

JOSIEL JOSÉ DA SILVA

Antibióticos na produção de etanol combustível: análise, dispersão no
meio ambiente e efeitos na biodigestão da vinhaça

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a Silva, Josiel José da
Antibióticos na produção de etanol combustível: análise, dispersão no meio ambiente e efeitos na biodigestão da vinhaça / Josiel José da Silva. – Araraquara : [s.n.], 2021
182 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Nelson Ramos Stradiotto

1. Cana-de-açúcar. 2. Etanol. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Espectrometria de massa. 5. Antibióticos.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Antibióticos na produção de etanol combustível: análise, dispersão no meio ambiente e efeitos na biodigestão da vinhaça

AUTOR: JOSIEL JOSÉ DA SILVA

ORIENTADOR: NELSON RAMOS STRADIOTTO

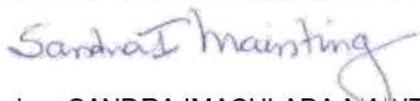
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. NELSON RAMOS STRADIOTTO (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química –
UNESP – Araraquara



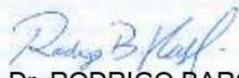
Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Pesquisadora SANDRA IMACULADA MAINTINGUER (Participação Virtual)
IPBEN / Instituto de Pesquisa em Bioenergia - UNESP - Rio Claro



Prof. Dr. MARCELO ZAIAT (Participação Virtual)
Departamento de Hidráulica e Saneamento / Escola de Engenharia - USP - São Carlos



Dr. RODRIGO BARCELLOS HOFF (Participação Virtual)
Seção Laboratorial Avançada / Laboratório Nacional Agropecuário - MAPA - Porto Alegre

Araraquara, 14 de maio de 2021

DADOS CURRICULARES

Formação acadêmica:

2013 – Mestrado em Química, Instituto de Química, Unesp, Araraquara

2010 – Graduação em Química (Licenciatura), Instituto de Química, Unesp, Araraquara

Artigos completos publicados em periódicos:

DA SILVA, Josiel José et al. Identification of organic contaminants in vinasse and in soil and groundwater from fertigated sugarcane crop areas using target and suspect screening strategies. *Science of The Total Environment*, v. 761, n. 20, p. 143237, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143237>.

DA SILVA, Josiel José et al. Pressurized Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS evaluation for the analysis of antibiotics in agricultural soils. *MethodsX*, v. 7, p. 101171, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101171>.

KIM, Joaquim Yuji Usukura et al. Efficient treatment of swimming pool water by photoelectrocatalytic ozonation: Inactivation of *Candida parapsilosis* and mineralization of Benzophenone-3 and urea. *Chemical Engineering Journal*, v. 378, n. April, p. 122094, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122094>

DA SILVA, Josiel José; PAIM, Leonardo Lataro.; STRADIOTTO, Nelson Ramos; Simultaneous determination of iron and copper in ethanol fuel using nafion/carbon nanotubes electrode. *Electroanalysis*, v. 26, n. 8, p. 1794–1800, 2014. <https://doi.org/10.1002/elan.201400136>

DOS SANTOS, Adriano et al. Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da adsorção de L-cisteína em ouro por meio da técnica de microbalança a cristal de quartzo. *Química Nova*, [S. l.], v. 35, n. 7, p. 1365–1368, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000700015>.

MUNIZ, E. C. et al. Synthesis and characterization of mesoporous TiO₂ nanostructured films prepared by a modified sol–gel method for application in dye solar cells. *Ceramics International*, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 1017–1024, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.11.014>

Capítulo de livro:

FENGA, Paula et al. Novos métodos analíticos para avaliação da qualidade do bioetanol combustível. In: LEMOS, Eliana G. M.; STRADIOTTO, Nelson Ramos (org.). *Bioenergia: Desenvolvimento, pesquisa e inovação*. São Paulo: UNESP, 2012. p. 945–978.

Trabalhos apresentados na forma de poster em eventos científicos:

- SILVA, J. J., SILVA, B. F., ZANONI, M.V.B., GROS, M., PETROVIC, M., STRADIOTTO, N. R. Antibiotics analyses in vinasse from sugarcane ethanol fuel production. In: 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2019), Milão, Itália, 16 a 20 de junho 2019
- SILVA, J. J., SILVA, B. F., ZANONI, M. V. B., STRADIOTTO, N. R., Sample preparation to antibiotics analysis in vinasse of ethanol fuel. In: 40th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry (ISEAC 40), Santiago de Compostela, Espanha, 19 a 22 de junho de 2018.
- SILVA, J. J., SILVA, B. F., ZANONI, M. V. B., STRADIOTTO, N. R. Antibiotics thermal stability and environmental risk from its use in fuel ethanol production. In: Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference (BBEST), Campos do Jordão, 17 a 19 de outubro de 2017.
- SILVA, J.J. et al. Determinação simultânea de ferro e cobre em etanol combustível. XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SiBEE), 2013, Campos do Jordao, UNIFESP e UFABC.
- SILVA J. J.; PAIN, L. L.; STRADIOTTO, N. R.; Desenvolvimento de eletrodo modificado com nanotubos de carbono contendo Nafion® para determinação simultânea de ferro e cobre em etanol combustível. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia. Sociedade Brasileira de Química.
- SILVA, J. J. et al. Células solares sensibilizadas por corante à base de SnO₂/Al₂O₃. In: XX Congresso de iniciação científica da UNESP (CIC), 2009, São José do Rio Preto, UNESP.
- SILVA, J. J. et al. Synthesis of SnO₂ for Dye-Sensitizer Solar Cells. In: 11th International Conference on Advanced Material (ICAM), 2009, Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais.
- MUNIZ, E. C. et al. Thick mesoporous TiO₂ nanostructured films obtained by screen-printing for application in dye-sensitized solar cells. In: 11th International Conference on Advanced Material (ICAM), 2009, Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais.
- SILVA, J. J. et. al. Hydrothermal synthesis of SnO₂ suspensions for the fabrication of nanostructures. In: VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), 2008, Guarujá, Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais.
- SILVA, J. J. et al. Síntese sol-gel de óxido de estanho para aplicação em anodos de células solares sensibilizadas por corantes. In: XX Congresso de iniciação científica da UNESP (CIC), 2008, São José dos Campos, UNESP.

Participação em cursos:

PDPI Estatística - CDPI Pharma (Centro de Desenvolvimento Profissional Industrial), on-line, de outubro a dezembro de 2020 (30 horas).

Introdução, Operação e Troubleshooting de Sistemas de LC-MS – Teoria e Prática. Curso oferecido pela Thermo Fisher Scientifics em São Paulo, SP, de 19 a 22 de março de 2018 (32 horas)

3ª Escola de Espectrometria de Massas BrMASS realizada em Natal, RN, de 03 a 08 de dezembro de 2017 (38 horas).

VI Escola de Separações realizada na Unicamp, Campinas, SP, de 26 a 28 de julho de 2017 (13 horas).

Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE: princípios teóricos. Curso realizado na Embrapa Sudeste, São Carlos, SP, de 22 a 24 de agosto de 2016 (24 horas).

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto, pela oportunidade de realizar o doutorado sob sua orientação e pelo aprendizado durante esta jornada.

À Dra. Bianca Ferreira da Silva, por toda ajuda e aprendizado proporcionado ao longo do doutorado, em especial durante meus “primeiros passos” na área de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e preparo de amostras.

À profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni, pelo apoio ao projeto.

À Dra. Mira Petrovic do Instituto Catalão de Pesquisa em Água (ICRA) da Espanha, por me receber em seu grupo de pesquisa durante 11 meses de intercâmbio e proporcionar grande aprendizado e crescimento profissional.

À Dra. Meritxell Gros do ICRA, por todo apoio e aprendizado proporcionado antes durante e depois do Intercâmbio que realizei no ICRA.

Ao Dr. Pablo Ferrero-Gago do ICRA, por todo apoio e aprendizado proporcionado durante e depois do intercâmbio que realizei no ICRA.

Ao prof. Dr. Arnaldo Sarti e à Ma. Brenda Clara Gomes Rodrigues por todo apoio e aprendizado proporcionado durante a realização dos estudos de biodigestão anaeróbia deste projeto.

À Dra. Lilian Torquato, pelas análises de ácidos orgânicos voláteis e sugestões feitas durante a realização dos estudos de biodigestão anaeróbia deste projeto.

À profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira, pelo fornecimento da coluna RAM utilizada na SPE on-line.

Ao prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes, pelas dicas, ajudas e discussões relacionadas a LC-MS/MS durante a realização deste trabalho.

À banca do exame geral de qualificação, composta pela profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina e pelo prof. Dr. Arnaldo Sarti, pelas discussões e contribuições proporcionadas.

Aos colegas do GEAR (Grupo de Eletroanalítica de Araraquara) e agregados pelo bom convívio, ajudas, e trocas de experiências durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do ICRA, que me acolheram de maneira tão agradável e me proporcionaram aprendizados técnicos-científicos, aprendizados da dinâmica organizacional do ICRA, da cultura espanhola/catalã, do idioma Espanhol, e o mais valioso, a amizade.

