

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAIZZA ZORMAN MARQUES

ENROFLOXACINO NA CULTURA DA SOJA: EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE
GRÃOS E RELAÇÃO MICROSSIMBIÓTICA

CURITIBA

2021

RAIZZA ZORMAN MARQUES

ENROFLOXACINO NA CULTURA DA SOJA: EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE
GRÃOS E RELAÇÃO MICROSSIMBIÓTICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Pedrosa Gomes

Coorientadores: Profa. Dra. Glaciela Kaschuk e
Dr. Júlio César Moreira de Brito

CURITIBA

2021

Marques, Raizza Zorman

Enrofloxacin na cultura da soja: efeitos sobre a produção de grãos e relação microsimbiótica. / Raizza Zorman Marques. - Curitiba, 2021.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo.

Orientador: Marcelo Pedrosa Gomes

Coorientadora: Glaciela Kaschuk

Coorientador: Júlio César Moreira de Brito

1. Antimicrobianos. 2. Soja. 3. Ecotoxicologia. I. Gomes, Marcelo Pedrosa. II. Kaschuk, Glaciela. III. Brito, Júlio César Moreira de. IV. Título. V. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA DO SOLO -
40001016014P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DO SOLO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **RAIZZA ZORMAN MARQUES** intitulada: **ENROFLOXACINO NA CULTURA DA SOJA: EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE GRÃOS E RELAÇÃO MICROSSIMBIÓTICA**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO PEDROSA GOMES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 23 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica
23/08/2021 12:35:20.0
MARCELO PEDROSA GOMES
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
23/08/2021 14:20:33.0
HELENA CRISTINA SILVA DE ASSIS
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO FARMACOLOGIA -
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/08/2021 13:34:20.0
JULIO CÉSAR MOREIRA DE BRITO
Avaliador Externo (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS)

Assinatura Eletrônica
23/08/2021 15:24:39.0
MARÍLIA MÉRCIA LIMA CARVALHO CARNEIRO
Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL TECNOLÓGICO BAIANO)

Em memória de Enrique Mihockiy Fernandez Martinez e Marcelo Bach de Aguiar.

AGRADECIMENTOS

Mãe e Ma, com vocês descobri que lar é muito mais que “onde”. Lar é “quem”. E sempre fomos nós três. Sou grata pela oportunidade de crescer rodeada por mulheres fortes, que insistem em continuar, mesmo quando tudo parece indicar o contrário. Obrigada por sonharem meus sonhos comigo e por acreditarem em mim. O amor de vocês ilumina meus passos. Juntas seguiremos sempre em frente!

Amigos e amigas, vocês me fazem livre pra ser quem eu sou. É um privilégio poder contar com pessoas tão especiais para multiplicar minhas alegrias e dividir minhas tristezas. Obrigada por me proporcionarem dias mais leves. Obrigada pelo aconchego e pelo riso fácil. Obrigada por me lembrarem todos os dias de que viver vale a pena. Sou feliz porque tenho vocês.

Professor Marcelo, eu sempre digo que tirei a sorte grande de ter no meu orientador um dos meus melhores amigos. A você dedico minha admiração, meu respeito, meu carinho e minha gratidão. É preciso ter um grande coração para ajudar a construir novos pensadores. Imagino que essa não seja uma tarefa fácil! Mas saiba que, desde que você chegou, eu não passo um só dia sem questionar os porquês. Nunca se esqueça de que você transformou a minha vida. Obrigada!

Aos meus coorientadores, obrigada por embarcarem nessa aventura comigo. Obrigada por todo carinho e atenção que dedicaram a mim e a essa dissertação.

Equipe do LAFIPE, sou grata por ter uma rede de apoio tão maravilhosa! Obrigada por todo o suporte, dentro e fora do laboratório. Que possamos aprender juntos todos os dias. Torço pelo sucesso de cada um de vocês!

A todo o Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, colegas, professores, técnicos e servidores, obrigada por mesmo distantes, tornarem meu sonho realidade. Obrigada por remarem contra a maré e por permitirem que projetos como o meu saiam do papel. Obrigada também a CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço a ciência por todos os dias transformar meu medo em coragem, por me fazer pensar diferente, por me desafiar, por tirar o melhor de mim e, principalmente, por ter feito de mim uma agente de mudança.

Agradeço a vida. Por todo abrir de olhos que veio como um recomeço. Que cada novo capítulo da minha história honre aqueles que partiram antes da hora. Minhas conquistas também serão de vocês.

Resistimos!

Quem não se movimenta, não sente as correntes que o prendem.

(Rosa Luxemburgo)

RESUMO

A contaminação das matrizes ambientais por antimicrobianos veterinários é um problema ambiental emergente. Por essas moléculas possuírem uma baixa metabolização no trato intestinal dos animais, as excretas se caracterizam como a principal fonte de contaminação dos ecossistemas. Ao atingirem o solo, os antimicrobianos podem interferir sobre organismos não-alvo como plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio. Além disso, o escoamento superficial e a lixiviação transportam esses químicos até os cursos d'água, direcionados à irrigação de culturas agrícolas. Nesse sentido, investigou-se o efeito da presença de enrofloxacino na água de irrigação e no solo destinado ao cultivo de soja. Na concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, enrofloxacino via água de irrigação levou a perda significativa do rendimento de grãos. Via solo, não foram identificados danos ao crescimento e desenvolvimento vegetal, porém concentrações a partir de $600 \mu\text{g.kg}^{-1}$ afetaram o metabolismo de nitrogênio das plantas, reduzindo a atividade da enzima nitrogenase, o teor de ureídeos e a translocação de N para a parte aérea. O aumento nas concentrações de prolina em folhas de plantas expostas a $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pode corresponder a um mecanismo de tolerância em resposta à potencial indução de estresse oxidativo pelo antimicrobiano. Além dos prejuízos ambientais e econômicos associados à uma menor produção de grãos, verifica-se um risco a saúde pública com a detecção desse antimicrobiano em tecidos vegetais comestíveis como folhas (até $560,85 \text{ ng.g}^{-1}$) e grãos (até $78,15 \text{ ng.g}^{-1}$), destinados à alimentação de animais e humanos, podendo desencadear, dentre outros problemas, na resistência bacteriana. Esse estudo alerta sobre os efeitos do enrofloxacino na microbiota do solo e nas plantas de interesse agrícola, discutindo sobre a bioacumulação desse antimicrobiano na cadeia trófica.

Palavras-chave: antimicrobianos; *Glycine max*, produtividade, contaminação, ecotoxicologia

ABSTRACT

The contamination of environmental matrices by veterinary antimicrobials is an emerging environmental problem. These molecules have low metabolization in the animals gut, being the excreta the main source of contamination to ecosystems. Once in the soil, antimicrobials can affect non-target organisms such as nitrogen-fixing bacteria and plants. In addition, surface runoff and leaching can transport these chemicals to water courses, used for irrigation of agricultural fields. Here, the effects of enrofloxacin presence in the irrigation water and in the soil used in soybean cultivation was investigated. Enrofloxacin via irrigation water ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) led to grain yield reduction. Through the soil, no damages to plant growth and development were identified, but at the $600 \mu\text{g.kg}^{-1}$ concentration, enrofloxacin affected plant nitrogen metabolism by reducing nitrogenase activity, ureide content and nitrogen translocation. Plants exposed to $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ showed increased proline concentration in their leaves, probably as a response to enrofloxacin-inducing oxidative stress. We conclude that the presence of enrofloxacin in environmental matrices led to environmental and economical concerns. There is also a risk to public health, since the antimicrobial was detected in edible plant tissues such as leaves (up to $560,85 \text{ ng.g}^{-1}$) and grains (up to $78,15 \text{ ng.g}^{-1}$). The presence of the antimicrobial in animal and human diets can result in bacterial resistance. This study warns about the effects of the enrofloxacin on soil microbiota and agricultural crops, discussing the bioaccumulation of this antimicrobial in the food chain.

Keywords: antimicrobials; *Glycine max*; yield; contamination; ecotoxicology

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ROTAS DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR FÁRMACOS VETERINÁRIOS	22
FIGURA 2 – GRÃOS DE SOJA COLHIDOS NO TRATAMENTO 0 (A) e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (B) DE ENROFLOXACINO	42
FIGURA 3 – EXEMPLO DE CROMATOGRAMA	44
FIGURA 4 – VARIAÇÃO TEMPORAL DAS CONCENTRAÇÕES DE ENRO E CIPRO NO SUBSTRATO DE VASOS SEM PLANTAS (A) E AS CONCENTRAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS NA COLHEITA NO SUBSTRATO DE VASOS SEM (- PLANTAS) E COM PLANTAS (+ PLANTAS) (B) EXPOSTOS A IRRIGAÇÃO COM ÁGUA CONTAMINADA POR ENRO (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	44
FIGURA 5 – CONCENTRAÇÃO DE ENROFLOXACINO POR ÓRGÃO DA PLANTA DE SOJA SUBMETIDA AO TRATAMENTO DE 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ DE ENROFLOXACINO	46
FIGURA 6 – CONCENTRAÇÃO DE CIPROFLOXACINO POR ÓRGÃO DA PLANTA DE SOJA SUBMETIDA AO TRATAMENTO DE 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ DE ENROFLOXACINO	47
FIGURA 7 – CRESCIMENTO DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO COM ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	66
FIGURA 8 – ESTADO DE ATIVAÇÃO DA RUBISCO EM PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO COM ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	67
FIGURA 9 – NÚMERO E MASSA SECA DOS NÓDULOS DESTACADOS DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO COM ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	68
FIGURA 10 – DIFERENÇA DE COLORAÇÃO ENTRE UM NÓDULO ATIVO (A) E UM INATIVO (B)	69
FIGURA 11 - ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE DOS NÓDULOS DESTACADOS DE PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO COM ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	70

FIGURA 12 – CONCENTRAÇÃO DE UREÍDEOS TOTAIS EM FOLHAS DE SOJA CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	71
FIGURA 13 – CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL EM RAÍZES (A) E PARTE AÉREA (B) DE PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	72
FIGURA 14 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS GS (A), GOGAT(B), NADH-GDH (C) E TEOR DE PROLINA (D) EM FOLHAS DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	74
FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE GRÃOS DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	75
FIGURA 16 - MASSA SECA DA PARTE AÉREA (A) E RAIZ (B) AO FINAL DO CICLO DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 E 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	76
FIGURA 17 - VARIAÇÃO TEMPORAL DAS CONCENTRAÇÕES DE ENROFLOXACINO NA RIZOSFERA DE PLANTAS DE SOJA	78
FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO DE ENROFLOXACINO NAS RAÍZES E FOLHAS DE SOJA CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	80
FIGURA 19 – CONCENTRAÇÃO DE ENROFLOXACINO NAS FOLHAS E GRÃOS DE SOJA CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS QUINOLONAS DE 1ª E 2ª GERAÇÃO	20
TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO DOS MACRO E MICRONUTRIENTES PRESENTES NA SOLUÇÃO DE HOAGLAND & ARNON (1950)	39
TABELA 3 – PRODUÇÃO DE GRÃOS EM PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) OU NÃO (0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) A IRRIGAÇÃO COM ÁGUA CONTAMINADA POR ENROFLOXACINO	42
TABELA 4 – TESTE F DA ANOVA DE MÚLTIPLAS VIAS PARA OS EFEITOS DE TRATAMENTO (0 E 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) E ÓRGÃOS DA PLANTA DE SOJA (RAÍZES, FOLHAS E GRÃOS)	46
TABELA 5 – ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO	60
TABELA 6 - TESTE F DA ANOVA DE DUAS VIAS PARA TRATAMENTOS (200, 600 E 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) E TEMPO DE APLICAÇÃO (0, 45 E 60 DIAS)	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1 OBJETIVO GERAL	17
1.1.1 Objetivos específicos.....	17
2 ANTIMICROBIANOS DE USO VETERINÁRIO: UMA QUESTÃO AMBIENTAL EMERGENTE.....	18
2.1 IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO ANIMAL NO BRASIL.....	18
2.2 USO DE MEDICAMENTOS NA PRODUÇÃO ANIMAL.....	18
2.3 FÁRMACOS NO AMBIENTE	21
2.4 ANTIMICROBIANOS E OS ORGANISMOS NÃO-ALVO	23
2.4.1 Microrganismos do solo.....	23
2.4.2 Plantas	24
2.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	25
2.6 REFERÊNCIAS	27
3 CAPÍTULO I: EFEITOS DA IRRIGAÇÃO COM ÁGUA CONTAMINADA POR ENROFLOXACINO NA CULTURA DA SOJA.....	34
3.1 RESUMO.....	35
3.2 ABSTRACT	35
3.3 INTRODUÇÃO	36
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.4.1 Condições experimentais	38
3.4.2 Produção de grãos	40
3.4.3 Avaliações químicas.....	40
3.4.4 Análises estatísticas	41
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.5.1 Produção de grãos	42
3.5.2 Quantificação de químicos	43
3.6 CONCLUSÕES	50
3.7 REFERÊNCIAS.....	51
4 CAPÍTULO II: ENROFLOXACINO NO CRESCIMENTO DE PLANTAS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA INOCULADA COM <i>BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM</i>.....	56
4.1 RESUMO.....	56

4.2 ABSTRACT	56
4.3 INTRODUÇÃO	58
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.4.1 Condições experimentais	60
4.4.2 Cultivo das plantas	61
4.4.3 Análises fisiológicas	61
4.4.4 Quantificação de enrofloxacino	62
4.4.5 Análises estatísticas	64
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.5.1 Crescimento das plantas	64
4.5.2 Nodulação e metabolismo de nitrogênio	68
4.5.3 Produção de grãos e massa seca ao final do ciclo	75
4.5.4 Quantificação de químicos	77
4.5.4.1 Solo	77
4.5.4.2 Plantas.....	79
4.6 CONCLUSÕES	83
4.7 REFERÊNCIAS.....	84
5 CONCLUSÃO GERAL.....	92
6 REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os antimicrobianos veterinários são insumos extensivamente utilizados no desenvolvimento da atividade pecuária. Com ação profilática, terapêutica e promotora de crescimento, esses medicamentos maximizam o desempenho da produção animal (KIRCHHELLE, 2018). Dentre as distintas classes de antimicrobianos, as fluoroquinolonas são uma das mais utilizadas e têm como um de seus principais representantes o enrofloxacino, empregado no tratamento de infecções respiratórias e gastrointestinais em animais de produção (LILLENBERG et al., 2010). Apesar de seu amplo espectro de ação e alta eficiência no combate a doenças (TROUCHON et al., 2017), esse fármaco apresenta uma baixa absorção no trato intestinal, podendo ter de 30 a 90% da dose administrada eliminada nas excretas, seja em sua composição íntegra ou parcialmente metabolizada (ZHANG et al., 2016). Dessa forma, cama de aves e dejetos líquidos (bovinos ou suínos), comumente utilizados como fertilizante em lavouras, são uma possível fonte de contaminação ambiental (XIE; SHEN; ZHAO, 2018). Além disso, processos de transferência, como o escoamento superficial e a lixiviação, podem direcionar essas moléculas a rios e lagos, ameaçando também o ecossistema aquático (OBIMAKINDE et al., 2017).

Quando presentes na solução solo, os antimicrobianos podem ser absorvidos pelas plantas (BOXALL et al., 2006) e então desencadear efeitos deletérios sobre a fotossíntese, a respiração e o metabolismo de nitrogênio (ROCHA et al., 2021), interferindo no processo de fixação biológica (REVELLIN et al., 2018) de modo a proporcionar um menor aporte nutricional, especialmente para espécies leguminosas. Os antimicrobianos também podem ser translocados e acumulados em diferentes tecidos vegetais (CHUNG et al., 2017). No caso de cultivos agrícolas, distúrbios fisiológicos possivelmente resultarão em perdas de produção e também na inserção desses químicos na cadeia trófica (GOMES et al., 2020a), o que pode levar à seleção de bactérias resistentes ou à indução de resistência bacteriana – tema de relevância à saúde pública mundial (CAMOTTI BASTOS et al., 2018).

Estudos acerca dos impactos dos antimicrobianos sobre plantas de interesse agrícola ainda são escassos. Pensando nisso, este trabalho visou determinar os efeitos ocasionados pela presença de enrofloxacino na água de irrigação e no solo destinados ao cultivo de soja (*Glycine max*). Esse trabalho traz à tona não só a questão econômica, resultado da interferência do antimicrobiano na produção de

grãos, como também as questões ambientais e sanitárias associadas à introdução dessa molécula na cadeia alimentar.

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetivou investigar os prejuízos produtivos e biológicos decorrentes da contaminação de matrizes ambientais por enrofloxacino, a partir da exposição de plantas de soja a água de irrigação e a solo de cultivo contaminados pelo antimicrobiano, determinando sua bioacumulação nos tecidos vegetais, o rendimento de grãos das plantas e a eficiência da fixação biológica de nitrogênio por *Bradyrhizobium japonicum*.

1.1.1 Objetivos específicos

- a) Investigar a capacidade de absorção de enrofloxacino pelas plantas de soja;
- b) Avaliar a distribuição e o acúmulo de enrofloxacino e ciprofloxacino pelas plantas de soja;
- c) Determinar a produção de grãos nas plantas de soja expostas ao antimicrobiano através da água de irrigação ou solo contaminado;
- d) Avaliar os efeitos do enrofloxacino no crescimento, metabolismo primário e metabolismo de nitrogênio em plantas de soja cultivadas em solo contaminado pelo antimicrobiano;
- e) Avaliar a nodulação das plantas inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* expostas ao solo contaminado com enrofloxacino.

2 ANTIMICROBIANOS DE USO VETERINÁRIO: UMA QUESTÃO AMBIENTAL EMERGENTE

2.1 IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO ANIMAL NO BRASIL

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de alimentos de origem animal. O país é líder nas exportações de carne bovina e de frango e o quarto maior exportador de carne suína (FAO, 2020), enfatizando a relevância da atividade pecuária brasileira para a economia, tanto a nível internacional, quanto nacional. Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estimam que, em 2021, os ganhos no valor bruto da produção agropecuária brasileira (VBP) girem em torno de R\$ 1,058 trilhões, sendo R\$ 330,12 bilhões provenientes da pecuária. Neste contexto, a carne bovina é a que mais contribui com o VBP, seguida pela carne de frango, leite, carne suína e ovos (BRASIL, 2021). As perspectivas para o setor de produtos de origem animal são positivas, com incrementos na produção (+1,9% ao ano), no consumo (+1,5% ao ano) e na exportação (+3,0% ao ano) até 2028 (BRASIL, 2018).

2.2 USO DE MEDICAMENTOS NA PRODUÇÃO ANIMAL

O faturamento do mercado brasileiro de produtos para a saúde animal segue em ascensão. Em 2019, o segmento embolsou R\$ 6,5 milhões, um aumento de 9,4% em relação ao ano anterior. Mais de $\frac{3}{4}$ das vendas se destinaram apenas a ruminantes, aves e suínos, demonstrando a participação efetiva destes insumos na pecuária. Quanto às classes terapêuticas, as mais visadas foram as dos antiparasitários, biológicos e antimicrobianos, respectivamente (SINDAN, 2020).

Os antimicrobianos correspondem a substâncias naturais ou sintéticas que matam ou inibem o crescimento de microrganismos. A utilização dessas moléculas como fármacos veterinários se iniciou na década de 1930 e, desde então, esses medicamentos revolucionaram a produção de alimentos, sendo importantes ferramentas na prevenção e tratamento de doenças, através da adoção de técnicas profiláticas, metafiláticas e terapêuticas. Além disso, quando administrados em doses subterapêuticas, os antimicrobianos funcionam também como promotores de crescimento, melhorando o desempenho e a conversão alimentar dos animais, o que

popularizou ainda mais seu uso a partir dos anos 1950 (KIRCHHELLE, 2020). Num contexto mais recente, porém, essa prática vem sendo banida em diversos países, incluindo o Brasil, como um meio para conter a seleção de bactérias resistentes (RABELLO et al., 2020; SNEERINGER; BOWMAN; CLANCY, 2019).

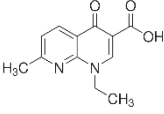
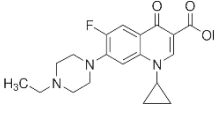
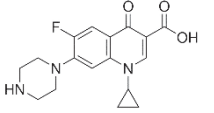
A introdução de barreiras legais contra a utilização de antimicrobianos como melhoradores de desempenho, bem como o desenvolvimento de aditivos alimentares alternativos de função similar, a exemplo dos probióticos (produto composto por microrganismos benéficos vivos que equilibram a flora intestinal), traz à tona um possível cenário de redução desse mercado (GADDE et al., 2017). No entanto, Van Boeckel et al. (2015) projetam que, até 2030, a utilização desses fármacos aumentará em 67% num parâmetro mundial e praticamente dobrará nos países que compõem o BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul). Os autores ainda preveem que China, Brasil e Índia, se destacarão respectivamente como primeiro, terceiro e quarto maiores consumidores, impulsionados, sobretudo, pela alta demanda por proteínas de origem animal e pela intensificação dos processos produtivos (VAN BOECKEL et al., 2015).

Os principais grupos farmacológicos de antimicrobianos utilizados na produção animal são os aminoglicosídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas e fluoroquinolonas (REGITANO; LEAL, 2010). Estes grupos se diferem principalmente por suas estruturas químicas e mecanismos de ação, sendo mais ou menos indicados para combater determinado patógeno, de acordo com as necessidades e particularidades de cada organismo (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011).

As fluoroquinolonas são a segunda geração de quinolonas, desenvolvidas a partir da descoberta do ácido nalidíxico (TABELA 1). Substituições em posições-chaves de sua estrutura química principal viabilizaram a ampliação do espectro de ação e da ação biológica da nova classe de moléculas. O nome fluoroquinolonas, inclusive, veio a partir da inserção de um átomo flúor na posição 6, modificação que expandiu a eficácia do grupo contra algumas bactérias Gram-positivas, além das Gram-negativas já combatidas pela substância original (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011). Esses antimicrobianos agem formando complexos com o sítio de ação das topoisomerasas II e IV, enzimas com papel fundamental sobre a helicoidização da fita de DNA e interligação dos cromossomos bacterianos. O mal

funcionamento das topoisomerasas impede a replicação e transcrição do DNA das bactérias, levando-as rapidamente à morte (BLONDEAU, 2004).

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS QUINOLONAS DE 1ª E 2ª GERAÇÃO

Componente	Estrutura química a	M.M a	pKa ₁ b,c	pKa ₂ b	log K _{ow} d	K _{oc} e	S. f, g, h	P.V a
Ácido nalidíxico		232,23	6,00	-	1,18	-	0,850	-
Enrofloxacin		359,40	5,70	7,97	4,70	186.340	0,634	2,0.10 ⁻¹³
Ciprofloxacino		331,34	6,08	8,41	1,03	61.000	0,138	2,85.10 ⁻¹³

M.M = massa molar (g.mol⁻¹);

pKa = constante de dissociação ácida;

log K_{ow} = coeficiente de partição octanol-água em pH 7,0;

K_{oc} = coeficiente de distribuição normalizado pelo carbono orgânico (L.kg⁻¹);

S = solubilidade em etanol a 303,15 K (mg.ml⁻¹);

P.V = pressão de vapor (mm Hg)

FONTE: ^a National Center For Biotechnology Information (2004a, 2004b, 2004c), ^b Zrnčic; Babic; Pavlovic (2015), ^c Lin et al. (2004), ^d Lewis et al. (2016), ^e Thiele-Bruhn (2003), ^f Jouyban (2007), ^g Liu et al. (2014), ^h Varanda et al. (2006)

O enrofloxacin (TABELA 1) foi a primeira fluoroquinolona aprovada para o uso veterinário (GIGUÈRE; DOWLING, 2013). Esse antibacteriano possui um amplo espectro de ação e é indicado para diversas espécies animais, sendo um dos principais aliados no combate a doenças respiratórias, além de atuar sobre infecções digestivas, urinárias, mamárias e dermatológicas (TROUCHON; LEFEBVRE, 2016). Após sua administração, grande parte do enrofloxacin é metabolizado a ciprofloxacino (TABELA 1), molécula igualmente relevante, também com ação antimicrobiana e de caráter ainda mais potente, direcionada principalmente a medicina humana (ROY et al., 2019).

Em função de suas propriedades farmacocinéticas¹, esses antimicrobianos podem persistir em tecidos e produtos destinados ao consumo. Com isso, é possível que, através dos alimentos, a população seja continuamente exposta a subdoses de

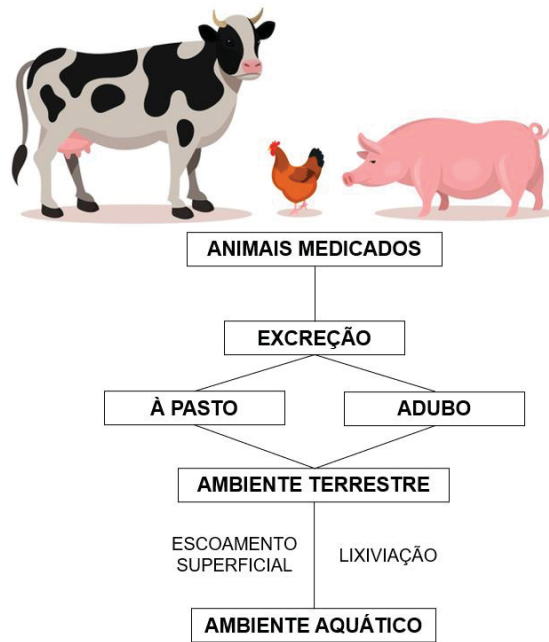
¹ Características que influenciam nos processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção do medicamento.

medicamentos, implicando em efeitos adversos à saúde humana, como intoxicações agudas ou crônicas, reações alérgicas, distúrbios gastrointestinais e resistência bacteriana (POŹNIAK et al., 2020). A fim de minimizar esses malefícios, entidades reguladoras de todo o mundo vêm limitando a presença desses químicos em carnes, pescados, leite, ovos e mel (EUROPEAN MEDICINE AGENCY, 2009). No Brasil, essa responsabilidade é da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabeleceu através da Instrução Normativa Nº 51 de 2019, parâmetros de Limite Máximo de Resíduo (LMR), Ingestão Diária Aceitável (IDA) e Dose de Referência Aguda (DrfA) para insumos farmacêuticos ativos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019).

