hidrogeniônico
pH <sub>ZPC</sub>	pH no ponto de carga zero
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDZ	Sulfadiazina
SH	Substâncias Húmicas
SMZ	Sulfametoxazol
SQX	Sulfaquinoxalina
TPSA	Trimetilsililpropionato de sódio
TC	Tetraciclina
UF-FT	Ultrafiltração em Fluxo Tangencial
UV	Ultravioleta

Vis

Visível

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	20
4.1 Reagentes e Soluções.....	20
4.2 Turfa: amostragem.....	20
4.3 Substâncias húmicas e humina.....	21
4.3.1 Extração e fracionamento.....	21
4.3.2 Purificação de SH, AH e AF.....	21
4.4 Caracterização das amostras de turfa, substâncias húmicas, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos.....	22
4.5 Determinação da concentração de TC por espectrometria de fluorescência.....	23
4.6 Determinação do tempo de equilíbrio de complexação.....	23
4.7 Capacidade de complexação de SH, AF, AH e HUM com TC.....	24
4.8 Cinética de adsorção.....	25
4.9 Isotermas de adsorção.....	26
4.10 Modelos para o estudo de adsorção.....	26
4.11 Carga no ponto zero.....	28
4.12 Espectroscopia de UV-vis nos estudos com sulfaquinoxalona.....	28
4.13 Ensaios por fluorescência molecular de SH e AH com SQX.....	28
4.14 Estudo por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN <sup>1</sup> H).....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
5.1 Estudo de SH e frações de matéria orgânica com TC.....	31
5.1.1 Caracterização.....	31
5.1.2 Estudo de interação entre as frações de MO e TC.....	34
5.1.2.1 Capacidade de complexação e o processo de adsorção.....	34

5.1.3 Interação da turfa com tetraciclina: cinética e estudos de adsorção.....	39
5.2 Estudos espectroscópicos de SH com SQX.....	46
5.2.1 Parâmetros de ligação e termodinâmicos.....	46
5.2.2 Efeito da concentração e do pH no processo de interação da SH com SQX.....	50
5.2.3 Espectroscopia UV-vis.....	54
5.2.4 Efeito da força iônica.....	56
5.2.5 Estudo de fluorescência 3D.....	57
5.2.6 Estudo por espectroscopia sincronizada.....	58
5.2.7 Ensaios com iodeto de potássio (KI).....	60
5.2.8 Estudo do efeito dos competidores: íons metálicos.....	61
5.2.9 Estudo espectroscópico por ressonância magnética nuclear (RMN).....	62
6. CONCLUSÃO.....	65
7. REFERÊNCIAS.....	66

## 1. INTRODUÇÃO

A composição da matéria orgânica (MO) está na dependência da fonte ambiental, ela é constituída de diversos compostos orgânicos encontrados em águas naturais, sedimentos e solos (AIKEN & COSTARIS, 1995; RODRÍGUEZ et al., 2014). Em geral os compostos orgânicos no solo podem ser encontrados em duas formas, Substâncias não-Húmicas e Húmicas. As Substâncias Húmicas (SH) geralmente são descritas como substâncias orgânicas naturais, altamente decomposta, polimerizada em uma estrutura de grande complexidade.

As SH podem ser classificadas de acordo com a sua solubilidade em três frações, humina (HUM), ácido fúlvico (AF) e ácido húmico (AH), sua solubilidade varia em meio ácido ou alcalino, a depender da fração de estudo. O AH apresenta reduzida solubilidade em meio ácido em condições de  $\text{pH} < 2$ , entretanto é solúvel em valores mais elevados, geralmente é mencionada como a fração de maior massa molecular, para o AF destaca-se a sua capacidade de ser solúvel em água em toda faixa de pH, contrapondo-se a essa fração temos a HUM que possui baixa solubilidade em água em quaisquer condições de pH e seu peso molecular é consideravelmente superior aos das frações citadas, motivo que justifica o seu processo de sedimentação e acumulação (SOUZA et al., 2016).

Além das frações da matéria orgânica, destaca-se a turfa, material complexo e que possui diversos componentes orgânicos, como a lignina, a celulose e os AH (STEVENSON, 1994; CUNHA et al., 2010).

As SH e a turfa atuam como excelentes agentes complexantes dadas à diversidade de grupos funcionais com diferentes cargas produzidas pela variação de pH, portanto influenciam no processo de adsorção de diferentes espécies, como íons metálicos influenciando em diferentes ações no ambiente, minimizando seus efeitos toxicológicos e associados a processos de (bio)remediação, visando à remoção de metais potencialmente tóxicos (KULIKOWSKA et al., 2015; RODRÍGUEZ et al., 2014).

O crescente desenvolvimento de produtos e o uso intensivo do solo permitiram a introdução no ambiente de compostos com diferente poder poluidor e toxicidade, tanto para a saúde humana quanto de animais. Os antibióticos de uso humano e animal, tetraciclina (TC) e a sulfaquinoxalina (SQX), se enquadram nesse grupo de substâncias que são intensamente utilizadas. A adsorção e a fixação desses compostos no solo dependem de suas propriedades físico-químicas e de uma série de outros fatores associados ao ambiente em que esses estão sendo descartados ou inseridos, como as características do solo, tipo de matéria orgânica predominante, clima e humidade (TASHO & CHO, 2016).

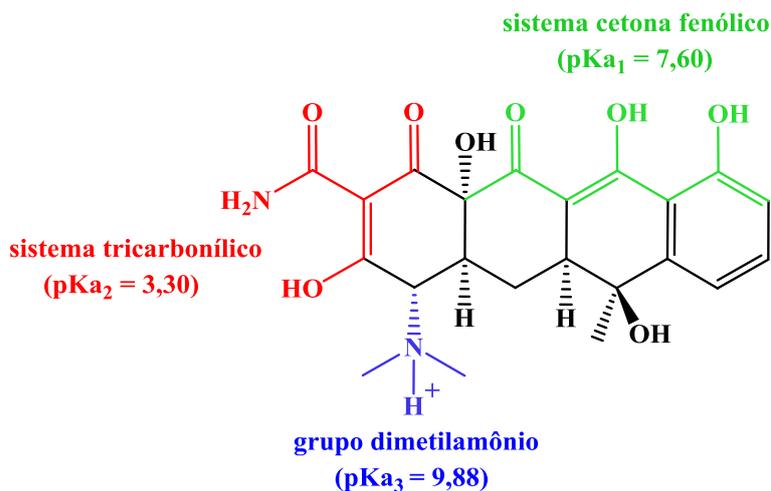
A presença de fármacos, como é o caso da TC, Figura 1, entre outros compostos orgânicos em diferentes compartimentos ambientais é uma questão emergente, dada a escassez de informações sobre o potencial impacto intimamente relacionado à sua ocorrência, seu destino e principalmente a efeitos ecotoxicológicos (BITTENCOUR et al., 2016). Este antibiótico é empregado tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. Seu uso é comum na criação de animais que são produtores de alimentos como gado e aves, assim este antimicrobiano está relacionado à promoção do crescimento dessas espécies, prevenção e controle de doenças e parasitas (GU et al. 2007). Apesar de desempenhar um papel importante para a medicina veterinária, a TC foi inserida recentemente no grupo dos contaminantes orgânicos emergentes, dada a sua presença em excrementos de animais, no leite, ovos e carne (MAHAMALLIK et al. 2015; SHALABY et al., 2011).

BORGHINI & PALMA (2014) destacaram o uso agrícola de lodo de esgoto e fertilizantes orgânicos contaminados com resíduos de TC como fonte de exposição ambiental, além de medicamentos descartados de forma inadequada (MAHAMALLIK et al., 2015). Eles mostraram que a principal via de entrada de produtos farmacêuticos no meio ambiente é por meio do esgoto doméstico, tratado ou não. Esses produtos podem estar presentes em águas superficiais através de tratamento de águas residuais efluentes de plantas ou de escoamento agrícola, essas ações contribuem para ampliar os efeitos negativos no ambiente aquático e no solo (INOSTROZA et al., 2017).

Assim, deve-se considerar que a bioacumulação da TC em espécies vegetais e em microrganismos está associada a sua disponibilidade no solo e em águas (PEREIRA et al., 2012). Este processo pode ser verificado a partir da interação deste fármaco com espécies existentes no solo.

A interação da TC com macromoléculas presentes no solo como as SH pode apresentar comportamentos diferentes. Neste caso, verifica-se que conforme os valores dos  $pK_a$  para a TC, Figura 1, podem existir até quatro espécies diferentes da molécula susceptíveis a interação, tais como  $H_3T^+$ ,  $H_2T$ ,  $HT^-$  e  $T^{2-}$ , e o maior ou menor distribuição das espécies presentes estão relacionado diretamente ao pH do meio.

**Figura 1 – Grupos funcionais da tetraciclina e associação com os valores de  $pK_a$ .**



**Fonte:** Souza et al., 2016

Diante de uma diversidade de princípios ativos de uso veterinário, posterior à TC, as sulfonamidas correspondem à classe de antimicrobianos mais convencionalmente utilizada com esse objetivo, utilizada há quase 50 anos. A SQX é um *N*-derivado da 4-aminobenzeno-sulfonamida, uma categoria de antibióticos sintéticos (JAMAL et al., 2014), seu emprego é devido ao amplo espectro de ação em bactérias Gram positivas, Gram negativas e protozoários, além de apresentar um valor acessível (HOFF & KIST, 2009).

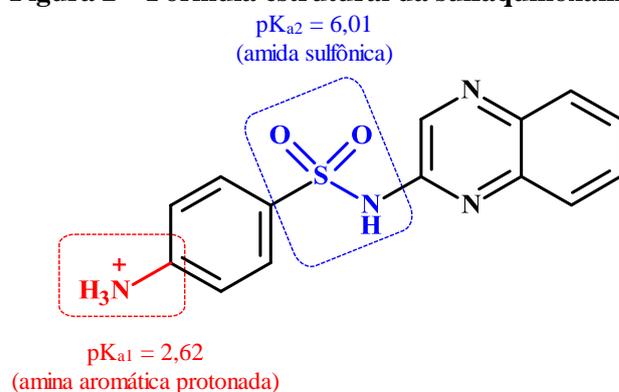
A SQX desempenha atividade bactericida e é utilizada em larga escala no tratamento contra infecções causadas por microrganismos principalmente em aves. Ela atua inibindo a síntese do ácido fólico e também apresentação bacteriostática, sua atividade como bactericida dá-se por ação combinada, assim pode agir como um potente agente antimicrobiano. É relatado na literatura que o aspecto benéfico de antibióticos adicionados na alimentação animal foi descoberto em 1950 (PEREIRA et al., 2012; SILVA et al., 2014).

Assim como a TC, o uso da SQX para tratamento e profilaxia de doenças na medicina veterinária pode gerar resíduos que chegam ao meio ambiente, motivo este que é necessário cuidado ao se fazer o uso desse fármaco. A prescrição de forma indiscriminada e sem controle potencializa a geração de resíduos, acarretando efeitos tóxicos, possíveis reações alérgicas e principalmente resistência bacteriana (SILVA FILHO et al., 2013). A seguir é apresentada na Figura 2 a fórmula estrutural da sulfaquinoxalina.

Estudo realizado por MASELLI et al. (2013), relatam que já foram detectados resíduos de antibiótico veterinário no solo, sedimento, no lodo de tratamento de esgoto, nas águas superficiais e subterrâneas e em efluente industrial. Também já foi identificada a presença de

resíduos proibitivos de sulfas em carne e ovos. É de responsabilidade da rede de laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) atuar na identificação de resíduos de antibióticos presentes em alimentos de origem animal. (LINDSEY et al., 2001; MIAO et al., 2004).

**Figura 2 – Fórmula estrutural da sulfaquinoxalina.**



**Fonte:** Hoff, R., 2014

A presença de diversos grupos funcionais na estrutura das SH e nas suas frações possibilita a sua interação com essas espécies poluentes no meio ambiente, podendo produzir diferentes efeitos em seu comportamento ambiental (KUN et al., 2014). As sulfonamidas apresentam uma ação mais intensa em valores de pH que variam de 7 a 8, acrescido ao tempo de exposição (TASHO & CHO, 2016). Vale ressaltar que, normalmente, o limite de concentração de antibióticos utilizados no ambiente não é totalmente regulamentado e a lei não exige que os resíduos animais sejam tratados na maioria dos casos, sendo, portanto uma das grandes preocupações relacionadas ao uso das sulfas e sua exposição ao meio, uma vez que o uso de antibióticos é um dos principais contribuintes para o surgimento de microrganismos resistentes (TAPPE et al., 2013; TASHO & CHO, 2016).

Estudos relacionados às frações da SH têm expandido a questão ambiental no que tange a interação com outros fármacos. Existem algumas pesquisas realizadas por Carlos et al. (2012) com seis poluentes emergentes (ácido clofíbrico, amoxicilina, acetamiprida, acetaminofeno, carbamazepina, e cafeína) que mostram a influência do AH, fração da SH, no processo de degradação fotoquímica de efluentes sintéticos contendo a mistura destes compostos, inferindo sobre a importância de se considerar tais interações das SH com possíveis poluentes no ambiente.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os impactos ambientais vêm se intensificando dada de uma série de fatores. Observa-se que o crescimento da população de forma desenfreada, ocupações de áreas inadequadas, agricultura intensiva que leva o uso de agroquímicos, além de fármacos, o aumento da produção de diversos resíduos atrelado a sua periculosidade são fatores mais do que suficientes para impactar o ambiente.

Por meio dos fatores que geram danos ambientais oriundos da ação humana, o solo é conduzido à degradação e concomitante perda de sua capacidade de suporte aos processos naturais necessários ao equilíbrio.

Desta forma, é importante compreender os fatores que afetam a mobilidade dos antibióticos no solo, quando se faz necessário minimizar o seu transporte para as águas subterrâneas e evitar o escoamento resultante da poluição de fontes não pontuais, assim este trabalho teve como objetivo avaliar o papel das frações da matéria orgânica como possíveis agentes complexantes, estudar a interação dessas frações com o antibiótico TC e SQX, visando entender o comportamento desses contaminantes no meio e assim minimizar danos ambientais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho visa avaliar a influência das frações da matéria orgânica (MO), como substâncias húmicas (SH) extraídas de turfa, ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) e humina (HUM) como possíveis agentes complexantes, além de estudar a interação dessas frações com o antibiótico TC por meio da técnica de adsorção, e para a SQX empregando-se ensaios espectroscópicos. Desta maneira, busca-se entender a ação desses contaminantes no meio para que assim seja possível minimizar danos ambientais.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar as contribuições das frações de MO (SH, AF, AH) na retenção/complexação da TC por ultrafiltração tangencial;
- b) Realizar estudos de adsorção da TC com turfa e humina, visando avaliar a viabilidade da aplicação desses adsorventes naturais no processo de remediação ambiental.
- c) Avaliar a interação da TC e da SQX com SH extraídas de amostras de turfa *in natura*;
- d) Estudar a interação da SQX com as frações da matéria orgânica (MO), presentes no solo, para entender o comportamento desses poluentes no ambiente, por meio de ensaios espectroscópicos, simulando condições ambientais.

## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados são de pureza analítica. Para ajuste do pH dos sistemas avaliados se empregou HCl 2 M (Suprapure, Merck AG, Alemanha) ou NaOH 1 M (Suprapure, Merck AG, Alemanha) em água de alta pureza (resistividade de 18,2 MΩ Cm a 25°C, sistema Milli-Q, Millipore, Billerica, MA, EUA).

Foram preparadas soluções estoque a 50 mg L<sup>-1</sup> de SH em tampão fosfato 10 mM. Para o estudo de interação das frações de MO com TC, as soluções estoque do antimicrobiano (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e as de trabalho foram preparadas em água Milli-Q e submetidas a ajuste de pH para 5,0. Preparou-se uma solução estoque de TC a 500 mg L<sup>-1</sup>, dissolvendo-se aproximadamente 0,05 g desse antibiótico em metanol para um volume final de 100 mL.

As soluções de trabalho de tetraciclina para análise quantitativa foram preparadas em solução tampão, a qual foi preparada a partir da dissolução de 0,62 g de ácido bórico (0,1 M), 0,64 g de acetato de magnésio (30 mM), 0,28 g de hidróxido de potássio (5 mM), 0,18 g EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (5 mM) e brometo de cetiltrimetilamônio (1 mM) para 100 mL, sendo o pH ajustado para 9,2 com hidróxido de sódio 1 M.

Para medição dos espectros de absorvância a concentração final de SH foi fixada em 5 mg L<sup>-1</sup>. Neste estudo, empregou-se uma solução estoque de TC 500 em metanol foram obtidas soluções de trabalho a concentração final correspondem a 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 20,0 μM.

Nos ensaios com a sulfaquinoxalina (SQX) foram preparadas soluções estoque de SH e AH a 50 mg L<sup>-1</sup> em pH 6. Nos estudos iniciais, se avaliou as concentrações 5,0; 10,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup> para ambos os sistemas, SH e AH. Todos os ensaios com sulfaquinoxalina foram realizados com SH a 20,0 mg L<sup>-1</sup>. Para o preparo da solução do antibiótico SQX se dissolveu 3,22 mg em 1 mL de DMSO, e em seguida, o sistema foi avolumado para 10 mL com tampão fosfato. Todas as soluções foram preparadas com tampão fosfato a pH 6. Adicionalmente, para ensaios de interação foram preparadas soluções estoque de NaCl e KI a 2 e 1 M, respectivamente.

### 4.2 Turfa: amostragem

As amostras de turfa foram coletadas na região do rio Mogi do município de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil, conforme informado por Souza e colaboradores, 2016.

No processo de amostragem, foram coletados 25 kg de turfa da região do rio Mogi no município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. As amostras foram transferidas para tabuleiros de madeira, secadas ao ar e submetidas à peneiração com malha de 2 mm.

### **4.3 Substâncias húmicas e humina**

#### **4.3.1 Extração e fracionamento**

Embora não seja possível detalhar com precisão a estrutura de uma SH, faz-se necessário entendê-la a partir de procedimentos que forneçam informações seguras a respeito da sua complexidade. As etapas de extração, fracionamento e purificação com as amostras neste estudo foram realizadas no grupo Química Ambiental do Instituto de Química da UNESP-Araraquara.

Realizou-se a extração de SH de turfa a partir do procedimento adotado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), utilizando como extrator uma solução de NaOH a 0,1 M, na razão 1:10 (m/v), durante 4 h em atmosfera de N<sub>2</sub>, esse procedimento a priori garante a obtenção de um extrato de baixa solubilidade, denominado humina (IHSS 2015). De acordo com Rocha et al. (2009) esse método é capaz de extrair até 80% de MO do solo, todavia é importante destacar que esse procedimento pode levar a alterações estruturais. Um segundo processo é o fracionamento, tem como papel obter frações bem distintas. Essa etapa tem como objetivo compreender melhor matrizes complexas de MO, assim ela corresponde a uma das técnicas mais relevantes para o estudo do comportamento de SH. Toda a etapa de separação baseou-se na solubilidade das frações de MO frente a determinados valores de pH, tal procedimento segue as normas adotadas pela IHSS.

Inicialmente isolou-se a HUM, considerada uma fração de baixa solubilidade em qualquer intervalo de pH, a mesma foi encaminhada cuidadosamente a lavagem com água ultrapura, separada por centrifugação e submetida à secagem em uma temperatura de 60°C por 24 h, até que fosse verificada a constância da massa obtida. Para a obtenção das demais frações, foi necessário acidificar o meio com uma solução de HCl 0,1 M, (pH ~1) submetido ao processo de centrifugação e sedimentação para que assim fosse precipitado o AH que é solúvel apenas em meio alcalino. Após a coleta do AH, apenas a fração de AF ficou em solução, a qual é solúvel em qualquer faixa de pH.