Às usinas sucroalcooleiras que forneceram as amostras de vinhaça de lodo de reator anaeróbio utilizadas neste trabalho.

Aos moradores rurais e ao DAAE de Araraquara que forneceram amostras de solo e água subterrânea utilizadas neste trabalho.

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pelo trabalho prestado à sociedade brasileira na formação dos novos profissionais e na condução de projetos de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de doutorado concedida (processo 140504/2016-8) nos primeiros meses do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelas bolsas de doutorado (processo 2016/06352-4) e de estágio de pesquisa no exterior (processo 2018/15739-5) concedidas para a realização deste trabalho.

À minha doce Flor, Carolina Gomes da Rocha. Que me acompanha a mais de uma década e compartilhou comigo os bons e maus momentos durante a realização deste trabalho sempre regados com muito amor e carinho. Obrigado pelo amor, carinho, pelos conselhos, dicas e sugestões ao longo deste trabalho.

Aos meus pais, por sempre apoiar minhas decisões, mesmo sem saber exatamente o porquê delas e que isso significasse minha ausência.

A todos e todas, aqui citados(as) e não citados(as), que contribuíram para que este trabalho se concretizasse, meu muito obrigado!

RESUMO

A vinhaça é um resíduo líquido proveniente da produção de etanol combustível a partir da cana-de-açúcar. Este resíduo tem sido utilizado há mais de 4 décadas na fertirrigação dos solos dos canaviais, sendo um aporte de água e nutrientes. Apesar da importância agrônômica e econômica desta prática, a fertirrigação pode ser uma fonte de contaminantes para o meio ambiente, especialmente com relação à antibióticos, os quais são utilizados no processo de produção do etanol. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar possíveis riscos associados à prática da fertirrigação, do ponto de vista da dispersão de contaminantes orgânicos no meio ambiente, com maior foco em antibióticos, e avaliar o impacto da presença de antibióticos na biodigestão anaeróbia da vinhaça. Para isso, três distintas abordagens foram adotadas, sendo: i) desenvolvimento de método LC-MS/MS para a análise de antibióticos (monensina, penicilina G, virginiamicina M1, virginiamicina S1, tetraciclina e eritromicina) em vinhaça, sendo avaliadas as técnicas SPE, SALLE e SPE on-line para o preparo de amostras. ii) Análise de amostras de vinhaça, solo e água subterrânea de áreas fertirrigadas com vinhaça, por dois métodos. O primeiro, baseado em LC-MS/MS para a determinação de 32 antibióticos de múltiplas classes, sendo avaliadas as técnicas de extração QuEChERS e ELP para as amostras de solo. O segundo, baseado em análise de investigação de compostos suspeitos (*Suspect Screening*) empregando estratégias avançadas com base LC-HRMS para avaliar a presença de 7811 contaminantes, incluindo pesticidas, produtos farmacêuticos e uma ampla gama de produtos químicos industriais, entre outras substâncias. iii) Avaliação da inibição da produção de metano na biodigestão anaeróbia da vinhaça contaminada com diferentes concentrações dos antibióticos monensina, penicilina G e tetraciclina empregando reator em batelada (500 mL). Como resultado, foi verificado que as técnicas SPE, SALLE e SPE on-line mostraram-se adequadas para a extração da maioria dos analitos na vinhaça. Além disso, com o método SPE on-line-LC-MS/MS desenvolvido, foi verificado que a monensina é capaz de resistir ao processo de produção de etanol e foi detectada em uma amostra de vinhaça na concentração de 14,3 ng mL⁻¹. Nas análises LC-MS/MS para múltiplas classes de antibióticos não foram detectados contaminantes adicionais, sendo que as técnicas de extração QuEChERS e ELP alcançaram desempenho semelhante, com pontos positivos específicos para cada caso. As análises por LC-HRMS permitiram a identificação por tentativa de 19 contaminantes de preocupação ambiental na vinhaça, 12 no solo e 25 na água subterrânea de áreas fertirrigadas. Porém, nenhum destes compostos estão diretamente ligados à vinhaça, sendo que os resultados mostraram a existência de outras fontes potenciais de contaminação para as amostras analisadas, principalmente associadas à atividade agrícola moderna. Os estudos de biodigestão permitiram verificar que os antibióticos estudados são capazes de inibir parcialmente a produção de metano nas concentrações de 0,5 ppm para a monensina, 1,0 ppm para a tetraciclina e 0,01 ppm para a penicilina. Estes resultados indicam que a vinhaça contaminada com antibióticos pode comprometer a eficiência da produção de biogás por biodigestão anaeróbia.

Palavras-chave: Vinhaça. Etanol Combustível. Antibióticos. LC-MS/MS. Biodigestão anaeróbia.

ABSTRACT

Vinasse is a liquid residue from sugarcane ethanol fuel production. This residue has been used for more than 4 decades in the fertigation of the soil of the sugarcane fields, providing water and nutrients. Despite the agronomic and economic importance of this practice, fertigation can be a source of contaminants for the environment, especially in relation to antibiotics, which are used in the ethanol production process. Thus, the objective of this work is to evaluate possible risks associated with the practice of fertigation, from the point of view of the dispersion of organic contaminants in the environment, with a greater focus on antibiotics, and to evaluate the impact of the presence of antibiotics on anaerobic digestion of vinasse. For this, three different approaches were adopted, being: i) development of LC-MS/MS method for the analysis of antibiotics (monensin, penicillin G, virginiamycin M1, virginiamycin S1, tetracycline and erythromycin) in vinasse, being evaluated the techniques SPE, SALLE and on-line SPE for sample preparation. ii) Analysis of vinasse, soil and groundwater samples from fertigated areas with vinasse, using two methods. The first, based on LC-MS/MS for the determination of 32 antibiotics from multiple classes, being that QuEChERS and PLE extraction techniques were evaluated for soil samples preparation. The second, based on suspect screening analysis employing advanced strategies based on LC-HRMS to assess the presence of 7811 contaminants, including pesticides, pharmaceuticals and a wide range of industrial chemicals, among other substances. iii) Evaluation of the inhibition of methane production in anaerobic digestion of vinasse contaminated with different concentrations of the antibiotics monensin, penicillin G and tetracycline in a batch reactor (500 mL). As result, it was possible to verify that the SPE, SALLE and on-line SPE techniques were suitable for the extraction of most analytes in vinasse. In addition, with the developed on-line SPE-LC-MS/MS method, it was possible to verify that monensin can resist to the ethanol production process and was detected in a vinasse sample at a concentration of 14.3 ng mL^{-1} . In the LC-MS/MS analyzes for multiple classes antibiotics, no additional contaminants were detected, and the QuEChERS and PLE extraction techniques achieved similar performance, with specific positive points for each case. The analysis by LC-HRMS allowed the identification by tentative of 19 contaminants of environmental concern in the vinasse, 12 in the soil and 25 in the groundwater from fertigated areas. However, none of these compounds are causally linked to vinasse, and the results showed the existence of other potential sources of contamination for the analyzed samples, mainly associated with modern agricultural activity. The digestion experiments showed that the studied antibiotics can partially inhibit the production of methane at concentrations of 0.5 ppm for monensin, 1.0 ppm for tetracycline and 0.01 ppm for penicillin G. These results indicate that vinasse contaminated with antibiotics can compromise the efficiency of biogas production by anaerobic digestion.

Keywords: Vinasse. Ethanol Fuel. Antibiotics. LC-MS/MS. Anaerobic Digestion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição das plantas produtoras de etanol combustível no Brasil.	21
Figura 2 - Esquema resumido das etapas da produção de etanol combustível a partir da cana-de-açúcar.	24
Figura 3 - Etapas da extração em fase sólida.	30
Figura 4 - Configuração do sistema cromatográfico bidimensional empregado na SPE on-line no modo <i>back-flush</i>	32
Figura 5 - Etapas envolvidas no emprego da SALLE.	34
Figura 6 - Esquema representando as partes integrantes de equipamentos modernos de HPLC com destaque para a fase estacionária empregada na coluna cromatográfica.	37
Figura 7 - Cromatograma genérico para as substâncias X, Y e Z.	39
Figura 8 - Partes principais de um espectrômetro de massas.	40
Figura 9 - Processo de ionização por <i>electrospray</i>	41
Figura 10 - Caminho percorrido por uma molécula e sequência de eventos em um LC-MS/MS.	43
Figura 11 - Espectro de massas em <i>full scan</i> obtido por ESI(+) do antibiótico virginiamicina S1.	56
Figura 12 - Intensidade de sinal obtida em cada nível dos parâmetros estudados. (n=3).	58
Figura 13 - Cromatograma obtido no primeiro gradiente exploratório gradiente.	59
Figura 14 - Cromatogramas de íons extraídos para cada analito empregando a coluna PFP Kinetex®.	61
Figura 15 - Cromatogramas de íons extraídos para cada analito empregando a coluna fenil-hexil Luna®.	62
Figura 16 - Efeito da concentração de PFPA na área do pico cromatográfico. (Analitos em 450 ng mL ⁻¹ para a estreptomicina e 150 ng mL ⁻¹ para os demais. n=2).	64
Figura 17 - Cromatogramas obtidos empregando 10 mmol L ⁻¹ de PFPA na fase móvel. (concentração dos analitos de 450 ng mL ⁻¹ para a estreptomicina e 150 ng mL ⁻¹ para os demais).	64
Figura 18 - Comparação da área de pico dos analito utilizando os métodos sem pareamento iônico.	66
Figura 19 - Cromatograma no modo EMS obtido da solução de virginiamicina M1 submetida às condições da destilação por diferentes tempos.	68