2.3 FÁRMACOS NO AMBIENTE

Parte dos fármacos fornecidos é eliminada nas excretas em sua forma íntegra ou parcialmente metabolizada (SPIELMEYER, 2018; TASHO; CHO, 2016). Assim, a presença dessas moléculas no meio ambiente representa uma via de exposição indireta aos antimicrobianos, que pode causar tantos prejuízos quanto a exposição direta mencionada anteriormente (CARVALHO; SANTOS, 2016; JECHALKE et al., 2014; PEREIRA et al., 2012). As possíveis rotas de contaminação estão ilustradas na FIGURA 1. A eliminação de fezes e urina durante o pastejo, bem como a aplicação dos dejetos nos campos agrícolas na forma de adubo, são as principais portas de entrada para os fármacos veterinários no ambiente (THIELE-BRUHN, 2003). Uma vez no solo, processos de escoamento superficial ou de lixiviação podem favorecer o deslocamento desses medicamentos para os mananciais, comprometendo o ecossistema aquático (JAFFRÉZIC et al., 2017).

FIGURA 1 – ROTAS DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR FÁRMACOS VETERINÁRIOS



FONTE: Adaptado de Tasho e Cho (2016)

Características como o pH e a composição mineralógica irão interferir no comportamento desses contaminantes no substrato (REGITANO; LEAL, 2010). Para o enrofloxacino, pH entre 3,5 e 6,5 favoreceram sua sorção à esmectita, de acordo com Yan, Hu e Jing (2012). De forma geral, minerais do tipo 2:1 tem maior potencial de sorção de antimicrobianos do que aqueles 1:1 e 0:1² (THIELE-BRUHN, 2003). Além disso, propriedades físico-químicas das moléculas também influenciarão diretamente em aspectos como a mobilidade e a persistência (TEIXIDÓ et al., 2014), por exemplo. Entre as fluoroquinolonas, tanto o coeficiente de distribuição (Kd), quanto a persistência tendem a ser altos. Leal et al. (2012), estudando a sorção de fluoroquinolonas a um latossolo, encontraram um Kd maior que 40.000 L.kg⁻¹, enquanto Alberio et al. (2018) relataram um período de persistência maior que 90 dias para a referida classe farmacológica, atributos que propiciam o acúmulo desses medicamentos nas matrizes ambientais (LUKASZEVICZ et al., 2016). No entanto, isso não impede que as moléculas atinjam os cursos d'água, visto que concentrações de

² Os argilominerais do solo são, em sua maioria, formados pela superposição de lâminas de tetraedros de silício e octaedros de alumínio, sendo que proporções 2:1 (tetraedros de silício:octaedros de alumínio) oferecem uma maior capacidade de troca de cátions (CTC).

até 6,5 mg.L⁻¹ foram detectadas em lagos na Índia, criando um meio potencialmente tóxico a algas, macrófitas e peixes (KOVALAKOVA et al., 2020).

2.4 ANTIMICROBIANOS E OS ORGANISMOS NÃO-ALVO

2.4.1 Microrganismos do solo

Fungos e bactérias do solo são organismos não-alvo que podem ser prejudicados pelos fármacos veterinários, uma vez que estes foram desenvolvidos justamente para inibir a atividade e o crescimento microbiano (GIRARDI et al., 2011). A contaminação do solo por medicamentos, mesmo em concentrações subletais, pode afetar o metabolismo e a atividade das enzimas microbianas, além de reduzir a biomassa e a biodiversidade das comunidades, interferindo nas funções ecológicas essenciais promovidas por esses seres (CYCOÑ; MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2019), dentre elas a manutenção da fertilidade, o sequestro de carbono e o andamento dos ciclos biogeoquímicos, acometendo de forma direta ou indireta plantas e animais (FIERER, 2017).

O nitrogênio (N), por exemplo, é um dos principais nutrientes requeridos pelos seres vivos. Este elemento encontra-se amplamente distribuído na atmosfera na forma de N₂, inacessível à maioria dos organismos em função da tripla ligação existente entre seus átomos. Para se tornar assimilável, é necessário que o N seja convertido a formas mais reativas, como a amônia (NH₃) e o nitrato (NO₃⁻). Essas transformações são naturalmente mediadas por microrganismos, que participam das etapas de assimilação, amonificação, nitrificação/desnitrificação, oxidação anaeróbica do amônio e fixação biológica (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma das maiores fontes de N para o ecossistema terrestre, sendo que os sistemas agrícolas contribuem, em termos globais, com a introdução de 50 a 70 Tg de N por ano (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008). Através da simbiose com bactérias diazotróficas, plantas da família Fabaceae são capazes de completar seu ciclo de vida sem a adição de fertilizantes nitrogenados de origem mineral. Isso ocorre porque os microrganismos, principalmente do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, contêm a enzima nitrogenase, que reduz o N atmosférico a NH₃, sendo uma fonte natural e sustentável de nitrogênio durante todo o desenvolvimento das culturas (SANTACHIARA et al., 2017).

A relação simbiótica mais bem sucedida dentro do meio agrônomo é aquela existente entre a soja e a *Bradyrhizobium japonicum*. Considerada como “a simbiose perfeita”, devido à alta afinidade entre os dois envolvidos, o processo gera importantes ganhos econômicos e ambientais (HUNGRIA; MENDES, 2015). Estima-se que a inoculação representa uma economia de aproximadamente US\$ 15 bilhões e que essa prática impede a descarga de cerca de 45 milhões de toneladas de CO₂ - equivalente na atmosfera, quando comparada à síntese, transporte e aplicação dos adubos nitrogenados minerais (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013).

Fatores como pH, temperatura, nutrição mineral e a presença de contaminantes - como os antimicrobianos - podem reduzir a eficiência da FBN (PETER H. GRAHAM, 1992; REVELLIN et al., 2018). Em condições laboratoriais, já se identificaram alterações na atividade da nitrogenase, bem como efeitos na nodulação e crescimento de nódulos na presença de sulfonamidas e tetraciclinas (SARTORIUS et al., 2009; SUN et al., 2016). No entanto, estudos envolvendo os impactos dos antimicrobianos sobre a FBN ainda são escassos, com resultados muito variáveis a depender da concentração do fármaco, sua forma de aplicação, duração do experimento e metodologia utilizada para quantificação dos compostos (DEVRIES; ZHANG, 2016). Além disso, ainda não existem estudos nesse sentido para a classe das fluoroquinolonas, sendo um importante nicho para a pesquisa.

2.4.2 Plantas

Solubilidade, tempo de meia vida e persistência ambiental elevados favorecem a absorção dos antimicrobianos veterinários pelas plantas (COLON; TOOR, 2016), sendo que a fitotoxicidade varia conforme a molécula e a cultura analisada (CHOWDHURY; LANGENKÄMPER; GROTE, 2016). A concentração do fármaco também é um fator importante, já que as plantas podem apresentar um comportamento bifásico em resposta ao xenobionte, caracterizando *hormesis* (AGATHOKLEOUS; KITAO; CALABRESE, 2018). Por exemplo, 0,01 mg.L⁻¹ de tetraciclina estimulou o crescimento da parte aérea em *Lactuca sativa*, *Daucus carota*, *Cucumis sativus* e *Solanum lycopersicum*, enquanto 1 mg.L⁻¹ inibiu o crescimento dessas hortaliças (PAN; CHU, 2016).

Como efeitos deletérios, relatam-se redução na germinação (ELUK et al., 2016), no crescimento (JIN; CHEN; SUN, 2009), na produtividade dos vegetais

(MARQUES et al., 2021) e danos ao metabolismo primário, especialmente à fotossíntese e à respiração (GOMES et al., 2017a). Além disso, os antimicrobianos podem ser translocados através dos vasos condutores e acumulados nos tecidos comestíveis como folhas e grãos, sendo introduzidos na cadeia trófica (PAN; CHU, 2017). No entanto, ainda não são bem conhecidos os efeitos da exposição contínua à subdoses de medicamentos via plantas, em longo prazo (REGITANO; LEAL, 2010). Sabe-se, porém, que resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal podem desencadear, dentre outros malefícios, aumento da resistência microbiana (OLIVEIRA et al., 2020).

2.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência aos antimicrobianos (AMR – em inglês) é considerada como um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Esse fenômeno aumenta a virulência das estirpes, impedindo o tratamento eficaz de doenças infectocontagiosas. Apenas na União Europeia, a AMR é responsável por aproximadamente 25 mil mortes anuais, com custos de 1,5 bilhões de euros associados ao tratamento das patologias e às perdas de produtividade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Definida como a capacidade dos microrganismos em serem insensíveis à presença de moléculas com atividade bactericida ou bacteriostática, a AMR pode ser intrínseca, quando ocorre naturalmente, ou adquirida, quando é originada por uma mudança no perfil genético do organismo, seja através de mutações no DNA cromossômico ou aquisição de DNA exógeno (REGEA, 2018). A exposição contínua a antimicrobianos gera uma pressão seletiva que favorece os indivíduos resistentes em detrimento dos suscetíveis (FLETCHER, 2015). Logo, a utilização de antimicrobianos veterinários em doses subterapêuticas, assim como o excesso de uso podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de resistência nas floras intestinais dos animais (THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016). Portanto, a aplicação dos dejetos nos campos agrícolas pode disseminar bactérias resistentes ou genes de resistência no ambiente terrestre e aquático (XIE; SHEN; ZHAO, 2018).

Há uma preocupação especial com as moléculas compartilhadas entre a medicina humana e medicina veterinária, pois o risco da transferência de genes de resistência entre espécies distantes é maior, seja por contato direto ou pelo consumo de alimentos (JECHALKE et al., 2014). Pensando nisso, a Organização Mundial da

Saúde desenvolveu um ranking dos antimicrobianos críticos à saúde humana, como uma estratégia de redução dos eventos de resistência advindos do uso de antimicrobianos em animais de produção. Nesse documento, são apresentadas as moléculas com maior potencial para o desenvolvimento de resistência, bem como as melhores técnicas de administração desses medicamentos a fim de minimizar riscos. Dentre elas estão as quinolonas, como o ciprofloxacino, principalmente em função da pequena disponibilidade de terapias para o tratamento de infecções graves por *Salmonella* e *Escherichia coli* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Outras medidas importantes para conter a AMR estão principalmente relacionadas ao controle do uso de antimicrobianos, manejo dos dejetos animais, utilização de produtos alternativos aos antimicrobianos (quando houver), boas práticas na produção animal e medidas regulatórias para definição de limites de antimicrobianos nos fertilizantes orgânicos (KUPPUSAMY et al., 2018). Além disso, estudos na dinâmica desses compostos no ambiente, sua interação com a rizosfera e sua transferência para alimentos de origem vegetal também são necessários (REGITANO; LEAL, 2010).

2.6 REFERÊNCIAS

AGATHOKLEOUS, Evgenios; KITAO, Mitsutoshi; CALABRESE, Edward J. Human and veterinary antibiotics induce hormesis in plants : Scientific and regulatory issues and an environmental perspective. **Environment International**, [s. l.], v. 120, n. May, p. 489–495, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.035>>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa nº51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Brasília, Brasil, 2019. p. 98.

BLONDEAU, Joseph M. Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology**, [s. l.], v. 49, n. 2 SUPPL. 2, p. 1–6, 2004.

BOXALL, Alistair B. A. et al. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 2288–2297, 2006.

BRASIL. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo** Brasília Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, , 2018.

BRASIL. **Agropecuária brasileira em números** Brasília Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, , 2021.

CAMOTTI BASTOS, Marília et al. Antibiotics and microbial resistance in Brazilian soils under manure application. **Land Degradation and Development**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 2472–2484, 2018.

CARVALHO, Isabel T.; SANTOS, Lúcia. Antibiotics in the aquatic environments : A review of the European scenario. **Environment International**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>>

CHOWDHURY, Farzana; LANGENKÄMPER, Georg; GROTE, Manfred. Studies on uptake and distribution of antibiotics in red cabbage. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 61–69, 2016.

CHUNG, Hyung Suk et al. Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 605–606, p. 322–331, 2017.

COLON, B.; TOOR, G. S. A Review of Uptake and Translocation of Pharmaceuticals and Personal Care Products by Food Crops Irrigated with Treated Wastewater. [s. l.], v. 140, 2016.

CYCOŃ, Mariusz; MROZIK, Agnieszka; PIOTROWSKA-SEGET, Zofia. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. MAR, 2019.

DEVRIES, Stephanie L.; ZHANG, Pengfei. Antibiotics and the Terrestrial Nitrogen Cycle: A Review. **Current Pollution Reports**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 51–67, 2016.

ELUK, D. et al. Effect of antibiotics on the germination and root elongation of argentine intensive crops. **International Journal of Environmental Research**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 471–480, 2016.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin **Official Journal of the European Union**, 2009. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf>

FAO. Meat market review. Overview of global meat market developments in 2020. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, [s. l.], n. December, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/ca3880en/ca3880en.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

FIERER, Noah. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 579–590, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>>

FLETCHER, Stephanie. Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. **Environmental Health and Preventive Medicine 2015 20:4**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 243–252, 2015. Disponível em: <<https://environhealthprevmed.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12199-015-0468-0>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

GADDE, U. et al. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. **Animal Health Research Reviews**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 26–45, 2017.

GIGUÈRE, Steeve; DOWLING, Patricia M. Fluoroquinolones. In: **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5th. ed. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2013. p. 704.

GIRARDI, Cristobal et al. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 198, p. 22–30, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.004>>

GOMES, M. P. et al. Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 328, p. 140–149, 2017.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Emerging contaminants in water used for maize irrigation: Economic and food safety losses associated with ciprofloxacin and glyphosate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 196, n. March, p. 110549, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110549>>

HERRIDGE, David F.; PEOPLES, Mark B.; BODDEY, Robert M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 311, n. 1–2, p. 1–18, 2008.

HUNGRIA, M.; MENDES, I.; MERCANTE, F. **A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono para as culturas do feijoeiro e da soja.** Londrina Embrapa Soja, , 2013.

HUNGRIA, Mariangela; MENDES, Iêda Carvalho. **Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis?** [s.l.: s.n.]. v. 2–2

JAFFRÉZIC, A. et al. Veterinary pharmaceutical contamination in mixed land use watersheds: from agricultural headwater to water monitoring watershed. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 609, p. 992–1000, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.206>>

JECHALKE, Sven et al. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 536–545, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>>

JIN, Caixia; CHEN, Æ. Qiuying; SUN, Æ. Ruilian. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium , sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat , Chinese cabbage and tomato. [s. l.], p. 878–885, 2009.

JOUYBAN, A. Prediction of the optimized solvent composition for solubilization of drugs in water-cosolvent mixtures. **Pharmazie**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 190–198, 2007.

KIRCHHELLE, Claas. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). **Palgrave Communications**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1057/s41599-018-0152-2>>

KIRCHHELLE, Claas. **Pyrrhic progress: the history of antibiotics in Anglo-American food production.** New Brunswick.

KOVALAKOVA, Pavla et al. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 251, p. 126351, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>>

KUPPUSAMY, Saranya et al. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, [s. l.], v. 257, n. January, p. 47–59, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.026>>

KUYPERS, Marcel M. M.; MARCHANT, Hannah K.; KARTAL, Boran. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 263–276, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>>

LEWIS, Kathleen A. et al. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 1050–1064, 2016.

LILLENBERG, M. et al. Enrofloxacin and Ciprofloxacin Uptake by Plants from Soil. **Agronomy Research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 807–814, 2010.

- LIN, Ching Erh et al. Electrophoretic behavior and pK a determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1051, n. 1–2, p. 283–290, 2004.
- LIU, Meng-Jiao et al. Measurement and Correlation of the Solubility of Enrofloxacin in Different Solvents from (303.15 to 321.05) K. [s. l.], 2014.
- LUKASZEVICZ, Paulina et al. Impact of Veterinary Pharmaceuticals on the Agricultural Environment: A Re-Inspection. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], p. 60, 2016.
- MARQUES, Raizza Zorman et al. Crop irrigation (soybean, bean, and corn) with enrofloxacin-contaminated water leads to yield reductions and antibiotic accumulation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 216, n. March, p. 112193, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651321003043>>
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 71188, Enrofloxacin**. 2004a. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enrofloxacin>>. Acesso em: 30 jun. 2021.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 2764, Ciprofloxacin**. 2004b. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>>. Acesso em: 30 jun. 2021.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 4421, Nalidixic acid**. 2004c. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nalidixic-acid>>. Acesso em: 30 jun. 2021.
- OBIMAKINDE, Samuel et al. Veterinary pharmaceuticals in aqueous systems and associated effects: an update. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 3274–3297, 2017.
- OLIVEIRA, Naila A. et al. Use of antibiotics in animal production and its impact on human health. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 40–47, 2020.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**Sixty-eight World Health AssemblyGenebra, 2015.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**5th ReviewGenevaWorld Health Organization, , 2017.
- PAN, Min; CHU, L. M. Ecotoxicology and Environmental Safety Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 126, p. 228–237, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.027>>

PAN, Min; CHU, L. M. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 599–600, p. 500–512, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.214>>

PEREIRA, Leandro Alves et al. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. **Química Nova**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 159–169, 2012.

PETER H. GRAHAM. Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 475–484, 1992.

POŻNIAK, Błażej et al. The influence of age and body weight gain on enrofloxacin pharmacokinetics in turkeys—Allometric approach to dose optimization. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 67–78, 2020.

RABELLO, Renata F. et al. Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: An update overview. **Animals**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1–43, 2020.

REGEA, Gemechu. Pharmacology & Clinical Research Review on Antibiotics Resistance and its Economic Impacts. **Researchgate.Net**, [s. l.], n. December, 2018. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/329338054>>

REGITANO, Jussara Borges; LEAL, Rafael Marques Pereira. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 601–616, 2010.

REVELLIN, Cécile et al. Long-term exposure of agricultural soil to veterinary antibiotics changes the population structure of symbiotic nitrogen-fixing rhizobacteria occupying nodules of soybeans (*Glycine max*). **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 84, n. 9, p. 1–11, 2018.

ROCHA, Daiane Cristina et al. Veterinary antibiotics and plant physiology: An overview. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 767, 2021.

ROY, D. C. et al. Ciprofloxacin Residue in Marketed Pork of North-East India. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2019.

SANTACHIARA, Gabriel et al. Relative importance of biological nitrogen fixation and mineral uptake in high yielding soybean cultivars. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 418, n. 1–2, p. 191–203, 2017.

SARTORIUS, Marilena et al. Sulphadimethoxine inhibits *Phaseolus vulgaris* root growth and development of N-fixing nodules. **Chemosphere**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 306–312, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.067>>

SINDAN. **Anuário da Indústria de Produtos para Saúde Animal**. São Paulo.

SNEERINGER, Stacy; BOWMAN, Maria; CLANCY, Matthew. The U.S. and EU Animal Pharmaceutical Industries in the Age of Antibiotic Resistance. [s. l.], n. ERR-264, p. 76 pp, 2019.

SPIELMEYER, Astrid. Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments : A short review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 9, n. June, p. 76–86, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.06.004>>

SPINOSA, Helenice de Souza; GÓRNIK, Silvana Lima; BERNARDI, Maria Martha. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 5ª Edição ed. [s.l: s.n.].

SUN, Jiajun et al. Effects of oxytetracycline on the abundance and community structure of nitrogen-fixing bacteria during cattle manure composting. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 216, p. 801–807, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.060>>

TASHO, Reep Pandi; CHO, Jae Yong. Science of the Total Environment Veterinary antibiotics in animal waste , its distribution in soil and uptake by plants : A review. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 563–564, n. 3, p. 366–376, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140>>

TEIXIDÓ, Marc et al. Sorption of enrofloxacin and ciprofloxacin in agricultural soils: Effect of organic matter. **Adsorption Science and Technology**, [s. l.], v. 32, n. 2–3, p. 153–163, 2014.

THANNER, Sophie; DRISSNER, David; WALSH, Fiona. Antimicrobial resistance in agriculture. **mBio**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2016.

THIELE-BRUHN, Sören. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 145–167, 2003.

TROUCHON, Tessa et al. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use To cite this version : HAL Id : hal-01503397 A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. [s. l.], v. 6, n. 2, p. 40–58, 2017.

TROUCHON, Tessa; LEFEBVRE, Sebastien. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. **Open Journal of Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 40–58, 2016.

VAN BOECKEL, Thomas P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. [s. l.], n. 16, p. 1–6, 2015.

VARANDA, Fátima et al. Solubility of antibiotics in different solvents. 1. Hydrochloride forms of tetracycline, moxifloxacin, and ciprofloxacin. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 45, n. 18, p. 6368–6374, 2006.

XIE, W. Y.; SHEN, Q.; ZHAO, F. J. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. **European Journal of Soil Science**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 181–195, 2018.

YAN, Wei; HU, Shan; JING, Chuanyong. Enrofloxacin sorption on smectite clays: Effects of pH, cations, and humic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 372, n. 1, p. 141–147, 2012.

ZHANG, Haibo et al. Chemosphere Residues and risks of veterinary antibiotics in protected vegetable soils following application of different manures. **Chemosphere**,

[s. l.], v. 152, p. 229–237, 2016. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.111>>

ZRNČIĆ, Mirta; BABIĆ, Sandra; PAVLOVIĆ, Dragana M. Determination of thermodynamic pKa values of pharmaceuticals from five different groups using capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 1232–1239, 2015.

3 CAPÍTULO I: EFEITOS DA IRRIGAÇÃO COM ÁGUA CONTAMINADA POR ENROFLOXACINO NA CULTURA DA SOJA

Texto retirado do artigo de Marques et al., (2021) intitulado “Crop irrigation (soybean, bean, and corn) with enrofloxacin-contaminated water leads to yield reductions and antibiotic accumulation” publicado na revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 216, p. 112193, mar. 2021. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112193

3.1 RESUMO

O uso crescente de antimicrobianos na produção animal é um problema ambiental emergente. Grande parte das doses dos fármacos administrados é eliminada nas excretas dos animais, que podem contaminar os cursos d'água que serão direcionados à irrigação de culturas agrícolas e comprometer a produção e/ou a segurança de alimentos. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da irrigação da cultura da soja com água artificialmente contaminada por enrofloxacino ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$), determinando-se a produção de grãos e o acúmulo do antimicrobiano nos diferentes órgãos da planta. A produção de grãos foi definida com base na massa seca (MS) de grãos por planta, enquanto as concentrações de enrofloxacino e ciprofloxacino (seu metabólito de degradação) nos tecidos vegetais foram quantificadas por cromatografia líquida após a colheita. O tratamento com enrofloxacino ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) reduziu significativamente a produção de grãos em plantas de soja. Tanto enrofloxacino [$78,15 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MS} - 26,17 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ MS}$] quanto ciprofloxacino [$8,23 - 23,04 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MS}$] foram detectados em todos os tecidos vegetais avaliados (raízes, folhas e grãos), sendo que as maiores concentrações de enrofloxacino e ciprofloxacino foram observadas nas raízes, seguidas pelas folhas e grãos. A presença de enrofloxacino na água utilizada para irrigar a soja pode resultar em perdas de produção, bem como implicar no acúmulo de antimicrobianos em folhas e grãos comumente destinados às dietas de humanos e animais, podendo assim interferir na segurança de alimentos.

Palavras-chave: Agricultura. Irrigação. Segurança de alimentos. Contaminação da água.

3.2 ABSTRACT

The increasing use of antibiotics in animal production has become an emergent environmental problem. The large percentages of applied antibiotic doses eliminated in animal excrement often end up contaminating water resources, which are then used for irrigation – compromising agricultural production and/or food security. Here, we evaluated the effects of crop irrigation with water artificially contaminated by enrofloxacin ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) and its accumulation in soybean tissues. Grain production was evaluated on the basis of grain dry weight plant^{-1} , while enrofloxacin and ciprofloxacin (its breakdown metabolite) concentrations in plant tissues were evaluated by HPLC after harvesting. Diminished production was observed in soybean plants irrigated with antibiotic-contaminated water. Enrofloxacin [78 ng.g DW^{-1} to $26.17 \mu\text{g.g DW}^{-1}$] and ciprofloxacin [$8.23 \text{ ng.g DW}^{-1}$ to $23.04 \text{ ng.g DW}^{-1}$] were found in all of the plant tissues (roots, leaves and grains). The highest enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations were observed in roots, followed by the leaves and seeds. The presence of enrofloxacin in the water used for irrigating soybeans can result in productivity losses and, as that antibiotic was encountered in plant tissues (leaves and seeds) that are consumed in the diets of both humans and animals, it can interfere with food security.

Keywords: Crop production. Irrigation. Food safety. Water contamination.

3.3 INTRODUÇÃO

Para garantir a competitividade do setor agropecuário frente ao mercado, são realizados amplos investimentos em insumos, buscando maximizar o desempenho da produção animal e vegetal. Contudo, algumas das técnicas utilizadas para viabilizar esses ganhos de produção geram impactos negativos na conservação e qualidade do solo, da água e, também, sobre a segurança de alimentos. Em relação à produção animal, o uso de antimicrobianos é uma prática habitual, que visa promover o crescimento, bem como prevenir e tratar doenças (TASHO; CHO, 2016).

Entre as classes de antimicrobianos mais relevantes para pecuária, encontra-se as fluoroquinolonas. Esse grupo tem seu modo de ação baseado na interação (através da formação de complexos) com a topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV, enzimas essenciais à multiplicação bacteriana, com funções na replicação do DNA e interligação cromossômica, respectivamente (HOOPER; JACOBY, 2016). Um importante representante dessa classe no âmbito veterinário é o enrofloxacino (Enro), molécula de amplo espectro de ação, indicada principalmente para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias Gram-negativas (embora também atue sobre alguns microrganismos Gram-positivos) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011). Porém, após sua administração, o antimicrobiano não é completamente assimilado pelo organismo animal, sendo então eliminado nas excretas em sua forma original ou parcialmente metabolizada. Assim, os dejetos animais contendo ativos farmacêuticos são, potencialmente, uma fonte de contaminação do solo, especialmente no meio rural, considerando a aplicabilidade do esterco como fertilizante em campos agrícolas (WEI et al., 2018).