#### **4.3.2 Purificação de SH, AH e AF**

As SH, AF e AH extraídas de amostras de turfa foram submetidas à purificação. Foram realizadas diálises para a eliminação de sais solúveis, com todas as amostras em

estudo, segundo procedimento descrito por Town et al. (1992). A água externa foi substituída três vezes, a cada 3-5 h, e posteriormente a cada 12 h, para garantir a ausência de íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) e consequentemente evitar a precipitação e ou a formação de complexos dado a sua presença. Os extratos foram submetidos à evaporação e posteriormente secos em um forno de ar circulante a uma temperatura de 50°C.

#### **4.4 Caracterização das amostras de turfa, substâncias húmicas, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos**

O processo de caracterização das amostras foi realizado pelo grupo de Química Ambiental do Instituto de Química da UNESP- Araraquara, conforme procedimentos adotados pela IHSS.

A composição elementar das amostras de turfa, SH, AH e AF foi obtida utilizando um analisador elementar (Thermo Finnigan, modelo Flash EA 1112). O teor de MO das amostras foi determinado por análise gravimétrica, em triplicata, calcinando 10 g da amostra a 750°C, durante 4 h, de forma que a matéria inorgânica foi considerada como o resíduo final calcinado. O cálculo do teor de MO foi obtido fazendo-se a diferença entre a amostra calcinada com a *in natura* seca (ROSA et al., 2000).

As técnicas espectroscópicas foram utilizadas nos estudos de SH e suas frações. A espectroscopia no UV-vis suporta os experimentos iniciais e traz informações importantes acerca da estrutura química (SANTOS, 2014). Para a obtenção dos espectros foram medidas massas de 2,0 mg de amostras de turfa, SH, AF e AH, em seguida submetidas à dissolução em um volume de 10 mL de solução 0,05 M de NaHCO<sub>3</sub>.

As medições da absorvância foram realizadas nos seguintes comprimentos de onda, 465 e 665 nm, em um espectrômetro DR 3900 (modelo Rack), no Laboratório de Ciências Ambientais do Agreste (LCCA) localizado no campus UFAL Arapiraca. Os espectros nestes valores estabelecem a razão E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>, que permitem avaliar o grau de humificação e a capacidade de complexação das SH e de suas frações.

No processo de caracterização dessas espécies, para auxílio na identificação dos grupos funcionais emprega-se a técnica de ressonância magnética nuclear <sup>13</sup>C (RMN) com polarização cruzada (PC) (SANTOS, 2014).

Na análise espectroscópica foi utilizada uma cubeta de vidro, de caminho óptico de 10 mm, e as medições foram obtidas em um espectrômetro modelo Hitachi U2000 (GAO et al., 1999; KONONOVA, 1966). Os experimentos de RMN <sup>13</sup>C com polarização cruzada foram realizados em um espectrômetro Varian (modelo Unity Inova 400).

No estudo por de RMN  $^{13}\text{C}$ , as amostras preparadas foram colocadas em um rotor de zircônio com um cilindro de diâmetro de 5 mm e centrifugada a 3 kHz numa sonda *Doty Supersonic* específica para teste de sólidos. As condições experimentais foram as seguintes frequência de ressonância 100,05 MHz para  $^{13}\text{C}$ , banda espectral de 20 KHz para PC, impulso de preparação de prótons de 3,8  $\mu\text{s}$ , tempo de contato de 1 ms, tempo de aquisição 12,8 ms e tempo de espera para relaxação de 500 ms. Os valores do deslocamento químico ( $\Delta\delta$ ) foram referenciados ao hexametil benzeno (HMB), que tem uma linha bem definida em 17,2 ppm.

Posterior aos estudos de caracterização, foram realizados estudos de interação entre frações da MO e TC. Todo o experimento foi baseado no procedimento analítico proposto por Burba et al. (2001), que se baseia na ultrafiltração em fluxo tangencial (UF-FT), realizada com as SH, AH, AF, HUM e a TC. O sistema de ultrafiltração é equipado por uma membrana de 1 kDa (Gelman Pall-Filtron Omega), onde ocorre a separação, da TC livre daquela que não complexou com as frações da MO, pois esta apresenta uma massa menor que 1 kDa, princípio este que explica o processo de separação por tamanho molecular (BERGH et al., 2001).

#### **4.5 Determinação da concentração de TC por espectrometria de fluorescência**

A determinação da concentração de TC livre realizada por espectrofluorimetria, utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF5301PC, Japão), realizado no Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica (LINQA) localizado no campus A.C. Simões da Universidade Federal de Alagoas.

A construção da curva de analítica para determinar a TC livre de 0,025 a 0,500  $\text{mg L}^{-1}$ , e todas as soluções foram preparadas em solução tampão (pH 9,2). Em tubos falcon, adicionou-se 1 mL da solução tampão e 2 mL da solução de TC, amostra ou o padrão, que em seguida foi encaminhada para as medições espectrofluorimétricas ( $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 502 \text{ nm}$ ), em cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm (PENA et al., 1998).

#### **4.6 Determinação do tempo de equilíbrio de complexação**

Com base neste estudo cinético de complexação da TC com a SH, se obtém o tempo mínimo necessário para que uma espécie de interesse forme complexo com as SH. Para tanto, utilizou-se um sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial desenvolvido (BURBA et al., 2001). Esta técnica de separação é formada por um sistema conectado a uma membrana de 1 kDa e 47 mm de diâmetro (polietersulfônica, Gelman Pall-Filtron OMEGA/Celulose regenerada) que só permite a passagem da TC na forma livre.

É um sistema versátil e de fácil manuseio, sem a necessidade de adição de reagentes, dessa forma não acarreta alterações significativas às amostras originais, todavia alguns cuidados deve-se tomar, por exemplo, verificar a montagem correta do sistema para garantir que está ocorrendo a filtração, observar imediatamente se ao iniciar o sistema em fluxo se não está ocorrendo vazamento da solução de trabalho.

Faz-se necessário verificar a aposição correta da membrana, além disso, deve-se ter cuidado para não ocorrer entupimento da mesma que é utilizada no sistema, esse fato pode ocorrer dado o aumento da concentração do soluto na superfície ou quando se faz uso de um soluto que apresenta baixa solubilidade no meio.

Mediu-se uma massa de 4,0 mg de SH que foram dissolvidas em 192 mL de água pura a fim de obter uma solução  $20,83 \text{ mg L}^{-1}$ . Nesta solução, foram adicionados 8 mL de uma solução de cloridrato de tetraciclina a  $125 \text{ mg L}^{-1}$ , cuja concentração final deste antimicrobiano foi de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  e para a SH de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Em intervalos, que variaram de 10 a 120 min foram coletadas 10 alíquotas, de aproximadamente 1,0 mL cada, para a determinação do tempo de equilíbrio de complexação.

Todas as amostras coletadas foram encaminhadas para determinação da concentração da TC livre por espectrometria de fluorescência molecular e diante dos resultados lançados, traçou-se uma curva referente à porcentagem de TC complexada em função do tempo.

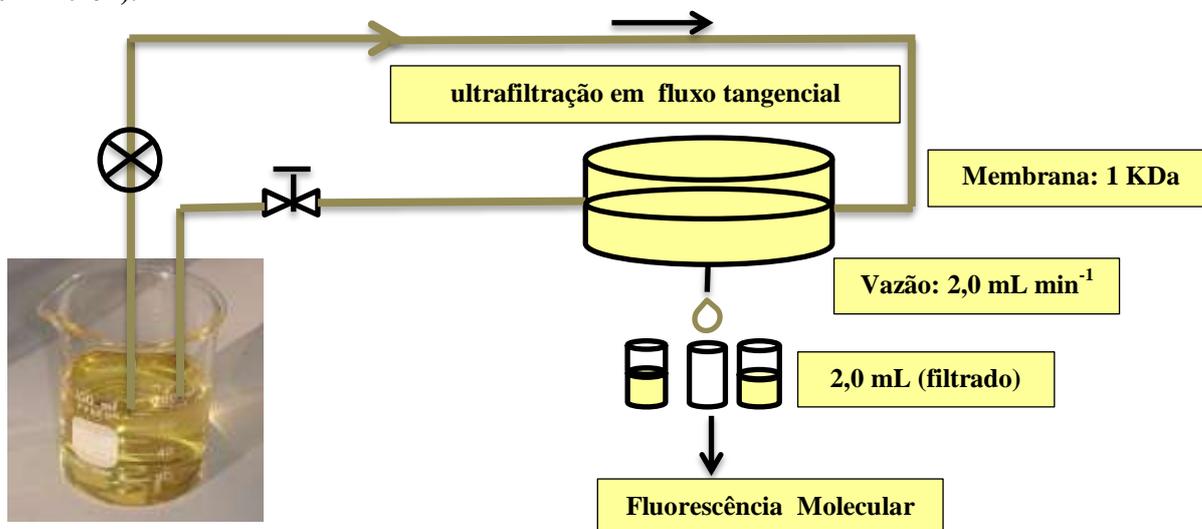
#### **4.7 Capacidade de complexação de SH, AF, AH e HUM com TC**

Para a determinação da capacidade de complexação (CC) foram medidas massas de 4,0 mg de SH, AF, AH e HUM e em seguida dissolveram-nas em água até obterem-se soluções dessas amostras a  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , com exceção da humina é apresenta baixa solubilidade. Exatos 200 mL dessas soluções foram empregados em titulações, com pH ajustado para 5,0. A princípio foi necessário deixar o sistema montado bombeando a solução inicial por 5 min, antes de adicionar a solução de TC, esse tempo foi necessário para o condicionamento da membrana ao meio que iria ser submetida.

Após o ajuste do sistema de UF-FT, coletou-se por filtração uma alíquota correspondente a 2,0 mL, referente ao tempo zero (branco), antes de adicionar a solução de TC. Em seguida, foram adicionando-se volumes da solução estoque de TC às soluções de SH, AF, AH e HUM para a obtenção de concentrações finais equivalentes a 0,05; 0,20; 0,40; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00 e  $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Após a adição de TC nas concentrações mencionadas, a solução resultante permaneceu por 20 min sob agitação, para que posteriormente fosse filtrada (Figura 3), e encaminhada para determinação da concentração de TC livre por fluorescência

molecular. Para determinar a capacidade de complexação (CC) traçou-se uma curva referente à concentração de TC total (adicionada) versus a concentração de TC livre.

**Figura 3 – Esquema do procedimento analítico utilizado para estudo de complexação entre Substâncias Húmicas de turfa e TC. Condições: sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial, equipado com membrana de porosidade 1 kDa e 47 mm de diâmetro (polietersulfônica, Gelman Pall-Filtron).**



Fonte: Autora deste trabalho, 2018

Após a adição de TC nas concentrações mencionadas, a solução resultante permaneceu por 20 minutos sob agitação, para que posteriormente fosse filtrada e fosse obtido o equilíbrio de troca. Conforme Figura 3, volumes de aproximadamente 2,0 mL foram coletados e encaminhados para determinação da concentração de TC livre por espectrometria de fluorescência.

Para determinar a CC traçou-se uma curva referente à concentração de TC adicionada versus a concentração de TC livre, esta obtida por meio do sistema de UF-FT.

#### 4.8 Cinética de adsorção

Os estudos cinéticos de adsorção foram realizados a uma temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e a uma agitação constante a 125 rpm. Em seguida alíquotas de 15,0 mL de solução do antimicrobiano TC a  $17,0 \text{ mg L}^{-1}$  foi transferida, usando uma pipeta, para frascos de polietileno com capacidade para 25,0 mL. Para determinar a influência do pH no processo de adsorção, foram realizados experimentos em diferentes valores de pH, 3, 4 e 5. Neste caso, adicionou-se 50,0 mg de turfa *in natura* em recipientes e ajustaram-se os valores de pH desejados com solução de HCl 1 M. Após o ajuste do pH, o sistema ficou sob agitação em intervalo de tempo que variou de 10 min a 50 h, para cada pH em estudo. Todas as misturas foram filtradas utilizando um sistema adaptado com membrana de filtração Millipore de 0,45

µm (celulose). Cada filtrado após ser recolhido foi encaminhado para determinação da TC remanescente (livre) por espectrometria de fluorescência molecular.

Diante dos dados, a quantidade de TC adsorvida no material foi calculada fazendo-se a diferença entre as concentrações inicial e final, e para isso utilizou-se a seguinte equação, (eq. 1):

$$q = \frac{(C_0 - C) \times V}{m} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo q a capacidade de adsorção da TC por mg por grama de turfa,  $C_0$  corresponde a concentração inicial de TC em  $\text{mg L}^{-1}$ , C a concentração final em  $\text{mg L}^{-1}$ , V o volume da solução em litro e m a massa do adsorvente em g.

#### 4.9 Isotermas de adsorção

Os experimentos voltados para o estudo da cinética de adsorção, realizados com a TC e a turfa *in natura*, foram desenvolvidos em pH 5 e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Durante o processo experimental, as amostras de turfa com TC foram submetidas à agitação, em mesa agitadora, em intervalos de tempo correspondentes a 1, 4 e 24 h. Para isso, pesaram-se amostras de 50 mg de turfa e em seguida foram transferidas para recipientes de polietileno. Cada recipiente recebia 15 mL de solução de TC nas seguintes concentrações: 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 75,0 e 100,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

Esse procedimento experimental foi empregado com o sistema HUM e TC, de forma semelhante ao realizado com a turfa. Pesou-se 5,0 mg de amostras de HUM, em seguida as massas pesadas foram encaminhadas para recipientes de polietileno. Em cada tubo, foi inserido 200 mL de solução de TC em diferentes concentrações, necessárias para a obtenção da cinética de adsorção com essa fração da SH. As soluções de TC utilizadas foram de diferentes concentrações, tais valores foram 0,10; 0,20; 0,40; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00 e 10,00  $\text{mg L}^{-1}$ . Estabeleceu-se 20 min como o tempo necessário para agitação durante o processo de adsorção, após o término do procedimento o filtrado submetido à determinação da concentração da TC nas amostras quantificadas.

#### 4.10 Modelos para o estudo de adsorção

O primeiro modelo proposto é o de Lagergren. Este modelo foi desenvolvido para adsorção de sistemas sólido-líquido, ele é indicado quando se deseja determinar a taxa de adsorção de um determinado soluto em uma solução líquida. Neste caso, a equação que é utilizada é representada por:

$$\frac{dq_e}{q_t} = K_1(q_e - q_t) \quad \text{Equação 2}$$

De acordo com a fórmula apresentada,  $q_e$  é a quantidade de adsorvato que ficou na superfície do sólido retido em equilíbrio, dado em  $\text{mg g}^{-1}$ ,  $q_t$  representa a quantidade de adsorvato que foi retida no tempo  $t$ , dado em  $\text{mg g}^{-1}$ ,  $K_1$  é uma constante para a taxa de reação de pseudo-primeira ordem e  $t$  é o tempo em minutos. Por meio da linearização da eq. 2, obtém-se a eq. 3:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - K_1 t \quad \text{Equação 3}$$

Entretanto para experimentos que se estendem em tempos maiores, a equação fornecida acima não apresenta bons resultados, assim ela é mais adequada para modelos de adsorção nos 20 a 30 min iniciais (AKSU, 2001).

Além do modelo de Lagergren, o modelo de pseudo-segunda ordem também é baseado na capacidade de adsorção do adsorvente. Ao contrário do que foi apresentado, este modelo pode ser aplicado para o estudo do comportamento cinético ao longo de todo o tempo experimental, sem nenhuma restrição quanto ao tempo de equilíbrio. A seguir é apresentada a equação 4 que é indicada para este modelo:

$$\frac{dq_t}{q_t} = k_2 (q_e - q_t)^2 \quad \text{Equação 4}$$

$K_2$  é a constante de velocidade da equação do modelo de pseudo-segunda ordem, e que após integração e linearização, ela pode ser descrita da seguinte forma. eq. 5.

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_t} \quad \text{Equação 5}$$

No modelo intraparticular, a cinética de adsorção é controlada por difusão da superfície para os locais intraparticulares (SOUSA et al., 2007). Este modelo de difusão intraparticular é expresso pela seguinte expressão cinética, eq. 6:

$$q_t = k_p t^{0,5} + C \quad \text{Equação 6}$$

Nesta expressão,  $q_t$  é a capacidade de adsorção individual considerando o tempo em estudo,  $K_p$  a constante de difusão intraparticular,  $t$  é o tempo em minutos e  $C$  a concentração em  $\text{mg L}^{-1}$ .

Além dos modelos de adsorção apresentados, o modelo cinético de Elovich envolve um processo de quimissorção, neste caso é que a superfície adsorvente é heterogênea (HO, 2006), a seguir é apresenta a equação 7 para o modelo de Elovich.

$$\frac{dq_t}{q_t} = \alpha e^{(-\beta q_t)} \quad \text{Equação 7}$$

Nesta expressão  $\alpha$  e  $\beta$  são as constantes e  $q_t$  a massa das espécies adsorvidas. A constante  $\alpha$  corresponde à velocidade inicial, dada em  $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$  e  $\beta$  indica o número de locais adequado para a adsorção no sistema, dado em  $\text{mg g}^{-1}$ . Assim, após o processo de integração da equação 7, temos a seguinte expressão:

$$q_t = \alpha + \beta \ln q_t \quad \text{Equação 8}$$

A aplicabilidade dos modelos apresentados foi verificada pelos gráficos  $\ln(q_e - q_t)$  versus  $t$ ,  $\frac{t}{q_t}$  versus  $t$ ,  $q_t$  versus  $t_{1/2}$  e  $q_t$  versus  $\ln t$ , respectivamente.

#### 4.11 Carga no ponto zero

Inicialmente ajustou-se o pH de uma solução de NaCl para valores entre 2 e 12 por adição de soluções de HCl ou NaOH. Foi necessário borbulhar  $\text{N}_2$  na solução, a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , para que ocorresse a remoção do dióxido de carbono dissolvido, atingindo um equilíbrio do pH inicial. Em seguida, em um volume de 50 mL de solução, foi adicionado uma massa de 0,10 g de turfa e o mesmo foi empregado para a HUM, e aguardou-se uma nova estabilização do valor do pH. Transcorridos 24 h, fez-se o registro do valor para o pH final.

Com os dados obtidos por meio do procedimento experimental, construiu-se um gráfico pH final versus pH inicial, os dados foram utilizados para determinar o ponto em que os valores de pH inicial e final permaneceram iguais ou onde mostraram uma mínima diferença (KHAN & SARWAR, 2007).

#### 4.12 Espectroscopia de UV-vis nos estudos com sulfaquinoxalina

As medidas espectroscópicas foram realizadas em um espectrofotômetro de duplo feixe Micronal (AJX-6100PC modelo, Brasil) utilizando cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico, no Laboratório de Instrumentação em Química Analítica – LINQA da UFAL campus A.C. Simões. Para esse ensaio foi avaliado o sinal de absorvância da SQX na ausência e na presença da SH, bem como a absorvância da SH livre. As concentrações utilizadas foram de 10 e 25  $\mu\text{M}$  para a SQX e 10  $\text{mg L}^{-1}$  para a SH e o registro dos espectros na faixa de 200 a 500 nm.

#### 4.13 Ensaios por fluorescência molecular de SH e AH com SQX

As medidas espectrofluorimétricas foram realizadas usando um espectrofluorímetro Shimadzu RF (5301PC, Japão), localizado na Central Analítica do Instituto de Química e

Biociência da UFAL, tendo como fonte de radiação uma lâmpada de xenônio (150 W) e empregando cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico, com as quatro faces transparentes. Durante as titulações espectrofluorimétricas manteve-se a concentração de SH ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) constante, com adição de quantidades crescentes de SQX, variando de 0-250  $\mu\text{M}$ .

Os espectros de emissão de fluorescência da SH foram obtidos empregando-se  $\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 497 \text{ nm}$ , com *slit* de 10 nm para excitação e emissão. Após o tempo de incubação (20 min) as medidas analíticas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata. Para determinação dos parâmetros termodinâmicos, foram realizadas titulações empregando-se três valores de temperatura 295, 303 e 311 K.