Figura 20 - Espectro de massas referentes aos picos da virginiamicina M1 e aos produtos gerados.....	69
Figura 21 - Cromatograma em varredura de íons (EMS) da solução de monensina sem passar por aquecimento (t = 0) e após 3,0 h em ebulição.....	71
Figura 22 - Espectros de massas referentes aos picos cromatográficos observados nos cromatogramas da Figura 21.	72
Figura 23 - Cromatograma no modo EMS da alíquota em t = 0 e em t = 1 h.	73
Figura 24 - Espectro de massas referentes aos picos da penicilina (t _R = 6,79 min) em A, ao produto 1 (t _R = 4,20 min) em B, ao produto 2 (t _R = 4,99 min) em C.....	74
Figura 25 - Cromatograma no modo EMS da solução de eritromicina antes e após 3,0 h em ebulição.....	75
Figura 26 - Espectro de massas referente ao pico da eritromicina e aos produtos gerados. A) eritromicina em t _R = 7,25 min, B) produto 1 (t _R = 8,69 min), C) produto 2 (t _R = 9,02 min), D) produto 3 (t _R = 9,29 min) e E) produto 4 (t _R = 9,60 min).	76
Figura 27 - Vinhaça bruta (5 mL) sem (esquerda) e com a adição de 1,8 g de (NH ₄) ₂ SO ₄ e incubação por 30 min a ~1,0 °C (direita).	78
Figura 28 - SPE realizada com soluções de limpeza contendo 20, 40, 60, 80 e 100% de metanol (da esquerda para direita). Em A: 10 mL de vinhaça diluída 2x. Em B: cartuchos HLB após passagem da vinhaça. Em C: após diferentes soluções de limpeza. Em D: eluato obtido com 7 mL de metanol. Em E: eluato após secagem e redissolução em 1 mL contendo 15% de ACN em água.	79
Figura 29 - Recuperação obtida para cada antibiótico em diferentes soluções de limpeza no SPE.	80
Figura 30 - Recuperação obtida em diferentes pHs utilizando o cartucho HLB Supel™-Select.	81
Figura 31 - Eluatos obtidos com amostras no pHs 5,5; 4,0 e 2,6 (da esquerda para direita).....	82
Figura 32 - Efeito da adição de EDTA na recuperação dos analitos.	83
Figura 33 - Recuperação obtida empregando soluções de limpeza contendo 0,1% de ácido fórmico, 0,1% de hidróxido de amônio e sem a adição de aditivo.	83
Figura 34 - Recuperação obtida empregando soluções de limpeza contendo 60, 50 e 40% de metanol em água.	84

Figura 35 - Recuperação obtida com cartuchos de extração HLB Supel™-Select, HLB Oasis®, Strata™-X e Strata™ C18-E. n = 2.	85
Figura 36 - Cromatogramas de íons extraídos de cada analito obtidos em vinhaça fortificada.....	86
Figura 37 - SALLE empregando como solventes extratores acetonitrila, etanol e isopropanol.	87
Figura 38 - Recuperação obtida (esquerda) e separação de fase após centrifugação (direita) empregando SALLE. n = 3.....	88
Figura 39 - Recuperação dos analitos empregando diferentes proporções de acetonitrila:vinhaça.....	89
Figura 40 - Efeito matriz para os analitos utilizando diferentes proporções solvente extrator:amostra.	90
Figura 41 - Área de pico normalizada para cada analito nas diferentes proporções extrator:amostra.	90
Figura 42 - Recuperação para cada analito nos diferentes valores de pH. (n = 3).	91
Figura 43 - Efeito matriz observado para cada analito nos diferentes valores de pH. .	92
Figura 44 - Cromatogramas de íons extraídos para tetraciclina e anidrotetraciclina em diferentes pHs.	93
Figura 45 - Cromatogramas de íons extraídos para cada analito em pH 6,0.	94
Figura 46 - Cromatograma obtido com as colunas HLB Oasis®, em A, e RAM, em B.	95
Figura 47 - Área de pico normalizada obtida para cada analito com diferentes colunas de extração.....	96
Figura 48 - Cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de vinhaça fortificada com 130,0 ng mL ⁻¹ dos analitos utilizando SPE on-line com coluna RAM.....	97
Figura 49 - Curva de adição de padrão e cromatograma obtido na análise de monensina em amostra de vinhaça.	101
Figura 50 - Espectro de massas de baixa resolução (MS/MS) vs alta resolução (QTOF) para tetraciclina.....	107
Figura 51 - Comparação dos resultados de recuperação obtidos por ELP (n=2) e QuEChERS (n=3).....	125
Figura 52 - Etapas do processo de identificação e número de suspeitos detectados após cada etapa em cada matriz.	130

Figura 53 - Identificação do carbendazim nas amostras de solo: a) cromatograma de íons extraídos (XIC) para o correspondente $[M+H]^+$ (± 2 mDa); b) espectro de massas contendo o correspondente $[M+H]^+$; c) XIC para o fragmento qualificador (m/z 160.0499) em alta energia de colisão (35eV) e o respectivo espectro de massas em d. e) Espectro de MS^2 do carbendazim obtido do MassBank (registro UF405003).	133
Figura 54 - Distribuição dos compostos detectados nas matrizes.	134
Figura 55 - Representação simplificada das etapas da biodigestão anaeróbia levando à formação de CH_4	148
Figura 56 - Sistema utilizado nos testes de AME.	150
Figura 57 - Biodigestão preliminar: volume deslocado em função do tempo.	154
Figura 58 - Definição do V_0 , curva corrigida da produção de metano em função do tempo e taxa máxima de produção de metano.	154
Figura 59 - Volume de metano produzido em função do tempo para os estudos com monensina.	157
Figura 60 - Volume de metano produzido em função do tempo para os estudos com tetraciclina.	158
Figura 61 - Volume de metano produzido em função do tempo para os estudos com penicilina.	159
Figura 62 - Decaimento da área de pico cromatográfico referente a cada antibióticos durante a biodigestão.	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros otimizados para detecção por MS.....	45
Tabela 2 - Parâmetros da fonte de ionização otimizados.	45
Tabela 3 - Programa de solvente utilizado com as diferentes colunas estudadas.....	46
Tabela 4 - Programa de solvente empregado no estudo da concentração de PFPA na fase móvel.	47
Tabela 5 - Programa de solvente empregado para virginiamicina M1, penicilina G, monensina e eritromicina. (A = água com 0,1% de ácido fórmico e B = acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico).....	48
Tabela 6 - Programa de solvente e posições das válvulas da extração e de desvio utilizados no método com extração em fase sólida <i>on-line</i>	54
Tabela 7 - Valores obtidos na otimização da detecção de cada analito.....	57
Tabela 8 - Valores obtidos na otimização dos parâmetros da fonte de ionização.	58
Tabela 9 - Limites de detecção e quantificação obtidos para os analitos estudados. ...	98
Tabela 10 - Dados obtidos para faixa linear, equação da reta e coeficiente de determinação no estudo de linearidade.....	99
Tabela 11 - Abundância relativa das transições monitoradas para cada analito obtida em solvente e em amostra fortificada. n = 5.....	100
Tabela 12 - Recuperação e repetibilidade obtida por adição de padrão (AP) ou padrão interno (PI).....	101
Tabela 13 - Lista dos analitos e respectivos ILIS utilizados no trabalho.	110
Tabela 14 - Localização dos pontos de coletas, fonte de água e tipo de solo nas áreas de coleta.....	112
Tabela 15 - Diferentes testes realizados utilizando a técnica de extração ELP.....	113
Tabela 16 - Solventes e sais empregados na otimização das extrações por QuEChERS.	114
Tabela 17 - Tempo de retenção (t_R) para a detecção por <i>Scheduled</i> MRM, íons precursores e transições monitoradas dos analitos.	117
Tabela 18 - Recuperação obtida para cada analitos nos diferentes testes realizados com ELP.....	122
Tabela 19 - Recuperação obtida para cada analitos nos diferentes testes empregando QuEChERS.....	124
Tabela 20 - Parâmetros da validação para água subterrânea. n=3.	127