No solo, os tempos de meia-vida das fluoroquinolonas podem ser muito longos, com 70% dos resíduos de Enro sendo detectados após 90 dias (ALBERO et al., 2018). Além disso, por meio de processos de biotransformação, o Enro pode ser degradado a ciprofloxacino (Cipro), outro importante antimicrobiano, que possui uma meia-vida no solo ainda maior, de até 3.466 dias, prolongando a persistência dessas moléculas no substrato (WALTERS; MCCLELLAN; HALDEN, 2010). O escoamento superficial e da lixiviação aumentam a possibilidade de que esses fármacos sejam encontrados em outras matrizes ambientais, principalmente em águas superficiais e/ou subterrâneas (CAMPAGNOLO et al., 2002; YANG; CARLSON, 2003). A aplicação direta de medicamentos na aquicultura e o descarte pontual de esgoto

também podem contribuir à contaminação dos mananciais por antimicrobianos (TROUGHON; LEFEBVRE, 2016), tendo em vista a ineficiência das estações de tratamento para remoção de resíduos desses químicos (AL-GHEETHI et al., 2015). As fluoroquinolonas são persistentes em sistemas aquáticos, com meia-vida de Enro e Cipro superior a 100 dias (KÜMMERER, 2009). Dessa forma, através do solo ou da água de irrigação, as plantas serão direta ou indiretamente expostas a esses insumos farmacêuticos (PAN; CHU, 2016).

As plantas são capazes de absorver antimicrobianos na solução do solo por meio de suas raízes e aloca-los em partes comestíveis (JAYAMPATHI; ATUGODA; JAYASINGHE, 2019), causando a inserção desses químicos na cadeia trófica, resultando, entre outros efeitos possíveis, na indução de resistência bacteriana e/ou seleção de bactérias resistentes (SOUZA et al., 2010). Outro ponto é que, quando presentes nos tecidos vegetais, esses antimicrobianos podem afetar o metabolismo das plantas, alterando seu crescimento e desenvolvimento (BÁRTÍKOVÁ; PODLIPNÁ; SKÁLOVÁ, 2016; ROCHA et al., 2021). Pesquisas já relataram os efeitos deletérios dos antimicrobianos na fotossíntese (GOMES et al., 2017a, 2020b; NUNES et al., 2019; OPRIS et al., 2013; YAN et al., 2019), na respiração (GOMES et al., 2020b; MOULLAN et al., 2015) e na assimilação de nitrogênio (GOMES et al., 2017c), bem como destacaram seu papel na indução de estresse oxidativo (GOMES et al., 2019, 2020b). No entanto, as implicações dos fármacos na produção de grãos entre as espécies de interesse agrícola ainda não são totalmente compreendidas. Ademais, os estudos de ecotoxicologia de antimicrobianos geralmente se concentram nas moléculas originais e não levam em consideração as ameaças de seus metabólitos de degradação - que muitas vezes podem ser ainda mais tóxicos e mais estáveis no meio ambiente (CARVALHO; SANTOS, 2016). Por exemplo, concentrações de Enro até 100 µg.L⁻¹ não demonstram toxicidade para algumas olerícolas (*Cucumis sativus*, *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus*) (MIGLIORE; COZZOLINO; FIORI, 2003), enquanto Cipro em concentrações tão baixas quanto 1,4 µg.L⁻¹ impacta negativamente plantas de milho (GOMES et al., 2020a). Como as plantas podem metabolizar Enro a Cipro (GOMES et al., 2019), a presença do antimicrobiano no meio ambiente, inclusive na água usada para irrigação, apresenta um elevado risco econômico e ambiental (GOMES et al., 2020a).

Embora alguns autores tenham investigado os efeitos e acúmulo do Enro por plantas cultivadas (*Cucumis sativus*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Raphanus*

sativus) (BOXALL, 2012; CHUNG et al., 2017; LILLENBERG et al., 2010; MIGLIORE; COZZOLINO; FIORI, 2003), estudos acerca dos efeitos desse antibacteriano na soja (*Glycine max*) tanto sobre a produção de grãos, quanto sobre o acúmulo em tecidos vegetais consumidos por humanos e animais, parecem ser inéditos. A cultura da soja é muito importante em todo o mundo como fonte significativa de nutrientes, especialmente no que se refere a seu perfil proteico e lipídico (LANGNER et al., 2019; SUDARIĆ, 2019). Além disso, essa leguminosa é cultivada em mais de 60 países, tendo posição de destaque na economia daqueles de base agrícola, onde a produção de grãos, óleo e farelo representa grande parte de suas receitas (SUDARIĆ, 2019). Portanto, perdas de produção associadas aos distúrbios fisiológicos provocados pela presença do antimicrobiano, bem como a presença de contaminantes nos grãos são questões importantes.

Nesse contexto, investigou-se a produção de grãos e o acúmulo de antimicrobianos (Enro e Cipro) em plantas de soja irrigadas com água contaminada com Enro. Além de averiguar possíveis perdas econômicas devido à interferência desse antimicrobiano na produção agrícola, buscou-se conscientizar sobre a introdução de antimicrobianos na cadeia alimentar e suas consequências negativas para o meio ambiente e a saúde pública.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Condições experimentais

O experimento foi conduzido de outubro de 2018 a fevereiro de 2019 em casa de vegetação no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil (25°24'38" S; 49°14'57" O; 920 m de altitude). O regime de temperatura durante o período do ensaio esteve entre 15 e 31°C e a luminosidade média foi de 825 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As sementes de soja (*Glycine max* cultivar KWS M6210) foram fornecidas pela EMBRAPA Milho e Sorgo (Sete Lagoas, Minas Gerais). Para o experimento, estas sementes foram desinfetadas numa solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 5 minutos, enxaguadas com água destilada e posteriormente semeadas em vasos de 5 litros contendo um substrato de areia e vermiculita na proporção 2:1. Este substrato foi escolhido devido a sua baixa capacidade de retenção de contaminantes, permitindo

a avaliação de um cenário de total disponibilidade do antimicrobiano adicionado via irrigação. Cada vaso recebeu 4 sementes.

Durante as duas primeiras semanas, as plantas foram irrigadas com 300 ml de água destilada. Quinze dias após a emergência efetuou-se o raleio, mantendo-se apenas a maior planta de cada vaso.

Uma solução estoque de Enro ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi preparada em água ultrapura utilizando enrofloxacino grau analítico (Ventranal, Sigma-Aldrich, Canadá) e esta serviu de base para a solução de concentração desejada no ensaio. As plantas foram expostas a uma concentração de 0 (controle) e $10 \mu\text{g Enro L}^{-1}$, com base na ocorrência típica desse fármaco em águas superficiais (KÜMMERER, 2009). A irrigação foi realizada duas vezes por semana com 300 ml de água destilada ou solução fresca de $10 \mu\text{g Enro L}^{-1}$, mantendo o substrato a 70% de sua capacidade de campo. Para garantir que não houvesse qualquer tipo de contaminação da parte aérea pelo antimicrobiano, a irrigação foi efetuada utilizando uma proveta direcionada ao nível do solo.

A nutrição das plantas ficou a cargo da aplicação semanal de 300 ml de solução nutritiva de Hoagland e Arnon, de composição descrita na TABELA 2 (HOAGLAND, D. R. ; ARNON, 1950). A força da solução foi reduzida a $\frac{1}{4}$ e a $\frac{1}{2}$ na primeira e segunda semana de implantação, respectivamente, a fim de evitar estresse salino nos estágios iniciais de desenvolvimento da cultura.

O tratamento e a nutrição ocorreram de maneira alternada, uma vez a cada três dias, mantendo o substrato a 70% de sua capacidade de campo durante toda a semana.

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO DOS MACRO E MICRONUTRIENTES PRESENTES NA SOLUÇÃO DE HOAGLAND & ARNON (1950)

Macronutrientes (mmol.L^{-1})							Micronutrientes ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)					
N-NO ₃	N-NH ₄	P	K	Ca	Mg ²⁺	SO ₄ ²⁻	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
14	1	1	5,98	4	1,98	2	46,3	0,31	17,92	9,11	0,1	0,76

FONTE: Hoagland e Arnon (1950)

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 10 repetições, em um total de 20 vasos distribuídos num delineamento inteiramente casualizado. Em paralelo, 5 vasos contendo apenas substrato, foram

submetidos ao mesmo regime de irrigação, com a finalidade de determinar a degradação do antimicrobiano via fotólise e hidrólise.

3.4.2 Produção de grãos

Com o enchimento completo das vagens (estádio R6 - maturidade fisiológica), todas as plantas de cada tratamento foram colhidas e fracionadas em raízes, folhas, vagens e grãos. Após isso, o material vegetal foi repetidamente lavado em água destilada e os grãos foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 45 °C. A variável produção de grãos correspondeu à massa seca de grãos por planta, sendo expressa em g de massa seca (MS) planta⁻¹.

3.4.3 Avaliações químicas

As concentrações de Enro e Cipro tanto no substrato, quanto nas plantas foram determinadas por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Para o substrato, essa técnica permitiu mensurar a degradação do Enro sob as condições ambientais da casa de vegetação. Nos vasos sem plantas, as coletas foram realizadas imediatamente após a primeira aplicação do tratamento, ao longo de 84 horas após a primeira aplicação do tratamento (tempo correspondente à nova aplicação de Enro) e no momento da colheita. Esta última ocorreu simultaneamente a coleta nos vasos que continham plantas. Três amostras simples de substrato foram retiradas de cada vaso a profundidades correspondentes à rizosfera (> 5 cm). Posteriormente, estas três amostras foram misturadas e homogeneizadas, formando uma única amostra composta por vaso. Desta amostra composta, 6 g foram utilizados para os procedimentos de extração, segundo metodologia de Janusch et al. (2014). Inicialmente, as amostras foram secas em SpeedVac (RC1010, Thermo) e sonicadas por 5 minutos. Depois, adicionou-se 3 ml de tampão fosfato de sódio (pH 7.0), mais 6 ml de clorofórmio e agitou-se por 30 minutos. A fração com o clorofórmio foi então coletada e novamente seca em SpeedVac.

Para as plantas, a extração dos antimicrobianos ocorreu conforme Migliore, Cozzolino e Fiori (2003), adicionando metanol/ácido cítrico (0.2 m, 50:50, pH 4.5) a 100 mg (massa seca) de material vegetal. Após a extração, as amostras também foram secas em SpeedVac.

A fim de determinar as taxas de recuperação, amostras de substrato e planta que não receberam o antimicrobiano foram contaminadas com concentrações conhecidas de Enro e Cipro e submetidas às mesmas técnicas de extração e quantificação.

Os resíduos das plantas e do substrato foram ressuspensos em fase móvel (trietilamina 0,4% pH 3,0, acetonitrila e metanol – 75:10:10 v/v/v). Após filtração, 10 µl foram injetados em HPLC (Waters 2695 HPLC) acoplado a um detector de fluorescência (FD Waters multi fluorescence detector 2475). Uma coluna Supelco Analytical C18 (250 mm × 4.6 mm × 5 µm) foi utilizada para separação cromatográfica.

As condições cromatográficas foram adaptadas de García Ovando et al. (2004). A temperatura da coluna foi definida em 35 °C ± 1 °C. Os parâmetros de comprimento de onda para o detector de fluorescência foram de 278 e 453 nm para excitação e emissão. Os solventes usados como fase móvel à taxa de 1 ml.min⁻¹ foram: trietilamina 0.4% (v/v), pH 3, como fase móvel A; metanol como fase móvel B; e acetonitrila como fase móvel C.

Soluções padrão de enrofloxacino e ciprofloxacino (United States Pharmacopeia, Rockville, MD, USA) foram usadas para as curvas de calibração, com pureza e validade comprovadas. As curvas contendo seis pontos apresentaram boa linearidade ($r^2 = 0,99$; $P < 0,0001$) no intervalo esperado para as concentrações das amostras. Cada ciclo de amostras contou com três brancos, três padrões e três amostras fortificadas. Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) foram respectivamente de 0,2 e 0,6 ng.L⁻¹ para Enro e 5 e 10 ng.L⁻¹ para Cipro (GARCÍA OVANDO et al., 2004). As taxas de recuperação foram maiores que 85% para ambos antimicrobianos.

3.4.4 Análises estatísticas

As análises foram realizadas através do software JMP 13.0 (SAS Institute Inc.). Os dados foram testados para normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Bartlett) e então estatisticamente avaliados. Os dados de produção de grãos foram avaliados utilizando o teste-*t* de Student. Já, os dados de concentração de antimicrobianos em diferentes tecidos da planta foram submetidos a uma two-way ANOVA, com interações entre tratamento (0 e 10 µg Enro L⁻¹) e órgão da planta (raízes, folhas e grãos) incluídos no modelo. Quando diferenças foram detectadas

pela ANOVA, as médias foram comparadas através do teste de Tukey a 5% de significância.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Produção de grãos

A irrigação com água contaminada por enrofloxacino ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) afetou significativamente a produção de grãos ($p < 0.05$) (TABELA 3; FIGURA 2).

TABELA 3 – PRODUÇÃO DE GRÃOS EM PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) OU NÃO ($0 \mu\text{g.L}^{-1}$) A IRRIGAÇÃO COM ÁGUA CONTAMINADA POR ENROFLOXACINO

Enrofloxacino	Produção de grãos (g MS planta ⁻¹)
0	4,48 ± 0,84 a
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	2,13 ± 0,66 b
Teste F	25,00

Valores representam a média ± DP de dez repetições.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

FONTE: Adaptado de Marques et al. (2021)

FIGURA 2 – GRÃOS DE SOJA COLHIDOS NO TRATAMENTO 0 (A) e $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (B) DE ENROFLOXACINO



FONTE: A autora (2019)

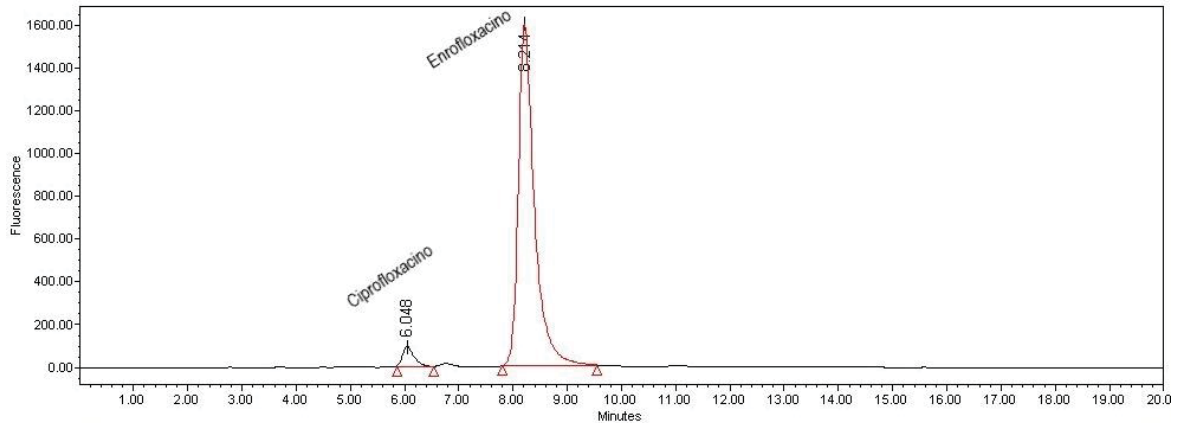
A redução na produção de grãos pode estar associada aos efeitos deletérios do antimicrobiano na fisiologia de plantas de soja. Embora não tenham sido observados efeitos deletérios no metabolismo fotossintético de plantas de *Lemna minor* expostas a Enro em concentrações de $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (GOMES et al., 2020b), avaliações acerca dos efeitos de nove antimicrobianos (amoxicilina, ampicilina, benzilpenicilina, ceftazidima, ceftriaxona, tetraciclina, doxiciclina, ciprofloxacino e eritromicina; $0,5$ e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$) em plantas de trigo evidenciaram reduções na fotossíntese líquida (associada à uma menor condução estomática) e nas concentrações de pigmentos fotossintetizantes (OPRIS et al., 2013). Da mesma forma, Gomes et al. (2020a) relataram que plantas de milho submetidas a tratamentos com Cipro ($2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$) demonstraram menores taxas fotossintéticas totais, bem como menor carboxilação da Rubisco e eficiência de uso de água. O Cipro também induziu estresse oxidativo e modificações morfológicas nessas plantas, incluindo diminuição na altura e no calibre dos feixes vasculares da folha, reduzindo o transporte de fotoassimilados - com conseqüente redução da produção de grãos (GOMES et al., 2020a).

Os efeitos de Enro e Cipro no metabolismo primário de plantas foram revisados por Rocha et al. (2021). A diminuição da fotossíntese, respiração e assimilação de nitrogênio, bem como aumento do estresse oxidativo, foram descritos em plantas expostas a esses antimicrobianos (ROCHA et al., 2021). Os efeitos negativos dos antimicrobianos no metabolismo energético (fotossíntese e respiração) e na nutrição mineral das plantas podem contribuir para a redução da produção de grãos. Taxas de fotossíntese e respiração mais baixas, bem como a assimilação de N, podem restringir a disponibilidade de esqueletos de carbono e aminoácidos necessários para a formação e desenvolvimento de grãos. Os resultados desse estudo evidenciam a importância de investigar as respostas fisiológicas de diferentes espécies de plantas de interesse agrícola à irrigação com água contaminada por antimicrobianos.

3.5.2 Quantificação de químicos

Os cromatogramas obtidos através da HPLC evidenciaram a presença tanto de Enro quanto de Cipro, seu principal metabólito, nas amostras do substrato e dos tecidos vegetais. Um exemplo pode ser visualizado na FIGURA 3.

FIGURA 3 – EXEMPLO DE CROMATOGRAMA

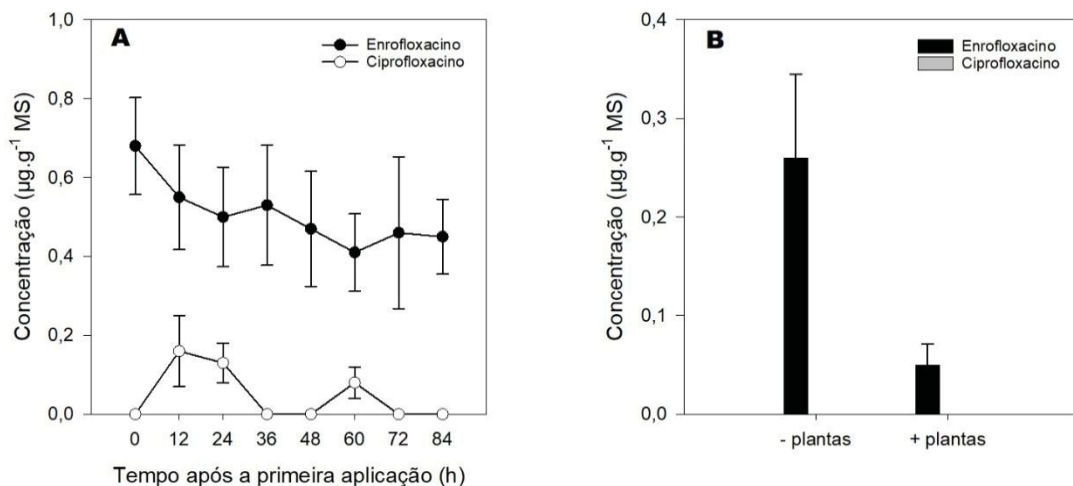


FONTE: A autora (2019)

A inexistente detecção de antimicrobianos nos substratos dos vasos ou nas plantas que não receberam o tratamento com Enro (dados não mostrados) confirma que não houve qualquer contaminação externa.

Os resultados acerca do comportamento do Enro no substrato em condições ambientais da casa de vegetação podem ser visualizados na FIGURA 4.

FIGURA 4 – VARIAÇÃO TEMPORAL DAS CONCENTRAÇÕES DE ENRO E CIPRO NO SUBSTRATO DE VASOS SEM PLANTAS (A) E AS CONCENTRAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS NA COLHEITA NO SUBSTRATO DE VASOS SEM (- PLANTAS) E COM PLANTAS (+ PLANTAS) (B) EXPOSTOS A IRRIGAÇÃO COM ÁGUA CONTAMINADA POR ENRO ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)



FONTE: Adaptado de Marques et al. (2021)

LEGENDA: Valores representam a média \pm DP de cinco repetições.

A luz é o principal fator abiótico que leva à degradação do Enro no solo e na água (SCISCENKO et al., 2020; STURINI et al., 2010, 2012). A fotodegradação causa

a oxidação da cadeia lateral de piperazina da molécula de Enro após aproximadamente 50 horas de irradiação, resultando na formação de um subproduto (que não Cipro), e degradação de até 80% da concentração inicial de Enro (STURINI et al., 2012). No entanto, a fotólise é limitada à camada superior da matriz sólida (7–8 mm), pois a disponibilidade de luz diminui consideravelmente nas camadas mais profundas. Conseqüentemente, a ação da fotólise sobre o Enro também é reduzida (STURINI et al., 2012). Conforme mostrado na FIGURA 4A, apenas 33% do Enro foi degradado no substrato de vasos sem plantas até 5 cm de profundidade após 84 h de irradiação. Portanto, é possível que a menor disponibilidade de luz na profundidade de enraizamento limite a fotodegradação de Enro.

No meio ambiente, o Enro também pode ser degradado por microrganismos, a exemplo dos fungos - com destaque às espécies ligninolíticas - que são os principais agentes bióticos que modificam e degradam fluoroquinolonas, devido à não especificidade de suas enzimas (RUSCH et al., 2019). De fato, a presença de Cipro no substrato de vasos sem plantas (FIGURA 4A) reforça essa afirmação, pois a degradação de Enro a Cipro é limitada a processos de biotransformação (TROUCHON; LEFEBVRE, 2016). Portanto, presume-se que, sem qualquer esterilização do substrato, os fungos presentes degradarão Enro a Cipro. A ausência de Cipro em vasos sem plantas na colheita (FIGURA 4B), indica que, uma vez formado, o metabólito está sujeito à degradação. No caso de vasos com plantas, a ausência do Cipro no substrato também pode estar relacionada à sua absorção pelas plantas. Paralelamente, a presença de Cipro nos tecidos vegetais pode ser devida ao próprio metabolismo vegetal. A degradação direta de Enro a Cipro por plantas de *E. canadenses* foi relatada por (GOMES et al., 2019). Segundo esses autores, a biotransformação desse antimicrobiano está associada à atividade do citocromo P450, uma vez que o Cipro não foi observado em tecidos vegetais quando esse complexo enzimático foi inibido. Deste modo, tanto a degradação microbiológica, quanto a metabolização de Enro nos tecidos vegetais podem explicar a ocorrência do Cipro nas plantas. Portanto, a capacidade de metabolização do enrofloxacino em plantas de interesse agrícola deve ser melhor investigada.

A TABELA 4 traz os resultados do Teste F da ANOVA de múltiplas vias para a concentração de Enro e Cipro na planta.

TABELA 4 – TESTE F DA ANOVA DE MÚLTIPLAS VIAS PARA OS EFEITOS DE TRATAMENTO (0 E 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) E ÓRGÃOS DA PLANTA DE SOJA (RAÍZES, FOLHAS E GRÃOS)

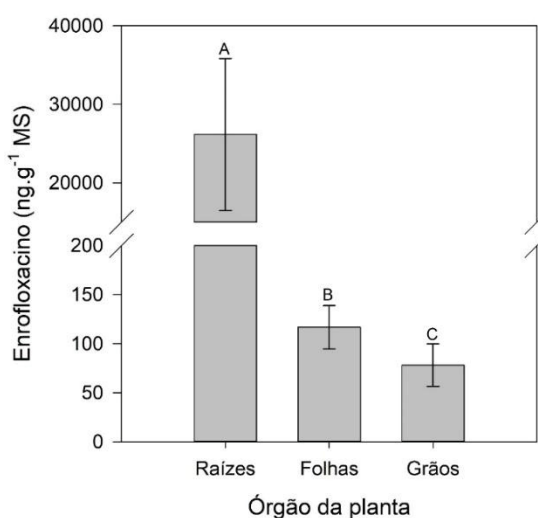
Fonte de variação	G.L	Enrofloxacino	Ciprofloxacino
Tratamento	1	468,75 ***	344,3878 ***
Órgão	2	0,25	1,6531
Tratamento*Órgão	2	65,5278 ***	43,4898 ***

FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: G.L – graus de liberdade; *** - significativa a 0,01%

A concentração de enrofloxacino por órgão da planta pode ser visualizado na FIGURA 5. O maior sítio de acúmulo foi as raízes, seguido por folhas e, por último, os grãos ($p < 0,001$).

FIGURA 5 – CONCENTRAÇÃO DE ENROFLOXACINO POR ÓRGÃO DA PLANTA DE SOJA SUBMETIDA AO TRATAMENTO DE 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DE ENROFLOXACINO



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de cinco repetições.

Letras representam diferenças significativas entre a concentração de fármacos nos diferentes órgãos da planta pelo Teste de Tukey ($P < 0,001$).