O efeito do pH em diferentes frações da matéria orgânica foi avaliado em soluções de SH e AH a  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , as quais foram tituladas com SQX em três valores de pH, os quais são 5, 6 e 7. Para a avaliação do efeito da força iônica foi utilizada uma solução de NaCl, em valores de concentração na faixa de 50-300 mM.

Os estudos por fluorescência 3D têm como objetivo obter informações acerca das variações estruturais, da origem e da presença dos possíveis grupos funcionais predominantes nas SH na presença da SQX (RODRÍGUEZ et al., 2014). Os espectros de fluorescência 3D foram obtidos a partir da SH  $20 \text{ mg L}^{-1}$  em pH 6, na ausência e na presença de SQX a  $125 \text{ M}$ . As medidas espectrofluorimétricas para excitação foram realizadas de 240-500 nm, enquanto para emissão de 250-700 nm.

O estudo de fluorescência sincronizada baseia-se na medição da intensidade de fluorescência ao mesmo tempo em que se varre os comprimentos de onda de excitação ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) e de emissão ( $\lambda_{\text{em}}$ ), mantendo uma diferença constante de comprimento de onda otimizado em  $\Delta\lambda(\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}}) = 18 \text{ nm}$ . O objetivo deste estudo consistiu em identificar os grupos funcionais presentes na SH, assim como a investigação de presença de estruturas monoaromáticas, indicativo do grau de humificação (SHIRSHOVA et al, 2009). As amostras foram excitadas em 222 nm e a emissão registrada na faixa 240 a 700 nm.

Titulações com solução de iodeto (I) promovem o *quenching* dinâmico de moléculas fluorescentes em solução, entretanto é necessário que o ligante esteja acessível para que assim ocorra a interação. Dado a avaliação do tipo de *quenching*, essas titulações com KI destinam-se a avaliar o grau de exposição dos fluoróforos da SH ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) na presença e na ausência da SQX, para tal fim determinou-se a constante de Stern-Volmer ( $K_{\text{SV}}$ ) como parâmetro para inferirmos o modo de ligação dado a presença do KI (PACHECO & BRUZZONE, 2012).

Para tanto se empregou soluções de SQX a 0, 25 e 100  $\mu\text{M}$  e de KI de 0-250 mM neste procedimento experimental.

Por fim, foi avaliada a influência de possíveis espécies competidoras no processo de interação da SH com a SQX. Para esta etapa experimental, selecionaram-se as seguintes espécies iônicas: Ca(II), Mg(II), Al(III), Cu(II), Zn(II), Fe(II), Fe(III), Cr(III), Cr(VI) e Mn(II), as quais foram mantidas a concentração de 10  $\mu\text{M}$ . De forma geral, empregaram-se como parâmetros de avaliação os valores de  $K_{SV}$  (constante de Stern-Volmer) e  $K_b$  (constante de ligação) nos estudos por fluorescência molecular.

#### 4.14 Estudo por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN $^1\text{H}$ )

O estudo da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para o núcleo de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) necessitou de solução estoque de SQX a 3,3  $\text{mg mL}^{-1}$  em DMSO- $d_6$  (Sigma). A solução estoque de SH a 3,3  $\text{mg L}^{-1}$  foi preparada em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). O ajuste do pH do meio foi dado pelo uso de solução tampão fosfato a 10 mM em água deuterada e pH 6. Para ajuste da referência (zero) empregou-se 10  $\mu\text{L}$  de trimetilsililpropionato de sódio (TPSA) preparado em água deuterada em tubos criogênicos. A partir dessas soluções, quatro diferentes sistemas foram utilizados no estudo de RMN  $^1\text{H}$  mantendo-se a concentração de SQX fixa em 0,66  $\text{mg mL}^{-1}$  e variando a concentração da SH em 0; 0,17; 0,33 e 0,66  $\text{mg L}^{-1}$ . O volume final de todos os sistemas foi de 600  $\mu\text{L}$ . O perfil do sinal e o deslocamento químico (em ppm) foram os principais parâmetros utilizados para avaliar a influência da concentração da SH no processo de interação com a SQX. Os valores para o deslocamento químico foram calculados a partir da equação 14.

$$\Delta\delta = \delta_{\text{complexo}} - \delta_{\text{livre}} \quad \text{Equação 14}$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Estudo de SH e frações de matéria orgânica com TC

#### 5.1.1 Caracterização

Foram realizadas a caracterização das amostras de turfa *in natura*, SH, AH, AF e HUM e determinado o teor de MO. A matéria orgânica se apresenta como o principal componente responsável pela biodisponibilidade de diversas espécies orgânicas e inorgânicas no ambiente. A análise elementar (H, C, O) permitiu determinar a razão elementar H/C e C/O. Para os grupos funcionais foram empregados estudos de RMN  $^{13}\text{C}$  e razão  $E_4/E_6$ , que corresponde a um parâmetro utilizado nos estudos por espectroscopia de UV-vis. A avaliação da razão  $E_4/E_6$  foi realizada nos seguintes comprimentos de onda, 465 nm e 665 nm, respectivamente. Os resultados obtidos das absorvâncias são úteis para se chegar ao valor da razão  $E_4/E_6$ . É importante destacar que esta razão independe dos valores da concentração da SH, AH, AF nas soluções, entretanto pode-se observar variações a depender do valor do pH da solução. De forma geral, o valor da razão  $E_4/E_6$  está associado ao grau de condensação dos constituintes aromáticos nas espécies húmicas.

A Tabela 1 a seguir mostra os níveis de MO total, determinado por calcinação. Os valores apresentados indicam o teor de matéria orgânica para a turfa, SH e HUM, porém para as frações AF e AH o parâmetro não foi avaliado. Os dados mostram que a turfa *in natura* apresentou um teor de MO de 58,44%, entretanto para a SH esse parâmetro foi maior, 78,70%, dessa forma pode-se inferir que a SH apresenta níveis mais elevados ainda quando está isolada. Para a amostra de HUM foi observado o menor teor de MO.

**Tabela 1.** Caracterização do teor de matéria orgânica (MO) das amostras de turfa, substâncias húmicas (SH), ácido fúlvico (AF), ácido húmico (AH) e humina (HUM), razão elementar (H/C e C/O) calculada pelos dados da análise elementar, quantificação de grupos funcionais por RMN  $^{13}\text{C}$  e razão  $E_4/E_6$ .

Parâmetro	Método	Amostras				
		turfa	SH	AF	AH	HUM
MO(%)	Calcinação	58,44	78,70	--	--	27,50
H/C	AE	1,13	1,16	1,18	1,20	--
C/O		1,87	0,81	0,88	0,96	--
Alifático (%)	RMN $^{13}\text{C}$	20,8	23,7	28,8	34,0	32,0
Éter (%)		7,2	4,2	8,9	12,0	13,0
Aromático (%)		60,6	61,6	34,0	23,0	33,0
Carboxílico, éster, e amida (%)		10,5	10,5	29,3	31,0	22,0
$E_4/E_6$	UV-vis	3,67	3,47	3,38	3,21	1,15

**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018. (--) indicando que o parâmetro não foi determinado

Os resultados da análise elementar mostram que as razões atômicas H/C são essenciais para entender os possíveis grupos funcionais presentes e também a composição da MO. Esses valores estão relacionados ao grau de condensação ou aromaticidade e isto por sua vez ao grau de humificação. Quanto menor for a razão atômica maior será a aromaticidade, portanto um aumento no teor de H significa um maior número de átomos de carbonos alifáticos ( $\text{CH}_2$ ) em vez de insaturados, e isto mostra a presença de materiais menos humificados ( $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}_2$ ) (JACUNDINO et al., 2015 e BOTERO et al., 2010).

A Tabela 1 consta razões H/C para cada amostra. Os valores para as razões foram 1,13; 1,16; 1,18 e 1,20 para turfa, SH, AF e AH, respectivamente, isto significa que a turfa e as SH apresentam maiores proporções de estruturas aromáticas condensadas se comparadas aos ácidos fúlvico e húmico.

Em estudo desenvolvido com ácido húmico extraído do sedimento do fundo de uma microbacia subtropical brasileira, Giovanela e colaboradores (2010) mostraram que os valores da razão H/C variaram de 1,15 a 1,24, assim os resultados apresentados neste trabalho estão em conformidade com os dados da literatura, uma vez que razões H/C maiores que 1 indica que as amostras trabalhadas são, provavelmente, originárias de plantas vasculares ao invés de MO oriunda de algas ou bactérias.

A segunda informação obtida por meio da AE mostra que o teor de carboidratos é verificado a partir da razão C/O. Valores mais elevados desta razão indicam um maior grau de humificação causado por uma redução no teor de carboidratos (SANCHES et al., 2007; GOVEIA et al., 2013).

Das frações analisadas, o AF apresentou uma relação C/O menor quando comparada ao AH, 0,88 e 0,96, respectivamente. Isto pode está relacionado à presença de grupos funcionais oxigenados em proporções diferentes nestas amostras analisadas, resultantes do processo de humificação.

Os resultados destacados acima na Tabela 1 estão em conformidade com o que foi apresentado por Chang et al. (2014). Observando os valores da AE apresentados por estes pesquisadores, percebe-se que os AFs possuem um maior teor de O e um menor de C quando comparados com os AHs, o mesmo comportamento foi identificado nos dados apresentados neste trabalho. Portanto, conclui-se que o AF por apresentar uma menor relação C/O possui um maior teor de O e um menor teor de C, indicativo, portanto de um menor grau de humificação.

Os ensaios por UV-vis em 465 e 665 nm mostraram o seguinte comportamento, em ordem decrescente, para as razões  $E_4/E_6$ : turfa > SH > AF > AH > HUM. É importante

destacar que todos os valores foram inferiores a 4, indicativo da presença expressiva de estruturas aromáticas condensadas. Esses dados permitem concluir que a HUM foi a amostra com maior grau de humificação dada a menor razão  $E_4/E_6$  seguida do AH.

O aumento da razão  $E_4/E_6$  indica uma estrutura com baixa aromaticidade, conseqüentemente, a diminuição da razão indica uma alta aromaticidade, logo está diretamente associada ao aumento da massa molar. (BOTERO, 2010; BOTERO et al., 2014; GIOVANELA et al., 2010).

Jacundino et al. (2015) relatam que razões  $E_4/E_6$  menores estão ligadas ao aumento da humificação de estruturas aromáticas e maior conjugação de ligações duplas e simples, dado que a aromaticidade apresenta relação inversa com o número de grupos alifáticos (DOBBSS et al., 2009; CHANG et al., 2014).

Os ensaios realizados, visando compreender as características das amostras estudadas, apresentam relações entre si. Sendo assim, por meio do estudo de RMN  $^{13}C$  foi possível entender e identificar a presença dos possíveis grupos funcionais. Os espectros obtidos mostram dados que estão em concordância com os demais resultados já apresentados, ou seja, mostram tendências semelhantes.

A partir dos ensaios de RMN de  $^{13}C$  concluiu-se que o AH apresentou a maior porcentagem de C alifático, 34,0% e a turfa a menor, 20,8%. Dada à existência de grupos etóxis, a HUM e os AHs foram as frações com as maiores proporções, respectivamente 13,0% e 12,0%, entretanto o mesmo não foi observado para a SH, cuja porcentagem foi de 4,2%. De todas as espécies estudadas, a SH apresentou a maior porcentagem de estruturas com carbonos aromáticos 61,6%.

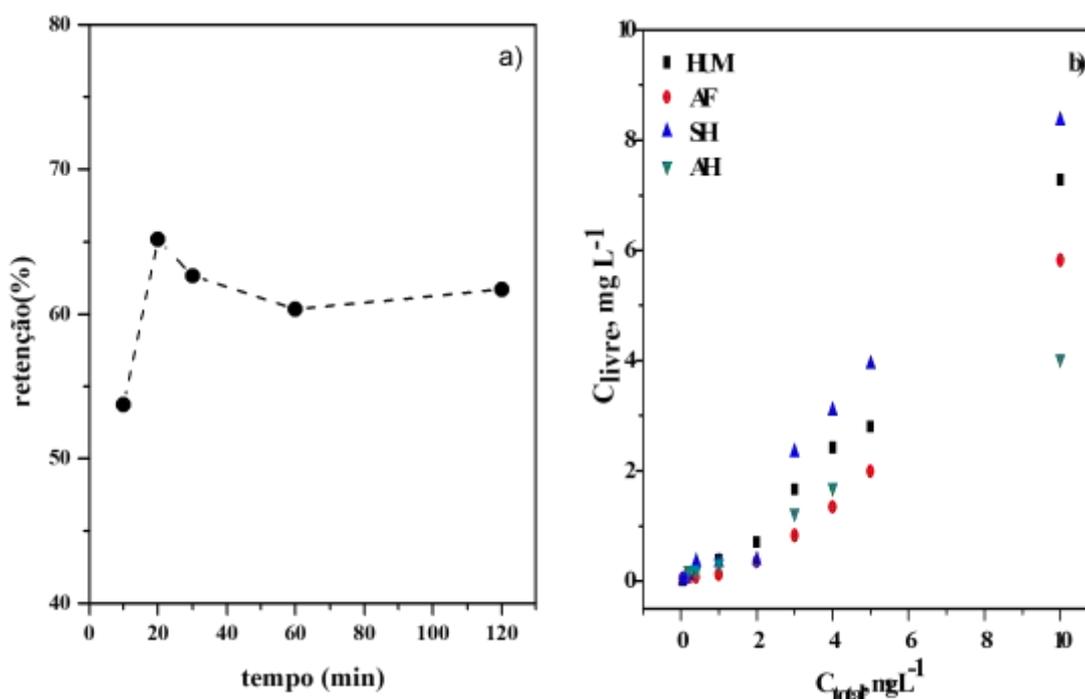
De certa forma, as diferenças que foram observadas podem estar diretamente ligadas ao processo de decomposição influenciado pelo tipo de microrganismos envolvidos, além dos fatores ambientais que estão associados a essa decomposição. Sun et al. (2010) e Ding et al. (2013) sugeriram que a abundância de anéis aromáticos na estrutura da MO é um fator importante que está diretamente ligado ao processo de adsorção de resíduos de antibiótico. Uma vez que se estas moléculas estão ligadas as frações de MO, elas podem alterar substancialmente o seu comportamento, além do destino e da mobilidade no ambiente.

### 5.1.2 Estudo de interação entre as frações de MO e TC

#### 5.1.2.1 Capacidade de complexação e o processo de adsorção

A capacidade de complexação (CC) é caracterizada pela máxima quantidade de TC livre que pode ser complexada pelas SH e suas frações em solução aquosa, cujo objetivo é entender a afinidade das mesmas por diferentes espécies contaminantes.

**Figura 4 – a) Tempo de equilíbrio entre tetraciclina e substâncias húmicas extraídas de amostras de turfa. b) Curva de capacidade de complexação para SH, AF, AH e HUM com TC utilizando a técnica de UF-FT. Concentração da amostra:  $20 \text{ mg L}^{-1}$  a pH 5 e concentração máxima de TC avaliada de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .**



Fonte: Autora deste trabalho, 2018.

Assim, utilizando soluções de SH, AH, AF e HUM adicionadas a TC foram obtidas informações sobre a CC dessas espécies por meio do sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial (UF-FT).

A Figura 4a refere-se a uma curva típica para determinação do tempo de equilíbrio de complexação, neste caso da SH com TC. De acordo com Jacundino et al. (2015), os complexos formados com MO tendem a estabilizar-se em função do tempo, dada a possibilidade de intensificar a interação entre as espécies. Isso se deve a rearranjos intermoleculares e/ou intramoleculares, além das transferências de espécies complexas para locais onde ocorre o processo de complexação mais profundos dentro da molécula.

Assim, a partir da análise da Figura 4a identifica-se que o equilíbrio de complexação foi alcançado após cerca de 20 minutos. Os resultados obtidos são comparáveis aos de outras

pesquisas anteriores sobre complexação com SH, extraídas de diferentes matrizes, com uma diversidade de espécies inorgânicas e orgânicas potencialmente tóxicas, mostrando que a cinética de complexação foi de 20 minutos (BOTERO et al., 2011).

Determinar a contribuição de cada fração de MO nas amostras de turfa durante a adsorção da TC e o processo de complexação em solução é fundamental para que possamos compreender os possíveis mecanismos e a afinidade dessas frações relacionadas ao antibiótico (bio)disponível no ambiente. Os dados da capacidade da CC são úteis, fornecem as concentrações máximas de TC que podem complexar com as SH, AH, AF e HUM.

Durante o procedimento de titulação com a TC, ocorreu inicialmente a saturação dos sítios de ligação mais fortes da SH, seguido pela saturação dos sítios mais fracos. A Figura 4b mostra a titulação da SH e suas frações com uma solução padrão de TC, utilizando a técnica de ultrafiltração por fluxo tangencial. A capacidade de complexação foi determinada traçando uma curva concentração de TC livre ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em função da concentração total de TC ( $\text{mg L}^{-1}$ ). As curvas mostram uma mudança no declive e como a capacidade de complexação foi obtida a partir da interseção dos dois trechos lineares (BOTERO et al., 2011). A Tabela 2 mostra a CC das frações de MO para diferentes espécies, inorgânicas e orgânica, comparado com a TC.

**Tabela 2.** Capacidade de complexação (CC) para diferentes espécies comparando-se com frações de MO e TC.

Espécies	Fração de MO	Origem	CC ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Referência
4-Nitrocatecol	SH	Turfa	20,30	Pacheco et al. (2003)
1-Naftol	AH	Solo	28,40	Chen et al. (1992)
Bisfenol A	SH	Aquática	2,07	Botero et al. (2011)
17 $\alpha$ -Ethinilestadiol			18,53	
Cu(II)	SH	Aquática	16,21	Rosa et al. (2006)
Cu(II)	SH	Turfa	8,73	Botero et al. (2013)
Pb(II)			17,24	
Al(III)			3,67	
CN <sup>-</sup>	SH	Solo	3,69	Souza et al. (2014)
		Aquática	2,07	
Tetraciclina	SH	Turfa	43,46	Este trabalho
	AF		26,16	
	AH		33,03	
	HUM		59,19	

**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018

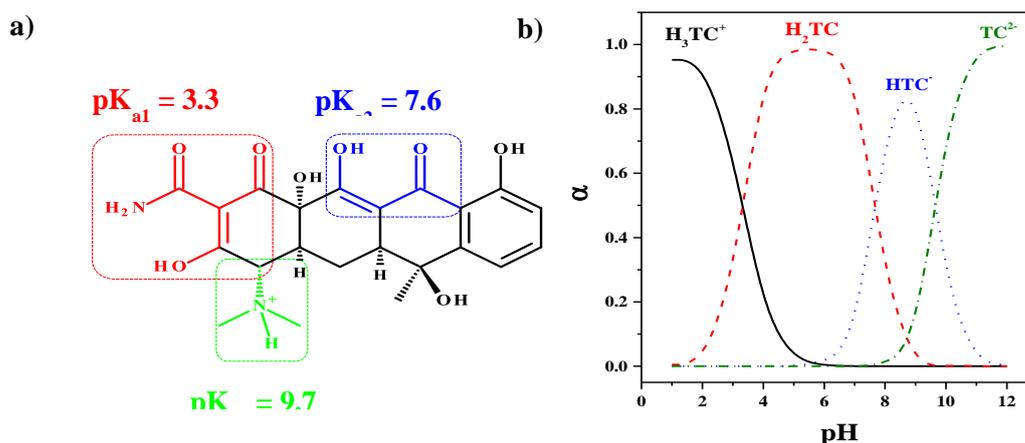
De acordo com o que está apresentada na Tabela 2, a maioria dos trabalhos utiliza a SH em estudos de capacidade de complexação, entretanto existe um pequeno número de publicações verificando a influência de diferentes frações no processo de interação. Das pesquisas apresentadas, apenas Chen et al. (1992) destacou o estudo do AH de solo com

relação a sua CC com a espécie 1-naftol. Cabe aqui ressaltar que a HUM é uma fração que historicamente não tem sido utilizada para avaliar a interação de espécies que atuam como contaminantes no ambiente. Este trabalho mostra as contribuições para a avaliação de diferentes frações de MO com TC em condições similares ao ambiente (Tabela 2), visto a necessidade de entender mais a fundo o papel das frações orgânicas como agentes que interferem no meio ambiente.