Tabela 21 - Parâmetros da validação para solo. n=3.	128
Tabela 22 - Detalhes dos compostos identificados por tentativa na vinhaça, nível de confiança 3 (<i>tentative candidate</i>) (SCHYMANSKI <i>et al.</i> , 2014).	137
Tabela 23 - Detalhes dos compostos identificados por tentativa no solo, nível de confiança 3 (<i>tentative candidate</i>) (SCHYMANSKI <i>et al.</i> , 2014).	141
Tabela 24 - Detalhes dos compostos identificados por tentativa em água subterrânea, nível de confiança 3 (<i>tentative candidate</i>) (SCHYMANSKI <i>et al.</i> , 2014).	142
Tabela 25 - Propriedades físico-químicas dos compostos detectados no solo (CHEMICALBOOK, 2020; CHEMSPIDER, 2020; KIM <i>et al.</i> , 2019b; WISHART <i>et al.</i> , 2018).	144
Tabela 26 - Propriedades físico-químicas dos compostos detectados na água subterrânea (CHEMICALBOOK, 2020; CHEMSPIDER, 2020; KIM <i>et al.</i> , 2019b; WISHART <i>et al.</i> , 2018).	145
Tabela 27 - Concentrações de antibióticos estudadas.	152
Tabela 28 - Taxa máxima de produção de metano (mL h ⁻¹) na ausência e na presença de diferentes concentrações de antibióticos.	155
Tabela 29 - Tempo gasto pelo sistema para iniciar a produção de metano (T ₀) nas biodigestões realizadas sem antibióticos e com antibióticos.	157

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABP - Ácido benzilpenicilóico.
- ACN - Acetonitrila
- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.
- ATC - Anidrotetraciclina
- CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência.
- CLAE-FR - Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.
- DIA - Aquisição independente de dados (do inglês *Data Independent Aquisition*).
- DSFP - *Norman Digital Sample Freezing Platform*.
- DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio.
- DQO - Demanda Química de Oxigênio.
- ELP - Extração por líquido pressurizado.
- EM - Efeito matriz
- EM - Espectrometria de massas.
- EMS - *Enhanced Mass Spectrometry*
- EPI - *Enhanced Product Ions*
- Eri - Eritromicina
- ESI - Ionização por *electrospray*.
- ESI(-) - Ionização por *electrospray* no modo negativo.
- ESI(+)- Ionização por *electrospray* no modo positivo.
- FD - Frequência de detecção.
- FIA - Análise por injeção em fluxo (do inglês *flow injection analysis*).
- FT-ICR - Analisador de massas por ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (do inglês *Fourier-transform ion cyclotron resonance*).
- HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*.
- ILIS - Padrão interno isotopicamente marcado (do inglês *Isotopically Labelled Internal Standards*).
- LC-HRMS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (do inglês *Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry*).
- LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês *Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry*).
- LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem.
- LD - Limite de detecção

LIT - Armadilha de íons linear (do inglês *Linear Ion Trap*).

LQ - Limite de Quantificação

m/z - razão massa carga.

MeOH - Metanol

Mon - Monensina

MRM - Monitoramento das reações múltiplas (do inglês *Multiple Reactions Monitoring*)

MS - *Mass spectrometry*.

Pen - Penicilina G

PFPA - Ácido pentafluoropropiônico (do inglês *pentafluoropropionic acid*).

PI - Íons produto (do inglês *Product ions*)

Q - Analisador de massas quadruplo linear

q - Célula de colisão quadrupolar.

QIT - Armadilha de íons de Paul (QIT do inglês *Quadrupole ion Trap*).

QuEChERS - Acrônimo para *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*.

RAM - Material de acesso restrito (do inglês *Restricted Access Material*)

SALLE - Extração líquido-líquido assistida pelo efeito *salting-out* (do inglês *Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*).

SPE - Extração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*).

SPE on-line - Extração em fase sólida on-line.

ST - Sólidos totais.

STP - Estreptomicina

SVT - Sólidos voláteis totais.

T_0 - Tempo gasto pelo sistema para iniciar a produção de metano (T_0).

TC - Tetraciclina.

TOF - Analisador de massas por tempo de voo (do inglês *Time-of-Flight*)

UHPLC - Ultra High Performance Liquid Chromatography.

VM - Virginiamicina M1

VS - Virginiamicina S1

SUMÁRIO

Introdução	21
Objetivos	27
Capítulo 1: Desenvolvimento de Método Analítico para Determinação de Antibióticos em Vinhaça Empregando LC-MS/MS.....	28
1.1 Introdução.....	28
1.1.1 Técnicas de Preparo de Amostra para Análise de Contaminantes de Preocupação Ambiental	29
1.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	34
1.2 Objetivo.....	43
1.3 Materiais e Métodos	43
1.3.1 Preparo das Soluções dos Analitos.	44
1.3.2 Otimização da Detecção por Espectrometria de Massas.....	44
1.3.3 Otimização dos Parâmetros da Fonte de Ionização.....	45
1.3.4 Otimização da Separação Cromatográfica	45
1.3.5 Separação Cromatográfica sem Pareamento Iônico.....	46
1.3.6 Separação Empregando Pareamento Iônico com PFPA	46
1.3.7 Estabilidade Térmica dos Antibióticos na Condição Térmica da Destilação	47
1.3.8 Preparo de Amostra.....	48
1.3.9 Validação do Método Analítico	54
1.4 Resultados e Discussões.....	55
1.4.1 Otimização da Detecção por Espectrometria de Massas.....	55
1.4.2 Otimização dos Parâmetros da Fonte de Ionização.....	57
1.4.3 Otimização da Separação Cromatográfica	58
1.4.4 Estudo da Estabilidade Térmica dos Antibióticos	66
1.4.5 Otimização do Preparo de Amostra	76
1.4.6 Validação no Método Analítico	97
1.4.7 Análise das Amostras de Vinhaça.....	101

1.5	Conclusões.....	102
Capítulo 2: Avaliação da Contaminação da Vinhaça, Solo e Água Subterrânea de Áreas Fertilizadas com Vinhaça Empregando Abordagem Alvo e Investigação de Compostos Suspeitos		
		103
2.1	Introdução.....	103
2.1.1	Preparo de Amostra Empregando ELP	104
2.1.2	Preparo de Amostra Empregando QuEChERS	105
2.1.3	Investigação de Compostos Suspeitos Empregando LC-HRMS	106
2.2	Objetivo	108
2.3	Materiais e Métodos	109
2.3.1	Reagentes	109
2.3.2	Coleta das Amostras de Água Subterrânea, Solo e Vinhaça.....	111
2.3.3	Otimização do Preparo das Amostras de Solo	112
2.3.4	Preparo de Amostras para as Análises de Água Subterrânea e Vinhaça....	114
2.3.5	Análises Cromatográficas	115
2.3.6	Avaliação da Performance dos Métodos Analíticos	118
2.3.7	Processamento dos Dados de HRMS.....	119
2.4	Resultados e Discussões.....	120
2.4.1	Análises Quantitativas por UHPLC-QqLIT.....	120
2.4.2	Análises Qualitativas por LC-HRMS.....	129
2.5	Conclusão	146
Capítulo 3: Avaliação da Inibição da Biodigestão Anaeróbia da Vinhaça por Antibióticos Utilizados na Produção de Etanol Combustível.....		
		147
3.1	Introdução.....	147
3.2	Objetivo	151
3.3	Materiais e Métodos	151
3.3.1	Testes de Biodigestão Anaeróbia	151

3.3.2 Análises Cromatográficas	153
3.4 Resultado e Discussões	153
3.4.1 Avaliação da Inibição do Processo de Biodigestão por Antibióticos	155
3.4.2 Monitoramento dos antibióticos durante a biodigestão	160
3.5 Conclusão	161
Conclusão Geral e Perspectivas Futuras.....	162
Referências Bibliográficas.....	163

Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol combustível, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América. Em 12/10/2020 havia no Brasil 362 usinas produtoras de etanol combustível autorizadas pela ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) para atuação no mercado do etanol combustível (ANP, 2020a). A maioria destas usinas são complexos industriais mistos, capazes de produzir tanto etanol quanto açúcar. Toda esta infraestrutura tem sua origem impulsionada pelo Programa Nacional do Álcool (Proálcool) na década de 70 (AMORIM *et al.*, 2011) e está concentrada na região centro-sul e nordeste do país, **Figura 1**, sendo responsável por uma produção total de 35,6 bilhões de litros de etanol e 224,5 milhões de toneladas de açúcar na safra 2019/2020 (CONAB, 2020). Vale destacar que no ano de 2019 a quantidade de gasolina comum (gasolina com adição de etanol) vendida no país foi de 38,2 bilhões de litros (ANP, 2020b). Desta forma, fica evidente a importância deste setor na composição da matriz energética brasileira como um setor estratégico em termos energético e econômico.

Figura 1 - Distribuição das plantas produtoras de etanol combustível no Brasil.



Fonte: ANP (ANP, 2020c).