A absorção radicular é a principal via de entrada para os antimicrobianos nas plantas e parece depender principalmente da solubilidade, polaridade e grau de hidrofobicidade da molécula (CHEN et al., 2017). A raiz é o principal órgão a acumular esses fármacos (ROCHA et al., 2021). Migliore et al. (2003), por exemplo, relataram que as raízes foram os principais locais de acúmulo de Enro em plantas de feijão e que, ao longo do tempo, o acúmulo desse medicamento resultou em efeitos tóxicos

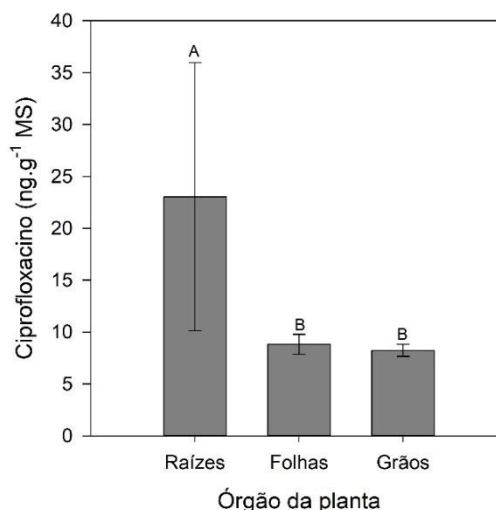
nas folhas. Ao contrário do observado pelos autores, não foram detectados quaisquer sintomas visuais de toxicidade na parte aérea da soja cultivada neste estudo (dados não mostrados). Tal fato pode ser devido às diferenças de concentrações testadas, tendo Migliore et al. (2003) utilizado concentrações de Enro acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ - pelo menos 10 vezes maiores do que as empregadas no presente estudo.

De acordo com Dodgen et al. (2015), após ser absorvido pelas raízes, o antimicrobiano se distribui pelos tecidos da planta, impulsionado, sobretudo, pelas taxas de transpiração. Logo, condições ambientais que afetam a transpiração modulam o acúmulo de antimicrobianos na parte aérea (DODGEN et al., 2015). Características morfofisiológicas das plantas, como a presença e extensão de barreiras apoplásticas, também podem desempenhar papéis na translocação e distribuição de antimicrobianos (ROCHA et al., 2021).

O acúmulo de Enro foi observado por Chowdhury, Langenkämper e Grote (2016) em plantas de repolho fertilizadas com esterco, com concentrações de até $16,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$ nas partes comestíveis. Os efeitos sobre a produção, porém, não foram fornecidos pelos autores. Por outro lado, Jin, Chen e Sun (2009), relataram relações lineares entre a diminuição do crescimento da raiz e da parte aérea e maiores concentrações aplicadas de Enro e mais dois antimicrobianos em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.).

As concentrações de Cipro foram maiores nas raízes do que nas folhas ou grãos (FIGURA 6).

FIGURA 6 – CONCENTRAÇÃO DE CIPROFLOXACINO POR ÓRGÃO DA PLANTA DE SOJA SUBMETIDA AO TRATAMENTO DE $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ DE ENROFLOXACINO



FONTE: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de cinco repetições.

Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre a concentração de fármacos nos diferentes órgãos da planta pelo Teste de Tukey ($P < 0,001$).

A absorção do Cipro pelas plantas foi bem documentada (EGGEN et al., 2011; GOMES et al., 2020a; KIPPER et al., 2010) e sua distribuição entre os diferentes órgãos das plantas variou entre as espécies estudadas, possivelmente devido às diferenças nas taxas de transpiração e nas características morfoanatômicas, bem como em suas capacidades individuais de absorver e metabolizar antimicrobianos. O Cipro foi relatado em maiores concentrações nas raízes do milho (GOMES et al., 2020a) e da cevada (EGGEN et al., 2011), da mesma maneira que foi com a soja nesse estudo.

Os resultados desse trabalho demonstram a presença de Enro e Cipro nos grãos (78,15 ng Enro g^{-1} MS; 8,23 ng Cipro g^{-1} MS) e nas folhas (116,73 ng Enro g^{-1} MS; 8,80 ng Cipro g^{-1} MS) de soja, que são comumente destinadas às dietas de animais e/ou humanos. Uma vez que os antimicrobianos podem ser acumulados através dos níveis tróficos (EXECUTIVE AGENCY FOR HEALTH AND CONSUMERS, 2013), a presença de concentrações de traços de substâncias químicas nos órgãos comestíveis das plantas resultará em seu acúmulo na cadeia alimentar.

O Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido para Enro (considerando a soma de Enro e Cipro como marcador residual) pela ANVISA (2018) nos tecidos musculares de bovinos, suínos, aves e peixes é de 100 $\mu g \cdot kg^{-1}$. Não há limites de LMR estabelecidos, entretanto, para esses contaminantes em alimentos de origem vegetal. O valor para a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de Enro é de 0,6 $\mu g \cdot kg^{-1}$, o que significa que a ingestão de, no máximo, 36 μg de Enro por dia por uma pessoa de 60 kg seria aceitável. Nesse contexto, os dados desse estudo sugerem que seria necessário a ingestão de mais de 460 g de grãos de soja por dia para superar o IDA recomendado. No entanto, é importante ressaltar que os antimicrobianos podem estar presentes na dieta através de diversos outros alimentos - e até mesmo de água - aumentando a somatória diária de consumo. Além disso, a soja (incluindo grãos e folhas) é utilizada na alimentação animal, favorecendo bioamplificação, levando em conta que o conteúdo de antimicrobianos nas folhas é especialmente alto. Segundo a American Society For Microbiology (2019), a presença de antimicrobianos em alimentos

derivados de plantas pode favorecer o desenvolvimento de bactérias resistentes e a transmissão de seus genes.

É importante destacar que as plantas deste estudo foram regadas com água destilada contaminada artificialmente com Enro e um substrato artificial foi utilizado para o crescimento da cultura. Essas condições representaram o pior cenário, em que há disponibilidade total de Enro, uma biodisponibilidade maior do que normalmente ocorre em campos plantados, onde os antimicrobianos irão interagir com a matriz do solo. Vários fatores, como a composição química do solo, pH e irradiância, afetarão a disponibilidade de fluoroquinolonas em matrizes sólidas e aquosas (STURINI et al., 2012). Como o Enro foi detectado em solos e em esterco em concentrações de até mg.kg^{-1} (STURINI et al., 2012), é possível que as plantas sejam expostas, por pelo menos alguns períodos de tempo, a concentrações biodisponíveis de Enro semelhantes aos usados no presente estudo. Portanto, é cada vez mais necessário considerar a qualidade da água utilizada na irrigação das culturas alimentares, pois o acúmulo de produtos farmacêuticos, sua inserção nos níveis tróficos, combinada com a transmissão vertical de resistência aos antimicrobianos, muito provavelmente terão efeitos deletérios na saúde humana e animal.

3.6 CONCLUSÕES

A produção de grãos de soja foi drasticamente reduzida quando submetida a irrigação com água contaminada por enrofloxacino ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$). Considerando que a economia brasileira é altamente dependente da produção agrícola e que tem na soja a líder do mercado de grãos, óleos e farelos, a presença deste antimicrobiano na água utilizada para irrigação da leguminosa pode implicar, além de perdas em produtividade, consideráveis impactos socioeconômicos. Além disso, o acúmulo de antimicrobianos (Enro e seu metabólito Cipro) em folhas e grãos dessa planta que é consumida tanto por humanos, quanto por animais, pode contribuir com o desenvolvimento e disseminação de organismos resistentes a antimicrobianos. A resistência a antimicrobianos é um problema mundial de saúde pública e regiões demonstrando elevadas taxas de resistência como a América Latina e sul da Ásia tem perspectivas de aumentos significativos no consumo de antimicrobianos veterinários (VAN BOECKEL et al., 2015). Porém, pouca atenção é dada ao fato de que os resíduos de antimicrobianos nos cultivos agrícolas podem transmitir patógenos resistentes à antimicrobianos aos seres humanos, visto que concentrações subletais de antimicrobianos podem induzir à resistência microbiana (AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 2019). Reduzir o uso preventivo de antimicrobianos na alimentação animal e monitorar a qualidade da água usada para irrigação de culturas são estratégias recomendadas para evitar perdas econômicas, bem como a inserção de resíduos farmacêuticos nas dietas de animais e humanos. No mais, é importante informar e educar consumidores, médicos veterinários e os produtores rurais sobre os riscos associados à resistência a antimicrobianos, que pode resultar em problemas de saúde mundialmente. Finalmente, estudos a campo envolvendo o destino dos antimicrobianos em diferentes matrizes ambientais, assim como seu potencial-efeito a organismos não-alvo são necessários.

3.7 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico**. 2011. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinolonas2.htm>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. In: 2018, **Anais...** [s.l: s.n.]

AL-GHEETHI, Adel A. S. et al. **Removal of heavy metals and antibiotics from treated sewage effluent by bacteria** *Clean Technologies and Environmental Policy* Springer Verlag, , 2015. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s10098-015-0968-z>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

ALBERO, Beatriz et al. Science of the Total Environment Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 643, p. 1562–1570, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.314>>

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. **Plants may be transmitting superbugs to people**. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<www.sciencedaily.com/releases/2019/06/190623122530.htm>.

BÁRTÍKOVÁ, Hana; PODLIPNÁ, Radka; SKÁLOVÁ, Lenka. Chemosphere Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. [s. l.], v. 144, p. 2290–2301, 2016.

BOXALL, Alistair B. A. **New and Emerging Water Pollutants arising from Agriculture**. United Kingdom.

CAMPAGNOLO, Enzo R. et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 299, n. 1–3, p. 89–95, 2002.

CARVALHO, Isabel T.; SANTOS, Lúcia. Antibiotics in the aquatic environments : A review of the European scenario. **Environment International**, [s. l.], 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>>

CHEN, Hui Ru et al. Assessment of veterinary drugs in plants using pharmacokinetic approaches: The absorption, distribution and elimination of tetracycline and sulfamethoxazole in ephemeral vegetables. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. e0183087, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183087>>.

Acesso em: 30 jun. 2021.

CHOWDHURY, Farzana; LANGENKÄMPER, Georg; GROTE, Manfred. Studies on uptake and distribution of antibiotics in red cabbage. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 61–69, 2016.

CHUNG, Hyung Suk et al. Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 605–606, p. 322–331, 2017.

DODGEN, Laurel K. et al. Effect of transpiration on plant accumulation and translocation of PPCP/EDCs. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 198, p. 144–153, 2015.

EGGEN, Trine et al. Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. **Chemosphere**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 26–33, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.041>>

EXECUTIVE AGENCY FOR HEALTH AND CONSUMERS. Study on the environmental risks of medicinal products. [s. l.], n. December, 2013.

GARCÍA OVANDO, H. .. et al. Simultaneous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle. **Archivos de Medicina Veterinaria**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 93–98, 2004. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013753011>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

GOMES, M. P. et al. Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 328, p. 140–149, 2017. a.

GOMES, M. P. et al. Enrofloxacin and Roundup® interactive effects on the aquatic macrophyte *Elodea canadensis* physiology. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 249, p. 453–462, 2019.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Responses of the nitrogen-fixing aquatic fern *Azolla* to water contaminated with ciprofloxacin: Impacts on biofertilization. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 232, p. 293–299, 2017. b.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Emerging contaminants in water used for maize irrigation: Economic and food safety losses associated with ciprofloxacin and glyphosate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 196, n. March, p. 110549, 2020. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110549>>

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Individual and combined effects of amoxicillin, enrofloxacin, and oxytetracycline on *Lemna minor* physiology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 203, n. March, 2020. b.

HOAGLAND, D. R. ; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, [s. l.], v. 347, p. 32, 1950.

HOOPER, David C.; JACOBY, George A. Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. a025320, 2016. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

JANUSCH, Franziska et al. Determination of fluoroquinolones in chicken feces - A new liquid-liquid extraction method combined with LC-MS/MS. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 792–799, 2014.

JAYAMPATHI, Tharuka; ATUGODA, Thilakshani; JAYASINGHE, Chamila. **4. Uptake and accumulation of pharmaceuticals and personal care products in leafy vegetables**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00004-4>>

JIN, Caixia; CHEN, Æ. Qiuying; SUN, Æ. Ruilian. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium , sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat , Chinese cabbage and tomato. [s. l.], p. 878–885, 2009.

KIPPER, Karin et al. Plant uptake of some pharmaceuticals commonly present in sewage sludge compost. **ICBEE 2010 - 2010 2nd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, Proceedings**, [s. l.], n. Icbec, p. 261–264, 2010.

KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>>

LANGNER, Josana A. et al. Maize: Key agricultural crop in food security and sovereignty in a future with water scarcity. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 648–654, 2019.

LILLENBERG, M. et al. Enrofloxacin and Ciprofloxacin Uptake by Plants from Soil. **Agronomy Research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 807–814, 2010.

MIGLIORE, Luciana; COZZOLINO, Salvatore; FIORI, Maurizio. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. [s. l.], v. 52, p. 1233–1244, 2003.

MOULLAN, Norman et al. Tetracyclines disturb mitochondrial function across eukaryotic models: A call for caution in biomedical research. **Cell Reports**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1681–1691, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.034>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

NUNES, Bruno et al. Evaluation of physiological changes induced by the fluoroquinolone antibiotic ciprofloxacin in the freshwater macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 72, p. 103242, 2019.

OPRIS, Ocsana et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Influence of nine antibiotics on key secondary metabolites and physiological characteristics in *Triticum aestivum* : Leaf volatiles as a promising new tool to assess toxicity Ocsana Opris. [s. l.], v. 87, p. 70–79, 2013.

PAN, Min; CHU, L. M. Ecotoxicology and Environmental Safety Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 126, p. 228–237, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.027>>

ROCHA, Daiane Cristina et al. Veterinary antibiotics and plant physiology: An overview. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 767, 2021.

RUSCH, Marina et al. Degradation and transformation of fluoroquinolones by microorganisms with special emphasis on ciprofloxacin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 17, p. 6933–6948, 2019.

SCISCENKO, Iván et al. Monitoring photolysis and (solar photo)-Fenton of enrofloxacin by a methodology involving EEM-PARAFAC and bioassays: Role of pH and water matrix. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 719, 2020.

SOUZA, Roberta Barreiros De et al. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp . Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* spp . **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 31, p. 413–428, 2010.

STURINI, Michela et al. Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural waters. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 4564–4569, 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es100278n>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

STURINI, Michela et al. Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials Marbofloxacin and Enrofloxacin. **Chemosphere**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 130–137, 2012.

SUDARIĆ, Aleksandra. **Soybean for Human Consumption and Animal Feed**. [s.l.] : IntechOpen, 2019. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/soybean-for-human-consumption-and-animal-feed>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

TASHO, Reep Pandi; CHO, Jae Yong. Science of the Total Environment Veterinary antibiotics in animal waste , its distribution in soil and uptake by plants : A review. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 563–564, n. 3, p. 366–376, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140>>

TROUCHON, Tessa; LEFEBVRE, Sebastien. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. **Open Journal of Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 40–58, 2016.

VAN BOECKEL, Thomas P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. [s. l.], n. 16, p. 1–6, 2015.

WALTERS, Evelyn; MCCLELLAN, Kristin; HALDEN, Rolf U. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. **Water Research**, [s. l.], v. 44, n. 20, p. 6011–6020, 2010.

WEI, Ziyang et al. Toxicity of enrofloxacin, copper and their interactions on soil microbial populations and ammonia-oxidizing archaea and bacteria. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24016-8>>

YAN, Yan et al. Ecotoxicological effects and accumulation of ciprofloxacin in *Eichhornia crassipes* under hydroponic conditions. **Environmental Science and**

Pollution Research, [s. l.], v. 26, n. 29, p. 30348–30355, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-019-06232-5>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

YANG, Shinwoo; CARLSON, Kenneth. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. **Water Research**, [s. l.], v. 37, n. 19, p. 4645–4656, 2003.

4 CAPÍTULO II: ENROFLOXACINO NO CRESCIMENTO DE PLANTAS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA INOCULADA COM *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

4.1 RESUMO

A presença de antimicrobianos no solo pode afetar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio, processo realizado por bactérias diazotróficas que, através da simbiose, disponibilizam amônio para plantas leguminosas. No meio agrícola, a *Bradyrhizobium japonicum* e a soja (*Glycine max*) estabelecem uma relação de grande sucesso, que dispensa o uso de adubos nitrogenados. A interferência sobre essa interação pode implicar em graves prejuízos econômicos e ambientais. Nesse sentido, o presente estudo objetivou investigar se o cultivo de soja em vasos contendo solo contaminado com 0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de enrofloxacino pode ser prejudicial ao crescimento, à nodulação e ao metabolismo de nitrogênio das plantas. Redução no número de nódulos e na atividade da enzima nitrogenase foi visualizada a partir de 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. A quantidade de ureídeos totais teve um decréscimo a partir de 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, enquanto a translocação do nitrogênio das raízes para a parte aérea foi fortemente inibida no tratamento de 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. As enzimas GS, GOGAT e NADH-GDH aumentaram sua atividade a partir de 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, provavelmente para suprir as necessidades de glutamato para a síntese de prolina, aminoácido relacionado ao estresse oxidativo, que também aumentou neste tratamento. No entanto, não foram observados efeitos sobre altura, massa seca e produção de grãos. Apesar de não haverem perdas de rendimento, detectou-se a presença do enrofloxacino em tecidos vegetais destinados ao consumo humano e animal (folhas: 560,85 ng.g^{-1} ; grãos: 55,35 ng.g^{-1}). No solo, o fármaco foi detectado em concentrações de 17 a 34% menores do que as iniciais, mesmo após 60 dias. Os riscos ao ambiente e à saúde humana associados à exposição a antimicrobianos em concentrações subterapêuticas são discutidos.

Palavras-chave: *Glycine max*, simbiose, antimicrobianos, produtividade, segurança de alimentos

4.2 ABSTRACT

Soil contamination by antimicrobials can affect the efficiency of the biological nitrogen fixation, a natural process mediated by diazotrophic bacteria that reduces nitrogen derived from atmosphere into ammonium, making it available to leguminous plants. In agriculture, *Bradyrhizobium japonicum* and soybean (*Glycine max*) establish a highly successful relationship, which does not require the use of nitrogen fertilizers throughout the whole plant cycle. Deleterious effects in this interaction can result in serious economic and environmental risks. The present study investigated if enrofloxacin-contaminated soil (0, 200, 600 and 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) affects soybean's growth, nodulation and nitrogen metabolism. The number of nodules and nitrogenase enzyme activity were affected at 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. The total ureides content decreased at 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, while the translocation of nitrogen from roots to shoots was strongly inhibited in the 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ treatment. The enzymes GS, GOGAT and NADH-GDH increased at 200

$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, probably to supply glutamate for the proline synthesis, amino acid related to oxidative stress, which also increased in this treatment. However, no effects on plants height, dry weight and grain yield were observed. Although there were no yield losses, enrofloxacin was detected in edible plant tissues (leaves: $560.85 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$; grains: $55.35 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$). In soil, enrofloxacin was detected in concentrations 17 to 34% lower than the initial ones, even after 60 days. The risks to the environment and human health associated with the presence of antimicrobials in subtherapeutic concentrations are discussed.

Keywords: *Glycine max*, symbiosis, antimicrobials, grain yield, food safety

4.3 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural realizado por bactérias diazotróficas na rizosfera das plantas, que supre as necessidades de N tanto para espécies vegetais nativas, quanto para cultivos agrícolas (MARSCHNER, 2012). Essas bactérias reduzem o nitrogênio de sua forma elementar (N_2) a amônia (NH_3) através da ação da enzima nitrogenase (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). A simbiose é o principal meio de fornecimento do N_2 fixado e ocorre principalmente através da associação entre plantas da família Fabaceae e rizóbios (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2020). Esta interação resulta na formação de estruturas especializadas nas raízes das plantas, denominadas nódulos, onde há formação de amônio (NH_4^+), que se redistribuirá para os tecidos da planta, podendo ser assimilado na forma de ureídeos, aminoácidos e amidas (OHYAMA et al., 2017).

A relação simbiótica existente entre a *Bradyrhizobium japonicum* e a soja (*Glycine max*) é um caso de sucesso dentro do meio agrônômico (HUNGRIA; MENDES, 2015). Morfologicamente, a *B. japonicum* se caracteriza como uma espécie aeróbica, não formadora de esporos, móvel e Gram negativa (GACHANDE; KHANSOLE, 2011). Essa bactéria não é nativa dos solos brasileiros, porém é abundante nos campos de cultivo devido à utilização dos inoculantes comerciais desde a década de 1960 (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). A alta especificidade, aliada à sua excepcional performance (DÖBEREINER; FRANCO; GUZMÁN, 1970) transformou o processo produtivo da soja que, desde então, dispensa o uso de adubos minerais nitrogenados (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

Diferentemente do processo industrial Haber-Bosch, que sintetiza NH_3 a partir do N_2 em condições de elevadas temperatura e pressão, a FBN ocorre a temperatura ambiente e em pressão atmosférica (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015), sendo assim uma alternativa economicamente viável e ambientalmente segura. Num cenário onde a inoculação da soja fosse completamente substituída pelo uso de fertilizantes inorgânicos nitrogenados, se triplicaria o custo de insumo por hectare e a emissão de gases de efeito estufa (referentes ao processo de síntese e ao uso dos adubos) aumentaria em 52 vezes (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013). Apesar de sua indubitável vantagem tecnológica, a simbiose está sujeita, no entanto, a diversos fatores ambientais que podem prejudicar sua eficiência (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Dentre eles, a presença de contaminantes como elementos traço, pesticidas e

antimicrobianos se mostra desfavorável à nodulação (SARTORIUS et al., 2009; TALANO et al., 2013; TORTOSA et al., 2021).

Antimicrobianos são substâncias de origem natural ou sintética que apresentam efeito bacteriostático e/ou bactericida sobre microrganismos. Descobertas nos anos 1930, essas moléculas revolucionaram não só a medicina humana, como também a produção de alimentos, ao serem introduzidas na atividade pecuária com a finalidade de prevenir e tratar doenças, além de agirem como promotoras de crescimento (KIRCHHELLE, 2018). Dentre os grupos farmacológicos mais utilizados na produção animal estão as fluoroquinolonas. Essas moléculas atuam sobre as enzimas topoisomerase II e IV, afetando os processos de replicação e transcrição do DNA das bactérias, tornando-as incapazes de sobreviver (GIGUÈRE; DOWLING, 2013). O maior representante da classe no âmbito veterinário é o enrofloxacino, antibacteriano de amplo espectro de ação, voltado para o tratamento de infecções ocasionadas principalmente por bactérias Gram-negativas, podendo agir também sobre algumas estirpes Gram-positivas e micoplasmas (TROUGHON; LEFEBVRE, 2016). O enrofloxacino tem como principal metabólito o ciprofloxacino, antimicrobiano comum à medicina humana, de caráter ainda mais potente (ROY et al., 2019).

Apesar de seus benefícios, os antimicrobianos veterinários são contaminantes emergentes frequentemente detectados nos ecossistemas terrestres e aquáticos (KÜMMERER, 2011), sobretudo em função de sua eliminação nas excretas dos animais de produção em proporções de 5 a 90% (SPIELMEYER, 2018). Sendo assim, o uso de dejetos animais para a fertilização dos campos agrícolas pode ser uma das mais importantes vias de contaminação das matrizes ambientais (ZHAO et al., 2020).

No solo, esses fármacos podem ser tóxicos a microrganismos não-alvo que habitam naturalmente neste sistema, tendo como possíveis impactos: alterações na abundância e atividade microbiana, com efeitos sobre a respiração do solo e sobre a atividade de enzimas como as desidrogenases, fosfatases e ureases; perturbações na estrutura das comunidades microbianas, gerando desequilíbrio entre as populações; e mudanças na diversidade genética das comunidades, aumentando, especialmente, o potencial de transferência de genes de resistência (CYCON; MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2019). Entretanto, estudos acerca dos impactos dos antimicrobianos sobre os ciclos biogeoquímicos ainda são escassos (ROOSE-AMSALEG; LAVERMAN, 2015).

No ciclo do nitrogênio, são relatados com maior frequência os efeitos dos antimicrobianos sobre as etapas de nitrificação/desnitrificação e também sobre a oxidação anaeróbica da amônia (anammox) (DEVRIES; ZHANG, 2016). Porém, pouco se fala sobre os impactos no processo de fixação biológica, essencial para a manutenção dos altos níveis produtivos da soja, uma das culturas leguminosas mais importantes a nível mundial (CHANG; HAE-IN; HUNGRIA, 2015).

Nesse sentido, esse trabalho buscou investigar se a eficiência da simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum* e a soja (*Glycine max*) é prejudicada quando as sementes inoculadas são cultivadas em um solo contaminado por enrofloxacino. Sabendo que a *B. japonicum* é uma bactéria Gram-negativa, a presença de um antimicrobiano voltado ao combate dessa classe de microrganismos pode apresentar efeito bacteriostático e/ou bactericida sobre a diazotrófica, afetando tanto aspectos de nodulação, quanto de crescimento e desenvolvimento da soja, relacionado a uma possível redução no aporte de nitrogênio para a planta.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Condições experimentais

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor de Ciências Agrárias, Curitiba, Paraná, Brasil (25°24'38" S; 49°14'57" O; 920 m de altitude) entre fevereiro e abril de 2021. A temperatura no interior da casa de vegetação durante o período do experimento esteve entre 15 e 41 °C, com umidade relativa do ar média de 56%.

O substrato utilizado para o cultivo foi um solo livre de contaminação por antimicrobianos, coletado da Fazenda Experimental Canguiri (UFPR). O solo da área é classificado como um Cambissolo Háplico Tb distrófico (SUGAMOSTO, 2002) e sua análise química está descrita na TABELA 5.

TABELA 5 – ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

pH CaCl ₂	pH SMP	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	P	C
		----- cmol _c .dm ⁻³ -----					mg.dm ⁻³	g.dm ⁻³
4,76	6,44	0,1	3,7	6,1	1,7	0,1	4,84	31,06

Fonte: A autora (2021)

Após secagem ao ar, o solo foi destorroado e peneirado em uma malha de 2 mm para sua homogeneização, sendo posteriormente adicionado a vasos de 16 cm de altura, com capacidade para 0,8 L, vedados ao fundo para evitar escoamento dos tratamentos. Cada vaso recebeu 800 g de solo.