Os valores obtidos para a CC das SH, AH, AF e HUM trazem dados quantitativos importantes, tais como a quantidade complexada de TC, bem como informação sobre o grau de afinidade das diferentes frações de MO. A análise dos dados permitiu inferir que a interação mais forte se deu com a HUM e TC ( $59,19 \text{ mg g}^{-1}$ ), seguida pela SH e TC ( $43,36 \text{ mg g}^{-1}$ ), uma vez que essas frações são as que apresentam maiores massas e principalmente dada a presença de uma diversidade de grupos funcionais. Além disso, a humina no valor de pH deste estudo comportou-se como uma estrutura neutra, o mesmo verificado com a TC, cujo somatório das cargas foi zero, justificando-se a sua carga global neutra nas condições do experimento, este fato intensificou o processo de interação entre as duas espécies. Percebe-se que o valor da CC da SH com a TC foi o valor mais elevado, se comparado a todas as outras espécies já estudadas conforme constam os dados na Tabela 2, indicativo de uma forte interação deste antibiótico com aquela fração de MO. Constata-se também que, todos os valores da CC das frações de MO oriundas do solo ou turfa foram maiores para as espécies orgânicas se comparados aos estudos citados com as espécies inorgânicas.

As demais frações, AH, fração solúvel em meio alcalino e que precipita em  $\text{pH} < 2$ , e AF, fração solúvel em qualquer faixa de pH, apresentam características diferentes, como o peso molecular e o teor de grupos funcionais. Nesse contexto o AF apresenta a menor proporção no peso molecular, menos carbono e nitrogênio e uma maior quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ ) por unidade de peso do que a outra fração (Tabela 1), motivo esse que foi observado menor CC para estas frações diante dos valores citados para a SH e a HUM.

Figura 5 – a) Estrutura da TC com os valores das suas constantes de acidez. b) Gráfico da distribuição de espécies em solução em função da variação do pH.



Fonte: Autora deste trabalho, 2018

É importante frisar que a SH é formada pela mistura de AH e AF, e que a maior contribuição para a CC da SH com a TC é da fração húmica, conforme valores apresentados por Goveia et al., 2013. A determinação da CC promoveu a saturação dos sítios de ligação, assim os valores observados nas condições da CC mostraram as diferenças entre as frações provenientes do processo de extração e que também há diferença no número total de locais disponíveis para a ligação dessas espécies.

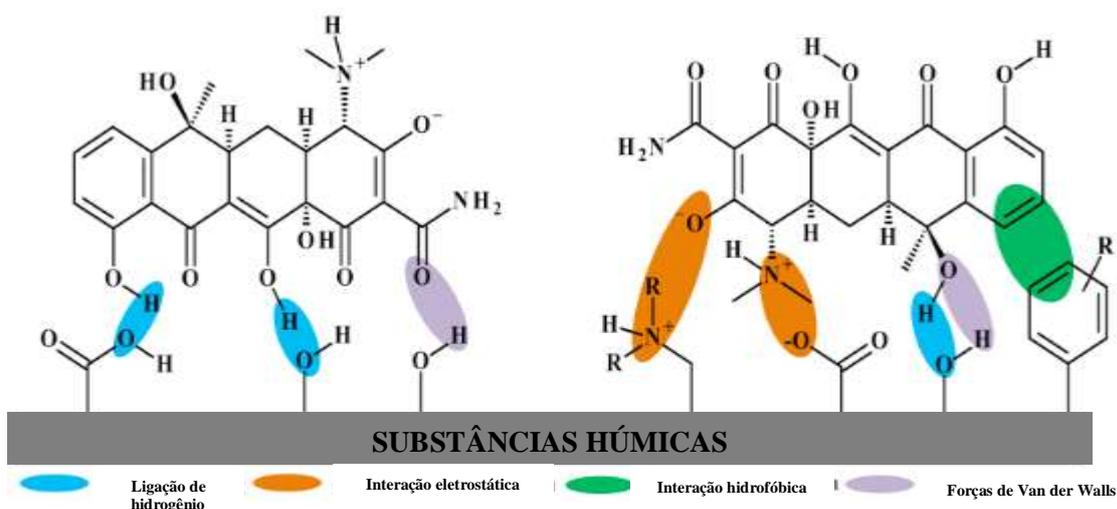
O trabalho, desenvolvido por Gu et al., (2007), avaliou a complexação da TC com a HUM mostrando a interação relativamente forte entre esse antimicrobiano e SH, e como se esperava influenciou significativamente a reatividade, a mobilidade e a biodisponibilidade desse antibiótico em ambientes de solo e subsuperficiais. Este trabalho sugeriu que a agregação de constituintes húmicos levou à formação de domínios hidrofóbicos e hidrofílicos e que poderiam resultar em interações complexas com contaminantes orgânicos. As interações, entre as espécies orgânicas e inorgânicas com as SH, dependem fortemente do tipo de espécie envolvida e do valor do pH. Neste estudo, o pH da molécula TC está com carga zero em virtude do grupo tricarbonilamida negativo ( $pK_{a1} = 3,3$ ) e do grupo dimetilamino protonado ( $pK_{a3} = 9,7$ ), como mostrado esquematicamente na Figura 5.

Conforme proposto pelo modelo de Donnan (BOTERO et al., 2013), observou-se que em pH 5 as interações preferidas foram do tipo eletrostática e que o pH afeta a conformação das SH e suas frações (SCHLAUTMAN & MORGAN, 1993; FERREIRA et al., 2001, 2002). De acordo com Ferreira et al., (2001, 2002), a diminuição do pH ocorre quando a protonação dos grupos está presente na estrutura húmica, o que favorece a interação intermolecular por ligação de hidrogênio, tornando a molécula com uma conformação mais condensada. Na

Figura 6 estão propostas possíveis interações entre a TC e a superfície heterogênea da SH em pH 5. Os tipos de interação destacados são as interações por forças eletrostáticas, hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e forças de van der Waals.

Em pH 5, os grupos relacionados com a função ácido carboxílico são parcialmente ou completamente dissociados dependendo do valor do  $pK_a$  e, em seguida são capazes de interagir com a molécula da TC por ligação de hidrogênio ou por efeito eletrostático. Em relação ao grupo amino capazes de protonação, ocorre a formação de um centro positivo, que pode interagir com a carga negativa do oxigênio presente na molécula do antibiótico. Além disso, também podem ocorrer interações por ligação de hidrogênio com grupos hidroxilas e interações fracas como forças de van der Waals e hidrofóbicas nas regiões da SH em contato com a TC onde há a predominância de regiões apolares, estrutura com átomos de carbono e hidrogênio apenas.

**Figura 6 – Proposta do tipo de interação que pode ocorrer entre os grupos funcionais presentes nas SH e TC (pH = 5).**



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018

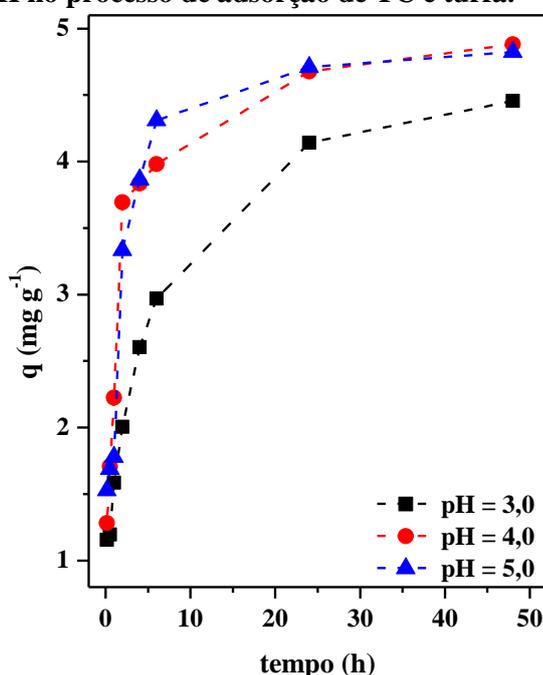
Os resultados para a capacidade de complexação e caracterização das amostras mostraram uma forte interação entre a fração HUM durante o processo de complexação e retenção de tetraciclina, considerando a avaliação da adsorção de metais potencialmente tóxicos por HUM (GOVEIA et al., 2013). Além disso, alguns pesquisadores têm estudado o uso de turfa em amostras *in natura* e HUM para retenção ou adsorção de contaminantes no ambiente, com objetivos de aplicá-los na remediação ambiental de áreas contaminadas (OLIVEIRA et al., 2015; JESUS et al., 2011).

### 5.1.3 Interação da turfa com tetraciclina: cinética e estudos de adsorção

A influência do pH foi inicialmente avaliada na adsorção de TC (concentração constante) e de amostras de turfa. Nesse sentido, avaliamos a adsorção do antibiótico nos valores de pH 3, 4 e 5 e os perfis das curvas cinéticas para esta avaliação (Figura 7).

De acordo com a Figura 7, observou-se uma menor interação da TC com amostras de turfa em pH 3 e, portanto, menor fator de retenção deste antibiótico na turfa, expresso pela capacidade de adsorção ( $q$ ). Este resultado pode estar associado à existência de uma distribuição semelhante das espécies  $H_3TC^+$  e  $H_2TC$  em pH 3 (Figura 5b), com cargas positiva e zero, respectivamente, relacionadas à condição da maioria dos grupos que derivam de ácidos mais fracos presentes na turfa que estão protonados. Dessa forma, observou-se uma diminuição do caráter eletrostático das interações, resultando em uma menor adsorção do antibiótico neste biomaterial.

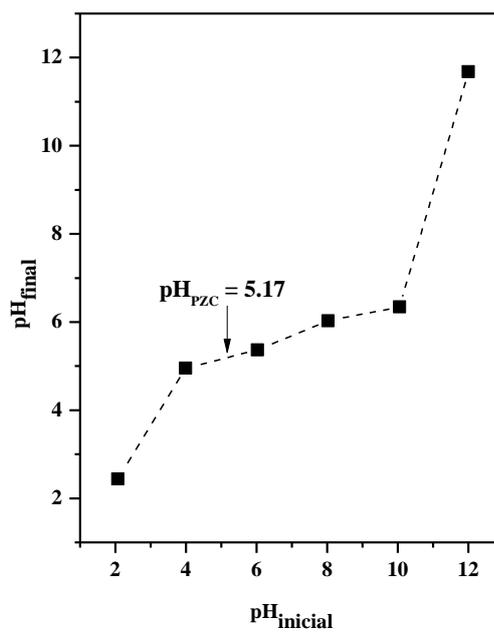
**Figura 7 – Influência do pH no processo de adsorção de TC e turfa.**



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018

Nos valores de pH 4 e 5, observou-se um perfil semelhante, isso se deve a maior proporção de espécies  $H_2T$  (Figura 5b) e possivelmente devido a um aumento nas interações eletrostáticas. Adicionalmente, o  $pH_{PZC}$  da turfa *in natura* foi de 5,17 conforme mostra a Figura 8; desta forma em pH 3, as cargas preferenciais da TC e da turfa foram positivas. Com o aumento do pH do meio, a densidade de carga superficial positiva foi reduzida e o processo de interação foi mais efetivo para valores de pH 4 e 5.

Figura 8. Valor do  $\text{pH}_{\text{PZC}}$  em turfa *in natura*.



Fonte: Autora deste trabalho, 2018

Os principais parâmetros descritos em relação aos modelos de adsorção foram calculados e apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Relação dos parâmetros cinéticos na adsorção de tetraciclina em turfa em função da variação de pH.

	$q_{exp}$ ( $mg\ g^{-1}$ ) <sup>*</sup>	Pseudo-primeira ordem			Pseudo-segunda ordem			Difusão Intrapartícula			Elovich		
		$q_e$ ( $mg\ g^{-1}$ )	$k_1$ ( $min^{-1}$ )	R	$q_e$ ( $mg\ g^{-1}$ )	$k_2$ ( $g\ mg^{-1}min^{-1}$ )	r	$K_p$ ( $mg\ g^{-1}min^{-0,5}$ )	C ( $mg\ g^{-1}$ )	R	$\alpha$ ( $mg\ g^{-1}min^{-1}$ )	$\beta$ ( $mg\ g^{-1}$ )	r
3,0	4,46	3,36	0,0023	0,9952	4,61	0,0017	0,9998	0,089	0,96	0,9787	0,75	1,47	0,9970
4,0	4,88	3,50	0,0042	0,9794	4,95	0,0033	0,9997	0,184	0,89	0,9418	0,41	0,70	0,9824
5,0	4,82	3,58	0,0055	0,9866	4,92	0,0034	0,9997	0,197	0,73	0,9663	0,62	0,74	0,9328

\* $q_{exp}$  = capacidade de adsorção experimental

**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018

De acordo com os dados da Tabela 3, o modelo de pseudo-segunda ordem foi o que se adaptou mais satisfatoriamente conforme o sistema avaliado e considerando todos os valores de pH. Esse modelo apresentou a melhor correlação ( $r \geq 0,9997$ ) em relação aos demais modelos e apresentou valores coerentes de  $q_e$  obtidos experimentalmente com uma diferença máxima de 3,36%.

Com base nestes resultados cinéticos, o pH 5 apresentou as melhores constantes de adsorção em função do tempo para o modelo de pseudo-segunda ordem. Assim, os estudos subsequentes realizados sobre as isotermas de adsorção deste pH foram mantidos. Foram também levados em conta: (i) assegurar que a única espécie ao balanço ácido-base da TC ( $H_2T$ , Figura 5b) e (ii) um pH que esteja mais próximo das condições ambientais.

Os dados do equilíbrio de adsorção da TC foram explorados utilizando o modelo de isoterma de Langmuir e Freundlich para estabelecer a correlação entre a massa de adsorvato e a concentração de equilíbrio na fase aquosa (pH 5) de antibiótico.

De acordo com o modelo de Langmuir, a capacidade de adsorção é dada pela Eq. (9):

$$q_e = q_{max} \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad \text{Equação 9}$$

onde  $q_{max}$  é a quantidade máxima de adsorvato retido no material sólido ( $mg\ g^{-1}$ ),  $K_L$  ( $L\ mg^{-1}$ ) são as constantes de Langmuir relacionadas com a capacidade de adsorção e  $C_e$  é a concentração de equilíbrio ( $mg\ L^{-1}$ ). Esta equação pode ser escrita como uma forma linearizada como segue (Eq. (10)).

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m} C_e + \frac{1}{K_L q_m} \quad \text{Equação 10}$$

O parâmetro  $R_L$  (Eq. (11)) é um parâmetro adimensional chamado fator de separação, que é definido da seguinte forma:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C} \quad \text{Equação 11}$$

Onde  $C$  é a concentração mais alta ( $mg\ L^{-1}$ ) e  $K_L$  a constante de Langmuir. Os valores de  $R_L > 1$  indicam que o processo é desfavorável,  $R_L = 1$  indica uma isoterma linear,  $0 < R_L < 1$  indica adsorção favorável e  $R_L = 0$  indica que o processo é irreversível (NGAH et al. 2002).

A isoterma de Freundlich é um modelo empírico, que pressupõe que o processo de adsorção ocorre em multicamadas em superfícies heterogêneas (HO et al., 2002). O modelo de Freundlich é descrito pela Equação (12):

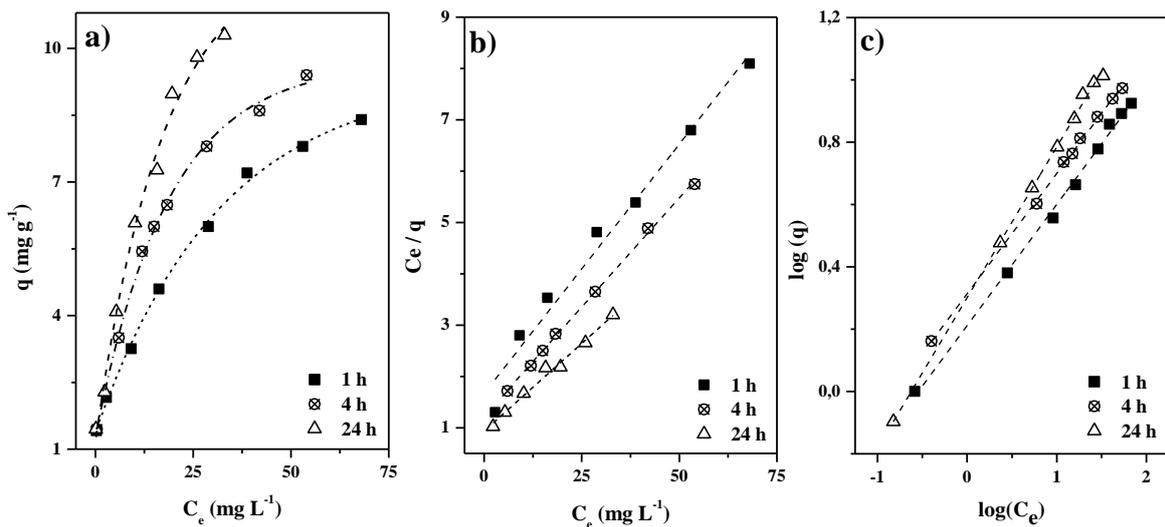
$$q_e = K_F C^{1/n} \quad \text{Equação 12}$$

Onde  $C_e$  é a concentração de equilíbrio do adsorvato ( $\text{mg L}^{-1}$ ).  $K_F$  e  $n$  são as constantes relacionadas com a capacidade e intensidade de adsorção de Freundlich, respectivamente. A equação de Freundlich pode ser escrita na forma linear (Equação (13)):

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad \text{Equação 13}$$

Os resultados destes estudos para as isotermas de adsorção estão ilustrados na Figura 9 e Tabela 4.

**Figura 9** – a) Isotermas de adsorção para o sistema TC em turfa *in natura* em função do tempo. b) Isotermas para o modelo de Langmuir. c) Isotermas para o modelo de Freundlich.



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018

De acordo com os resultados da Figura 9 e da Tabela 4, pode-se observar que, para os tempos de contato entre 1 e 4 h, não houve definição de qual modelo se ajusta aos dados experimentais com base na similaridade dos valores dos coeficientes de regressão.

**Tabela 4.** Parâmetros de Langmuir e Freundlich para as isotermas do sistema tetraciclina e turfa. Sendo:  $q_{exp}$  a capacidade de adsorção experimental

Tempo (h)	$q_{exp}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Isoterma de Langmuir				Isoterma de Freundlich		
		$q_{max}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$K_L$ ( $\text{L mg}^{-1}$ )	$R_L$	$R$	$1/n$	$K_F$ ( $\text{L mg}^{-1}$ )	$R$
1	8,32	10,29	0,058	0,20	0,9893	0,39	1,62	0,9983
4	9,41	11,76	0,069	0,22	0,9992	0,40	2,40	0,9996
24	10,33	14,64	0,073	0,29	0,9938	0,48	2,43	0,9993

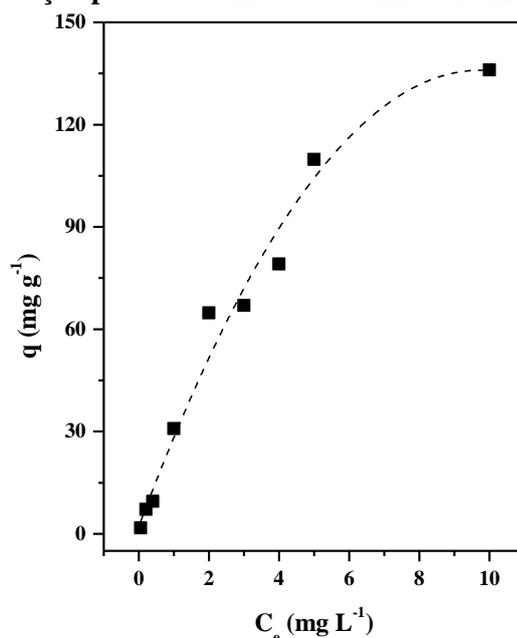
**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Esse fato pode ser associado ao tempo de equilíbrio termodinâmico que ainda não havia sido atingido (Figura 9). Assim, durante 24 h, o sistema está em equilíbrio, e nestas condições, o melhor modelo para descrever o sistema que está sendo considerado seria o de Freundlich.