Para a produção do etanol combustível no Brasil é utilizada como matéria prima principalmente a cana-de-açúcar. Nos últimos anos, uma área de aproximadamente 8,4 milhões de hectares tem sido dedicada a esta cultura (CONAB, 2020). A cana-de-açúcar apresenta em sua composição de 10-17% de sacarose, principal carboidrato que é fermentado e convertido

em etanol. Entre as principais matérias-primas utilizadas mundialmente para a produção de etanol combustível, a cana-de-açúcar se destaca no Brasil e o milho nos Estados Unidos da América (NOGUEIRA *et al.*, 2008). O etanol é um combustível renovável que tem grande destaque na diminuição da emissão de gases de efeito estufa, quando comparado aos combustíveis fósseis. Esta característica é mais marcante para o etanol oriundo da cana-de-açúcar e, no cenário atual, este combustível constitui uma alternativa para amenizar os efeitos nocivos da queima de combustíveis fósseis (SADEGHINEZHAD *et al.*, 2014).

O uso do etanol combustível, ao invés da gasolina, em veículos com motores de ciclo Otto, contribui com uma redução de emissão de 71% dos gases de efeito estufa, comparado com a gasolina (2009/28/EC, 2009), embora este ganho na redução da emissão tenha sido questionado, devido a diferentes metodologias aplicadas na análise e falta de transparência no dados utilizados (BICALHO; SAUER; PATIÑO-ECHEVERRI, 2019; DE SOUZA DIAS *et al.*, 2015). Da mesma maneira, o uso de misturas gasolina-etanol (~25% de etanol) também traz vantagens ambientais pois permitem abolir o uso de aditivos para melhoramento da octanagem como o MTBE (do inglês *methyl tert-butyl ether*) cujo impacto negativo no meio ambiente devido à contaminação de águas subterrâneas já foi verificado (FACETTI *et al.*, 2019).

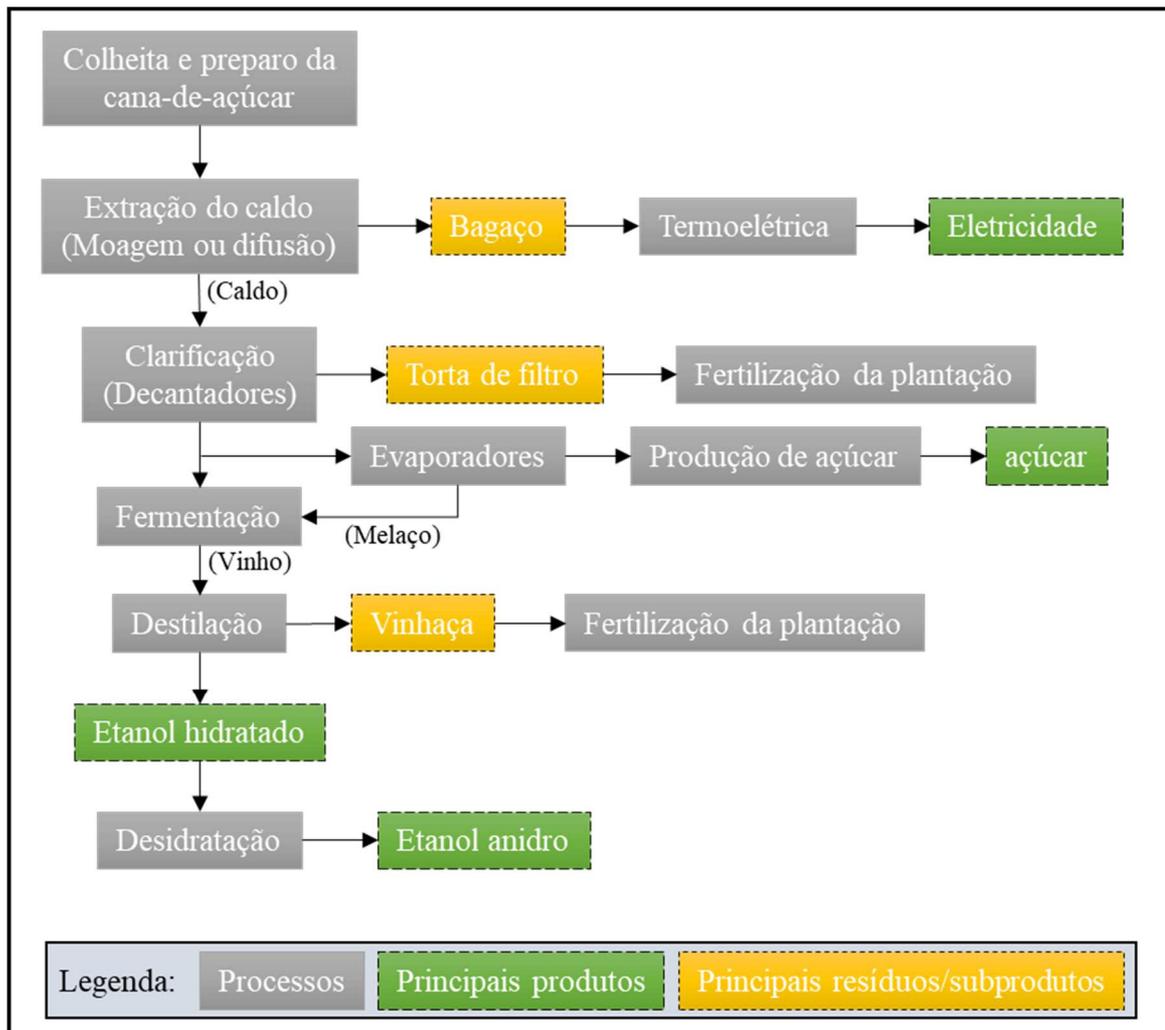
Embora o uso de etanol combustível apresente vantagens ambientais em relação aos combustíveis de origem fóssil, um complexo agroindustrial do porte deste setor também impõe novos desafios ambientais a serem superados, como por exemplo, a gestão dos resíduos gerados. Resumidamente, as etapas industriais envolvidas na produção do etanol combustível estão descritas abaixo (AMORIM *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2008) e esquematizadas na

Figura 2:

- 1) **Extração do caldo da cana:** esta etapa é realizada por moagem ou empregando difusores, extraíndo o caldo de cana e gerando uma grande quantidade de bagaço de cana. O caldo de cana extraído pode ser utilizado tanto para a produção de etanol quanto de açúcar.
- 2) **Clarificação do caldo:** o caldo é submetido a tratamento químico para coagulação, floculação e precipitação das impurezas e decantação/filtração para remoção dos sólidos. Como resultado, tem-se um caldo com menor quantidade de sólidos e a torta de filtro, que é o montante de sólido removido.

- 3) **Evaporação:** o caldo de cana tratado, quando destinado à produção de açúcar, é concentrado em evaporadores e cozedores para a cristalização do açúcar. Deste processo, resulta ainda o melaço (ou mel), solução residual rica em açúcar.
- 4) **Fermentação:** o caldo de cana clarificado, ou o melaço diluído resultante da produção de açúcar, ou uma mistura dos dois (o mosto) é fermentada por leveduras produzindo o “vinho” com uma porcentagem de etanol na faixa de 8-9%. Após finalizada a fermentação, as leveduras são recuperadas por centrifugação e tratadas para serem empregadas em uma próxima batelada de fermentação. Já o vinho, é levado para a coluna de destilação.
- 5) **Destilação:** nesta etapa o etanol é separado do “vinho” produzindo o etanol hidratado com aproximadamente 96% (v/v) de etanol e vinhaça (ou vinhoto) na proporção aproximada de 1 L de etanol para 12 L de vinhaça. O etanol hidratado pode ser o produto final, que é empregado diretamente como combustível, concorrendo com a gasolina, ou pode ser submetido a desidratação.
- 6) **Desidratação:** o etanol hidratado é enviado para colunas de desidratação para a remoção de água, produzindo o etanol anidro com aproximadamente 99,7% (v/v) de etanol.

Figura 2 - Esquema resumido das etapas da produção de etanol combustível a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser visto na **Figura 2**, os principais resíduos gerados na produção de etanol combustível a partir na cana de açúcar são a torta de filtro, o bagaço e a vinhaça. Estes resíduos são, na verdade, subprodutos, sendo reaproveitados e empregados na cadeia produtiva como matérias-primas para outros fins. No caso da torta de filtro e da vinhaça, estas são empregadas na fertilização do solo do canavial, diminuindo a demanda por fertilizantes minerais, além de diminuir a demanda por irrigação, no caso da vinhaça. Já o bagaço é utilizado para queima no sistema termoelétrico para geração de energia elétrica e térmica, as quais são utilizadas no próprio processo de produção do etanol, sendo que o excedente de energia elétrica é vendido para o sistema de energia elétrica brasileiro (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Entre os resíduos gerados, a vinhaça é o resíduo que enfrenta o maior desafio para a sua adequada destinação. Neste caso, a adequada destinação envolve o reaproveitamento da vinhaça gerando o menor impacto possível e geração de receita. A vinhaça é um resíduo líquido,

proveniente da etapa de destilação na produção de etanol. Sua composição é variável, contendo elevada carga de matéria orgânica e minerais como potássio, nitrogênio, fosfato e água, fazendo desta uma ótima fonte de nutrientes e água para o solo das plantações de cana-de-açúcar (BORDONAL *et al.*, 2018), justificando assim seu emprego na fertirrigação dos canaviais. Atualmente, a fertirrigação dos canaviais com vinhaça é a prática mais empregada como destinação final da vinhaça gerada (MORAES *et al.*, 2014). Desta forma, tendo como referência a produção de etanol da safra 2019/2020 e a proporção de 12 L de vinhaça para 1 L de etanol produzido (AMORIM *et al.*, 2011), um montante de aproximadamente 400 bilhões de litros de vinhaça são reaproveitados anualmente por meio da fertirrigação.