A partir de uma solução mãe de 50 mg.ml⁻¹ de enrofloxacino (Sigma Aldrich, Brasil), preparou-se as diluições de 160, 480 e 800 µg.L⁻¹, dedicadas à contaminação do solo. Foram aplicados 250 ml de solução por vaso, correspondendo então às concentrações de 200, 600 e 1000 µg.kg⁻¹, respectivamente, conforme a ocorrência desse fármaco em solo adubado com cama de aves (PARENTE et al., 2019). Foram utilizados 10 vasos por tratamento (0, 200, 600 e 1000 µg.kg⁻¹) e estes foram dispostos de maneira aleatória numa bancada metálica. A semeadura foi realizada após 24 horas do procedimento de contaminação, para que o antimicrobiano pudesse se distribuir uniformemente por todo o volume do substrato.

4.4.2 Cultivo das plantas

Sementes de soja (*Glycine max* cultivar 95Y52) obtidas da empresa Pioneer foram superficialmente desinfestadas numa solução de hipoclorito de sódio 1,25% por 5 minutos. Em seguida, foram enxaguadas repetidamente em água destilada e, então, inoculadas. O inoculante líquido utilizado foi o Total Nitro Metabolic HC (nome comercial) fornecido pela empresa Biotrop, composto por 7×10^9 UFC.mL⁻¹ de *Bradyrhizobium japonicum*, estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080. A aplicação da suspensão ocorreu conforme a indicação da bula fornecida pelo fabricante. Posteriormente, foram semeadas 4 sementes por vaso a 5 cm de profundidade.

Após vinte dias, efetuou-se o raleio, mantendo apenas duas plantas por vaso até o final do experimento. Os vasos foram irrigados com 150 ml de água deionizada duas vezes por semana, a fim de manter o solo a 70% de sua capacidade de campo durante todo o ensaio.

4.4.3 Análises fisiológicas

As análises fisiológicas foram realizadas no início do desenvolvimento das vagens (estádio R3), momento em que ocorrem as maiores taxas de fixação de N₂

(ARACHCHIGE et al., 2020). Dez plantas de cada tratamento foram coletadas, e avaliadas quanto à altura, diâmetro do caule e massa fresca da parte aérea e das raízes. O primeiro trifólio completamente expandido foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo mantido à -20 °C até as avaliações do estado de ativação da Rubisco (SALES et al., 2018), atividades das enzimas glutamina sintetase (GS) (OAKS et al., 1980), glutamato sintase (GOGAT) (RACHIM; NICHOLAS, 1985) e glutamato desidrogenase dependente de NADH (NADH-GDH) (GROAT; VANCE, 1981), concentração de ureídeos totais (LESCANO, 2020) e prolina (BIJAY; DALE, 1998). As plantas foram avaliadas quanto ao número, diâmetro, massa seca e viabilidade dos nódulos. Para a atividade da enzima nitrogenase, 10 mg (massa fresca) de nódulos maiores que 2 mm destacados das raízes de 10 plantas foram colocados em tubos de coleta de sangue (Vacutainer[®]), sendo a atividade da enzima baseada na técnica de redução do acetileno (MAGUE; BURRIS, 1972). Após determinação da massa seca das raízes e parte aérea, a concentração de nitrogênio total foi avaliada seguindo o método colorimétrico proposto por Oliveira (1981).

Ao final do ciclo da cultura (estádio R8), foram colhidas as 10 plantas restantes de cada tratamento, verificando a massa seca na parte aérea e nas raízes, bem como a produção de grãos, expressa em g MS por planta.

4.4.4 Quantificação de enrofloxacino

Foram avaliadas as concentrações de enrofloxacino no solo rizosférico e nas plantas (parte aérea, raízes e grãos) utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

O solo rizosférico foi coletado em tubos Falcon no momento da semeadura, na primeira coleta e ao final do experimento. A extração prosseguiu com a adição de 1 ml de tampão fosfato (pH 3,0 a 4,0) e 1 ml de clorofórmio a 1 g de solo seco. Após agitação em vórtex e circulação por 10 minutos, o homogenato foi filtrado em seringas de 10 ml com algodão. Então, 500 µl da fase inferior dessa solução foram recolhidos em tubos de ensaio e evaporados em capela. Aos pellets secos adicionou-se 1 ml de água acidificada (água contendo 1% de ácido acético), e o soluto foi sonicado por 2 minutos, seguido por centrifugação a 3000 x g por 5 minutos. A extração em fase sólida (SPE) ocorreu em cartuchos C18 de 6 ml (Spe-edTM) acoplados em Manifold à vácuo (Supelco[®] VisiprepTM), previamente acondicionados com 10 ml de solução de

ácido acético 1% em água. A amostra foi então percolada, seguida por 10 ml da mesma solução de ácido acético 1% em água. A partir daí, os tubos coletores foram trocados por tubos com tampa, afim de recolher os analitos posteriormente eluídos com 5 ml da seguinte fase: 60% de ácido acético 1% em água e 40% de acetonitrila 1% ácido acético, sendo então levados para secagem em placa aquecedora.

Para as plantas, homogeneizou-se 0,1 g de material vegetal seco e triturado em 1,5 ml de acetonitrila contendo 1% ácido acético. O homogenato foi sonicado por 5 minutos, seguidos por agitação em vórtex por 1 minuto. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi então coletado em tubos Falcon de 15 ml, onde completou-se o volume com água acidificada. A SPE foi feita em cartuchos C18, acondicionados com 15 ml de solução de ácido acético 1% e acetonitrila 10% em água, seguidos pela percolação de 15 ml de amostra e 15 ml da mesma solução de ácido acético 1% e acetonitrila (9:10 v/v) para limpeza. Para eluição, utilizou-se 4 ml de acetonitrila P.A. e os analitos foram levados para secagem em Modular Concentrator SpeedVac Thermo Scientific SPD121P.

A ressuspensão dos analitos (tanto do solo, quanto das plantas) foi realizada em 1 ml de fase móvel (trietilamina 0,4% pH 3,0, acetonitrila e metanol – 75:10:10 v/v/v). As amostras foram então agitadas em vórtex por 2 minutos e filtradas em filtro de nylon 0,45 µm, sendo coletadas em vials de 2 ml.

Após filtração, 10 µl foram injetados em HPLC (Waters 2695 HPLC) acoplado a um detector de fluorescência (FD Waters multi fluorescence detector 2475). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Supelco Analytical C18 (250 mm × 4.6 mm × 5 µm).

As condições para realização da cromatografia foram seguidas conforme García Ovando et al. (2004), com modificações. A temperatura da coluna foi mantida a 35 °C ± 1 °C. Os comprimentos de onda utilizados no detector de fluorescência foram de 278 nm para excitação e 453 nm para emissão. Foram usados como solventes na fase móvel à taxa de 1 ml.min⁻¹: trietilamina 0.4% (v/v), pH 3, como fase móvel A; metanol como fase móvel B; e acetonitrila como fase móvel C.

Para as curvas de calibração foi utilizada solução padrão de enrofloxacin (United States Pharmacopeia, Rockville, MD, USA) de pureza e validade comprovadas. Curvas contendo seis pontos apresentaram boa linearidade ($R^2 = 0,99$; $P < 0,0001$) no intervalo esperado para as concentrações das amostras. Cada ciclo de amostras foi acompanhado de três brancos, três padrões e três amostras fortificadas.

O limite de detecção (LOD) foi de 0,2 ng.L⁻¹ enquanto o limite de quantificação (LOQ) foi de 0,6 ng.L⁻¹ (GARCÍA OVANDO et al., 2004).

As taxas de recuperação foram determinadas por curvas de matrização a partir de amostras de solo e planta do tratamento controle (sem contaminação). A estas foram adicionadas concentrações conhecidas de enrofloxacino e se efetuaram os mesmos procedimentos de extração e quantificação. Os valores de taxa de recuperação obtidos estiveram acima de 85% para o antimicrobiano testado.

4.4.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software JMP 13.0 (SAS Institute Inc.). Os dados foram testados quanto à normalidade de Shapiro-Wilk e homoscedasticidade de Bartlett e, então, submetidos a análise de variância (ANOVA). Quando diferenças significativas foram detectadas pela ANOVA, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

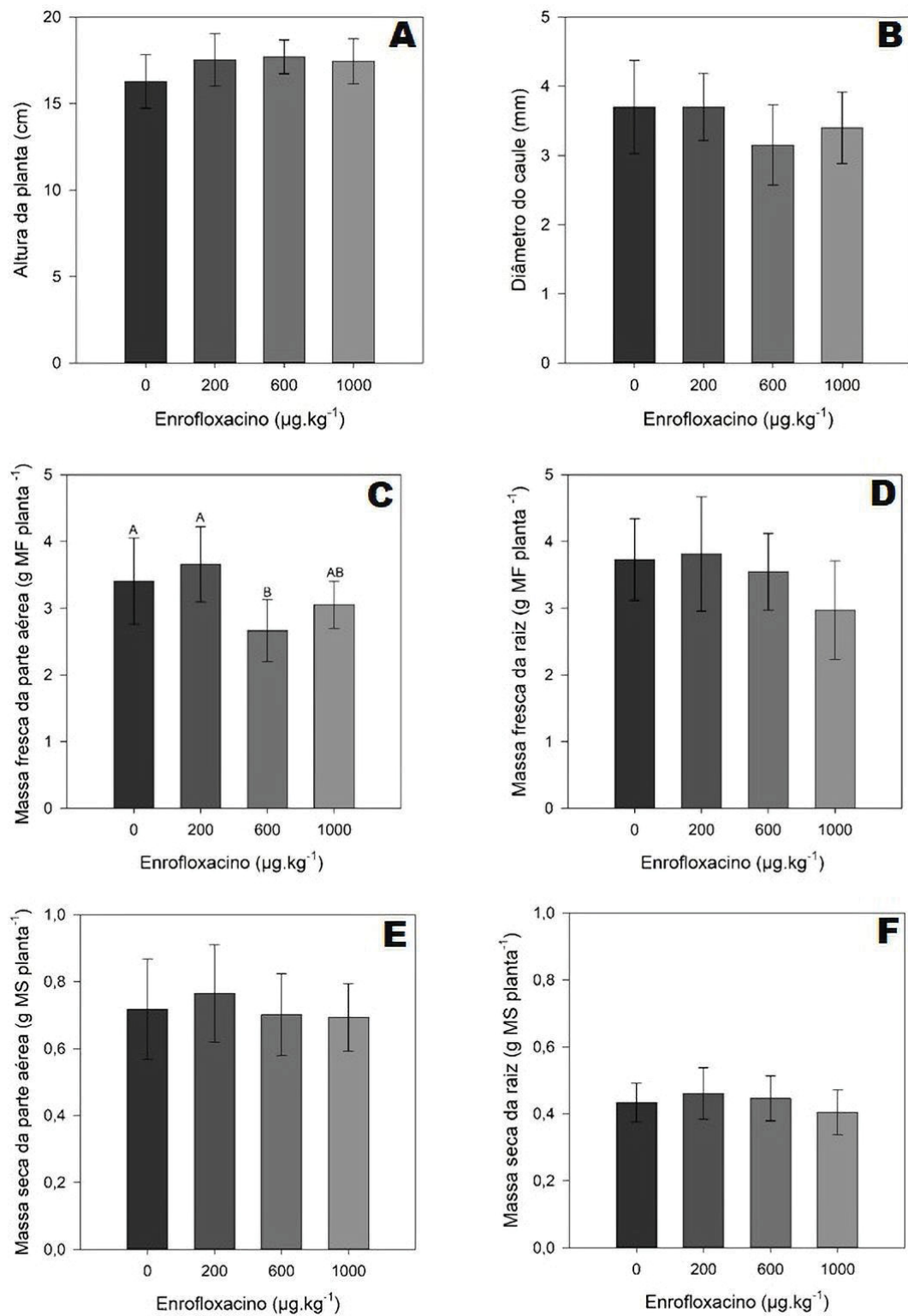
4.5.1 Crescimento das plantas

Dentre as variáveis de crescimento avaliadas (altura, diâmetro do caule, massa fresca e massa seca), a contaminação do solo com enrofloxacino somente afetou a produção de massa fresca da parte aérea, que foi menor no tratamento de 600 µg.kg⁻¹ em relação ao controle (F= 6,9416; p<0,001) (FIGURA 7). Ao contrário, em *Triticum aestivum*, *Cyphomandra betacea* e *Brassica campestris*, o comprimento da parte aérea e das raízes foi diminuído pela presença de enrofloxacino no solo quando em concentração de 5 mg.kg⁻¹ (JIN; CHEN; SUN, 2009). Essa inibição deve ser decorrente do efeito das maiores concentrações investigadas por Jin e colaboradores. É importante ressaltar, entretanto, que concentrações acima de 1 mg enrofloxacino kg⁻¹ não são comumente detectadas em solos (KOVALAKOVA et al., 2020; KUPPUSAMY et al., 2018; LUKASZEVICZ et al., 2016).

Riaz et al. (2017), avaliando o efeito do enrofloxacino sobre trigo (*T. aestivum*), verificou uma redução na massa fresca das raízes e da parte aérea das plantas submetidas a 5 e 100 mg.L⁻¹ do antimicrobiano, respectivamente. A diminuição do

crescimento esteve associada a uma elevação nos biomarcadores de estresse oxidativo, como o malondialdeído (MDA), sinalizando danos estruturais às membranas (RIAZ et al., 2017). Similarmente, Timmerer et al. (2020) observaram que a biomassa vegetal (fresca e seca) de mostarda branca (*Sinapis alba*) foi significativamente afetada pelo tratamento de 7 mg.kg⁻¹ de enrofloxacino. No presente estudo, entretanto, não se observou o efeito do antimicrobiano na produção de massa seca da soja ($p > 0,05$; FIGURA 7E). A diminuição de massa fresca observada no tratamento de 600 µg enrofloxacino kg⁻¹ está relacionada, então, somente ao teor de água da planta, que pode ser alterado pelo efeito do enrofloxacino sobre o processo transpiratório. Efeitos negativos de fluoroquinolonas como o ciprofloxacino na eficiência do uso da água foi observado em plantas de milho (GOMES et al., 2020a). Além disso, o antimicrobiano também causou inibição da síntese de carotenoides em 0,5 mg.L⁻¹ (OPRIS et al., 2013). Tais pigmentos são precursores da síntese de ácido abscísico, hormônio envolvido no fechamento dos estômatos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

FIGURA 7 – CRESCIMENTO DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO COM ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)

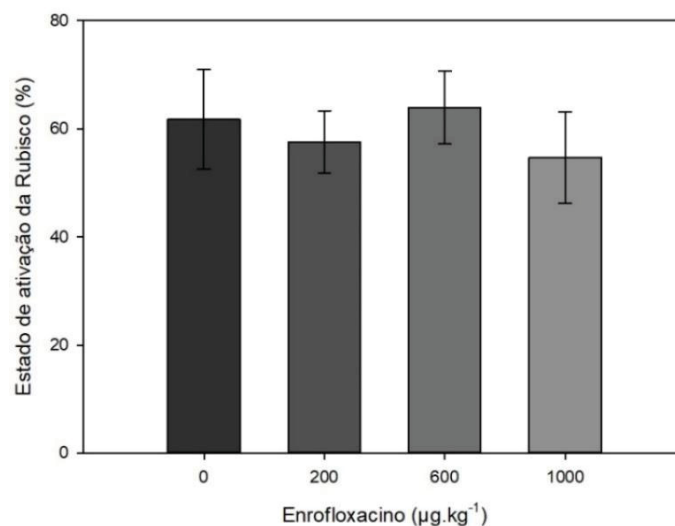


Fonte: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 10 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Antimicrobianos são conhecidos por afetar a fotossíntese devido ao seu efeito deletério na síntese de pigmentos fotossintetizantes (NUNES et al., 2019; OPRIS et al., 2013) e na atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), enzima-chave na fase bioquímica da fotossíntese (GOMES et al., 2020a). Segundo Gomes et al. (2020), em plantas de milho (*Zea mays*), o ciprofloxacino ($0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$) diminui a eficiência carboxilativa da Rubisco, podendo também reduzir o conteúdo e a atividade dessa enzima, em função do efeito supressor do pelo acúmulo de carboidratos nas folhas induzido pelo antimicrobiano. Nesse estudo, entretanto, o enrofloxacino não afetou o estado de ativação da Rubisco em plantas de soja ($p > 0,05$; FIGURA 8).

FIGURA 8 – ESTADO DE ATIVAÇÃO DA RUBISCO EM PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO COM ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)



Fonte: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 10 repetições.

A ativação da Rubisco é uma etapa primordial à disponibilização da enzima para o ciclo catalítico. Logo, assumindo atividade carboxilase, reduções nesse processo implicariam num menor aporte de esqueletos de carbono para a planta, refletindo negativamente no crescimento e desenvolvimento vegetal (BUCHANAN, 2017). No caso de grandes culturas, deve-se considerar ainda o reflexo sobre a produção de grãos (GOMES et al., 2020a). Entretanto, como visto, o processo fotossintético não foi afetado em plantas de soja, justificando a ausência de efeito na

produção de massa seca de plantas cultivadas em solo contaminado por enrofloxacino.

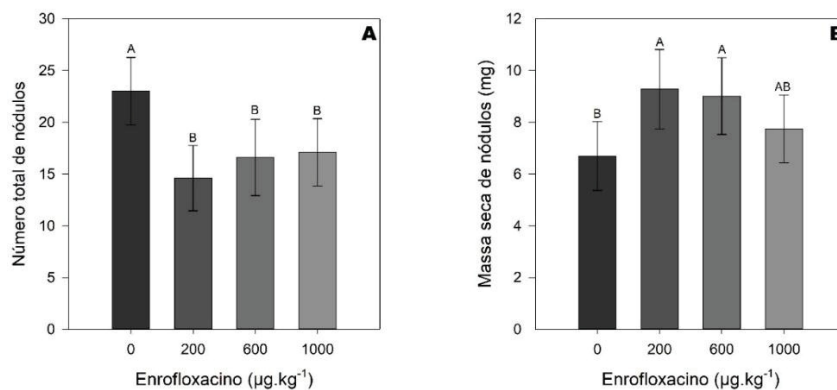
4.5.2 Nodulação e metabolismo de nitrogênio

Os nódulos são a resposta morfológica da planta à infecção das raízes pelos rizóbios, constituindo o ambiente ideal para a fixação biológica, uma vez que garantem as condições microaeróbias exigidas para o pleno funcionamento da nitrogenase e para a síntese de ATP por parte das bactérias (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

A campo, é comum que se avalie o êxito da inoculação através de variáveis como o número, tamanho e viabilidade dos nódulos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001), sendo que esta última está associada à atividade da leg-hemoglobina, proteína que permite o suprimento de oxigênio (O_2) para os bacteroides, de forma a não inativar a nitrogenase (MARSCHNER, 2012).

A FIGURA 9 mostra que houve uma diferença significativa tanto no número ($F=9,6740$; $p<0,001$), quanto na massa seca dos nódulos ($F=7,0826$; $p<0,001$), quando as plantas foram expostas ao enrofloxacino. A viabilidade dos nódulos (avaliada pela coloração rósea indicativa da atividade da leg-hemoglobina), em contrapartida, não foi significativamente afetada ($p>0,05$; dados não mostrados). Em média, 96% dos nódulos estavam ativos. A coloração rósea do interior dos nódulos pode ser visualizada na FIGURA 10.

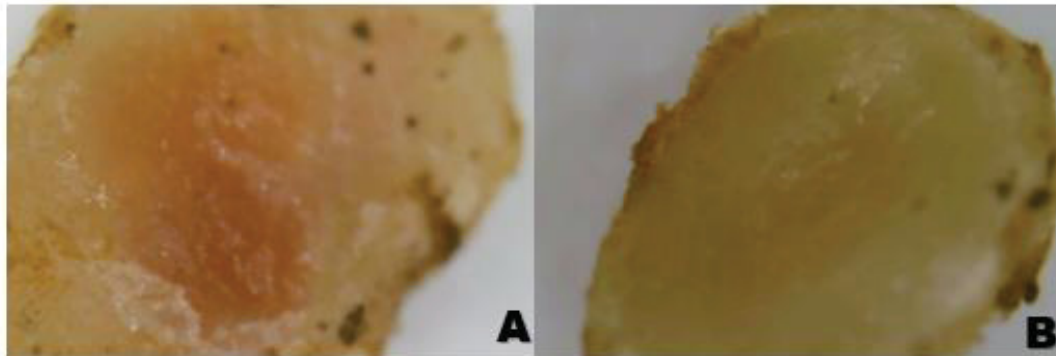
FIGURA 9 – NÚMERO E MASSA SECA DOS NÓDULOS DESTACADOS DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO COM ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)



Fonte: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 10 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

FIGURA 10 – DIFERENÇA DE COLORAÇÃO ENTRE UM NÓDULO ATIVO (A) E UM INATIVO (B)



Fonte: A autora (2021)

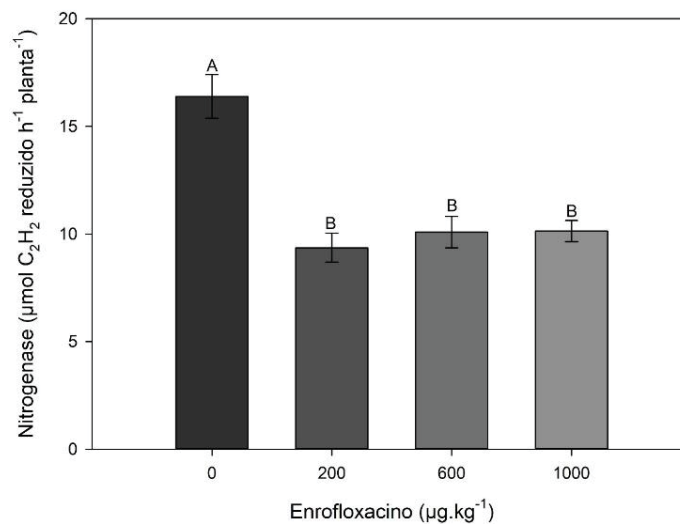
A presença de enrofloxacino em concentrações acima de $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ reduziu a quantidade de nódulos nas raízes das plantas de soja. O mesmo foi visto para *Rhizobium etli* e feijão (*Phaseolus vulgaris*) cultivados em solo contendo 300mg.kg^{-1} de sulfadimetoxina, provavelmente relacionados a inibição do processo de invasão dos tecidos pela bactéria (SARTORIUS et al., 2009). De acordo com Revellin et al. (2018), a aplicação a longo prazo de antimicrobianos como tilosina, clorotetraciclina e sulfametazina no solo é capaz de modificar as populações de *Bradyrhizobium* que ocupam os nódulos de soja, possivelmente ao interferir nas interações da planta com a bactéria, impedindo o estabelecimento da relação microssimbótica.

Döbereiner, Franco e Guzmán (1970) correlacionaram positivamente a eficiência da fixação (quantidade de N fixado por unidade de tecido nodular) com a massa dos nódulos, especialmente para estirpes de *B. japonicum* que, neste trabalho, foram beneficiadas pela presença de enrofloxacino a 200 e $600 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Sartorius et al. (2009) não verificaram efeitos da sulfadimetoxina até 300mg.L^{-1} sobre o crescimento dos nódulos de *Rhizobium etli* cultivado em meio de cultura completo, ao passo que Ostermann et al. (2019), verificaram um aumento na massa fresca de nódulos de *Sinorhizobium melioli* em plantas de *Medicago sativa* submetidas a uma mistura de sulfametazina e oxitetraciclina (200mg.kg^{-1}). Os autores sugerem que o efeito positivo esteja ligado à sinalização química provocada pelas subdoses de antimicrobianos, implicando em um aumento na fixação biológica de nitrogênio (OSTERMANN et al., 2019). A presença de antimicrobianos em concentrações abaixo da concentração inibitória mínima (CIM) pode privilegiar as interações nas

comunidades bacterianas, podendo modular inclusive a comunicação dos microrganismos com as plantas (ARSENEAULT; FILION, 2017).

No interior dos nódulos está localizada a unidade central de fixação de nitrogênio: o complexo enzimático nitrogenase (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2020). Essa metaloenzima, que contém ferro e molibdênio, disponibiliza nitrogênio para a planta a partir da redução do N_2 a NH_3 . A presença de enrofloxacino a partir de $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ afetou negativamente a atividade da nitrogenase ($F=22,3982$; $p<0,001$) (FIGURA 11).

FIGURA 11 - ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE DOS NÓDULOS DESTACADOS DE PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO COM ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$)



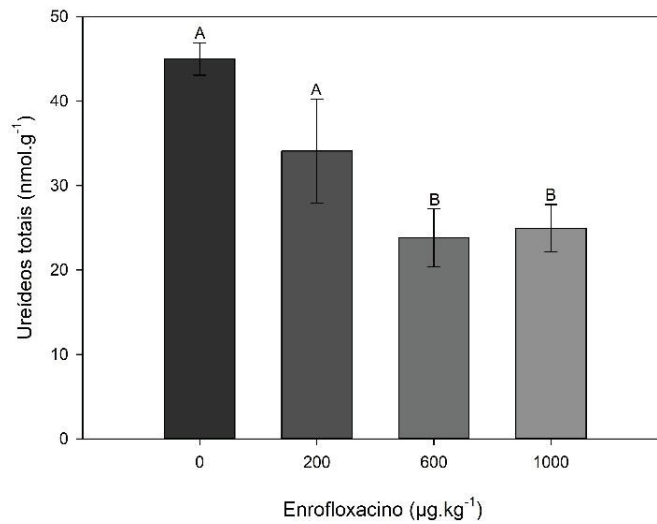
Fonte: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 10 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Sun et al. (2016) verificaram redução na atividade da nitrogenase de uma comunidade bacteriana fixadora de nitrogênio submetida a oxitetraciclina (10mg.kg^{-1}). Os autores atribuíram essa redução ao fato da nitrogenase ser uma enzima intracelular e que este compartimento pode ser facilmente acessado pelo antimicrobiano. Uma inibição desse complexo enzimático também foi detectada em *Azolla-Anabaena* submetida a ciprofloxacino ($0,75 \text{mg.L}^{-1}$) (GOMES et al., 2017c). Gomes e colaboradores (2017b) dissertam que as reduções na atividade da nitrogenase podem ser função de perturbações do antimicrobiano sobre o metabolismo energético das plantas, já que o processo de fixação é exigente em NADPH e NADH.