A adsorção envolve normalmente dois tipos de mecanismos dependendo das condições de pH. O primeiro são as reações de permuta catiônica entre as superfícies de argila e o grupo amina protonado da TC em condições ácidas (SITHOLE & GUY, 1987; FIGUEROA et al., 2004; KULSHRESTHA et al., 2004; PILS & LAIRD, 2007; LI et al., 2015; WANG et al., 2010). O segundo é a complexação de íons anfotéricos sobre a superfície de argila acompanhada com uma captação de prótons, que é mais favorável em uma condição ácida e neutra (FIGUEROA et al., 2004). Kulshrestha (2004) sugeriu o possível mecanismo hidrofóbico no processo de interação. Com a presença de cátions bivalentes, a adsorção da TC foi melhorada e um mecanismo de ponte de superfície pode estar envolvido, especialmente em condições neutras ou alcalinas (FIGUEROA et al. 2004; PILS & LAIRD, 2007; WANG et al., 2008).

As Substâncias Húmicas do solo também podem interferir na interação entre as superfícies da TC e a argila. Foi relatado que com uma grande quantidade de AH, a adsorção foi reduzida, porque o AH mascarou os locais de adsorção ou a difusão intercalada da TC (KULSHRESTHA et al., 2004; PILS & LAIRD 2007; ZHANG, 2014). Devido à TC ser amplamente utilizada como antibiótico veterinário, descobriu-se estes compostos adsorvem em superfícies minerais ou na MO do solo através de troca catiônica ou por ligações iônicas (FIGUEROA et al., 2004; PILS & LAIRD 2007; PAROLO et al., 2008; KANG et al., 2012).

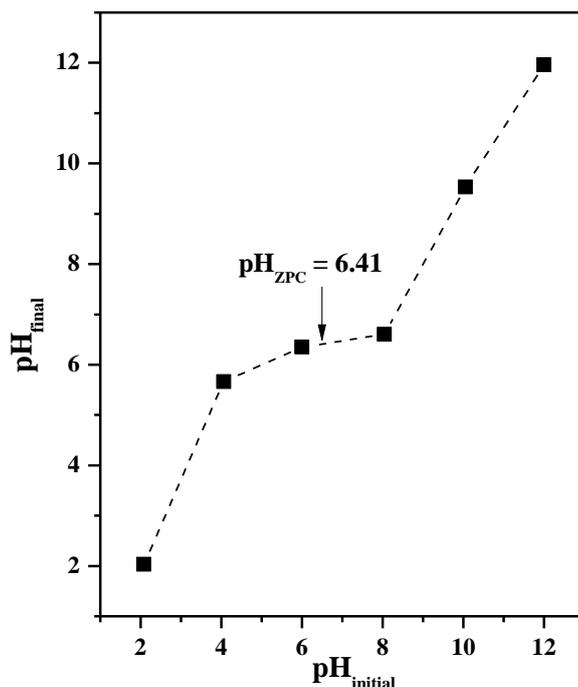
Estudo de adsorção foi desenvolvido com a fração não solúvel da SH, a HUM, sua isoterma de adsorção em pH 5 foi avaliada conforme Figura 10. Simulando as condições ambientais durante o processo de interação TC com HUM, já que pensando em um ambiente real, para uma possível aplicação da HUM como remediadora ambiental, a faixa de pH ~ 6 é mais comum. A cinética de interação entre TC e HUM mostrou-se rápida e atingiu um nível de retenção de aproximadamente 70%, após 20 min do início.

**Figura 10 – Isoterma de adsorção para o sistema tetraciclina e humina.**

**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Em pH 5, condição de trabalho, a TC tinha uma carga líquida zero dependendo do grupo dimetilamino protonado ( $pK_{a3}= 9,7$ ) e da dissociação do ácido protônico do sistema conjugado tricarbonilamida ( $pK_{a1}=3,3$ ) (Figura 5). Esse fato permitiu que a molécula interagisse com diferentes locais presentes no húmico, o que levou a uma melhoria na interação com esse biomaterial. Além disso, o  $pH_{PZC}$  da HUM foi de 6,41 (Figura 11), indicando que no pH avaliado, o adsorvente tinha uma carga superficial predominantemente positiva. Assim, existe a probabilidade de que o processo de interação HUM e TC ocorra preferencialmente pelo sistema conjugado tricarbonilamida dissociado. Portanto, os dados experimentais (Figura 9) foram tratados com os modelos de isotermas de Langmuir e de Freundlich.

**Figura 11 – Valor do  $\text{pH}_{\text{PZC}}$  determinado na humina.**



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Considerando a isoterma de Langmuir, os parâmetros obtidos foram os seguintes:  $K_L = 6,42 \text{ L mg}^{-1}$ ,  $q_{max} = 158,7 \text{ mg g}^{-1}$  ( $q_{exp} = 136,1 \text{ mg g}^{-1}$ ),  $R_t = 0:02$ , e  $r = 0,9768$ , enquanto as isotermas de Freundlich foram as seguintes:  $K_F = 14,64 \text{ L mg}^{-1}$ ,  $1/n = 0,70$  e  $r = 0,9898$ . Os dados obtidos a partir da isoterma de adsorção TC e HUM seguem muito melhor o modelo de Freundlich, considerando o valor do coeficiente de correlação linear ( $r$ ) e os respectivos valores das constantes para cada modelo ( $K_L$  e  $K_F$ ), pois em ambos os casos apresentam valores mais elevados. O modelo de Freundlich considera que o processo de adsorção ocorre com um material adsorvente que apresenta uma superfície heterogênea e de adsorção em multicamadas, que se relaciona com o material avaliado satisfatoriamente.

## 5.2 Estudos espectroscópicos de SH com SQX

### 5.2.1 Parâmetros de ligação e termodinâmicos

A partir da titulação espectrofluorimétrica da SH com a SQX pôde-se determinar os principais parâmetros de ligação e termodinâmicos que governam o processo de interação entre a macromolécula (SH) e o ligante (SQX). As informações quanto ao mecanismo de *quenching* foram obtidas por meio da equação de Stern-Volmer (equação 15), na qual se relaciona a razão da intensidade de fluorescência, na presença e ausência em função da concentração do *quencher*.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \text{ ou } \frac{F_0}{F} = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad \text{Equação 15}$$

Em que  $F_0$  é a intensidade de fluorescência da SH livre e  $F$  a intensidade de fluorescência do complexo SQX-SH no estado fundamental,  $[Q]$  a concentração da SQX que atua como *quencher*,  $K_{SV}$  é a constante de *quenching* que pode ser obtida pelo coeficiente angular do gráfico  $F_0/F$  versus  $[Q]$  (POURESHGHI et al., 2017).

Os possíveis mecanismos de *quenching* podem ser de dois tipos, *quenching* dinâmico e *quenching* estático. O *quenching* dinâmico compreende um processo em que o fluoróforo no estado excitado entra em contato com a espécie *quencher*, isso ocorre por meio de colisão entre ambos e conseqüentemente resulta na desativação do fluoróforo. Portanto, é observado é que posterior a colisão, há uma transferência de energia do fluoróforo no estado excitado para a espécie *quencher*, acarretando a diminuição do sinal de fluorescência. No *quenching* estático, o fluoróforo no estado excitado ao entrar em contato com o *quencher* leva à formação do complexo não fluorescente no estado fundamental, resultando assim na desativação do fluoróforo, liberação de calor e como consequência uma redução no sinal analítico (MOLINA-BOLÍVAR, et al., 2014).

O mecanismo do tipo de *quenching* foi definido por meio de ensaios com variação da temperatura, observado a variação do valor da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) ou ainda, a partir do estudo por UV-vis, uma vez que esta técnica possibilita avaliar a formação do complexo (SH-SQX) no estado fundamental.

Diante de resultados da Tabela 5, consegue-se inferir que, dada à diminuição do valor de  $K_{SV}$  à medida que a temperatura aumenta, sugere-se que o mecanismo de interação é por *quenching* estático, caso contrário, para o *quenching* dinâmico seria aumento de  $K_{SV}$  com elevação da temperatura do meio (WANG et al., 2014; PRAVEEN et al., 2015). Q. Wan et al. (2014) estudaram a interação do antibiótico sulfametoxazol (uma sulfonamida) com albumina de soro humano (HSA), e os resultados para a constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) apresentaram o mesmo perfil do observado neste trabalho. Este resultado para o  $K_{SV}$  indica que a interação SH-SQX é dada pela formação do complexo no estado fundamental, e que o emprego de temperaturas elevadas resulta em uma diminuição da estabilidade de complexo formado. Adicionalmente, a Tabela 5 apresenta outros parâmetros de ligação e termodinâmicos para caracterização do processo de interação.

**Tabela 5.** Parâmetros de ligação e termodinâmicos resultantes do estudo de interação por fluorescência molecular da SH titulada com SQX em três valores de temperatura, 295,303 e 311 K.

T (K)	Parâmetros de ligação				Parâmetros termodinâmicos			
	K <sub>sv</sub> (10 <sup>3</sup> L mol <sup>-1</sup> )	R	K <sub>b</sub> (10 <sup>3</sup> L mol <sup>-1</sup> )	N	R	ΔH (KJ mol <sup>-1</sup> )	ΔS (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	ΔG (kJ mol <sup>-1</sup> )
295	4,23 ± 0,10	0,9965	2,67 ± 0,01	0,95 ± 0,03	0,9964			-19,53
303	3,99 ± 0,11	0,9955	2,97 ± 0,01	0,97 ± 0,03	0,9941	+ 9,32	+97,8	-20,31
311	3,68 ± 0,11	0,9955	3,26 ± 0,01	0,99 ± 0,03	0,9931			-21,09

**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Por meio da Equação de Hill (equação 16), calculou-se a constante de ligação ( $K_b$ ) e o número de sítios de ligação ( $n$ ), este parâmetro refere-se à estequiometria do complexo supramolecular.

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \cdot \log [Q] \quad \text{Equação 16}$$

Nesta equação  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente,  $[Q]$  é a concentração do ligante. Os valores para  $K_b$  e  $n$  foram calculados a partir da inclinação e intercepto do gráfico  $\log \frac{(F_0 - F)}{F}$  versus  $\log [Q]$ , respectivamente. Conforme dados mencionados na Tabela 5 observou-se um aumento na estabilidade no complexo formado SQX-SH, justificada pelo aumento na constante de ligação  $K_b$  com a elevação da temperatura.

A Tabela 6 mostra um comparativo com outras pesquisas desenvolvidas, propondo ensaios que obtiveram perfis opostos a este trabalho. Praveen et al. (2015) em estudo realizado com o antimicrobiano sulfametoxazol (SMZ), da mesma classe da sulfaquinoxalina, identificaram uma diminuição na estabilidade ( $K_b$ ) do complexo do sulfametoxazol e albumina de soro humano (HSA), o mesmo padrão foi observado por Q. Wang et al. (2014). Adicionalmente, Yang et al., (2015) estudando a interação entre o AH e o ânion dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), obteve valores de  $K_b$ , da mesma magnitude que SH-SQX.

**Tabela 6.** Relação entre a temperatura e valores de  $K_b$  em diferentes complexos estudados.

Complexo	T(K)	$K_b(10^3 \text{ L mol}^{-1})$	Referência
SH-SQX	295	2,67	Este trabalho
	303	2,97	
	311	3,26	
AH- $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	298	3,01	Y.-L. GU et al.(2015)
	310	2,50	
HSA-SMZ	293	4,28	QIN WANG et al. (2014)
	298	3,55	
	303	3,35	
	308	3,17	
HSA-SMZ	288	22,5	PRAVEEN et al.(2015)
	298	15,60	
	308	8,50	

**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Para o número de sítios de ligação ( $n$ ) variou de 0,95 a 0,99, assim infere-se que a estequiometria do complexo formado foi 1:1, indicando a possibilidade de regiões preferenciais para ligação na SH pela SQX, comparando-se ao comportamento das proteínas, já que estas apresentam estruturas definidas.

Os parâmetros termodinâmicos foram calculados a partir das equações (3) e (4) e foram apresentados na Tabela 5.

$$\ln K_b = - \frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação 3}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação 4}$$

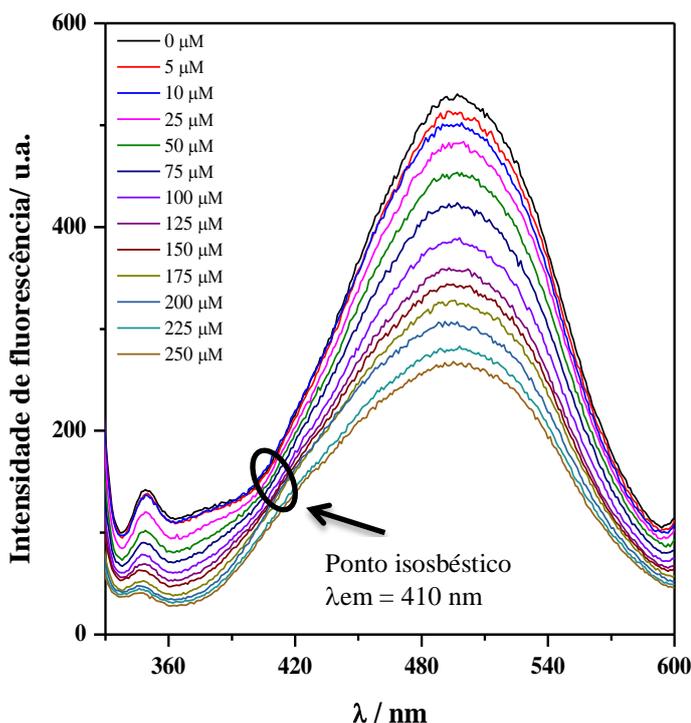
O estudo termodinâmico nas temperaturas, 295, 303 e 311 K possibilitou constatar a natureza das ligações envolvidas, além da descrição da espontaneidade do processo. Os dados da Tabela 5 permitem-nos inferir que o processo de interação foi espontâneo, dado os valores de  $\Delta G$  terem sido menores do que zero. Um fator identificado é que com a elevação da temperatura obteve-se valores mais negativos de  $\Delta G$ , sugerindo que o processo de interação seja endotérmico, sendo confirmado com o valor de  $\Delta H > 0$  (WANG et al., 2015).

Quanto ao tipo de ligação envolvida são destacadas forças hidrofóbicas  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ , forças eletrostáticas,  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S > 0$  e ligações de hidrogênio e forças de van der Waals para  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$  (ZHANG, Y., et al, 2009), para tanto os dados apresentados para a SQX informam que esse antimicrobiano interage com a SH por meio de forças hidrofóbicas, já que o valor  $\Delta H$  e  $\Delta S$  foram respectivamente,  $+ 9,32 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $+ 97,8 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Em pesquisa desenvolvida por Islam et al. (2016) identificaram semelhante comportamento, seus estudos basearam-se na interação entre HSA-SDZ (sulfadiazina).

### 5.2.2 Efeito da concentração e do pH no processo de interação da SH com SQX

Inicialmente avaliou-se a influência da concentração de SH quanto ao perfil espectral e intensidade de fluorescência. A solução da SH utilizada apresentou uma banda larga de emissão com máximo em 493 nm relativo à presença de diferentes grupos químicos característicos das SH, como grupos oxigenados, como carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas de vários tipos (BOTERO et al., 2014). A intensidade de emissão de fluorescência foi proporcional ao aumento da concentração da SQX (Figura 12), devido ao aumento da concentração dos grupos fluoróforos no meio, contudo, parte da fluorescência da macromolécula é suprimida em função da concentração da SQX. Em seguida, soluções com diferentes concentrações de SH (5, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>) foram tituladas com SQX (pH = 6).

**Figura 12** – Espectros de fluorescência de SH a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  na ausência e na presença de SQX (0-250  $\mu\text{M}$ ), pH 6, identificando-se a presença em  $\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$  a existência do ponto isobéstico.

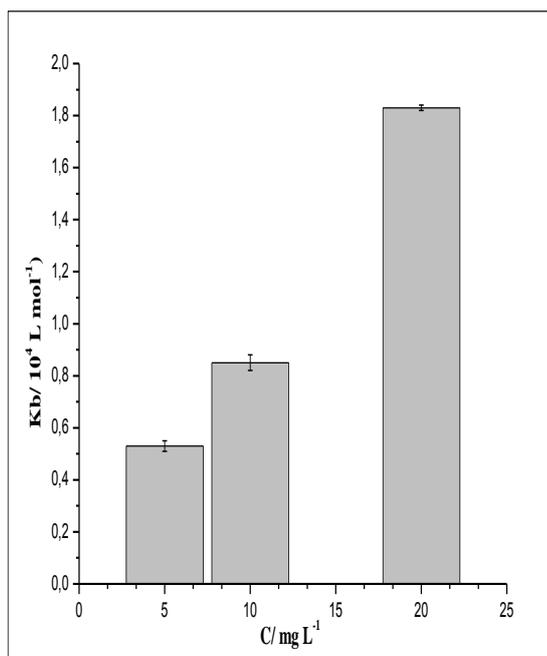


**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Pela Figura 12 observa-se uma redução gradativa na intensidade de fluorescência da SH livre devido ao aumento da concentração de SQX, essa diminuição da fluorescência intrínseca pode ser ocasionada por diversos fatores como interações moleculares com a macromolécula, transferência de energia, *quenching* por formação de complexo no estado fundamental ou por colisão (QIN WANG et al., 2014). Assim, devido ao processo de interação, entre a SQX e a SH, as propriedades fluorescentes da macromolécula podem ser alteradas, dado diversos fatores como, por exemplo, mudanças conformacionais na SH e interação com o solvente. Observou-se comportamento similar em estudo realizado por Ali & Al-Lohedan (2014), onde descreveram o processo de interação entre o antibiótico sulfadiazina e a proteína albumina de soro humano (HSA) e, por Naik et al. (2015) em que se avaliou a interação do sulfametoxazol com HSA.