Tendo como base o volume de vinhaça que é reaproveitado anualmente por meio da fertirrigação, diversas são as preocupações relacionadas com esta prática. Entre estas estão a possibilidade de salinização do solo (FUESS; GARCIA, 2014), aumento na emissão de gases de efeito estufa (N_2O e CH_4) (OLIVEIRA *et al.*, 2013, 2015) e contaminação de águas subterrâneas (GONZÁLEZ; MEJÍA, 2015). Desta forma, estes temas têm sido foco de pesquisa com o intuito de conhecer os impactos ambientais relacionados a fertirrigação com vinhaça. Além disso, a possibilidade da vinhaça ser uma fonte de dispersão de antibióticos para o meio ambiente tem chamado a atenção recentemente (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; SULEIMAN *et al.*, 2018). O uso de antibióticos na produção de etanol se dá na etapa de fermentação, sempre que os níveis de contaminação com bactérias colocam em risco a produtividade das leveduras responsáveis pela conversão do açúcar em etanol. Desta forma, a contaminação pode ser eliminada e a produtividade mantida (AMORIM *et al.*, 2011).

A dispersão de antibióticos no ambiente traz a preocupação relacionada ao aumento dos microrganismos resistentes a antibióticos (MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014). Antibióticos e genes responsáveis pela resistência podem alcançar os solos, as águas superficiais e subterrâneas por diferentes vias. A migração de substâncias entre os diferentes compartimentos ambientais depende de propriedades físico-químicas de cada molécula, as quais podem guiar processos importantes como solubilidade, sorção e reatividade que serão responsáveis pela sua mobilidade no ambiente. Desta forma, torna-se necessária a análise dos diversos compartimentos do ambiente com o intuito de identificar a ocorrência destes contaminantes (BOY-ROURA *et al.*, 2018).

Além da problemática relacionada à contaminação do ambiente, a presença de antibióticos na vinhaça pode comprometer a adoção de processos para a redução da carga orgânica da vinhaça por meio da produção de biogás. Atualmente, o processo que demonstra

maior viabilidade econômica para esta tarefa é a biodigestão anaeróbia, que permitiria reduzir a carga orgânica da vinhaça, produzindo o biogás (mistura de gases contendo principalmente metano) e isso sem diminuir a capacidade nutritiva da vinhaça para o solo (ESPANA-GAMBOA *et al.*, 2011). Entretanto, a presença de antibióticos na vinhaça pode comprometer a eficiência da conversão da matéria orgânica em biogás no processo de biodigestão anaeróbia, a qual depende de um consórcio de microrganismos que podem ser inibidos com a ação dos antibióticos (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). Desta forma, o uso de antibióticos na produção de etanol combustível e a prática da fertirrigação com vinhaça dos canaviais, como forma de reaproveitamento e destinação final deste resíduo, trazem novos riscos que requerem maior investigação com o intuito de dimensionar os impactos decorrentes destas práticas.

Entre as lacunas na literatura científica relacionadas a este tema, está a falta de estudos para a quantificação de antibióticos em vinhaça, além de solo e água subterrânea de áreas tratadas com vinhaça. Os trabalhos de analítica com vinhaça têm se restringido principalmente a determinação de sua composição/propriedade, como determinação de carbono orgânico total, nitrogênio total, enxofre total, DBO (demanda bioquímica de oxigênio), DQO (demanda química de oxigênio), sólidos em suspensão, sólidos dissolvidos, turbidez, salinidade, pH, carboidratos, aminoácidos, ácido oxálico, ácido acético, ácido lático, ácido fumárico, ácido succínico, glicerol, etanol, íons metálicos, nitratos, sulfatos, amônio entre outros (BENKE; MERMUT; CHATSON, 1998; CERÓN; AYERBE, 2013; CRESPI *et al.*, 2011; DOELSCH *et al.*, 2009; WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000).

Na literatura científica é possível encontrar trabalhos de determinação de antibióticos em diversas matrizes, como carne, peixe, ovo, leite, urina, ração animal, grãos secos de destilaria (tradução literal do termo em inglês “*dried distillers grains*”), águas superficiais, efluentes, solo, sedimento, entre outros (CHA; YANG; CARLSON, 2005; CHIESA *et al.*, 2015; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; DE ALWIS; HELLER, 2010; DELAHAUT *et al.*, 2010; FERRER; THURMAN, 2012; GÓMEZ-PÉREZ *et al.*, 2015; SEKAR; WU, 2006; TURNIPSEED *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2012). Na maioria destes trabalhos a técnica analítica utilizada é a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS), uma ferramenta capaz de realizar análises qualitativas e quantitativas de amostras complexas com elevada seletividade e com a capacidade de alcançar limites de detecção muitas vezes inferiores a ng mL^{-1} .

Entre os antibióticos mais comumente aplicados durante o processo de fermentação etanólica estão a penicilina G, virginamicina (composta pela mistura de virginamicina M1 e

virginiamicina S1), monensina, tetraciclina e estreptomicina (HYNES *et al.*, 1997; ISLAM; TOLEDO; HAMDY, 1999; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011; OLIVA-NETO; YOKOYA, 2001), os quais foram alvo de estudo neste trabalho.

Objetivos

Este trabalho tem o objetivo de suprir lacunas no conhecimento sobre as consequências do uso de antibióticos na produção de etanol combustível. Para isso, nos próximos capítulos serão abordados os seguintes estudos:

- I. Desenvolvimento de método analítico para determinação de antibióticos em vinhaça empregando LC-MS/MS.
- II. Avaliação de contaminantes em vinhaça, solo e água subterrâneas de áreas fertirrigadas com vinhaça por abordagens do tipo alvo e análises de compostos suspeitos (*suspect screening*).
- III. Avaliação da inibição da biodigestão anaeróbia termofílica da vinhaça por antibióticos.

Capítulo 1: Desenvolvimento de Método Analítico para Determinação de Antibióticos em Vinhaça Empregando LC-MS/MS

1.1 Introdução

A resistência a antibióticos é um problema a nível global que faz com que a eficiência dos antibióticos no combate às infecções seja reduzida devido ao surgimento de bactérias resistentes (HEUER; SCHMITT; SMALLA, 2011; MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014). Estima-se que atualmente 700.000 pessoas morrem por ano no mundo por conta de microrganismos resistentes (MATTHIESSEN *et al.*, 2016). Apesar do impacto deste tema na saúde pública, não há regulamentação para o uso de antibióticos na indústria sucroalcooleira. Desta forma, o setor sucroenergético passa a ser um potencial dispersor de antibióticos no ambiente devida à prática de uso de antibióticos no processo produtivo do etanol combustível e da fertirrigação dos canaviais com vinhaça.

A capacidade de alguns antibióticos de resistirem ao processo industrial similar ao da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e estarem presentes nos resíduos gerados já foi anteriormente demonstrada por Duelge e colaboradores, ao analisarem grãos de destilação, um resíduo sólido oriundo da produção de etanol de milho (DUELGE; NISHSHANKA; DE ALWIS, 2017). Desta forma, espera-se que o mesmo aconteça com a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. No entanto, há uma lacuna de conhecimento sobre a existência ou não de antibióticos na vinhaça e, por consequência, se a prática de fertirrigação é responsável pela dispersão destes contaminantes no ambiente.

A análise de antibióticos e outros compostos farmacêuticos em diferentes matrizes, como amostras ambientais (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2015; VALSECCHI *et al.*, 2015), alimentos (MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; MORENO-GONZÁLEZ; GARCÍA-CAMPAÑA, 2017), esgoto (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2015) e outras (DUELGE; NISHSHANKA; DE ALWIS, 2017; LIMA GOMES *et al.*, 2015) tem sido realizadas com elevada acurácia e alcançando baixos níveis de detecção empregando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) e utilizando técnicas de extração como SPE (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2015), SALLE (MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; MORENO-GONZÁLEZ; GARCÍA-CAMPAÑA, 2017) e SPE on-line (GUSMAROLI; INSA; PETROVIC, 2018; LIMA GOMES *et al.*, 2015; VALSECCHI *et al.*, 2015). Desta forma, as

três técnicas de extração (SPE, SALLE e SPE on-line) seguida da análise por LC-MS/MS são abordagens promissoras na análise de antibióticos em diferentes matrizes, tendo sido as abordagens selecionadas para realização deste trabalho. Mais detalhes sobre estas técnicas serão abordados na sequência.