Uma menor atividade da nitrogenase pode reduzir a disponibilidade de NH_4 para a síntese de glutamina e glutamato, mediada pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). Conseqüentemente, produtos da assimilação desses aminoácidos, que seriam transportados pelo xilema até a parte aérea da planta, também deixam de ser produzidos. Na FIGURA 12 é possível observar que a concentração de ureídeos totais foi afetada pelo enrofloxacino a partir de $600 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ($F= 21,2136$; $p<0,001$).

FIGURA 12 – CONCENTRAÇÃO DE UREÍDEOS TOTAIS EM FOLHAS DE SOJA CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$)



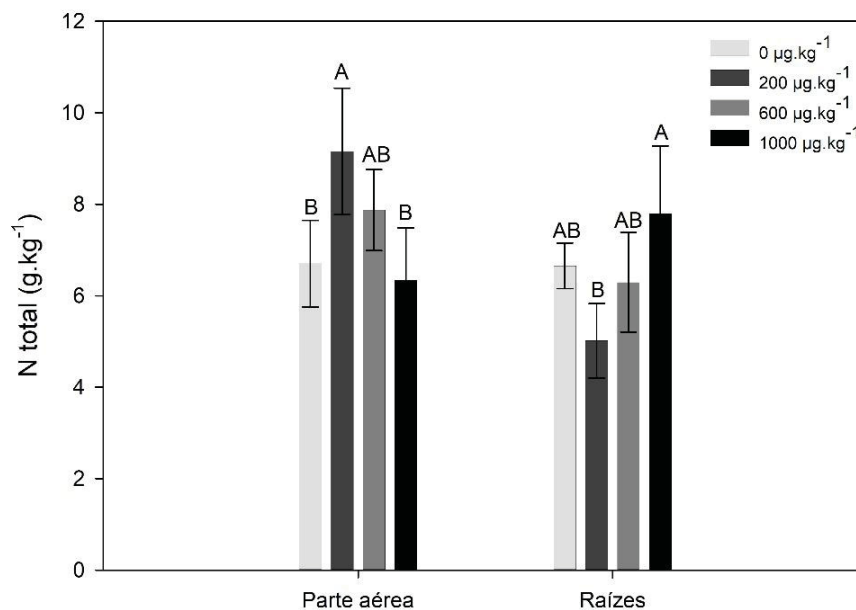
Fonte: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 10 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Os ureídeos totais (alantoína e alantoato) são as principais formas orgânicas de N transportado em algumas leguminosas tropicais - como a soja (LESCANO, 2020), sendo que cada molécula contém 4 átomos de N (OHYAMA et al., 2017). Portanto, alterações nas concentrações de ureídeos podem significar um baixo suprimento de N para a parte aérea da soja. Entretanto, o resultado da análise das concentrações de nitrogênio, mostrados na FIGURA 13, não confirmam essa hipótese. Apesar de apresentarem menor atividade da nitrogenase e menor concentração de ureídeos nas folhas, a concentração de N na parte aérea não diferenciou entre as plantas tratadas com concentrações de enrofloxacino $\geq 600 \text{ mg.kg}^{-1}$ e controle, sendo inclusive maior nas plantas do tratamento com 200 mg.kg^{-1} . Isso indica que a nutrição nitrogenada das plantas não está restrita à associação

simbiótica e que as raízes continuam a obter nitrogênio do solo. De fato, mesmo quando noduladas, as raízes das plantas continuam a importar nitrato, amônio e outros compostos nitrogenados do solo (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). A ausência de efeitos do antimicrobiano no crescimento radicular (uma vez que a massa seca das raízes não foi afetada), indica que as plantas continuaram a explorar e obter nitrogênio do solo, garantindo seu suprimento para a parte aérea.

FIGURA 13 – CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL EM RAÍZES (A) E PARTE AÉREA (B) DE PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)



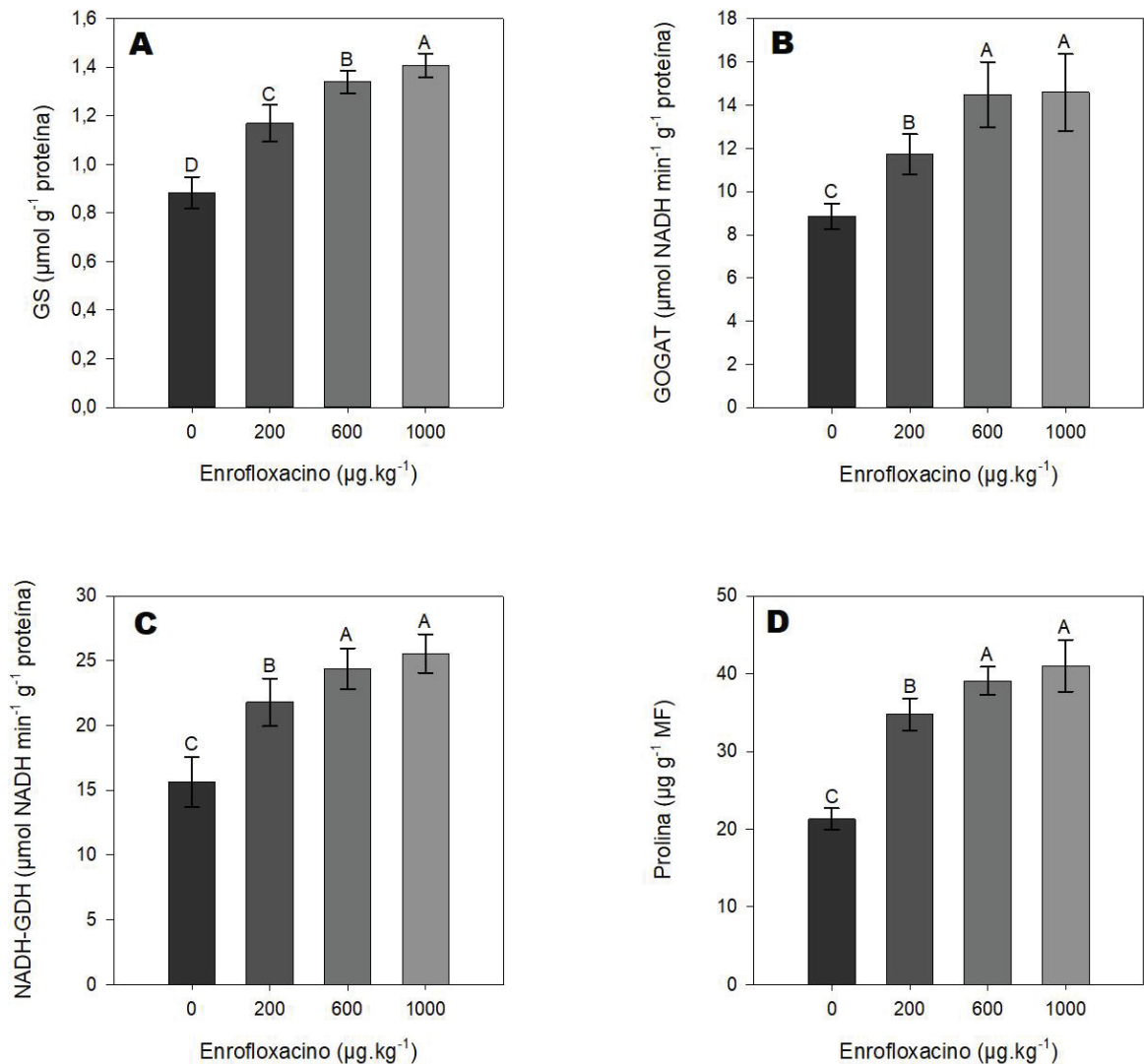
Fonte: A autora (2021)

LEGENDA Barras representam a média \pm o desvio padrão de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Os teores de N da parte aérea do tratamento de 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram mais altos quando comparados com o tratamento de 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, enquanto os teores de N radicular exibiram um comportamento inverso: mais altos na concentração de 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ quando comparados com a de 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Isso pode indicar que há uma menor translocação de N das raízes para a parte aérea em 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. O índice de translocação (razão entre o N da parte aérea e o N radicular) foi de 0,62 para 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e de 1,82 para 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, um número quase três vezes mais alto. Um menor transporte de nitrogênio via xilema pode ser uma estratégia da planta para evitar danos causados pelo antimicrobiano às raízes. Antimicrobianos da classe das

fluoroquinolonas podem induzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos compartimentos celulares, levando a planta ao estresse oxidativo (GOMES et al., 2017a; NUNES et al., 2019; RIAZ et al., 2017). No entanto, os vegetais possuem um mecanismo de defesa, denominado sistema antioxidante, que desempenha um papel fundamental na limpeza das EROs. Os principais integrantes do sistema antioxidante são enzimas e aminoácidos, que irão agir de forma a inibir ou minimizar os possíveis danos causados pelas EROs (NETWORKS; AHMAD, 2014). Portanto, a quantidade mais elevada de enrofloxacino disponibilizada às raízes de plantas cultivadas em solo contaminado com 1000 μg enrofloxacino kg^{-1} pode demandar uma maior síntese desses compostos nitrogenados no sistema radicular. Ressalta-se também que todas as enzimas do metabolismo de N analisadas neste estudo exibiram maior atividade nas folhas de plantas submetidas a enrofloxacino, sendo que a GS foi maior em 1000 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ ($F= 46,2171$; $p<0,001$), enquanto GOGAT ($F=17,1709$; $p<0,001$) e GDH ($F=22,9947$; $p<0,001$) foram maiores em 600 e 1000 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$. A prolina, aminoácido relacionado ao estresse, também demonstrou um aumento relevante nas folhas a partir de 200 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ ($F= 21,8650$; $p<0,001$) (FIGURA 14).

FIGURA 14 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS GS (A), GOGAT(B), NADH-GDH (C) E TEOR DE PROLINA (D) EM FOLHAS DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)



Fonte: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 10 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Aumento nos níveis de prolina está relacionado à proteção oxidativa (GOMES et al., 2017b). A síntese deste composto é estimulada por condições que induzem aumento da concentração intracelular de EROS (SOSHINKOVA et al., 2012). Embora possa ser sintetizada da ornitina, em condições de estresse, a prolina é principalmente produzida via glutamato (HARE; CRESS, 1997). Considerando que uma maior síntese de prolina implica em uma maior necessidade por glutamato (seu precursor), justifica-se o aumento nos níveis de glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), que agem em conjunto incorporando o NH_4 à glutamina, que depois é convertida a

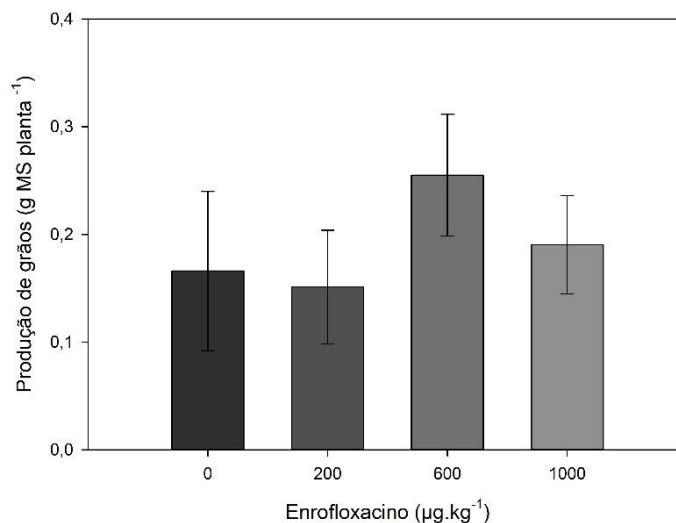
glutamato. Além disso, embora a glutamato desidrogenase (GDH) desempenhe um papel catabólico para desaminação de glutamato, em condições de elevada demanda de prolina, a atividade da GDH é induzida, funcionando no anabolismo de glutamato (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015), similarmente ao observado nas plantas tratadas com enrofloxacino.

Neste trabalho, o estresse provocado pelas concentrações de enrofloxacino entre $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ parece ter sido contido pelo sistema antioxidante ao ponto de não causar danos estruturais às plantas, de acordo com os dados de crescimento da FIGURA 7. No entanto, é importante considerar que esse estudo considera a presença de uma única molécula no ambiente, o que não ocorre em condições reais. Sabe-se que o ecossistema rural recebe uma alta carga de contaminantes, seja na forma de elementos traço, pesticidas ou medicamentos, que juntos podem apresentar um comportamento sinérgico, desfavorecendo a produção vegetal (GOMES et al., 2019).

4.5.3 Produção de grãos e massa seca ao final do ciclo

A produção de grãos (FIGURA 15) e a massa seca da soja ao final do ciclo de cultivo (FIGURA 16) não foram significativamente afetadas pela presença do antimicrobiano ($p>0,05$).

FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE GRÃOS DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 e $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$)

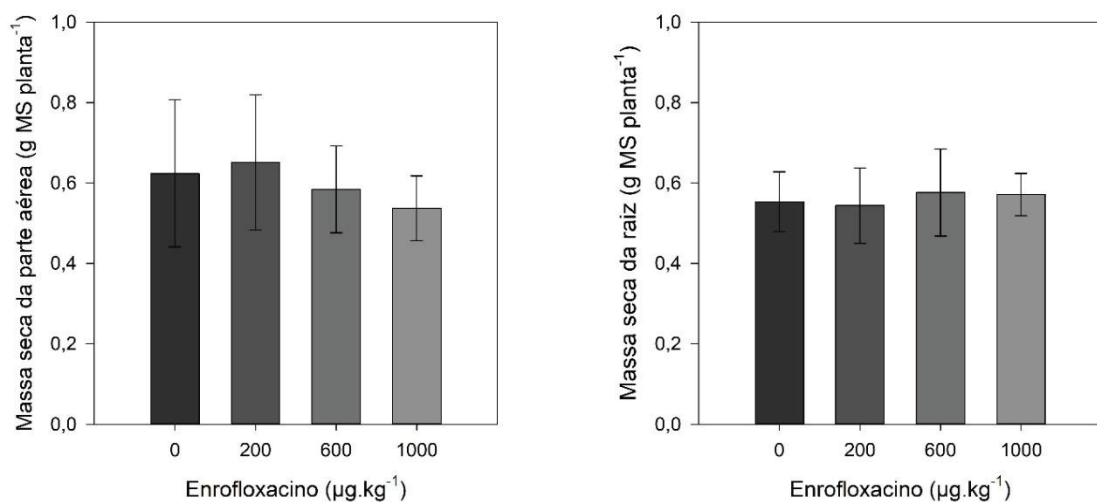


Fonte: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 5 repetições.

Marques et al. (2021) relataram uma queda de 47% na produção de soja submetida a irrigação com água contaminada por enrofloxacino ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$). No entanto, seu experimento se deu em substrato de areia e vermiculita, o qual proporciona total disponibilidade do antimicrobiano (MARQUES et al., 2021). Em contrapartida, no presente estudo, a soja foi cultivada em um solo rico em matéria orgânica ($5,35\%$)³ e com uma CTC efetiva⁴ de $8 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ (TABELA 5). Logo, é possível que mecanismos de complexação ou adsorção tenham retido parte do xenobionte na fase sólida, evitando que a planta fosse exposta a níveis de antimicrobianos críticos ao seu desenvolvimento. Essa hipótese é validada pelos dados de Leal et al. (2013), que encontraram coeficientes de sorção (K_d) maiores que $4947,4 \text{ L.kg}^{-1}$ para enrofloxacino em 13 solos brasileiros, e de Teixidó et al. (2014), que comprovaram a duplicação da sorção dessa molécula em solos que receberam 5% de ácidos húmicos.

FIGURA 16 - MASSA SECA DA PARTE AÉREA (A) E RAIZ (B) AO FINAL DO CICLO DAS PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (0, 200, 600 E 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)



Fonte: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 10 repetições.

Esse também pode ser o motivo para não terem sido detectadas diferenças na massa seca das plantas ao final do ciclo. Mukhtar et al. (2020), demonstrou que a

³ Estimativa baseada nos teores médios de carbono da matéria orgânica do solo

⁴ Soma dos cátions que podem ser trocados nos complexos de carga do solo (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} e Al^{3+})

adição de diferentes fontes de matéria orgânica (casca de arroz, esterco e cama de aves) reduzem os efeitos fitotóxicos de fluoroquinolonas como o ciprofloxacino, levofloxacino e ofloxacino (10 mg.kg^{-1}) sobre a massa seca tanto de raízes, quanto da parte aérea em plantas de arroz (*Oryza sativa*) (MUKHTAR et al., 2020).

Ressalta-se também a importância do efeito mitigatório conferido pela relação microssimbiótica visualizada em plantas expostas a outros xenobiontes, como pesticidas e metais (NEMAT et al., 2020; SHAHID; KHAN, 2019). Nemat et al. (2020) dissertam que a inoculação com *B. japonicum* aumentou a atividade de enzimas antioxidantes, fenólicos e flavonoides que aliviaram o estresse por cromo hexavalente em *Capsicum annum*. De acordo com Shahid e Khan (2019), estirpes de *B. japonicum* com capacidade para degradar fungicidas podem ser utilizadas inclusive na remediação de solos contaminados por essa classe de agrotóxicos. Neste estudo, a presença do simbiote pode ter protegido as plantas de soja dos danos à produção, o que não ocorreu no estudo de Marques et al. (2021), onde as plantas não foram inoculadas.

Apesar dos caracteres produtivos não terem sido alterados, a composição nutricional dos grãos pode ter sido afetada. Mukhtar et al. (2020) observou um decréscimo significativo no teor de proteína de grãos de arroz submetidos a ciprofloxacino (10 mg.kg^{-1}). A soja, principal fonte de proteína vegetal na alimentação humana e animal, deve apresentar padrões mínimos de proteína bruta. O não atendimento desses requisitos pode impedir a comercialização, além de representar perdas em qualidade e em valor nutritivo (HIRAKURI et al., 2018). No entanto esses atributos não foram avaliados neste trabalho.

4.5.4 Quantificação de químicos

4.5.4.1 Solo

As concentrações de enrofloxacino no solo variaram conforme o tempo, sendo que no período inicial (logo após a aplicação) detectou-se a maior concentração e no período final (60 dias depois) a menor, para todos os tratamentos ($F=60,2571$; $p<0,001$) (TABELA 6; FIGURA 17).

TABELA 6 - TESTE F DA ANOVA DE DUAS VIAS PARA TRATAMENTOS (200, 600 E 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) E TEMPO DE APLICAÇÃO (0, 45 E 60 DIAS)

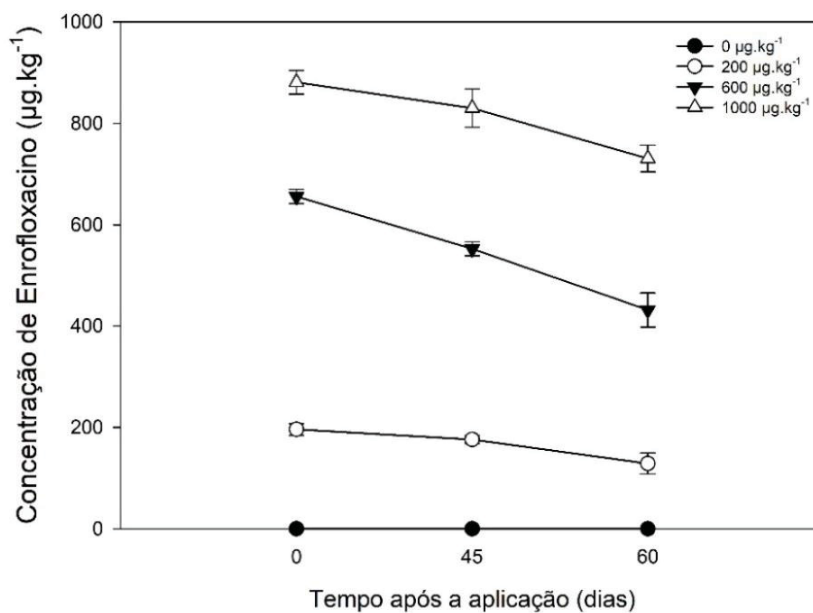
Fonte de variação	G.L.	Teste F
Tratamento	2	562,3714***
Tempo	1	60,2571***
Tratamento x Tempo	2	0,0857

G.L. – graus de liberdade; *** significativo a 0,01%

Fonte: A autora (2021)

A molécula de enrofloxacino foi persistente no solo analisado, sendo que a concentração detectada ao final de 60 dias foi equivalente a, no mínimo, 2/3 da concentração aplicada inicialmente (FIGURA 17).

FIGURA 17 - VARIAÇÃO TEMPORAL DAS CONCENTRAÇÕES DE ENROFLOXACINO NA RIZOSFERA DE PLANTAS DE SOJA



Fonte: A autora

LEGENDA: Os pontos correspondem à média \pm o desvio padrão de 5 repetições.

Jechalke et al. (2014) mostraram que a persistência de fluoroquinolonas no solo pode variar de meses a anos, e que o tempo favorece seu acúmulo nesse ambiente. De fato, Parente et al. (2019) verificaram uma elevação na concentração de enrofloxacino e ciprofloxacino em solos fertilizados com cama de aves após um

intervalo de oito meses. Albero et al. (2018), avaliando a persistência de antimicrobianos a um solo com e sem adubação orgânica, verificaram que aproximadamente 70% dos resíduos de fluoroquinolonas permaneciam na matriz sólida mesmo após 90 dias de incubação. O comportamento das fluoroquinolonas no ambiente está mais associado à sorção do que à degradação biótica ou abiótica (RIAZ et al., 2018).

A fotodegradação é o principal mecanismo abiótico de degradação de fluoroquinolonas (LIN et al., 2010). Segundo Sturini et al. (2012), a exposição a luz solar pode promover a degradação de até 80% do enrofloxacino em amostras de solo. Entretanto, a fotólise se restringirá às camadas mais superficiais do solo, visto que a presença de luz é limitada em profundidades maiores que 5 mm (OZAKI et al., 2021). Além disso, a fotodegradação elimina apenas as cadeias laterais e não o anel fluoroquinolona do enrofloxacino, ao qual se associam os efeitos biológicos da molécula (STURINI et al., 2012). Logo, os riscos aos organismos não-alvo permanecem. No que diz respeito a biodegradação, essa ocorre fundamentalmente por fungos lignolíticos presentes no solo, que possuem um grande arsenal enzimático capaz de biotransformar poluentes por oxidação/redução e conjugação (RUSCH et al., 2019). A própria planta também é capaz de degradar antimicrobianos, através da atividade do citocromo P450 (GOMES et al., 2019).

Parte do enrofloxacino aplicado também foi perdido do solo através da absorção radicular, visto que o antimicrobiano foi detectado em todos os órgãos da planta (FIGURA 18 e 19).

4.5.4.2 Plantas

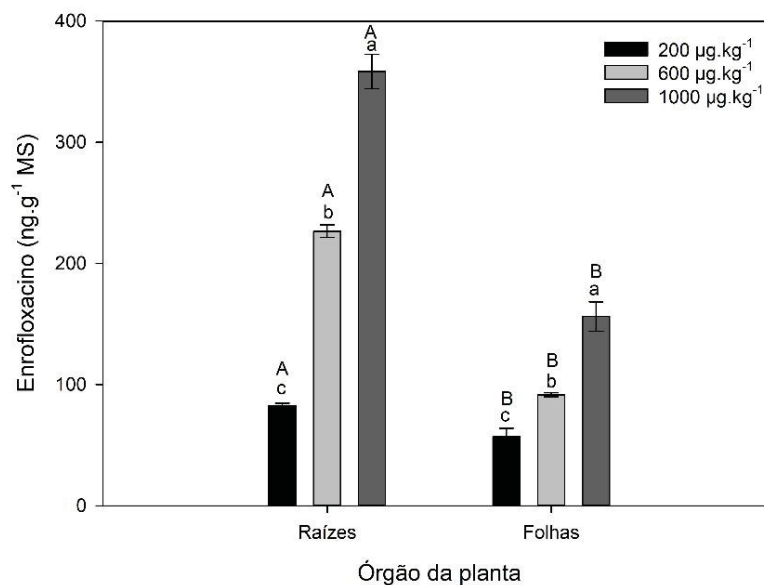
Ainda que o experimento demonstre o potencial de sorção do enrofloxacino à matriz sólida, a presença de concentrações de até 560,85 ng.g⁻¹ nas folhas, 358 ng.g⁻¹ nas raízes e 55,35 ng.g⁻¹ nos grãos indicam que o fármaco esteve disponível na solução do solo, sendo passível de absorção, translocação e acúmulo nos tecidos vegetais (FIGURA 17 e 18).

A presença de concentrações de fluorquinolonas em raízes, folhas e grãos de diferentes espécies agrícolas já foi descrita por diversos autores (CHUNG et al., 2017; EGGEN et al., 2011; KIPPER et al., 2010; LILLENBERG et al., 2010; MIGLIORE;

COZZOLINO; FIORI, 2003). Porém, os estudos envolvendo grandes culturas como a soja ainda são escassos.

No estágio R3, as raízes acumularam mais enrofloxacino do que as folhas em todos os tratamentos ($F=112,50$; $p<0,001$), sendo que o tratamento de $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ acumulou mais que o de 200 e que o de $600 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ($F=175,50$; $p<0,001$) (FIGURA 18).

FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO DE ENROFLOXACINO NAS RAÍZES E FOLHAS DE SOJA CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO (200 , 600 e $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$)



Fonte: A autora (2021)

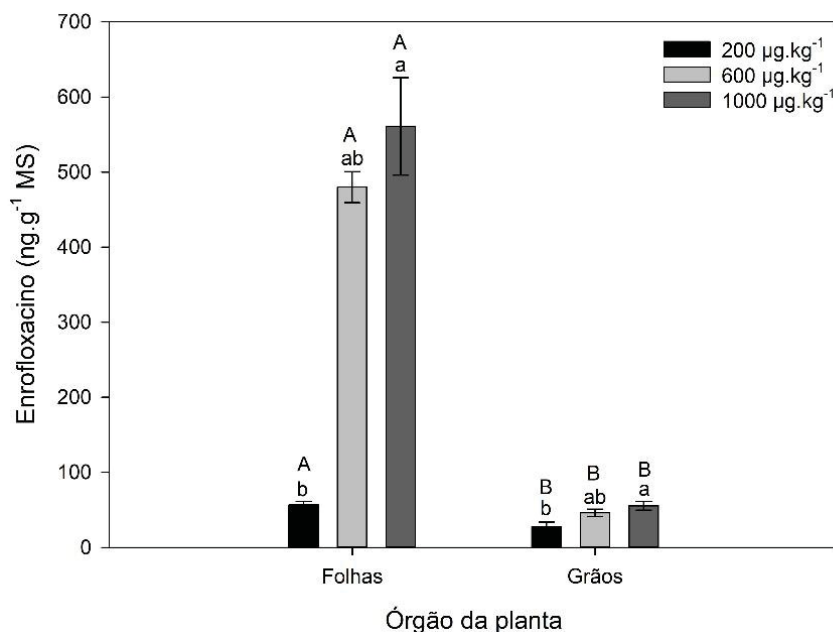
LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 10 repetições. Letras minúsculas representam diferenças significativas entre os tratamentos (200 , 600 e $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ enrofloxacino) no mesmo órgão, enquanto letras maiúsculas representam diferenças significativas entre diferentes órgãos (raízes e folhas) dentro do mesmo tratamento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

A revisão realizada por Rocha et al. (2021) revelou que as raízes são o principal sítio de acúmulo de antimicrobianos, assim como os resultados encontrados para enrofloxacino por Migliore, Cozzolino e Fiori (2003) em feijão, Gomes et al. (2020) em milho e Marques et al. (2021) em soja. A absorção de antimicrobianos é influenciada pela transpiração, sendo que o aumento das taxas transpiratórias proporcionam um maior acúmulo de xenobiontes na parte aérea dos vegetais (DODGEN et al., 2015). Sabendo que a transpiração das plantas corresponde à perda de água na forma de vapor (TAIZ et al., 2017), é possível que a menor massa fresca

e a maior concentração de enrofloxacino encontradas no tratamento de $600 \mu\text{g.kg}^{-1}$ estejam positivamente correlacionadas.

Ao final do ciclo da cultura (estádio R8), comparou-se o acúmulo em folhas e grãos. Visualizou-se um maior acúmulo nas folhas do que os grãos para os três tratamentos ($F=106,58$; $p<0,001$), e as concentrações nas folhas e nos grãos foram maiores em $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ do que em $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$, que não diferiram de $600 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ($F=27,78$; $p<0,001$) (FIGURA 20).

FIGURA 19 – CONCENTRAÇÃO DE ENROFLOXACINO NAS FOLHAS E GRÃOS DE SOJA CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO POR ENROFLOXACINO ($200, 600$ e $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$)



Fonte: A autora (2021)

LEGENDA: Barras representam a média \pm o desvio padrão de 10 repetições. . Letras minúsculas representam diferenças significativas entre os tratamentos ($200, 600$ e $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ enrofloxacino) no mesmo órgão, enquanto letras maiúsculas representam diferenças significativas entre diferentes órgãos (raízes e folhas) dentro do mesmo tratamento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância ($p<0,05$).

A detecção de concentrações de enrofloxacino acima de $27,57 \text{ ng.g}^{-1}$ em tecidos vegetais comestíveis serve de alerta para a inserção dessa molécula na cadeia alimentar. Entidades de saúde de todo o mundo já reconhecem os riscos associados à presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal, que podem desencadear desde alergias, a infecções gastrointestinais e intoxicações agudas ou crônicas (POŹNIAK et al., 2020). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu em legislação um Limite Máximo de

Resíduo (LMR) e Ingestão Diária Aceitável (IDA) de enrofloxacino em tecidos musculares de diferentes espécies⁵, sendo que o LMR foi definido em 100 µg.kg⁻¹ e o IDA em 0,6 µg.kg⁻¹ (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019). Isso significa que uma pessoa de 60 kg poderia ingerir até 36 µg de enrofloxacino por dia, sem efeitos adversos à saúde. Considerando o pior cenário desse estudo, seria necessário que este indivíduo hipotético se alimentasse de 650,4 g de grãos de soja por dia para atingir o IDA. No entanto, é importante considerar que o antimicrobiano pode ser oriundo de outras fontes alimentícias como carnes, leite, ovos, olerícolas, grãos e até mesmo da água potável (CHANDER et al., 2016; LILLENBERG et al., 2010; TADIĆ et al., 2021; TEGLIA et al., 2021; VERMA et al., 2020), aumentando a somatória diária. Além disso, a exposição contínua a subdoses de antimicrobianos gera pressão de seleção em bactérias causadoras de doenças, que passarão a ser insensíveis aos tratamentos convencionais, caracterizando a resistência (FLETCHER, 2015). Esse fenômeno está associado a gastos de 1,5 bilhões de euros e responsável por 25 mil mortes anuais, apenas na União Europeia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Por isso, é fundamental o desenvolvimento de medidas regulatórias que limitem a presença de antimicrobianos nos fertilizantes orgânicos, na água destinada a irrigação ou abastecimento e também nos alimentos de origem vegetal. Deve-se frisar a essencialidade das boas práticas na produção animal, com o controle do uso desses medicamentos e manejo dos resíduos destinados à adubação. Outro ponto é a necessidade de mais estudos abordando a dinâmica desses compostos no ambiente, bem como sua interação com o sistema solo-planta e organismos não-alvo (KUPPUSAMY et al., 2018).

⁵ Bovinos, equinos, suínos, caprinos, ovinos, aves e peixes.

4.6 CONCLUSÕES

A presença de enrofloxacino no solo utilizado para cultivo de soja afetou a nodulação, reduzindo o número de nódulos por planta, a atividade da enzima nitrogenase e o teor de ureídeos totais nas folhas. O metabolismo de nitrogênio também foi alterado, com restrição na translocação do nitrogênio das raízes para a parte aérea. Também houve um aumento da atividade das enzimas GS, GOGAT e NADH-GDH, possivelmente em resposta ao aumento da prolina, proveniente da assimilação do glutamato. A elevação nos níveis de prolina indica um possível estresse oxidativo gerado pelo antimicrobiano, embora os danos possam ter sido contidos, já que nem altura, nem massa seca e nem produção de grãos das plantas de soja foram prejudicadas.

Apesar de não terem sido constatadas perdas produtivas, detectou-se a presença de até 55,3 ng.g⁻¹ de enrofloxacino nos grãos de soja, comumente destinados ao consumo humano e animal. No solo, o antimicrobiano também foi encontrado, se mostrando persistente por mais de 60 dias, com níveis de degradação inferiores a 34%.

Esse trabalho traz à tona a importância e a necessidade de se desenvolverem mais estudos envolvendo a interferência dos antimicrobianos sobre organismos não-alvo, que executam funções ecológicas essenciais aos biosistemas. A fixação biológica de nitrogênio deve receber atenção especial, pois é um processo ambientalmente seguro e economicamente viável para o fornecimento de um dos nutrientes mais exigidos nos campos de produção do Brasil.

Por fim, esse estudo serve também como um alerta, tanto para o acúmulo desses químicos nas matrizes ambientais quanto para sua inserção na cadeia trófica, que pode acarretar, dentre outros problemas, na seleção de bactérias resistentes e no desenvolvimento de resistência bacteriana.

4.7 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa nº51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Brasília, Brasil, 2019. p. 98.

ALBERO, Beatriz et al. Science of the Total Environment Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 643, p. 1562–1570, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.314>>

ARACHCHIGE, Pavithra S. Pitumpe et al. Temporal biological nitrogen fixation pattern in soybean inoculated with Bradyrhizobium. **Agrosystems, Geosciences & Environment**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. e20079, 2020. Disponível em: <<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/agg2.20079>>. Acesso em: 10 jul. 2021.

ARSENEAULT, Tanya; FILION, Martin. Biocontrol through antibiosis: exploring the role played by subinhibitory concentrations of antibiotics in soil and their impact on plant pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 267–274, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2017.1354335>>

BIJAY, K. S.; DALE, L. S. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Science Society of America**, [s. l.], v. 12, p. 527–530, 1998.

BUCHANAN, Bob B. Fotossíntese: Reações de Carboxilação. In: TAIZ, Lincoln et al. (Eds.). **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6a ed. [s.l.] : Artmed, 2017. p. 888.

BUCHANAN, Bob B.; GRUISSEM, Wilhelm.; JONES, Russell L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2nd. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015.

CHANDER, Vikas et al. Pharmaceutical compounds in drinking water. **Journal of Xenobiotics**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–7, 2016.

CHANG, Woo-Suk; HAE-IN, Lee; HUNGRIA, Mariangela. Soybean Production in the Americas. In: **Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. p. 1–448.

CHUNG, Hyung Suk et al. Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 605–606, p. 322–331, 2017.

COLE, Michael A.; ELKAN, Gerald H. Transmissible Resistance to Penicillin G, Neomycin, and Chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 248, 1973. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC444536/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/abstract/PMC444536/)>. Acesso em: 25 jul. 2021.

- CYCOŃ, Mariusz; MROZIK, Agnieszka; PIOTROWSKA-SEGET, Zofia. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. MAR, 2019.
- DEVRIES, Stephanie L.; ZHANG, Pengfei. Antibiotics and the Terrestrial Nitrogen Cycle: A Review. **Current Pollution Reports**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 51–67, 2016.
- DÖBEREINER, Johanna; FRANCO, Avilio A.; GUZMÁN, Iván. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 155–161, 1970.
- DODGEN, Laurel K. et al. Effect of transpiration on plant accumulation and translocation of PPCP/EDCs. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 198, p. 144–153, 2015.
- EGGEN, Trine et al. Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. **Chemosphere**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 26–33, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.041>>
- FERNANDES JÚNIOR, Paulo Ivan; REIS, Veronica Massena. Algumas Limitações à Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas. **Embrapa Agrobiologia - Documentos**, [s. l.], v. 252, p. 40, 2008.
- FLETCHER, Stephanie. Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. **Environmental Health and Preventive Medicine 2015 20:4**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 243–252, 2015. Disponível em: <<https://environhealthprevmed.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12199-015-0468-0>>. Acesso em: 6 jul. 2021.
- GARCÍA OVANDO, H. .. et al. Simultaneous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle. **Archivos de Medicina Veterinaria**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 93–98, 2004. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013753011>>. Acesso em: 30 jun. 2021.
- GIGUÈRE, Steeve; DOWLING, Patricia M. Fluoroquinolones. In: **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5th. ed. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2013. p. 704.
- GOMES, M. P. et al. Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 328, p. 140–149, 2017. a.
- GOMES, M. P. et al. **Glyphosate-dependent inhibition of photosynthesis in willow** **Frontiers in Plant Science**, 2017. b.
- GOMES, M. P. et al. Enrofloxacin and Roundup® interactive effects on the aquatic macrophyte *Elodea canadensis* physiology. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 249, p. 453–462, 2019.
- GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Responses of the nitrogen-fixing aquatic fern *Azolla* to water contaminated with ciprofloxacin: Impacts on biofertilization. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 232, p. 293–299, 2017. c.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Emerging contaminants in water used for maize irrigation: Economic and food safety losses associated with ciprofloxacin and glyphosate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 196, n. March, p. 110549, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110549>>

GROAT, R. Gene; VANCE, Carroll P. Root Nodule Enzymes of Ammonia Assimilation in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 1198–1203, 1981. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16661836/>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, [s. l.], v. 21, p. 79–102, 1997.

HIRAKURI, Marcelo Hiroshi et al. **Análise de aspectos econômicos sobre a qualidade de grãos de soja no Brasil** Circular Técnica 145 Londrina EMBRAPA, , 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/187998/1/CIRCULAR-TECNICA-145.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; MENDES, I. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja componente essencial para a competitividade de produto brasileiro. **Documentos - EMBRAPA Soja**, [s. l.], p. 80, 2007.

HUNGRIA, M.; MENDES, I.; MERCANTE, F. **A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono para as culturas do feijoeiro e da soja**. Londrina Embrapa Soja, , 2013.

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, Iêda Carvalho. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. **Circular Técnica - EMBRAPA Soja**, [s. l.], v. 35, p. 48, 2001.

HUNGRIA, Mariangela; MENDES, Iêda Carvalho. **Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis?** [s.l: s.n.]. v. 2–2

HUNGRIA, Mariangela; VARGAS, Milton A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, [s. l.], v. 65, n. 2–3, p. 151–164, 2000.

JECHALKE, Sven et al. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 536–545, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>>

JIN, Caixia; CHEN, Æ. Qiuying; SUN, Æ. Ruilian. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium , sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat , Chinese cabbage and tomato. [s. l.], p. 878–885, 2009.

KIPPER, Karin et al. Plant uptake of some pharmaceuticals commonly present in sewage sludge compost. **ICBEE 2010 - 2010 2nd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, Proceedings**, [s. l.], n. Icbec, p. 261–264, 2010.

KIRCHHELLE, Claas. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). **Palgrave Communications**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1057/s41599-018-0152-2>>

KOVALAKOVA, Pavla et al. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 251, p. 126351, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>>

KÜMMERER, K. Emerging Contaminants. In: **Treatise on Water Science**. [s.l.] : Elsevier, 2011. v. 3p. 69–87.

KUPPUSAMY, Saranya et al. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, [s. l.], v. 257, n. January, p. 47–59, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.026>>

LEAL, Rafael Marques Pereira et al. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. **Chemosphere**, [s. l.], v. 92, n. 8, p. 979–985, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.018>>

LESCANO, Ignacio. Determination of Ureides Content in Plant Tissues. **Bio-protocol**, [s. l.], v. 10, n. 11, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33659312/>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

LILLENBERG, M. et al. Enrofloxacin and Ciprofloxacin Uptake by Plants from Soil. **Agronomy Research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 807–814, 2010.

LIN, Juo Shan et al. Effects of light and microbial activity on the degradation of two fluoroquinolone antibiotics in pond water and sediment. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 456–465, 2010.

LINDSTRÖM, Kristina; MOUSAVI, Seyed Abdollah. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1314–1335, 2020. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.13517>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

LUKASZEVICZ, Paulina et al. Impact of Veterinary Pharmaceuticals on the Agricultural Environment: A Re-Inspection. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], p. 60, 2016.

MAGUE, T. H.; BURRIS, R. H. REDUCTION OF ACETYLENE AND NITROGEN BY FIELD-GROWN SOYBEANS. **New Phytologist**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 275–286, 1972. Disponível em: <<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-8137.1972.tb04074.x>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

MARQUES, Raizza Zorman et al. Crop irrigation (soybean, bean, and corn) with enrofloxacin-contaminated water leads to yield reductions and antibiotic accumulation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 216, n. March, p. 112193, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651321003043>>

MARSCHNER, Petra. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3rd. ed. USA: Elsevier, 2012.

MIGLIORE, Luciana; COZZOLINO, Salvatore; FIORI, Maurizio. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. [s. l.], v. 52, p. 1233–1244, 2003.

MUKHTAR, Ayesha et al. Phytotoxicity of different antibiotics to rice and stress alleviation upon application of organic amendments. **Chemosphere**, [s. l.], v. 258, p. 127353, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127353>>

NEMAT, Hafsa et al. Ameliorative effect of co-application of Bradyrhizobium japonicum EI09 and Se to mitigate chromium stress in Capsicum annum L. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1780412>, [s. l.], v. 22, n. 13, p. 1396–1407, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15226514.2020.1780412>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

NETWORKS, Antioxidant; AHMAD, Parvaiz. **Oxidative Damage to Plants**. [s.l: s.n.].

NUNES, Bruno et al. Evaluation of physiological changes induced by the fluoroquinolone antibiotic ciprofloxacin in the freshwater macrophyte species Lemna minor and Lemna gibba. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 72, p. 103242, 2019.

OAKS, Ann et al. Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. **Planta** 1980 **148:5**, [s. l.], v. 148, n. 5, p. 477–484, 1980. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02395318>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

OHYAMA, Takuji et al. Amino Acid Metabolism and Transport in Soybean Plants. In: TOSHIKI ASAO (Ed.). **Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal**. [s.l.] : IntechOpen, 2017. p. 171–196.

OLIVEIRA, Sebastião A. De. Método colorimétrico para a determinação de nitrogênio em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 645–649, 1981. Disponível em: <<https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/17044>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

OPRIS, Ocsana et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Influence of nine antibiotics on key secondary metabolites and physiological characteristics in Triticum aestivum : Leaf volatiles as a promising new tool to assess toxicity Ocsana Opris. [s. l.], v. 87, p. 70–79, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance** Sixty-eight World Health Assembly Genebra, 2015.

OSTERMANN, Anne et al. Symbiotic Nitrogen Fixation in Soil Contaminated with the Veterinary Antibiotics Oxytetracycline and Sulfamethazine. **Journal of Environmental Quality**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 1067–1073, 2019.

OZAKI, Noriatsu et al. Photodegradation of fragrance materials and triclosan in water: Direct photolysis and photosensitized degradation. **Environmental Technology & Innovation**, [s. l.], v. 23, p. 101766, 2021. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352186421004144>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

PARENTE, Cláudio E. T. et al. Fluoroquinolones in agricultural soils: Multi-temporal variation and risks in Rio de Janeiro upland region. **Chemosphere**, [s. l.], v. 219, p. 409–417, 2019.

POŹNIAK, Błażej et al. The influence of age and body weight gain on enrofloxacin pharmacokinetics in turkeys—Allometric approach to dose optimization. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 67–78, 2020.

RACHIM, M. A.; NICHOLAS, D. J. D. Glutamine synthetase and glutamate synthase from *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 2541–2548, 1985.

RIAZ, Luqman et al. Physiological and antioxidant response of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings to fluoroquinolone antibiotics. **Chemosphere**, [s. l.], v. 177, p. 250–257, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.033>>

RIAZ, Luqman et al. Fluoroquinolones (FQs) in the environment: A review on their abundance, sorption and toxicity in soil. **Chemosphere**, [s. l.], v. 191, p. 704–720, 2018.

ROCHA, Daiane Cristina et al. Veterinary antibiotics and plant physiology: An overview. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 767, 2021.

ROOSE-AMSALEG, Céline; LAVERMAN, Annet M. Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 4000–4012, 2015.

ROY, D. C. et al. Ciprofloxacin Residue in Marketed Pork of North-East India. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2019.

RUSCH, Marina et al. Degradation and transformation of fluoroquinolones by microorganisms with special emphasis on ciprofloxacin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 17, p. 6933–6948, 2019.

SALES, Cristina R. G. et al. Spectrophotometric Determination of RuBisCO Activity and Activation State in Leaf Extracts. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 1770, p. 239–250, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7786-4_14>. Acesso em: 29 jul. 2021.

SARTORIUS, Marilena et al. Sulphadimethoxine inhibits *Phaseolus vulgaris* root growth and development of N-fixing nodules. **Chemosphere**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 306–312, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.067>>

SHAHID, Mohammad; KHAN, Mohd Saghir. Fungicide tolerant Bradyrhizobium japonicum mitigate toxicity and enhance greengram production under hexaconazole stress. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s. l.], v. 78, p. 92–108, 2019.

SOSHINKOVA, T. N. et al. Proline and functioning of the antioxidant system in *Theilungiella salsuginea* plants and cultured cells subjected to oxidative stress. **Russian Journal of Plant Physiology** 2013 **60:1**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 41–54, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443713010093>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

SPIELMEYER, Astrid. Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments : A short review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 9, n. June, p. 76–86, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.06.004>>

STURINI, Michela et al. Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials Marbofloxacin and Enrofloxacin. **Chemosphere**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 130–137, 2012.

SUGAMOSTO, M. .. **Uso de Técnicas de Geoprocessamento para Elaboração de Mapa de Aptidão Agrícola e Avaliação da Adequação de Uso do Centro de Estações Experimentais do Canguiri, Município de Pinhais- Paraná**. 2002. Universidade Federal do Paraná, [s. l.], 2002.

SUN, Jiajun et al. Effects of oxytetracycline on the abundance and community structure of nitrogen-fixing bacteria during cattle manure composting. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 216, p. 801–807, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.060>>

TADIĆ, Đorđe et al. Occurrence and human health risk assessment of antibiotics and their metabolites in vegetables grown in field-scale agricultural systems. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 401, n. July, 2021.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l: s.n.]. v. 6 ed.

TALANO, Melina A. et al. Arsenic effect on the model crop symbiosis Bradyrhizobium–soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 63, p. 8–14, 2013.

TEGLIA, Carla M. et al. Determination of residual enrofloxacin in eggs due to long term administration to laying hens. Analysis of the consumer exposure assessment to egg derivatives. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 351, p. 129279, 2021.

TEIXIDÓ, Marc et al. Sorption of enrofloxacin and ciprofloxacin in agricultural soils: Effect of organic matter. **Adsorption Science and Technology**, [s. l.], v. 32, n. 2–3, p. 153–163, 2014.

TIMMERER, Ulrike et al. Toxic effects of single antibiotics and antibiotics in combination on germination and growth of *Sinapis alba* L. **Plants**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2020.

TORTOSA, Germán et al. Oxidative Stress Produced by Paraquat Reduces Nitrogen Fixation in Soybean-Bradyrhizobium diazoefficiens Symbiosis by Decreasing Nodule Functionality. **Nitrogen**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 30–40, 2021.

TROUCHON, Tessa; LEFEBVRE, Sebastien. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. **Open Journal of Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 40–58, 2016.

VERMA, M. K. et al. Screening of Enrofloxacin and Ciprofloxacin Residues in Chicken Meat by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Pharmaceutical Research International**, [s. l.], v. 32, n. 21, p. 64–69, 2020. Disponível em: <<https://www.journaljpri.com/index.php/JPRI/article/view/30753>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

ZHAO, Fangkai et al. Effects of land use and rainfall on sequestration of veterinary antibiotics in soils at the hillslope scale. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 260, p. 114112, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114112>>

5 CONCLUSÃO GERAL

Plantas de soja expostas ao enrofloxacino tanto via água de irrigação, quanto via solo, tiveram importantes processos fisiológicos alterados pelo xenobionte. No entanto, a produção de grãos só foi afetada quando as plantas foram expostas via água de irrigação. Apesar de ambos estudos terem demonstrado uma baixa degradação do antimicrobiano (até 34%), os processos de sorção e complexação proporcionados pela CTC e pela matéria orgânica do solo foram, possivelmente, o motivo pelo qual as plantas cultivadas nessa matriz não tiveram perdas de rendimento. A concentração de enrofloxacino nas raízes das plantas expostas via água de irrigação foi, no mínimo, 50 vezes maior do que via solo. Logo, é possível que a indisponibilização do antimicrobiano tenha proporcionado uma menor absorção radicular e, conseqüentemente, amenizado os efeitos deletérios à fotossíntese supostamente advindos do estresse oxidativo. Quando no solo, o antimicrobiano afeta o metabolismo de nitrogênio nas plantas, inclusive quanto à capacidade de fixação de N proveniente da simbiose com *Bradyrhizobium japonicum*. Entretanto, embora a atividade da nitrogenase, o teor de ureídeos e a translocação do nitrogênio da raiz para a parte aérea tenham sido menores no tratamento de 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, o crescimento e desenvolvimento vegetal não foram afetados, tendo suas necessidades supridas, provavelmente, por outras formas de N disponíveis no solo.

Em seu relatório “*Global Assessment of Soil Pollution – Summary for policy makers*”, publicado em 2021, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) reconhece a poluição do solo como uma ameaça à qualidade dos alimentos, da água e do ar, além de apontar a vulnerabilidade do ambiente e da saúde humana quando envolvidos nessa problemática. Segundo a FAO (2021), a poluição do solo é invisível aos olhos, mas proporciona graves conseqüências aos serviços ecossistêmicos. Portanto, a adoção de técnicas de manejo e conservação, que assegurem a integridade dos recursos naturais, são indispensáveis na garantia da diversidade e complexidade das comunidades microbianas, protegendo os principais responsáveis pela fertilidade do solo, pelo sequestro de carbono, pela manutenção dos ciclos biogeoquímicos e pela degradação de contaminantes como os antimicrobianos (FIERER, 2017; RUSCH et al., 2019). A preservação da estrutura dos agregados e da matéria orgânica do solo também atua na imobilização das moléculas,

mantendo-as sorvidas e/ou complexadas, impedindo sua bioacumulação nos níveis tróficos (YAN; HU; JING, 2012).

A exposição de plantas de soja à enrofloxacino, independente da via de contaminação e da matriz sólida utilizada, proporcionou o acúmulo do antimicrobiano em partes comestíveis da planta, com concentrações de até 78,15 ng.g⁻¹ nos grãos. Portanto, riscos associados à exposição contínua a subdoses dessa fluoroquinolona devem ser considerados, especialmente no que diz respeito à indução de resistência bacteriana e transferência de genes de resistência (FLETCHER, 2015).

Considerando a relevância do tema, sugere-se que mais pesquisas sejam feitas explorando o comportamento dos antimicrobianos veterinários no ambiente e seus efeitos a organismos não-alvo como as bactérias fixadoras de nitrogênio e as plantas de interesse agrícola, especialmente a soja. Além disso, é importante que os órgãos ambientais competentes ajam no desenvolvimento de políticas públicas voltadas ao controle da qualidade da água destinada a irrigação, adicionando os fármacos veterinários na lista de compostos a serem quantificados quanto a seu Valor Máximo Permitido, já existente para pesticidas, por exemplo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). A regulamentação de limites de antimicrobianos nos adubos orgânicos, que são os principais veículos de disseminação desses químicos no ambiente, também é necessária.