A Figura 13 mostra a influência do aumento da concentração da SH em relação aos valores de  $K_b$ . Assim, há a formação preferencial do complexo, em função da maior quantidade de sítios de interação disponíveis, uma vez que a SH se caracteriza como um conjunto de agregados com diferentes macromoléculas com uma grande diversidade de grupos funcionais (BOTERO et al., 2014). Para os experimentos posteriores se fixou a concentração da SH em  $20 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Figura 13 – Gráfico do comportamento de  $K_b$  em função do aumento da concentração da macromolécula no meio.**

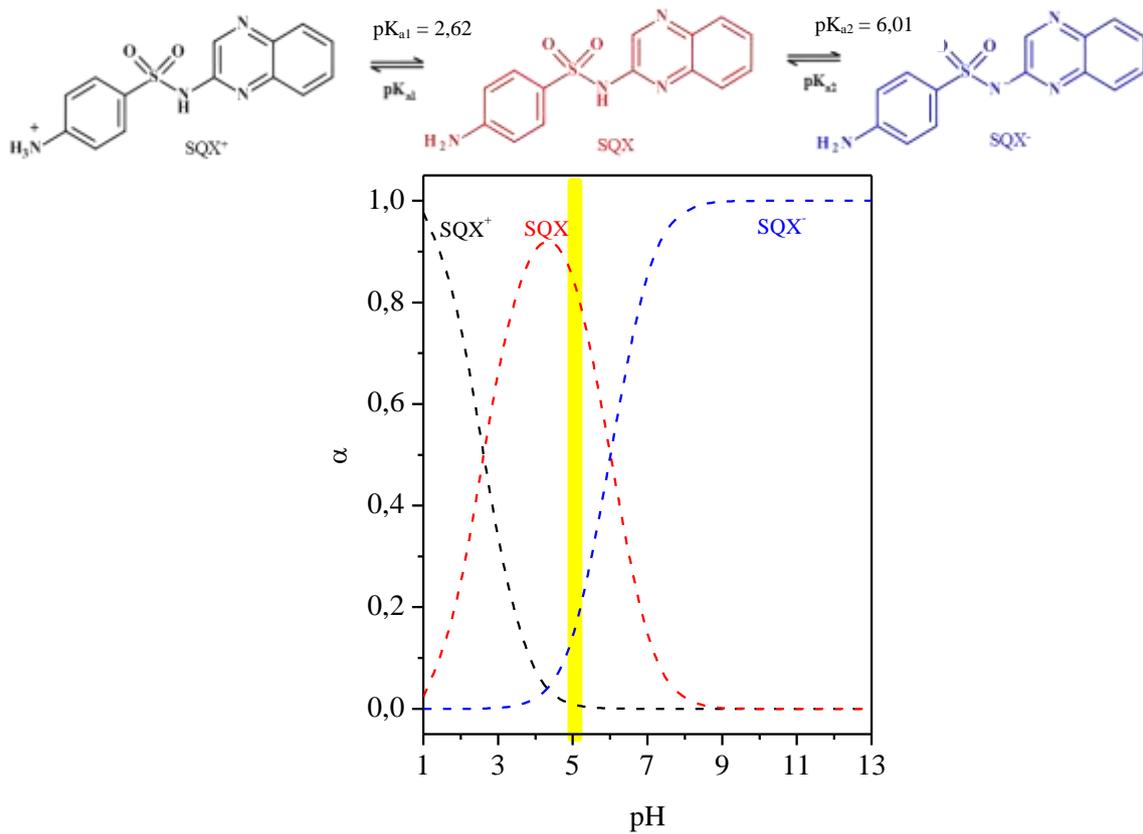


**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Adicionalmente, a Figura 14 mostra a distribuição das espécies da SQX em função do pH, e os respectivos valores de  $pK_{a1} = 2,61$  e  $pK_{a2} = 6,01$ . É observado que no pH 5 há uma distribuição maior de espécies neutras, tanto para a SH, carga global neutra em  $pH_{PZC} = 5,1$ , quanto para a SQX. Esses dados obtidos, com os ensaios de pH na ausência e na presença de SQX com SH, possibilitaram a partir dos estudos de fluorescência molecular, em pH 6, identificar um ponto isobéstico (Figura 12) em  $\lambda_{em}$  de 410 nm, ponto no qual duas espécies em equilíbrio químico possuem a mesma intensidade de fluorescência. Isso significa que neste valor de comprimento de onda para a emissão de fluorescência, há uma distribuição igual nas concentrações das espécies livre e complexada da SH.

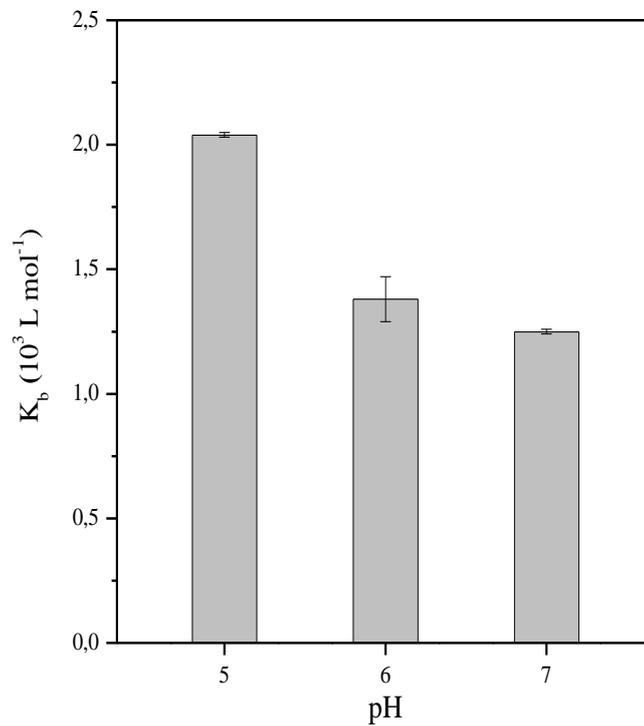
Uma vez estabelecida a concentração da SH se avaliou o efeito do pH no sistema, pois tanto a macromolécula como o ligante são derivados de ácidos fracos, e assim, a carga e natureza ácido-base das diferentes espécies em solução são dependentes do pH. Para explorar os efeitos do pH no processo de interação se avaliou a variação da constante de ligação ( $K_b$ ) em pH 5, 6 e 7. Estes valores de pH foram selecionados visando simular as condições de concentração hidrogeniônica no solo (PEDROTTI et al., 2015). Como observado na Figura 15, o aumento do pH levou a redução do valor da constante de ligação ( $K_b$ ), sendo observado máximo interação em pH 5.

Figura 14 – Distribuição das espécies de SQX. Estudo da SH na presença de SQX em função do pH (5, 6 e 7).



Fonte: Autora deste trabalho, 2018

Figura 15 – Gráfico da constante de ligação  $K_b$  da SH ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) em função de três valores de pH, 5, 6 e 7.



Fonte: Autora deste trabalho, 2018.

A SQX apresenta dois grupos ionizáveis, o grupo amino do anel aromático ( $pK_{a1} = 2,62$ ) e grupo amino da amida sulfônica ( $pK_{a2} = 6,01$ ), assim, podem ser formadas até três espécies diferentes em meio aquoso, em função da variação do pH, como observado na Figura 14. Como pode ser visto, em pH 5 tem-se aproximadamente 91% da SQX na forma neutra, enquanto que para pH 6 se observa uma distribuição de 50% na forma neutra e aniônica, já em pH 7 tem-se 90% na forma aniônica. Como o valor de  $pH_{PZC}$  da SH é 5,15 (Figura 11), ou seja, neste pH a SH encontra-se com carga global neutra, isso justifica que em pH 5 se tenha obtido o maior valor de  $K_b$ , visto que tanto a SH como a SQX estarem preferencialmente neutras. Por outro lado, com aumento do pH, tanto a SH como a SQX aumentam a fração aniônica, o que pode levar a repulsões, e desta forma, reduzir o valor de  $K_b$  no processo de interação.

Por fim, o pH 6 foi selecionado para os estudos subsequentes, por ser o valor intermediário de pH da faixa avaliada, e ser a condição que mais se assemelha as condições ambientais de solos brasileiros em situação agrônômica (PEDROTTI et al., 2015).

### 5.2.3 Espectroscopia UV-vis

A técnica de espectroscopia de absorção UV-vis pode ser utilizada para verificar se ocorreram alterações estruturais na molécula de interesse, ou ainda para investigar e confirmar a interação entre a SH e o ligante em estudo, neste caso a SQX.

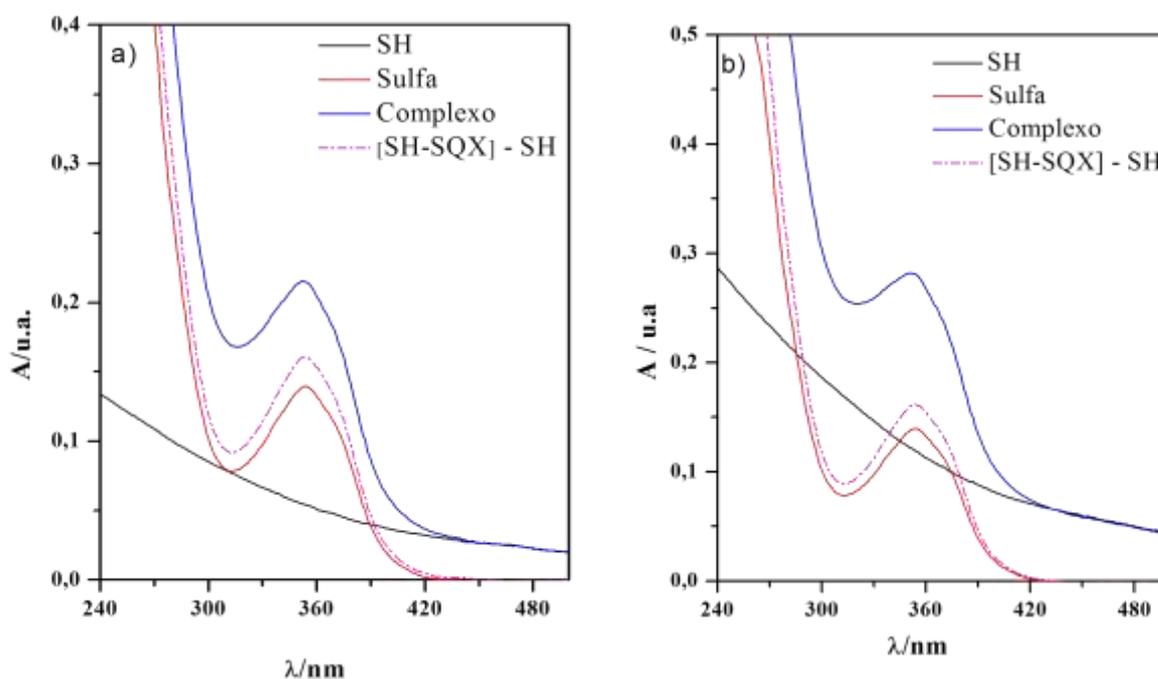
Os espectros de absorvância referentes à SQX e SH livres e o respectivo complexo SH-SQX estão apresentados na Figura 16. A SQX apresentou máximo de absorção em 354 nm, relativo a transições  $n \rightarrow \pi^*$ . Após adição da SH ocorreu deslocamento hipsocrômico de 3 nm, devido à formação do complexo SH-SQX ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 351$  nm), comportamento similar foi observado em estudo realizado por Naik et al. (2015), onde o deslocamento da banda de absorção do complexo HSA-sulfametoxazol foi para o azul, ou seja, deslocamento para menores comprimentos de onda. Todavia Wang et al. (2014), em estudo para o mesmo complexo, observaram deslocamento da banda de absorção de 213 para 219 nm (efeito batocrômico), isso permite concluir que os espectros de absorção, para os antibióticos da classe das sulfonamidas, não apresentam uma regularidade de resposta quando se comparam os deslocamentos das bandas ao interagir com macromoléculas, entretanto todas as situações estão em conformidade, dada a diminuição da intensidade de absorção (efeito hipocrômico) após a formação do complexo. Assim, por meio do resultado deste trabalho conclui-se que o microambiente na SH que interagiu com a SQX permitiu um aumento no grau de hidrofobicidade.

Para avaliação da formação do complexo, realizou-se a diferença do espectro referente ao sistema da mistura (SH + SQX) em relação ao espectro da SH livre. Caso a formação do espectro não seja evidenciada, o espectro resultante deve ser sobreponível ao espectro da SQX livre. Na Figura 16, observa-se que independentemente da concentração da SQX no meio, não ocorreu sobreposição espectral, evidenciando a formação do complexo SH-SQX. Contudo, conforme esperado a concentração do antibiótico influenciou no grau de interação com a SH, como pode ser observado nos valores de variação apresentados na Tabela 7.

Em uma avaliação quantitativa, a partir dos valores das absorvâncias dos diferentes sistemas avaliados, se comparou se  $A_{SQX} + A_{SH} \neq A_{\text{complexo}}$  (VAZ JUNIOR et al., 2017). Nesse contexto, por meio dos dados da Tabela 7 pôde-se observar que os valores de  $\Delta A$  foram diferentes de zero, sugerindo que houve formação de complexo supramolecular entre a SQX e a SH, e que a concentração do ligante influencia no processo de interação.

Assim, percebe-se que o processo de *quenching* estático pode ser confirmado a partir do espectro de UV-vis da Figura 16 a seguir, uma vez que a técnica monitora a formação do complexo no estado fundamental. Mostrando que o resultado obtido por fluorescência molecular está em conformidade com os espectros por UV-vis verificados a seguir.

**Figura 16 – Espectros no UV-vis dos sistemas avaliados em diferentes concentrações de SQX, sendo a) SH a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e SQX a  $25 \text{ }\mu\text{M}$  e b) SH a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  e SQX a  $25 \text{ }\mu\text{M}$ , todos os sistemas em pH 6.**



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

**Tabela 7.** Valores de intensidade de absorvância em diferentes concentrações de SH e SQX do complexo formado e do  $\Delta A$  em  $\lambda = 354$  nm. (1) SH ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) – SQX  $10 \text{ }\mu\text{M}$ , (2) SH ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) – SQX ( $25 \text{ }\mu\text{M}$ ), (3) SH ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) – SQX ( $10 \text{ }\mu\text{M}$ ), (4) SH ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) – SQX ( $25 \text{ }\mu\text{M}$ ).

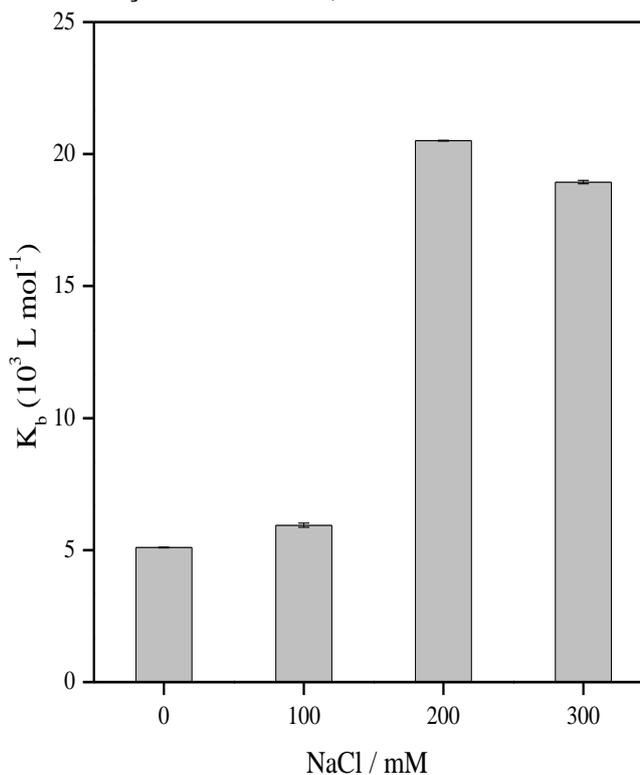
	SH – SQX (1)	SH – SQX (2)	SH – SQX (3)	SH – SQX (4)
$A_{\text{SH}}$	0,054	0,054	0,119	0,119
$A_{\text{SQX}}$	0,063	0,140	0,063	0,140
$A_{\text{COMPLEXO}}$	0,114	0,215	0,176	0,281
$A_{\text{SH}} + A_{\text{SQX}}$	0,117	0,194	0,182	0,259
$A_{\text{COMPLEXO}} - (A_{\text{SH}} + A_{\text{SQX}})$	- 0,003	+ 0,021	- 0,006	+ 0,022

**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

#### 5.2.4 Efeito da força iônica

A força iônica é avaliada a partir da adição de NaCl no meio. A influência da força iônica na interação entre SH e SQX, foi avaliada a partir da titulação espectrofluorimétrica realizada na ausência e na presença de diferentes concentrações de NaCl (100-300 mM).

**Figura 17 – Avaliação da força iônica na interação entre SH e SQX, gráfico de  $K_b$ , na ausência e na presença de solução de concentração de NaCl 100, 200 e 300 mM.**



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

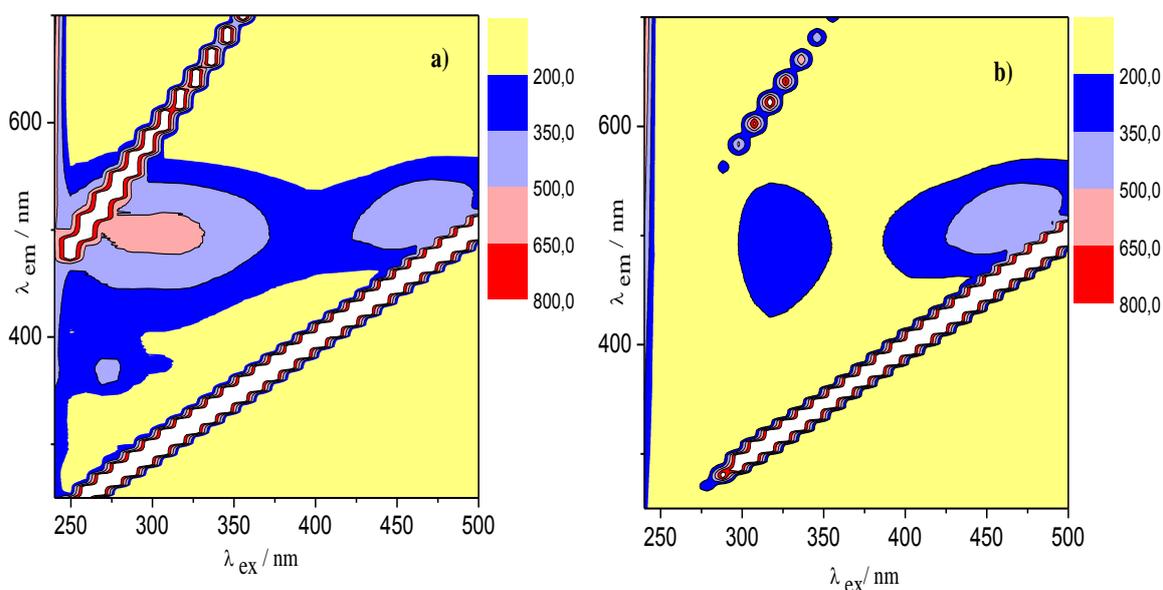
De acordo com os resultados mostrados na Figura 17, após a adição da concentração de solução de NaCl, verificou-se um aumento de até 69% da constante de ligação  $K_b$ , comparando-se a condição na ausência e na presença de NaCl. Percebe-se que os valores para  $K_b$  variaram de  $5,10 \times 10^3$  a  $20,52 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ . Este perfil pode ser justificado com base nos parâmetros termodinâmicos, cuja força preferencial de interação é pelo mecanismo hidrofóbico, sugere-se que provavelmente ocorreu uma redução das cargas superficiais e o ligante migrou para regiões mais internas da macromolécula, aumentando sua afinidade pela SH no processo de interação, e por consequência isto é refletido na elevação do valor de  $K_b$ .

### 5.2.5 Estudo de fluorescência 3D

A espectroscopia de fluorescência 3D permite obter informações quanto à estrutura, origem e presença de possíveis grupos funcionais existentes na SH. Os espectros foram obtidos a partir de SH na ausência e na presença de SQX ( $125 \mu\text{M}$ ) e as soluções excitadas no intervalo de 240-500 nm e a emissão registrada de 250-700 nm.

O estudo de fluorescência 3D a seguir mostra o comportamento antes e após a adição de SQX à solução de SH. Assim, foi possível averiguar as possíveis mudanças na macroestrutura, em que visto uma maior variação do sinal da banda referente ao ácido húmico.

**Figura 18 – a) Espectro de fluorescência 3D de SH. b) Espectros de fluorescência 3D de SH na presença de SQX  $125 \mu\text{M}$ .**



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

De acordo com Jacquín et al. (2017), a região do fluoróforo  $\lambda_{ex}$  de 200-250 nm e emissão de 250-380 nm é destinada a região semelhante à composição *like-protein*, é observado que na presença de SQX houve uma supressão da fluorescência nesta região, indicativo, portanto de mudança na macroestrutura da SH nesta condição. Também, é perceptível outra mudança na região do fluoróforo referente ao AH, que se situa na faixa de comprimento de onda de excitação que vai de 250 – 500 nm, com emissão registrada entre 380 – 500 nm.