1.1.1 Técnicas de Preparo de Amostra para Análise de Contaminantes de Preocupação Ambiental

Na maioria dos casos, o preparo de amostra é uma etapa obrigatória para a análise química. Isso se deve ao fato de que poucos são os instrumentos analíticos totalmente automatizados capazes de realizar a manipulação da amostra e a análise em etapa única. O preparo de amostra pode ter dois objetivos principais. O primeiro é isolar o analito, eliminando componentes da matriz e promovendo uma limpeza da amostra (*clean up*). O segundo objetivo é concentrar os analitos, ou seja, transferir os analitos da amostra para um volume menor. Com estes dois objetivos, pode-se então eliminar componentes da matriz, que poderia afetar a performance do método e aumentar a detectabilidade (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015).

No contexto dos métodos cromatográficos, o preparo de amostra em geral é a etapa que demanda maior tempo do analista. (GRECCO *et al.*, 2018). Esta etapa pode envolver procedimentos simples de manipulação da amostra como diluição e/ou filtração ou procedimentos mais complexos, envolvendo o emprego de técnicas de extração. No que diz respeito a análise de contaminantes orgânicos em amostras ambientais por LC-MS/MS, a técnica de extração mais empregada é a extração em fase sólida SPE (do inglês *solid phase extraction*) (KIM *et al.*, 2018). Apesar dos diferentes sorventes empregados em SPE, o que permite o emprego da técnica para uma vasta gama de analitos, e da grande capacidade de enriquecimento do analito na amostra, a SPE é uma técnica muito laboriosa, fato que é superado pela extração em fase sólida on-line (SPE on-line). Outra técnica, que em termos de frequência analítica se coloca na posição intermediária entre SPE e SPE on-line, é a SALLE. Neste trabalho, as três técnicas citadas são alvo de estudo para a extração de antibióticos em amostras de vinhaça.

1.1.1.1 Extração em Fase Sólida (SPE)

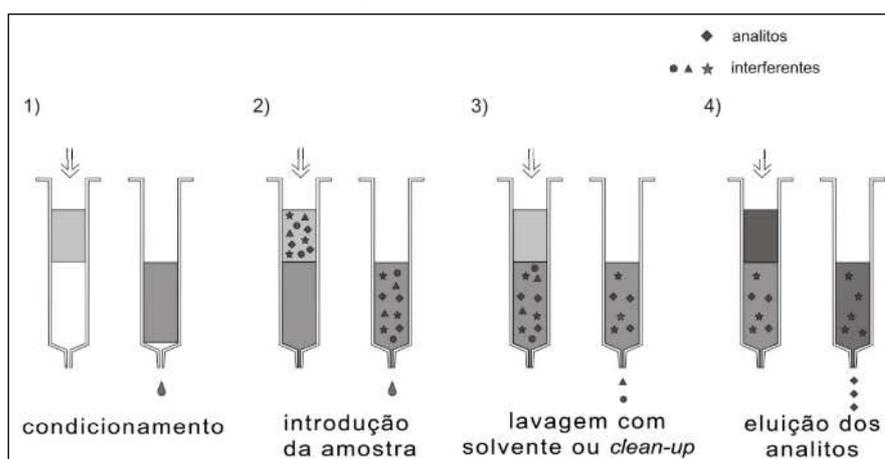
A SPE tem sua origem na década de 70 como uma alternativa à extração líquido-líquido trazendo vantagens como a diminuição no consumo de solvente orgânico, ausência de

emulsões, possibilidade de automação, maior seletividade, entre outros. Esta é uma técnica de extração líquido-sólido, extraindo o analito de uma fase líquida por meio da interação da amostra com um sorvente sólido. Os dispositivos utilizados na SPE, denominados cartuchos de extração, podem apresentar variados formatos e os mecanismos de retenção do analito no sorvente pode envolver partição, adsorção, troca iônica (catiônica e aniônica), entre outros (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016; JARDIM, 2010).

De forma geral, as etapas envolvidas na aplicação da SPE estão resumidas na **Figura 3** e incluem:

1. **Condicionamento:** ativar/equilibrar o cartucho com solvente compatível com o solvente da amostra.
2. **Introdução/percolação da amostra:** a amostra é percolada no cartucho promovendo a interação da amostra com o sorvente responsável pela extração do analito.
3. **Limpeza com solvente (*clean up*):** nesta etapa é possível eliminar componentes da amostra retidos no sorvente utilizando um solvente apropriado, que não seja capaz de eluir o analito e que possa eluir outras substâncias presentes.
4. **Eluição:** empregando o solvente apropriado, os analitos podem ser removidos do sorvente e coletados para análise.

Figura 3 - Etapas da extração em fase sólida.



Fonte: Jardim e colaboradores (JARDIM, 2010).

Usualmente, após a etapa de eluição, o extrato coletado é secado sob fluxo de nitrogênio e redissolvido em solvente apropriado para a análise. Como pode ser notado, são várias as etapas no procedimento de extração por SPE, o que demanda tempo de preparo e aumenta a

possibilidade de erro durante sua execução, sendo estas as principais desvantagens da técnica. Outra desvantagem é o elevado custo dos cartuchos de extração, pois os mesmos são de uso único, e após a extração são descartados (JARDIM, 2010). Apesar dos aspectos negativos apontados, a SPE oferece soluções para diversos problemas analíticos relacionados ao preparo de amostras. São diversos sorventes disponíveis comercialmente, o que faz a técnica apropriada para analitos (semivoláteis e não voláteis) com uma ampla faixa de propriedades, incluindo compostos neutros, polares, apolares, ionizáveis, entre outros. Além disso, analitos em baixa concentração podem ter sua concentração aumentada em até 5000 vezes, possibilitando sua análise quantitativa ou qualitativa em nível de traços (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016; JARDIM, 2010).

A extração em fase sólida é conhecida por ser uma técnica de extração laboriosa e associada com baixa frequência analítica, porém, a possibilidade de automação e a SPE on-line surgem para superar a limitação citada. Em ambos os casos, a necessidade de instrumentação dedicada à automação se torna um dos primeiros impasses para sua implementação. Outro fator limitante que pode ser um problema é a ocorrência de efeito memória (*carryover*), que pode limitar ou inviabilizar sua aplicação. Mas, superados os pontos destacados, tanto a automação quanto a SPE on-line trazem o aumento da frequência analítica, melhora da precisão e exatidão (ROSSI; ZHANG, 2000). Mais detalhes sobre a SPE on-line serão dados na **seção 1.1.1.2**.

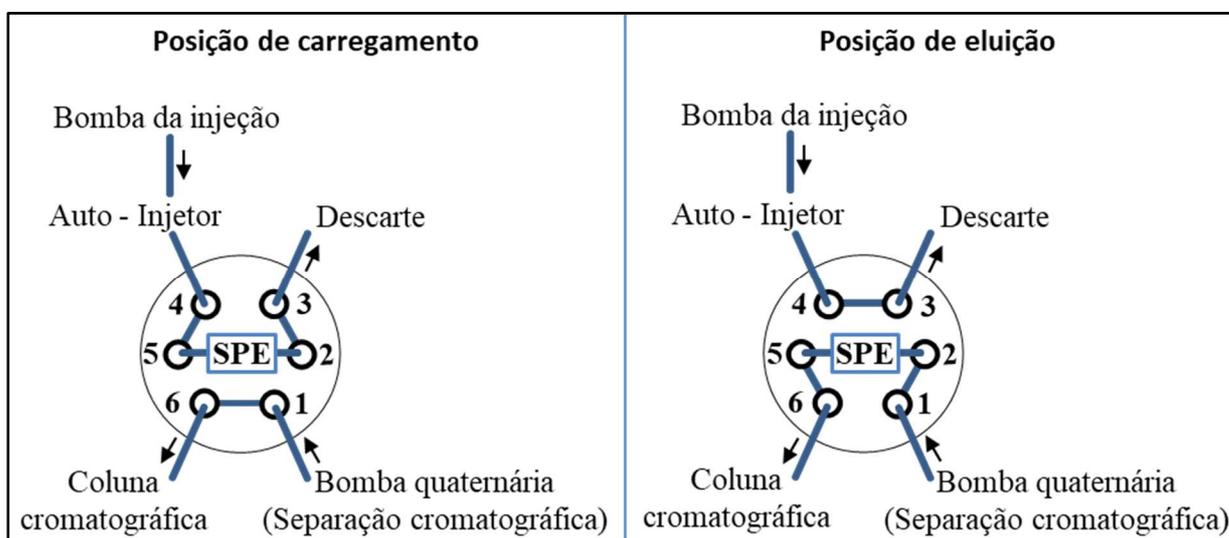
Os materiais mais largamente empregados como sorvente em SPE consistem em grupos orgânicos ligados quimicamente à sílica, como por exemplo os grupos C18 (octadodecil), C8 (octil), fenil, ciano, diol, amino, amina quaternária, ácido sulfônico, ácido carboxílico entre outros. Os materiais poliméricos também se destacam, como por exemplo os sorventes baseados em copolímeros contendo dois monômeros que resultam em características hidrofílica e lipofílica em um único material (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016; JARDIM, 2010), como é o caso dos sorventes HLB SupelTM-Select, HLB Oasis[®] e StrataTM-X, por exemplo. Este tipo de sorvente apresenta muitas vantagens em relação aos sorventes baseados em grupos orgânicos quimicamente ligados à sílica, como por exemplo tolerância a uma ampla faixa de pH e capacidade de retenção de compostos em uma faixa de polaridade maior. Desta forma, estes materiais são os mais indicados para o desenvolvimento de métodos multirresíduos (que envolve uma grande quantidade de analitos) e multiclasses (que envolve várias classes de analitos), nos quais a necessidade de extrair substâncias com diferentes propriedades é recorrente (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013). De fato, um dos cartuchos de extração mais utilizados na extração de antibióticos em águas ambientais é o HLB Oasis[®]. Este

grupo de substância se apresenta em uma grande faixa de propriedades, incluindo substâncias polares, apolares, ácidas, básicas entre outras (SEIFRTOVÁ *et al.*, 2009), fato motivador para o emprego de cartuchos de extração do tipo polimérico com características hidrofílica-lipofílica neste trabalho.