Finalmente, esse trabalho corrobora com os pareceres das agências internacionais sobre a necessidade do uso racional de antimicrobianos, incentivando as boas práticas na produção animal, bem como a utilização de técnicas alternativas, quando houverem. É imprescindível haver também o investimento em tecnologias de descontaminação das matrizes ambientais, que sejam eficientes e acessíveis, remediando os efeitos dos antimicrobianos nos ecossistemas.

6 REFERÊNCIAS

AGATHOKLEOUS, Evgenios; KITAO, Mitsutoshi; CALABRESE, Edward J. Human and veterinary antibiotics induce hormesis in plants : Scientific and regulatory issues and an environmental perspective. **Environment International**, [s. l.], v. 120, n. May, p. 489–495, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.035>>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico**. 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinolonas2.htm>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. In: 2018, **Anais...** [s.l: s.n.]

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa nº51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Brasília, Brasil, 2019. p. 98.

AL-GHEETHI, Adel A. S. et al. **Removal of heavy metals and antibiotics from treated sewage effluent by bacteriaClean Technologies and Environmental Policy** Springer Verlag, , 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10098-015-0968-z>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

ALBERO, Beatriz et al. Science of the Total Environment Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 643, p. 1562–1570, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.314>>

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. **Plants may be transmitting superbugs to people**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.sciencedaily.com/releases/2019/06/190623122530.htm>.

ARACHCHIGE, Pavithra S. Pitumpe et al. Temporal biological nitrogen fixation pattern in soybean inoculated with Bradyrhizobium. **Agrosystems, Geosciences & Environment**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. e20079, 2020. Disponível em: <<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/agg2.20079>>. Acesso em: 10 jul. 2021.

ARSENEAULT, Tanya; FILION, Martin. Biocontrol through antibiosis: exploring the role played by subinhibitory concentrations of antibiotics in soil and their impact on plant pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 267–274, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2017.1354335>>

BÁRTÍKOVÁ, Hana; PODLIPNÁ, Radka; SKÁLOVÁ, Lenka. Chemosphere Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. [s. l.], v. 144, p. 2290–2301, 2016.

- BIJAY, K. S.; DALE, L. S. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Science Society of America**, [s. l.], v. 12, p. 527–530, 1998.
- BLONDEAU, Joseph M. Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology**, [s. l.], v. 49, n. 2 SUPPL. 2, p. 1–6, 2004.
- BOXALL, Alistair B. A. et al. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 2288–2297, 2006.
- BOXALL, Alistair B. A. **New and Emerging Water Pollutants arising from Agriculture**. United Kingdom.
- BRASIL. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo** Brasília Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, , 2018.
- BRASIL. **Agropecuária brasileira em números** Brasília Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, , 2021.
- BUCHANAN, Bob B. Fotossíntese: Reações de Carboxilação. In: TAIZ, Lincoln et al. (Eds.). **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª ed. [s.l.] : Artmed, 2017. p. 888.
- BUCHANAN, Bob B.; GRUISSEM, Wilhelm.; JONES, Russell L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2nd. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015.
- CAMOTTI BASTOS, Marília et al. Antibiotics and microbial resistance in Brazilian soils under manure application. **Land Degradation and Development**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 2472–2484, 2018.
- CAMPAGNOLO, Enzo R. et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 299, n. 1–3, p. 89–95, 2002.
- CARVALHO, Isabel T.; SANTOS, Lúcia. Antibiotics in the aquatic environments : A review of the European scenario. **Environment International**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>>
- CHANDER, Vikas et al. Pharmaceutical compounds in drinking water. **Journal of Xenobiotics**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–7, 2016.
- CHANG, Woo-Suk; HAE-IN, Lee; HUNGRIA, Mariangela. Soybean Production in the Americas. In: **Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. p. 1–448.
- CHEN, Hui Ru et al. Assessment of veterinary drugs in plants using pharmacokinetic approaches: The absorption, distribution and elimination of tetracycline and sulfamethoxazole in ephemeral vegetables. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. e0183087, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183087>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

CHOWDHURY, Farzana; LANGENKÄMPER, Georg; GROTE, Manfred. Studies on uptake and distribution of antibiotics in red cabbage. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 61–69, 2016.

CHUNG, Hyung Suk et al. Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 605–606, p. 322–331, 2017.

COLE, Michael A.; ELKAN, Gerald H. Transmissible Resistance to Penicillin G, Neomycin, and Chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 248, 1973. Disponível em: </pmc/articles/PMC444536/?report=abstract>. Acesso em: 25 jul. 2021.

COLON, B.; TOOR, G. S. A Review of Uptake and Translocation of Pharmaceuticals and Personal Care Products by Food Crops Irrigated with Treated Wastewater. [s. l.], v. 140, 2016.

CYCOŃ, Mariusz; MROZIK, Agnieszka; PIOTROWSKA-SEGET, Zofia. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. MAR, 2019.

DEVRIES, Stephanie L.; ZHANG, Pengfei. Antibiotics and the Terrestrial Nitrogen Cycle: A Review. **Current Pollution Reports**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 51–67, 2016.

DÖBEREINER, Johanna; FRANCO, Avilio A.; GUZMÁN, Iván. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 155–161, 1970.

DODGEN, Laurel K. et al. Effect of transpiration on plant accumulation and translocation of PPCP/EDCs. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 198, p. 144–153, 2015.

EGGEN, Trine et al. Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. **Chemosphere**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 26–33, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.041>>

ELUK, D. et al. Effect of antibiotics on the germination and root elongation of argentine intensive crops. **International Journal of Environmental Research**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 471–480, 2016.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin **Official Journal of the European Union**, 2009. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf>

EXECUTIVE AGENCY FOR HEALTH AND CONSUMERS. Study on the environmental risks of medicinal products. [s. l.], n. December, 2013.

FAO. Meat market review. Overview of global meat market developments in 2020. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, [s. l.], n. December, p.

1–13, 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/ca3880en/ca3880en.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

FAO. **Global assessment of soil pollution**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations and the United Nations Environment Programme, 2021.

FERNANDES JÚNIOR, Paulo Ivan; REIS, Veronica Massena. Algumas Limitações à Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas. **Embrapa Agrobiologia - Documentos**, [s. l.], v. 252, p. 40, 2008.

FIERER, Noah. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 579–590, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>>

FLETCHER, Stephanie. Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. **Environmental Health and Preventive Medicine 2015 20:4**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 243–252, 2015. Disponível em: <<https://environhealthprevmed.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12199-015-0468-0>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

GACHANDE, B. D.; KHANSOLE, G. S. Morphological, Cultural and Biochemical Characteristics of *Rhizobium japonicum* syn and *Bradyrhizobium japonicum* of Soybean. **Bioscience Discovery**, [s. l.], v. 02, n. 1, 2011.

GADDE, U. et al. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. **Animal Health Research Reviews**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 26–45, 2017.

GARCÍA OVANDO, H. .. et al. Simultaneous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle. **Archivos de Medicina Veterinaria**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 93–98, 2004. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013753011>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

GIGUÈRE, Steeve; DOWLING, Patricia M. Fluoroquinolones. In: **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5th. ed. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2013. p. 704.

GIRARDI, Cristobal et al. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 198, p. 22–30, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.004>>

GOMES, M. P. et al. Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 328, p. 140–149, 2017. a.

GOMES, M. P. et al. **Glyphosate-dependent inhibition of photosynthesis in willow** **Frontiers in Plant Science**, 2017. b.

GOMES, M. P. et al. Enrofloxacin and Roundup® interactive effects on the aquatic macrophyte *Elodea canadensis* physiology. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 249, p. 453–462, 2019.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Responses of the nitrogen-fixing aquatic fern *Azolla* to water contaminated with ciprofloxacin: Impacts on biofertilization. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 232, p. 293–299, 2017. c.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Emerging contaminants in water used for maize irrigation: Economic and food safety losses associated with ciprofloxacin and glyphosate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 196, n. March, p. 110549, 2020. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110549>>

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Individual and combined effects of amoxicillin, enrofloxacin, and oxytetracycline on *Lemna minor* physiology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 203, n. March, 2020. b.

GROAT, R. Gene; VANCE, Carroll P. Root Nodule Enzymes of *Ammonia* Assimilation in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 1198–1203, 1981. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16661836/>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, [s. l.], v. 21, p. 79–102, 1997.

HERRIDGE, David F.; PEOPLES, Mark B.; BODDEY, Robert M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 311, n. 1–2, p. 1–18, 2008.

HIRAKURI, Marcelo Hiroshi et al. **Análise de aspectos econômicos sobre a qualidade de grãos de soja no Brasil** Circular Técnica 145 Londrina EMBRAPA, , 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/187998/1/CIRCULAR-TECNICA-145.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

HOAGLAND, D. R. ; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, [s. l.], v. 347, p. 32, 1950.

HOOPER, David C.; JACOBY, George A. Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. a025320, 2016. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; MENDES, I. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja componente essencial para a competitividade de produto brasileiro. **Documentos - EMBRAPA Soja**, [s. l.], p. 80, 2007.

HUNGRIA, M.; MENDES, I.; MERCANTE, F. **A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono para as culturas do feijoeiro e da soja**. Londrina Embrapa Soja, , 2013.

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, Iêda Carvalho. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. **Circular Técnica - EMBRAPA Soja**, [s. l.], v. 35, p. 48, 2001.

HUNGRIA, Mariangela; MENDES, Iêda Carvalho. **Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis?** [s.l.: s.n.]. v. 2–2. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>>

HUNGRIA, Mariangela; VARGAS, Milton A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, [s. l.], v. 65, n. 2–3, p. 151–164, 2000.

JAFFRÉZIC, A. et al. Veterinary pharmaceutical contamination in mixed land use watersheds: from agricultural headwater to water monitoring watershed. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 609, p. 992–1000, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.206>>

JANUSCH, Franziska et al. Determination of fluoroquinolones in chicken feces - A new liquid-liquid extraction method combined with LC-MS/MS. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 792–799, 2014.

JAYAMPATHI, Tharuka; ATUGODA, Thilakshani; JAYASINGHE, Chamila. **4. Uptake and accumulation of pharmaceuticals and personal care products in leafy vegetables**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00004-4>>

JECHALKE, Sven et al. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 536–545, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>>

JIN, Caixia; CHEN, A.E. Qiuying; SUN, A.E. Ruilian. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium, sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat, Chinese cabbage and tomato. [s. l.], p. 878–885, 2009.

JOUYBAN, A. Prediction of the optimized solvent composition for solubilization of drugs in water-cosolvent mixtures. **Pharmazie**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 190–198, 2007.

KIPPER, Karin et al. Plant uptake of some pharmaceuticals commonly present in sewage sludge compost. **ICBEE 2010 - 2010 2nd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, Proceedings**, [s. l.], n. Icbec, p. 261–264, 2010.

KIRCHHELLE, Claas. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). **Palgrave Communications**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1057/s41599-018-0152-2>>

KIRCHHELLE, Claas. **Pyrrhic progress: the history of antibiotics in Anglo-American food production**. New Brunswick.

KOVALAKOVA, Pavla et al. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 251, p. 126351, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>>

KÜMMERER, K. Emerging Contaminants. In: **Treatise on Water Science**. [s.l.] : Elsevier, 2011. v. 3p. 69–87.

KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>>

KUPPUSAMY, Saranya et al. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, [s. l.], v. 257, n. January, p. 47–59, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.026>>

KUYPERS, Marcel M. M.; MARCHANT, Hannah K.; KARTAL, Boran. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 263–276, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>>

LANGNER, Josana A. et al. Maize: Key agricultural crop in food security and sovereignty in a future with water scarcity. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 648–654, 2019.

LEAL, Rafael Marques Pereira et al. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. **Chemosphere**, [s. l.], v. 92, n. 8, p. 979–985, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.018>>

LESCANO, Ignacio. Determination of Ureides Content in Plant Tissues. **Bio-protocol**, [s. l.], v. 10, n. 11, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33659312/>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

LEWIS, Kathleen A. et al. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 1050–1064, 2016.

LILLENBERG, M. et al. Enrofloxacin and Ciprofloxacin Uptake by Plants from Soil. **Agronomy Research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 807–814, 2010.

LIN, Ching Erh et al. Electrophoretic behavior and pK a determination of quinolones with a piperaziny substituent by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1051, n. 1–2, p. 283–290, 2004.

LIN, Juo Shan et al. Effects of light and microbial activity on the degradation of two fluoroquinolone antibiotics in pond water and sediment. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 456–465, 2010.

LINDSTRÖM, Kristina; MOUSAVI, Seyed Abdollah. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1314–1335, 2020. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.13517>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

LIU, Meng-Jiao et al. Measurement and Correlation of the Solubility of Enrofloxacin in Different Solvents from (303.15 to 321.05) K. [s. l.], 2014.

LUKASZEVICZ, Paulina et al. Impact of Veterinary Pharmaceuticals on the Agricultural Environment: A Re-Inspection. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], p. 60, 2016.

MAGUE, T. H.; BURRIS, R. H. REDUCTION OF ACETYLENE AND NITROGEN BY FIELD-GROWN SOYBEANS. **New Phytologist**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 275–286, 1972. Disponível em: <<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-8137.1972.tb04074.x>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

MARQUES, Raizza Zorman et al. Crop irrigation (soybean, bean, and corn) with enrofloxacin-contaminated water leads to yield reductions and antibiotic accumulation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 216, n. March, p. 112193, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651321003043>>

MARSCHNER, Petra. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3rd. ed. USA: Elsevier, 2012.

MIGLIORE, Luciana; COZZOLINO, Salvatore; FIORI, Maurizio. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. [s. l.], v. 52, p. 1233–1244, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria 2.914 de 12 de Dezembro de 2011**, 2011.

MOULLAN, Norman et al. Tetracyclines disturb mitochondrial function across eukaryotic models: A call for caution in biomedical research. **Cell Reports**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1681–1691, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.034>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

MUKHTAR, Ayesha et al. Phytotoxicity of different antibiotics to rice and stress alleviation upon application of organic amendments. **Chemosphere**, [s. l.], v. 258, p. 127353, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127353>>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 71188, Enrofloxacin**. 2004a. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enrofloxacin>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 2764, Ciprofloxacin**. 2004b. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 4421, Nalidixic acid**. 2004c. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nalidixic-acid>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

NEMAT, Hafsa et al. Ameliorative effect of co-application of Bradyrhizobium japonicum EI09 and Se to mitigate chromium stress in Capsicum annum L. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1780412>, [s. l.], v. 22, n. 13, p. 1396–1407, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15226514.2020.1780412>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

NETWORKS, Antioxidant; AHMAD, Parvaiz. **Oxidative Damage to Plants**. [s.l: s.n.].

- NUNES, Bruno et al. Evaluation of physiological changes induced by the fluoroquinolone antibiotic ciprofloxacin in the freshwater macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 72, p. 103242, 2019.
- OAKS, Ann et al. Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. **Planta** 1980 **148:5**, [s. l.], v. 148, n. 5, p. 477–484, 1980. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02395318>>. Acesso em: 29 jul. 2021.
- OBIMAKINDE, Samuel et al. Veterinary pharmaceuticals in aqueous systems and associated effects: an update. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 3274–3297, 2017.
- OHYAMA, Takuji et al. Amino Acid Metabolism and Transport in Soybean Plants. In: TOSHIKI ASAO (Ed.). **Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal**. [s.l.] : IntechOpen, 2017. p. 171–196.
- OLIVEIRA, Sebastião A. De. Método colorimétrico para a determinação de nitrogênio em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 645–649, 1981. Disponível em: <<https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/17044>>. Acesso em: 14 jul. 2021.
- OLIVEIRA, Naila A. et al. Use of antibiotics in animal production and its impact on human health. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 40–47, 2020.
- OPRIS, Ocsana et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Influence of nine antibiotics on key secondary metabolites and physiological characteristics in *Triticum aestivum* : Leaf volatiles as a promising new tool to assess toxicity Ocsana Opris. [s. l.], v. 87, p. 70–79, 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**Sixty-eight World Health AssemblyGenebra, 2015.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**5th ReviewGenevaWorld Health Organization, , 2017.
- OSTERMANN, Anne et al. Symbiotic Nitrogen Fixation in Soil Contaminated with the Veterinary Antibiotics Oxytetracycline and Sulfamethazine. **Journal of Environmental Quality**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 1067–1073, 2019.
- OZAKI, Noriatsu et al. Photodegradation of fragrance materials and triclosan in water: Direct photolysis and photosensitized degradation. **Environmental Technology & Innovation**, [s. l.], v. 23, p. 101766, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352186421004144>>. Acesso em: 28 jul. 2021.
- PAN, Min; CHU, L. M. Ecotoxicology and Environmental Safety Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 126, p. 228–237, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.027>>

- PAN, Min; CHU, L. M. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 599–600, p. 500–512, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.214>>
- PARENTE, Cláudio E. T. et al. Fluoroquinolones in agricultural soils: Multi-temporal variation and risks in Rio de Janeiro upland region. **Chemosphere**, [s. l.], v. 219, p. 409–417, 2019.
- PEREIRA, Leandro Alves et al. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. **Química Nova**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 159–169, 2012.
- PETER H. GRAHAM. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 475–484, 1992.
- POŹNIAK, Błażej et al. The influence of age and body weight gain on enrofloxacin pharmacokinetics in turkeys—Allometric approach to dose optimization. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 67–78, 2020.
- RABELLO, Renata F. et al. Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: An update overview. **Animals**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1–43, 2020.
- RACHIM, M. A.; NICHOLAS, D. J. D. Glutamine synthetase and glutamate synthase from *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 2541–2548, 1985.
- REGEA, Gemechu. Pharmacology & Clinical Research Review on Antibiotics Resistance and its Economic Impacts. **Researchgate.Net**, [s. l.], n. December, 2018. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/329338054>>
- REGITANO, Jussara Borges; LEAL, Rafael Marques Pereira. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 601–616, 2010.
- REVELLIN, Cécile et al. Long-term exposure of agricultural soil to veterinary antibiotics changes the population structure of symbiotic nitrogen-fixing rhizobacteria occupying nodules of soybeans (*Glycine max*). **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 84, n. 9, p. 1–11, 2018.
- RIAZ, Luqman et al. Physiological and antioxidant response of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings to fluoroquinolone antibiotics. **Chemosphere**, [s. l.], v. 177, p. 250–257, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.033>>
- RIAZ, Luqman et al. Fluoroquinolones (FQs) in the environment: A review on their abundance, sorption and toxicity in soil. **Chemosphere**, [s. l.], v. 191, p. 704–720, 2018.
- ROCHA, Daiane Cristina et al. Veterinary antibiotics and plant physiology: An overview. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 767, 2021.

ROOSE-AMSALEG, Céline; LAVERMAN, Annet M. Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 4000–4012, 2015.

ROY, D. C. et al. Ciprofloxacin Residue in Marketed Pork of North-East India. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2019.

RUSCH, Marina et al. Degradation and transformation of fluoroquinolones by microorganisms with special emphasis on ciprofloxacin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 17, p. 6933–6948, 2019.

SALES, Cristina R. G. et al. Spectrophotometric Determination of RuBisCO Activity and Activation State in Leaf Extracts. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 1770, p. 239–250, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7786-4_14>. Acesso em: 29 jul. 2021.

SANTACHIARA, Gabriel et al. Relative importance of biological nitrogen fixation and mineral uptake in high yielding soybean cultivars. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 418, n. 1–2, p. 191–203, 2017.

SARTORIUS, Marilena et al. Sulphadimethoxine inhibits *Phaseolus vulgaris* root growth and development of N-fixing nodules. **Chemosphere**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 306–312, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.067>>

SCISCENKO, Iván et al. Monitoring photolysis and (solar photo)-Fenton of enrofloxacin by a methodology involving EEM-PARAFAC and bioassays: Role of pH and water matrix. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 719, 2020.

SHAHID, Mohammad; KHAN, Mohd Saghir. Fungicide tolerant *Bradyrhizobium japonicum* mitigate toxicity and enhance greengram production under hexaconazole stress. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s. l.], v. 78, p. 92–108, 2019.

SINDAN. **Anuário da Indústria de Produtos para Saúde Animal**. São Paulo.

SNEERINGER, Stacy; BOWMAN, Maria; CLANCY, Matthew. The U.S. and EU Animal Pharmaceutical Industries in the Age of Antibiotic Resistance. [s. l.], n. ERR-264, p. 76 pp, 2019.

SOSHINKOVA, T. N. et al. Proline and functioning of the antioxidant system in *Thellungiella salsuginea* plants and cultured cells subjected to oxidative stress. **Russian Journal of Plant Physiology** 2013 60:1, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 41–54, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443713010093>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

SOUZA, Roberta Barreiros De et al. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp . Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* spp . **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 31, p. 413–428, 2010.

SPIELMEYER, Astrid. Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments : A short review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 9, n. June, p. 76–86, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.06.004>>

SPINOSA, Helenice de Souza; GÓRNIAC, Silvana Lima; BERNARDI, Maria Martha. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 5ª Edição ed. [s.l: s.n.].

STURINI, Michela et al. Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural waters. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 4564–4569, 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es100278n>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

STURINI, Michela et al. Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials Marbofloxacin and Enrofloxacin. **Chemosphere**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 130–137, 2012.

SUDARIĆ, Aleksandra. **Soybean for Human Consumption and Animal Feed**. [s.l.] : IntechOpen, 2019. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/soybean-for-human-consumption-and-animal-feed>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

SUGAMOSTO, M. .. **Uso de Técnicas de Geoprocessamento para Elaboração de Mapa de Aptidão Agrícola e Avaliação da Adequação de Uso do Centro de Estações Experimentais do Canguiri, Município de Pinhais- Paraná**. 2002. Universidade Federal do Paraná, [s. l.], 2002.

SUN, Jiajun et al. Effects of oxytetracycline on the abundance and community structure of nitrogen-fixing bacteria during cattle manure composting. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 216, p. 801–807, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.060>>

TADIĆ, Đorđe et al. Occurrence and human health risk assessment of antibiotics and their metabolites in vegetables grown in field-scale agricultural systems. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 401, n. July, 2021.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l: s.n.]. v. 6 ed.

TALANO, Melina A. et al. Arsenic effect on the model crop symbiosis Bradyrhizobium–soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 63, p. 8–14, 2013.

TASHO, Reep Pandi; CHO, Jae Yong. Science of the Total Environment Veterinary antibiotics in animal waste , its distribution in soil and uptake by plants : A review. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 563–564, n. 3, p. 366–376, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140>>

TEGLIA, Carla M. et al. Determination of residual enrofloxacin in eggs due to long term administration to laying hens. Analysis of the consumer exposure assessment to egg derivatives. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 351, p. 129279, 2021.

TEIXIDÓ, Marc et al. Sorption of enrofloxacin and ciprofloxacin in agricultural soils: Effect of organic matter. **Adsorption Science and Technology**, [s. l.], v. 32, n. 2–3, p. 153–163, 2014.

THANNER, Sophie; DRISSNER, David; WALSH, Fiona. Antimicrobial resistance in agriculture. **mBio**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2016.

THIELE-BRUHN, Sören. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 145–167, 2003.

TIMMERER, Ulrike et al. Toxic effects of single antibiotics and antibiotics in combination on germination and growth of *Sinapis alba* L. **Plants**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2020.

TORTOSA, Germán et al. Oxidative Stress Produced by Paraquat Reduces Nitrogen Fixation in Soybean-*Bradyrhizobium diazoefficiens* Symbiosis by Decreasing Nodule Functionality. **Nitrogen**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 30–40, 2021.

TROUCHON, Tessa et al. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use To cite this version : HAL Id : hal-01503397 A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. [s. l.], v. 6, n. 2, p. 40–58, 2017.

TROUCHON, Tessa; LEFEBVRE, Sebastien. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. **Open Journal of Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 40–58, 2016.

VAN BOECKEL, Thomas P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. [s. l.], n. 16, p. 1–6, 2015.

VARANDA, Fátima et al. Solubility of antibiotics in different solvents. 1. Hydrochloride forms of tetracycline, moxifloxacin, and ciprofloxacin. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 45, n. 18, p. 6368–6374, 2006.

VERMA, M. K. et al. Screening of Enrofloxacin and Ciprofloxacin Residues in Chicken Meat by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Pharmaceutical Research International**, [s. l.], v. 32, n. 21, p. 64–69, 2020. Disponível em: <<https://www.journaljpri.com/index.php/JPRI/article/view/30753>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

WALTERS, Evelyn; MCCLELLAN, Kristin; HALDEN, Rolf U. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. **Water Research**, [s. l.], v. 44, n. 20, p. 6011–6020, 2010.

WEI, Ziyang et al. Toxicity of enrofloxacin, copper and their interactions on soil microbial populations and ammonia-oxidizing archaea and bacteria. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24016-8>>

XIE, W. Y.; SHEN, Q.; ZHAO, F. J. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. **European Journal of Soil Science**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 181–195, 2018.

YAN, Wei; HU, Shan; JING, Chuanyong. Enrofloxacin sorption on smectite clays: Effects of pH, cations, and humic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 372, n. 1, p. 141–147, 2012.

YAN, Yan et al. Ecotoxicological effects and accumulation of ciprofloxacin in *Eichhornia crassipes* under hydroponic conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 26, n. 29, p. 30348–30355, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-019-06232-5>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

YANG, Shinwoo; CARLSON, Kenneth. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. **Water Research**, [s. l.], v. 37, n. 19, p. 4645–4656, 2003.

ZHANG, Haibo et al. Chemosphere Residues and risks of veterinary antibiotics in protected vegetable soils following application of different manures. **Chemosphere**, [s. l.], v. 152, p. 229–237, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.111>>

ZHAO, Fangkai et al. Effects of land use and rainfall on sequestration of veterinary antibiotics in soils at the hillslope scale. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 260, p. 114112, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114112>>

ZRNČIĆ, Mirta; BABIĆ, Sandra; PAVLOVIĆ, Dragana M. Determination of thermodynamic pKa values of pharmaceuticals from five different groups using capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 1232–1239, 2015.