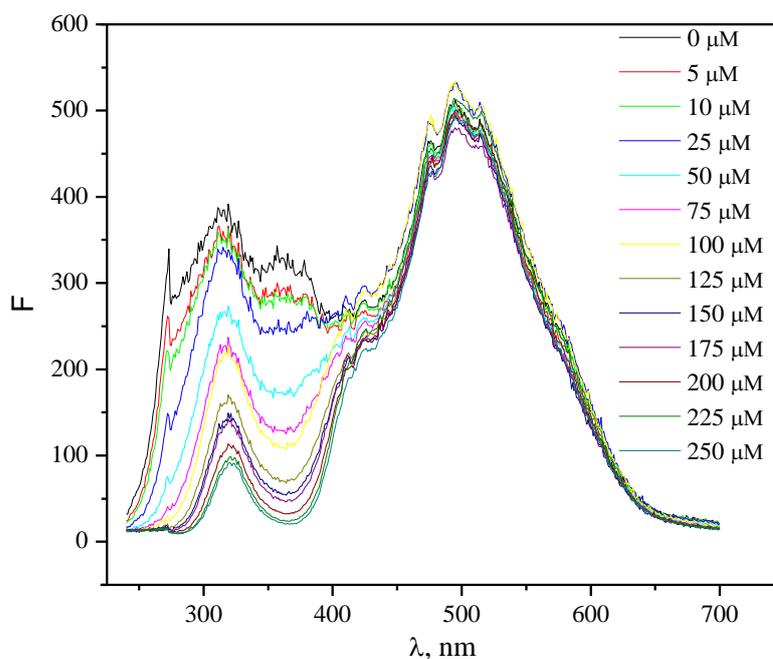
Em estudo semelhante, desenvolvido com matéria orgânica, Park & Snyder (2018) informaram o mesmo perfil de emissão, na faixa de 380 – 550 nm apresentada. Comparando-se o espectro em 3D de SH, na ausência de SQX, com o obtido após a adição do antibiótico SQX a 125  $\mu$ M, percebe-se que ocorreu uma mudança na estrutura da macromolécula, identificada pela diminuição da intensidade de fluorescência na região de emissão específica para ácido húmico (Figura 18b).

Essa macromolécula apresenta vários grupos funcionais, com características hidrofílica ou hidrofóbica, o que permite a interação com diferentes espécies em solução. Dessa forma, mudanças na estrutura de SH *in natura* foram evidenciadas através desse teste, devido maior variação da banda referente à fração de ácido húmico presente na macroestrutura da substância húmica.

#### 5.2.6 Estudo por espectroscopia por fluorescência sincronizada

Por meio de estudos de fluorescência sincronizada buscou-se identificar os grupos funcionais existentes na SH, assim como a investigação de presença de estruturas monoaromáticas, uma vez que são indicativas do grau de humificação. Para que fosse possível a obtenção dos espectros se fez necessário variar simultaneamente a excitação e a emissão, mantendo-se fixo o valor de  $\Delta\lambda$  ( $\lambda_{em} - \lambda_{ex}$ ) entre os comprimentos de onda de emissão e excitação (VARLAN & HILLEBRAND, 2010). A escolha do valor  $\Delta\lambda$  foi baseada em quem melhor forneceu uma resolução otimizada do sinal síncrono. Estudos realizados mostram que  $\Delta\lambda$  de 15 e 60 nm fornecem, respectivamente, informações a respeito de resíduos de tirosina e triptofano (WANG et al., 2013), todavia para este trabalho desenvolvido foi utilizado um  $\Delta\lambda$  de 18 nm, uma vez que Peuravuori et al. (2002) mostraram melhores resoluções na análise dos fluorófos nesta solução de trabalho.

**Figura 19 – Espectros de fluorescência sincronizada ( $\Delta\lambda= 18$  nm) de amostras de SH (extraídas de turfa) com SQX 0-250  $\mu$ M.  $\lambda_{\text{ex}} = 222$  nm e  $\lambda_{\text{em}}$  de 240-700 nm.**



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Os espectros de varredura no estudo de fluorescência sincronizada são representações da soma de espectros de diversos fluoróforos diferentes presentes na macromolécula analisada. De forma geral, eles permitem uma melhor separação espectral dos sinais dos fluoróforos em picos individuais (PROVENZANO et al., 2004), também oferecem um potencial uso para reduzir as interferências sobrepostas (UYGUNER & BEKBOLET, 2005).

Guo et al. (2013) realizaram estudo de fluorescência sincronizada com MO com deslocamento de 18 nm, e o decaimento nos sinais foi observado na faixa de emissão de SH referente aos fluoróforos que se comportam semelhantes às proteínas, logo não observando alteração na região específica para a SH.

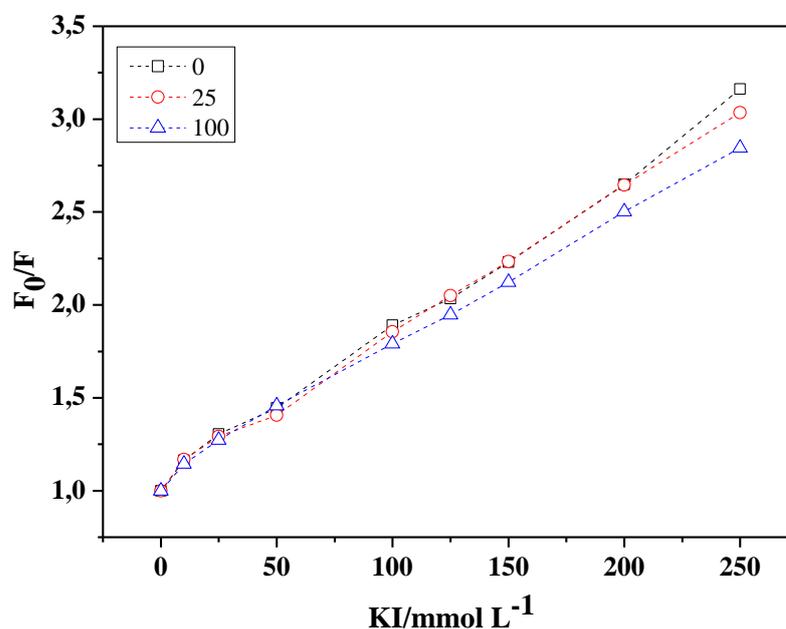
Guo et al. (2013) identificaram três picos nas regiões compreendidas entre 270 – 285 nm, destinada a região para materiais semelhantes a proteínas, o segundo pico de 342 – 350 nm, correspondente ao AF e o último pico entre 357 – 365 nm, para o AH. Fazendo-se uma correlação com os resultados apresentados na Figura 19, percebe-se que há nessas regiões citadas pelos autores, picos onde se presencia uma maior intensidade de fluorescência, exatamente em 272 nm, 348 nm e 357 nm, valores que estão compreendidos nas faixas mencionadas. Além dos 3 picos destacados, nos espectros acima identificou-se um quarto pico em 495 nm, este foi o que apresentou a maior intensidade nos ensaios de fluorescência sincronizada. De acordo com Peuravuori et al. (2002) o sinal em 348 nm corresponde a

presença de naftaleno e seus derivados e que espectros emitidos entre 370 e 480 nm são atribuídos a aromáticos policíclicos .

### 5.2.7 Ensaio com iodeto de potássio (KI)

O iodeto ( $I^-$ ) é capaz de promover o *quenching* dinâmico de moléculas fluorescentes em solução, entretanto o ligante precisar estar acessível para que ocorra a interação com este íon, assim, neste trabalho analisou-se a acessibilidade do  $I^-$  à macromolécula SH. O ensaio com KI busca avaliar o grau de exposição dos fluoróforos, como uma alternativa para auxiliar no entendimento do modo de ligação. Para tanto, se utiliza como parâmetro os valores da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para um melhor entendimento do processo de formação do complexo ligante-macromolécula.

**Figura 20 – Intensidade de fluorescência em função de valores de concentrações crescentes de sulfaquinoxalina na presença de iodeto.**



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Conforme Figura 20, o ensaio de KI indica que a acessibilidade dos íons iodetos ao fluoróforo diminuiu com aumento da concentração SQX, percebe-se que houve uma diminuição na razão  $F_0/F$  resultante do aumento da concentração do ligante, e consequentemente do sinal de fluorescência. Pode-se confirmar este fato a partir dos valores obtidos do  $K_{SV}$  e do  $K_b$  presentes na Tabela 8 a seguir.

**Tabela 8.** Valores de  $K_{SV}$  obtidos por fluorescência molecular no estudo de interação SH e SQX na presença de iodeto.

$C_{SQX}$	$K_{SV} (10^3 L mol^{-1})$	R
0 $\mu M$	8,21 $\pm$ 0,19	0,9980
25 $\mu M$	7,95 $\pm$ 0,13	0,9990
100 $\mu M$	7,16 $\pm$ 0,13	0,9989

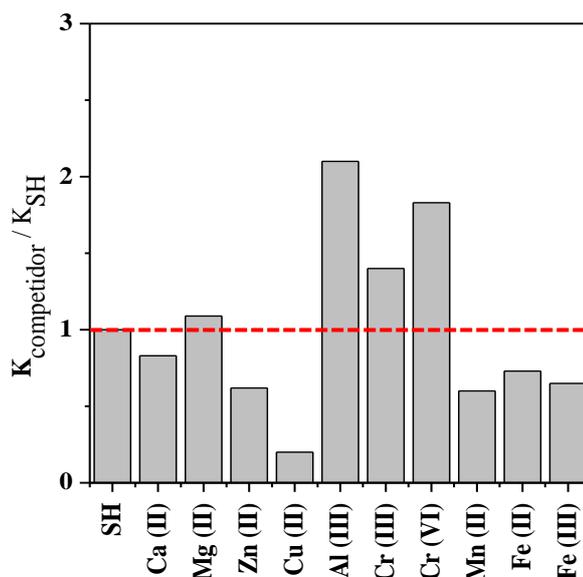
**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Os dados da Tabela 8 indicam que os valores do  $K_{SV}$  foram menores na presença de maiores concentrações de SQX, sugerindo-se que a SH está mais protegida e o íon iodeto não teve expressivo acesso a mesma, caso os valores tivessem sido maiores, significaria que o iodeto teria acesso à SH. O valor do  $K_{SV}$  foi calculado por meio da equação 15, onde [Q] corresponde a concentração do iodeto de potássio.

#### 5.2.8 Estudo do efeito dos competidores: íons metálicos

Os íons metálicos podem influenciar no processo de interação de frações da MO de turfa com fármacos de uso veterinário, logo, os seus efeitos em pH 6,0 estão expressos pela constante de ligação  $K_b$ , esta foi apresentada na Figura 21 abaixo.

**Figura 21 – Efeito da presença de íons metálicos no processo de interação entre SH e a SQX.**



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018

Os dados apresentados mostram que, para os íons Ca(II), Zn(II), Cu(II), Mn(II), Fe(II) e Fe (III), os valores da relação da constante de ligação na presença e na ausência dos competidores foram menores do que 1, isto significa que a adição desses íons não favorece a

formação do complexo. Dessa forma, a diminuição da constante de ligação ( $K_{\text{competidores}}$ ) sugere que ocorreu competição entre os íons apresentados e a SQX pelo mesmo sítio de ligação da SH. Já para as demais espécies, Mg(II), Al(III), Cr(III) e Cr(VI), conforme se verifica na Figura 21,  $K_{\text{competidores}}/K_{\text{SH}} > 1$  a presença desses competidores favorece a interação entre SH e SQX, indicativo de mudança conformacional da macromolécula.

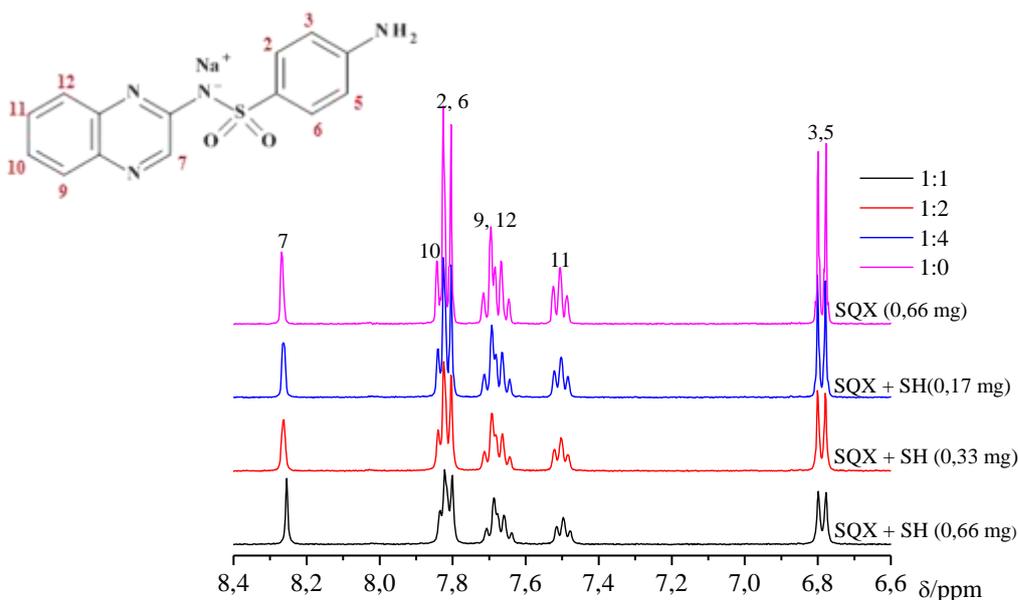
Comportamento semelhante foi observado em pesquisa desenvolvida por Yang et al. (2015), estes investigaram a interação entre a lisozima e o antibiótico cefalotina na presença de espécies iônicas metálicas como Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II) e Fe(III). Mostraram que na presença de determinados íons metálicos observava-se o aumento de  $K_b$  em relação à constante na ausência dos competidores, indicativo de mudança conformacional na macromolécula, já que não houve competição dos íons pelo sítio de ligação. Comportamento oposto foi identificado com outro grupo de íons metálicos, motivo que justificaram a diminuição de  $K_b$  dada à competição pelo mesmo sítio de ligação da cefalotina.

#### 5.2.9 Estudo espectroscópico por ressonância magnética nuclear (RMN)

O estudo por espectroscopia por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  foi utilizado para monitorar o epítipo da SQX durante o processo de interação com a SH. Essas alterações são decorrentes da formação do complexo supramolecular com a SH (FIGUEIREDO & MARSAIOLI 2007), logo o ensaio foi realizado na ausência e na presença da macromolécula em pH 6,0.

Por meio do perfil espectral foi possível determinar os valores do deslocamento químico dos sinais dos hidrogênios da SQX. A Figura 22 a seguir mostra os espectros de RMN  $^1\text{H}$  da sulfaquinoxalina na ausência e na presença de substâncias húmicas em três concentrações diferentes.

**Figura 22 – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de SQX na ausência e na presença de SH em pH 6.**



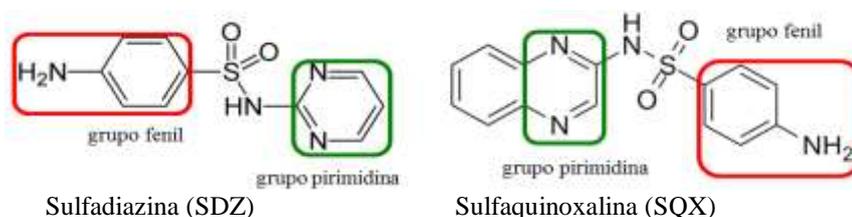
**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

A Figura 22 mostra os espectros de RMN  $^1\text{H}$  para SQX na ausência e na presença de SH. Analisando os valores de variação de deslocamento químico ( $\Delta\delta$ ) pôde-se observar que os hidrogênios 2, 6, 7, 9 e 12 da SQX são os que estão provavelmente interagindo com a SH. Os sinais mostrados para os hidrogênios aromáticos aparecem entre 7,4 e 8,3 ppm e em  $\sim 6,7$  ppm, porém neste último não foi notada uma variação no  $\Delta\delta$ , sugerindo que possivelmente não ocorreu uma interação entre ligante e macromolécula neste hidrogênio.

Em pesquisas realizadas por Francioso et al., (2001) e Batista et al., (2016) constam que a faixa de 6,0 a 8,5 ppm está relacionada à presença de  $^1\text{H}$  de anel aromático heterocíclico ou altamente substituído, incluindo quinonas e fenóis. Chamundeeswari et al. (2014) mostraram os espectros de RMN  $^1\text{H}$  para o antibiótico sulfametoxazol. Comparando-se esse espectro com o apresentado para a SQX neste trabalho, foram identificados dois picos com o mesmo perfil, o primeiro situado em  $\sim 6,7$  ppm e o segundo em  $\sim 7,5$  ppm. Assim, a região de 6,0 a 9,0 ppm é destinada a região aromática.

Srivastava & Sun (2017) em estudo desenvolvido com sulfadiazina (SDZ) mostraram perfis espectrais de RMN  $^1\text{H}$ . Eles destacaram sinais na faixa de 6,01 a 8,50 ppm, que se mostraram referentes a hidrogênios do grupo fenil e do grupo pirimidina (Figura 23). Portanto, verifica-se que esses estudos destacados nos permitem concluir a existência de uma similaridade no perfil espectral dos antibióticos que fazem parte da classe das sulfonamidas. Além disto, a interação SH-SQX se dá preferencialmente pela região aromática, já que esses hidrogênios pertencem a estas regiões no antimicrobiano estudado.

**Figura 23** – Estruturas dos antimicrobianos sulfadiazina (SDZ) e SQX apresentando os grupos fenil e pirimidina.



**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Os dados obtidos a partir da Figura 22 mostram uma diminuição da intensidade do sinal de ressonância, em todos os picos, comparado ao sinal de SQX na ausência de SH e os valores para o deslocamento químico ( $\Delta\delta$ ), de RMN  $^1\text{H}$  (em ppm), estão apresentados na Tabela 9 a seguir.

**Tabela 9.** Deslocamento químico ( $\delta$ ) RMN  $^1\text{H}$  na ausência e presença de SQX em diferentes proporções de massa de SH. a) SQX (0,66 mg), b) 1: 4, SQX + SH (0,17 mg), c) 1: 2, SQX + SH (0,33 mg), d) 1: 1, SQX + SH (0,66 mg) em tampão de fosfato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e pH 6. Volume final de  $600 \mu\text{L}$ .

Hidrogênio	$\delta/\text{ppm}$				$\Delta\delta^1$
	SQX	SQX:SH/proporção em massa			
		1:4	1:2	1:1	
2, 6	7,781	7,812	7,811	7,808	+ 0.027
3, 5	6,789	6,789	6,789	6,789	+ 0.000
7	8,254	8,262	8,264	8,268	+ 0.014
9, 12	7,685	7,681	7,680	7,677	+ 0.008
10	7,843	7,841	7,840	7,836	- 0.007
11	7,507	7,502	7,503	7,497	- 0.010

<sup>1</sup>O  $\Delta\delta$  foi calculado na diferença entre  $\delta(\text{SQX:SH} = 1)$  e  $\delta(\text{SQX})$ .

**Fonte:** Autora deste trabalho, 2018.

Para os hidrogênios 2, 6 e 7 percebe-se que houve um maior deslocamento químico, seguido dos hidrogênios 9 e 12 (Tabela 9), diante disso é possível concluir que esta região (epítopo) é onde está ocorrendo a maior interação com SH. Entretanto não foi observado uma variação no deslocamento para os hidrogênios 3 e 5, provavelmente não deve estar ocorrendo interação da SH com esses hidrogênios da SQX. Por fim, os hidrogênios 10 e 11 apresentaram os menores valores de  $\Delta\delta$ , respectivamente  $- 0,007$  e  $- 0,010$  ppm.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados baseado nos estudos de caracterização das frações de MO da turfa *in natura*, pôde-se concluir que a SH apresentara o maior teor de MO dentre as frações analisadas. Todas as frações possuem estruturas aromáticas condensadas, logo indicativas de um elevado grau de humificação, constatado pelos valores das razões  $E_4/E_6 < 4$ , indicando a predominância de estruturas aromáticas condensadas.

Os experimentos de adsorção realizados mostraram que das frações de MO as SH e a HUM apresentaram os maiores valores para a CC em pH 5 com a TC, logo essas frações mostram potencial para serem utilizadas na remediação ambiental como adsorventes naturais. A aplicação de SH e HUM pode ser futuramente utilizada em solos contaminados com resíduos de TC e, quando possível, estender a outros fármacos de uso veterinário.

Os estudos espectroscópicos simulando condições ambientais mostraram que a interação entre a SH e a SQX foi por *quenching* estático e que uma maior estabilidade entre as espécies foi apresentada em temperatura mais elevada. Os ensaios para os parâmetros termodinâmicos mostraram que essas espécies se ligam por forças hidrofóbicas e maiores concentrações da SH e menores valores de pH favorecem a interação. Esses dados são importantes para que assim seja possível compreender o comportamento da SQX no ambiente.

Pelo que foi apresentado, pode-se concluir que antibióticos de uso veterinário no solo interagem com SH e suas frações. Sua maior ou menor interação depende de fatores como pH, temperatura, cátions e ânions presentes, força iônica, entre outros aspectos. Assim, conhecer o comportamento desses poluentes e seus efeitos é uma demanda atual e necessária, pois permite entender como as SH e suas frações atuam por processos de adsorção e complexação com espécies presentes no ambiente. Tais informações podem ser para traçar metas que possibilitem minimizar o efeito poluidor e conseqüentemente toxicológico desses antimicrobianos nos extratos ambientais, além de disponibilizar informações que nos orientem como lidar com uma carga de resíduos da indústria farmacêutica com aplicação em medicina veterinária de forma mais cautelosa.

## 7. REFERÊNCIAS

- AIKEN G.R.; COSTARIS, E. Soil and hydrology: their effect on NOM. **J Am Water Works Assoc.** v. 87, p. 36 – 45, 1995.
- AKSU, Z. Biosorption of reactive dyes by dried activated sludge: equilibrium and kinetic modeling. **Biochemical Engineering Journal.** v.7, p. 79-84, 2001.
- ALI, M.S. e AL-LOHEDAN, H.A. Interaction of human serum albumin with sulfadiazine. **Journal of Molecular Liquids.** v. 197, p. 124 – 130, 2014.
- BATISTA, A.P.S., et al . Correlating the chemical and spectroscopic characteristics of natural organic matter with the photodegradation of sulfamerazine. **Water Research.** v. 9, p. 20 – 29, 2016.
- BERGH, J.V.; JAKUBOWSKI, B., BURBA, P. Investigations on the conditional kinetic and thermodynamic stability of aquatic humic substance- metal complexes by means of EDTA exchange, ultrafiltration and atomic spectrometry. **Talanta.** v. 55, p. 587 – 593, 2001.
- BIALK-BIELINSKA, A., et al. Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials.** p. 264 – 274, 2012.
- BITTERN COURT, S., et al. Sorção de compostos orgânicos emergentes em lodo de esgoto. **Engenharia sanitária e ambiental.** v. 21, n. 1, 2016.
- BORGHI, A. A. e PALMA, M. S. A. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 50, n. 1, jan./mar., 2014.
- BOTERO, W. G., et al. Peat humic substances enriched with nutrients for agricultural applications: Competition between nutrients and non-essential metals present in tropical soils. **J. Haz. Mat.** v. 177, p. 307–311, 2010.
- BOTERO, W.G., et al. Characterization of the interactions between endocrine disruptors and aquatic humic substances from tropical rivers. **J Braz Chem Soc.** v. 22, n. 6, p. 1103 – 1110, 2011.
- BOTERO, W.G., et al. Influence of the extractant on the complexing capacity of humic substances from peat for macro and micronutrients using continuous flow: agricultural application and environmental Impacts. **J Braz Chem Soc.** v. 24, p. 2015 – 2020, 2013.
- BURBA, P.; DEN B.V.; KLOCKOW, D. On-site characterization of humic-rich hydrocolloids and their metal loads by means of mobile size-fractionation and exchange techniques. **Fresenius J Anal Chem.** v. 371, p. 660 – 669, 2001.
- CARLOS, L., et al. Photochemical fate of a mixture of emerging pollutants in the presence of humic substances. **Water research.** v. 46, p. 4732 – 4740, 2012.
- CERQUEIRA, S. da C.A., et al. Spectroscopic characterization of the reduction and removal of chromium (VI) by tropical peat and humin. **Fuel.** v. 91, p. 141 – 146, 2012.

- CHAMUNDEESWARI S.P., V; SAMUEL E., J. J.; Sundaraganesan, N. Molecular structure, vibrational spectra, NMR and UV spectral analysis of sulfamethoxazole. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 118. 1–10, 2014.
- CHANG, R.R.; MYLOTTE, R.; HAYES, M.H.B.; MCLNERNEY, R.; TZOU, Y.M. A comparison of the compositional differences between humic fractions isolated by the IHSS and exhaustive extraction procedures. **Naturwissenschaften**. v.101, p. 197–209, 2014.
- CHEN, S., et al. Complexation of 1-naphthol by humic and fulvic acids. **Soil Sci Soc Am J**. v. 56, p. 67 – 73, 1992.
- CUNHA, G.C., et al. Adsorption of trihalomethanes by humin: batch and fixed bed column studies. **Bioresour Technol**. v.101, n.3345 – 3354, 2010.
- DING, Y., et al. Measurement of associations of pharmaceuticals with dissolved humic substances using solid phase extraction. **Chemosphere**. v.91, p. 314 – 319, 2013.
- DOBBSS, L.B. et al. Chemical and spectroscopic characterization of isolated humic and fulvic the surface layer of Brazilian latosols. **Rev Bras Ciênc Solo**. v. 33, p. 51 – 63, 2009.
- FERREIRA, J.A.; NASCIMENTO, O.R.; MARTIN-NETO, L. Hydrophobic interactions between spin-label 5-SASL and humic acid as revealed by ESR spectroscopy. **Environ Sci Technol**. v. 35, p. 761 – 765, 2001.
- FERREIRA, J.A., et al. Sorption interactions between imazaquin and a humic acid extracted from a typical Brazilian oxisol. **J Environ Qual**. v. 31, p. 1665 –1670, 2002.
- FIGUEROA, R.A.; LEONARD, A.; MACKAY, A.A. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. **Environ Sci Technol**. v. 38, p. 476 – 483, 2004.
- FRANCIOSO, O., et al. Spectroscopic study (DRIFT, SERS and <sup>1</sup>H NMR) of peat, leonardite and lignite humic substances. **Journal of Molecular Structure**. 565 – 566, 481 – 485, 2001.
- GAO, K., et al. Interaction between peat, humic acid and aqueous metal ions. **Environ Geochem Health**. v. 21, p.13 – 26, 1999.
- GIOVANELA, M., et al. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from the bottom sediments of a Brazilian subtropical microbasin. **Journal of Molecular Structure**. v. 981, p. 111–119. 2010.
- GOVEIA, D., et al. Adsorption and release of micronutrients by humin extracted from peat samples. **J Braz Chem Soc**. v. 24, p. 721 – 730, 2013.
- GU, C., et al; Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. **Chemosphere**. v. 66, p. 1494 – 1501, 2007.
- GUO, Xu-jing., et al. Detection of dissolved organic matter in saline–alkali soils using synchronous fluorescence spectroscopy and principal component analys. **Spectrochimica**

**Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** 104. 280–286, 2013.

HO, Y.S.; PORTER, J.F.; MCKAY, G. Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ions onto peat: copper, nickel and lead single component systems. **Water Air Soil Poll.** v. 141, p. 1 – 33, 2002.

HO, Y-S. Review of second-order models for adsorption systems. **J Hazard Mater.** v. 136, p. 681 – 689. 2006.

HOFF, R. B. **Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas.** Curso de Pós-graduação em biologia celular e molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008. 125 p.

HOFF, R. B. **Identificação e caracterização de metabólitos de sulfaquinoxalina.** Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. 215 p.

HOFF, R. B.; KIST, T.B.L. Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis. **J. Sep. Sci.**, v. 32, p. 854 - 866, Brasil, dezembro, 2009.

INOSTROZA, P.A., et al. Chemical activity and distribution of emerging pollutants: insights from a multi-compartment analysis of a freshwater system. **Environmental pollution.** v. 231, p. 339 – 347., 2017.

ISLAM, M. M., et al. Caffeine and sulfadiazine interact differently with human serum albumin: A combined fluorescence and molecular docking study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** v. 152, p. 23 – 33, 2016.

JACQUIN, C., et al. Three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence (3DEEM) for quick and pseudo-quantitative determination of protein. **Water Research.** v. 118, p. 82 – 92, 2017.

JACUNDINO J.S., et al. Interactions between humin and potentially toxic metals: prospects for its utilization as an environmental repair agent. **J Environ Chem Eng.** v.3, p. 708 – 715, 2015.

JAMAL, S., et al. Fluorescence detection and identification of eight sulphonamides using capillary electrophoresis on released excipients in lake water. **Arabian journal of chemistry.** 2014.

JESUS, A.M.D., et al. Use of humin as an alternative material for adsorption/desorption of reactive dyes. **Desalination.** v. 274, p.13 – 21, 2011.

KANG, H.J. LIM, M.Y.; KWON, J.H. Effects of adsorption onto silica sand particles on the hydrolysis of tetracycline antibiotics. **J Environ Monit.** v.14, p. 1853 – 1859, 2012.

KHAN, M.N. e SARWAR, A. Determination of points of zero charge of natural and treated adsorbents. **Surf Rev Lett.** v.14, p. 461 – 469, 2007.

KONONOVA, M.M. Soil organic matter. Its Nature, Its Role in Soil Formation and in Soil Fertility. 2<sup>a</sup> ed. 1966.

KULIKOWSKA, D., et al. Feasibility of using humic substances from compost to remove heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) from contaminated soil aged for different periods of time. **J Hazard Mater.** v. 300, p. 882 - 891, 30 dezembro, 2015.

KULSHRESTHA, P.; GIESE, R.F.; AGA, D.S. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: insights on factors affecting its mobility in soil. **Environ Sci Technol.** v.38, p. 4097 – 4105, 2004.

KUN, L. Mechanism of ofloxacin fluorescence quenching and its interaction with sequentially extracted dissolved organic matter from lake sediment of Dianchi, China. **Environ Monit Assess.** v. 186, p. 8857 – 8864, 2014.

KUOKKANEN, V., et al. Electrocoagulation treatment of peat bog drainage water containing humic substances. **Water Res.** v. 79, p. 79 - 87, 1 agosto de 2015.

LI, C.L., et al. Thermodynamics of Cu<sup>2+</sup> adsorption on soil humin. **Int J Environ Res.** v. 9, p. 43 – 52, 2015.

LINDSEY, M.E.; MEYER, M. e THURMAN, E.M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Anal Chem.** v.73, p. 4640 – 4646, 2001.

MAHAMALLIK, P.; SAHA, S.; PAL, A. Tetracycline degradation in aquatic environment by highly porous MnO<sub>2</sub> nanosheet assembly. **Chemical Engineering Journal.** v. 276, p. 155 - 165, 2015.

MASELLI, B.de S., et al. Ecotoxicidade de efluentes brutos e tratados gerados por uma fábrica de medicamentos veterinários. **Revista ambiente e água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science.** v. 8, n.2, 2013.

MIAO, X-S., et al. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. **Environ Sci Technol.** v.38, p. 3533 – 3541, 2004.

MOHAMADI M., et al. Spectroscopic and electrochemical studies of the interaction between oleuropein, the major bio-phenol in olives, and salmon sperm DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** v. 148, p. 260 – 265, abril, 2015.

MOLINA-BOLÍVAR, J. A., et al. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. **Journal of luminescence,** Espanha, v.156, p.141–149, Ago., 2014.

NAIK, P.N., et al. Non-covalent binding analysis of sulfamethoxazole to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, UV–vis, FT-IR, voltammetric and molecular modeling. **Journal of Pharmaceutical Analysis.** v. 5, n. 3, p. 143 – 152, 2015.

NCBI-National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD20894, USA. Disponível em:<

[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dimethyl\\_sulfoxide#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dimethyl_sulfoxide#section=Top)>. Acessado em: Ago. 2018

NOVAES, S. F., et al. Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. **Ciência Rural.**, v.47, n. 8, Julho de 2017.

OLIVEIRA, L.K., et al. Adsorption/desorption of arsenic by tropical peat: influence of organic matter, iron and aluminium. **Environ Technol.** v. 36, 149 – 159, 2015.

PACHECO, M. E. e BRUZZONE, L. Interactions between imazethapyr and bovine serum albumin: Spectrofluorimetric study. **Journal of Luminescence.** v. 132, p. 2730 – 2735.

PAROLO, M.E., et al. Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects. **Appl Clay Sci.** v. 40, p.179 – 186, 2008.

PEDROTTI, A., et al. Atributos químicos do solo modificados por diferentes sistemas de cultivo associados a culturas antecessoras ao cultivo do milho, nos Tabuleiros Costeiros. **Magistra.** v. 27, n. 3/4, p. 292 – 305, 2015.

PENA, A., et al. Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. **J Pharm Biomed Anal.** v.18, p. 839 – 845, 1998.

PEREIRA, K.F., et al. Uso de sondas de epifluorescência para a avaliação de sêmen criopreservado bubalino. In: 16º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA. **Anais...** Embrapa Amazônia oriental, Agosto, 2012.

PEURAVUORI, J.; KOIVIKKO, R.; PIHLAJA, K. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. **Water Research.** v. 36, p. 4552 – 4562, 2002.

PILS, J.R.V.; LAIRD, D.A. Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K- and Ca-saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes. **Environ Sci Technol.** v.41, p.1928 – 1933, 2007.

PROVENZANO, M. R., et al. Fluorescence behaviour of Zn and Ni complexes of humic acids from different sources. **Chemosphere.** 55. 885–892, 2004.

REHMAN, S.U., et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** Índia, v.576, p.49 – 60, maio, 2015.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. Introdução à Química Ambiental. 2ª ed., Porto Alegre: **Bookman editora**, 2009.

RODRÍGUEZ, F.J.; SCHLENGER, P.; GARCÍA-VALVERDE, M. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: structural characterization of humic substances. **Sci Total Environ.** v. 476, n. 477, p. 718 – 730, 2014.

ROMÃO, L. P. C. **Utilização da ultrafiltração em fluxo tangencial como nova metodologia para determinação da capacidade de complexação e constantes de equilíbrio de íons Cu(II) complexados por matéria orgânica natural.** UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara- SP, 2003. 97 p.

ROSA, A.H.; ROCHA, J.C., FURLAN, M. Humic substances of peat: study of the parameters that influence on the process of alkaline and extraction. **Quim Nov.** v. 23, p. 472–476, 2000.

SANCHES, S.M.; DE CAMPOS, S.X.; VIEIRA, E.M. Caracterização das frações das substâncias húmicas de diferentes tamanhos moleculares. **Ecl Quím.** v.32, p. 49 – 56, 2007.

SANTOS, C. H. **Estudo da matéria orgânica e composição elementar de solos arenosos de regiões próximas a São Gabriel da Cachoeira no Amazonas.** Universidade de São Paulo – São Carlos – SP, 2014. 173 p.

SCHLAUTMAN, M.A. e MORGAN, J.J. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. **Environ Sci Technol.** v. 27, p. 961 – 969, 1993.

SHALABY, A.R., et al. Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver. **Food chemistry.** V. 124, p. 1660 – 1666, Fev. 2011.

SILVA FILHO, M. P., et al. Indicações de medicamentos de uso veterinário por balconistas de farmácias e estabelecimentos veterinários em diversos municípios do Estado da Paraíba. **Biofar – Revista de Biologia e Farmácia.** v. 9,n.3, 2013.

SILVA, E.P.; SOUZA, J.R.; CALDAS, E.D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química nova.** v. 37, n. 1, p. 111 – 122, 2014.

SOUSA, F.W., et al. The use of green coconut shells as absorbents in the toxic metals. **Quim Nov.** v. 30, p. 1153 – 1157, 2007.

SOUZA, S. O. et al. Evaluation of different fractions of the organic matter of peat on tetracycline retention in environmental conditions: in vitro studies. **J Soils Sediments.** v.) 16, 1764–1775, 2016.

SRIVASTAVA, R. e SUN, Y. Silver sulfadiazine immobilized glass as antimicrobial fillers for dental restorative materials. **Materials Science and engineering C.** v. 75, p. 527 – 534, 2017.

Sulfaquinoxalina sódica. Disponível em: <http://quimicaalkano.com/product/sulfaquinoxalina-sodica/>. Acessado em: fev. 2018

SUN, K. et al. Sorption of endocrine disrupting chemicals by condensed organic matter in soils and sediments. **Chemosphere.** v. 80, n. 7, p. 709 – 715, 2010.

STEVENSON, FJ. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2<sup>a</sup> ed., New York, 1994.

- TAPPE, W., et al. Degradation of Sulfadiazine by *Microbacterium lacus* Strain SDZm4, Isolated from Lysimeters Previously Manured with Slurry from Sulfadiazine-Medicated Pigs. **Appl Environ Microbiol.**; v. 79, n.8, p. 2572 – 2577, abril, 2013.
- TASHO, R. P. e CHO, J. Y. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. **Sci Total Environ.** v. 563 –564, p. 366-376, 1 setembro, 2016.
- TOWN, R. M.; KIPTON, H. POWELL, J. Elimination of adsorption effects in gel permeation chromatography of humic substances. **Anal. Chim. Acta.** v. 256, p. 81-86, 1992.
- ÚNICA – União da indústria da cana-de-açúcar, 2011 <[www.unica.com.br](http://www.unica.com.br)> acessado em 20 de julho de 2013.
- UYGUNER, C.S. e BEKBOLET, M. Evaluation of humic acid photocatalytic degradation by UV–vis and fluorescence spectroscopy. **Catalysis Today.** v. 101, p. 267 – 274, 2005.
- VARLAN, A.; HILLEBRAND, M. Bovine and Human Serum Albumin Interactions with 3-Carboxyphenoxathiin Studied by Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy, **Molecules**, Romênia, v. 15, p. 3905-3919, Maio, 2010.
- VAZ JUNIOR, S.; LOPES, W.T.; MARTIN-NETO, L. Study of molecular interactions between humic acid from Brazilian soil and the antibiotic oxytetracycline. **Environmental Technology & Innovation.** v. 4, p. 260 – 207, 2015.
- ZHANG, Y., et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods. **Journal of Hazardous Materials**, China, v. 163, p. 1345–1352, Ago., 2009
- ZHANG, J., et al. The role of humic acid in the toxicity of arsenite to the diatom *Navicula* sp. **Environ Sci Pollut Res.** v. 21, p. 4366 – 4375, 2014.
- YANG, Y.; LI, D.; XU, C. Influences of urea, pH and metal ions on the interaction between cepharanthine and lysozyme by steady state fluorescence spectroscopy, **Journal of Molecular Structure.** v. 1084, p. 229 - 235, China, dezembro 2015.
- WANG, Q.; ZHANG, S.-R.; JI, X. Investigation of interaction of antibacterial drug sulfamethoxazole with human serum albumin by molecular modeling and multi-spectroscopic method. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** v. 124, p. 84 – 90, 2014.
- WANG, Q., et al. Study on the interaction characteristics of cefamandole with bovine serum albumin by spectroscopic technique. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v.136, p. 321–326, Out., 2015