1.1.1.2 Extração em Fase Sólida on-line (SPE on-line)

A SPE on-line proporciona preparo de amostra e análise cromatográfica em etapa única. Isso significa menor manipulação da amostra e por consequência menor possibilidade de erro. Para isso, é utilizado um sistema cromatográfico bidimensional no modo comutação de coluna (*column switching*). Neste sistema, a primeira dimensão é a coluna de extração, e a segunda é a coluna cromatográfica. A coluna de extração é responsável pela extração dos analitos e limpeza da amostra, já a coluna cromatográfica é responsável pela separação cromatográfica propriamente dita. Ambas as dimensões trabalham simultaneamente, porém, o caminho que os analitos seguem no sistema cromatográfico é determinado pela posição da válvula comutadora que une as duas dimensões, como pode ser visto na **Figura 4**.

Figura 4 - Configuração do sistema cromatográfico bidimensional empregado na SPE on-line no modo *back-flush*.



Fonte: elaborada pelo autor.

A injeção da amostra é realizada na posição de carregamento. Nesta posição, a bomba da injeção é responsável por levar a amostra injetada pelo injetor automático até a coluna de extração por meio do bombeamento da fase móvel da injeção. Na coluna de extração os analitos são retidos e por um curto período, a fase móvel da injeção, fluindo continuamente, promove a

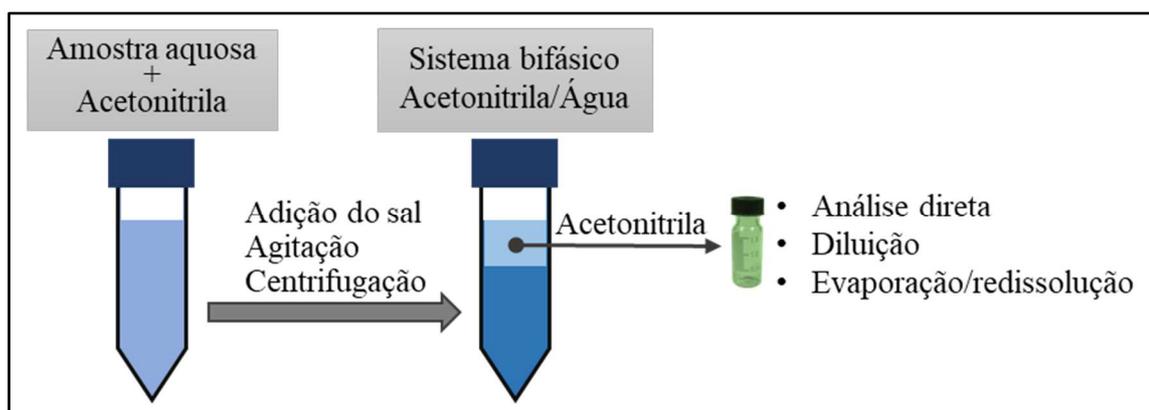
limpeza da amostra. Simultaneamente, a fase móvel da separação cromatográfica flui pela coluna cromatográfica a equilibrando para o posterior recebimento dos analitos. Após finalizada a etapa de injeção/extração/limpeza da amostra, a válvula comutadora é acionada mudando para a posição eluição. Nesta posição, a fase móvel da separação cromatográfica flui diretamente para a coluna de extração, em sentido contrário ao da fase móvel de injeção, promovendo a eluição dos analitos e os transportando para a coluna cromatográfica, onde ocorrerá a separação cromatográfica. Desta forma, em etapa única, ocorre a extração e a separação cromatográfica (EUGÊNIA; QUEIROZ, 2017; KATAOKA; SAITO, 2012).

1.1.1.3 Extração Líquido-Líquido Assistida pelo Efeito *salting-out* (SALLE)

A SALLE é uma técnica de extração que se baseia na separação de fase entre dois líquidos miscíveis, sendo um deles água, promovida pela adição de alta concentração de sal, 1-10 mol L⁻¹. Neste processo são formadas duas fases, uma aquosa com alta concentração salina, e outra orgânica. Devido à alta concentração salina na fase aquosa os analitos migram para a fase orgânica, ocorrendo então a extração dos analitos na fase orgânica. Os primeiros relatos da aplicação desta técnica de extração remonta a década de 70 e desde então tem sido aplicada principalmente na análise de amostras biológicas (GRECCO *et al.*, 2018; VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013). De forma genérica, as etapas envolvidas na aplicação da SALLE podem ser vistas na **Figura 5**.

Diversos fatores afetam a eficiência da extração por SALLE, como por exemplo a identidade e a concentração de sal utilizada, o tipo de solvente orgânico (solvente extrator) e as propriedades físico-químicas do analito. Diversos sais como cloreto de sódio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, acetato de amônio, entre outros, já foram empregados na extração por SALLE em uma larga faixa de concentração. Vários solventes extratores também já foram estudados, como etanol, isopropanol, acetona, acetato de etila, acetonitrila, entre outros. A efetiva separação de fase vai depender do solvente extrator empregado e do tipo e concentração de sal. Em uma situação de efetiva separação de fase, a capacidade de extração será diretamente afetada pela solubilidade do analito no solvente extrator. Desta forma, definir o tipo e concentração de sal, o solvente extrator, e a proporção entre solvente extrator:amostra são os desafios iniciais para o desenvolvimento de método de extração por SALLE (GRECCO *et al.*, 2018; VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013).

Figura 5 - Etapas envolvidas no emprego da SALLE.



Fonte: elaborada pelo autor.

1.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação de componentes presentes em uma amostra. A separação cromatográfica se dá devido a distribuição das espécies e duas fases em contato. Estas fases são classificadas como fase estacionária e fases móvel (gás de arraste no caso da cromatografia gasosa), sendo que a fase móvel flui pela fase estacionária gerando um fluxo que transporta os componentes presentes na mistura a ser separada. Desta forma, as substâncias transportadas pela fase móvel, interagem com as fases estacionária e móvel de maneira imposta pelas propriedades físico-químicas das espécies envolvidas e, como resultado, tem-se que substâncias diferentes, no geral, migram pela fase estacionária em velocidades diferentes, ocorrendo assim a separação cromatográfica (COLLINS, 1997).

O surgimento da cromatografia remonta os primeiros anos do século 20, com os trabalhos de Ramsey, realizando a separação de gases e vapores empregando carvão como sorvente e Michael Tswett, que separou pigmentos de plantas empregando um cilindro de vidro preenchido com sólidos finamente divididos e solventes orgânicos percolados por gravidade (MCNAIR; MILLER, 2009). Vale destacar que o conhecimento em métodos de separação, de uma forma empírica, já foi relatado muito antes do século 20, remontando a história da humanidade. Porém, somente no trabalho de Tswett é que o mecanismo de adsorção foi corretamente atribuído ao fenômeno envolvido na separação e o termo cromatografia foi empregado pela primeira vez. Desta forma, os trabalhos de Tswett são considerados como o marco inicial das técnicas cromatográficas e o século 20 é muitas vezes denominado o século da cromatografia (COLLINS, 2009).

As separações cromatográficas podem ser realizadas de diversas maneiras e uma variedade enorme de técnicas cromatográficas estão atualmente disponíveis para serem empregadas aos mais diversos problemas de separação. Pode-se dividir a cromatografia em dois grandes grupos, como a cromatografia planar e a cromatografia em coluna. Na cromatografia planar, a fase estacionária é disposta em uma superfície planar, como por exemplo a cromatografia em papel e a cromatografia em camada delgada. Em ambos os casos, a base da fase estacionária é imersa na fase móvel, a qual flui por capilaridade pela fase estacionária transportando a mistura a ser separada, cujos componentes migram diferencialmente e como consequência tem-se a separação. Já na cromatografia em coluna, a fase estacionária é disposta em tubos cilíndricos e a fase móvel flui pela fase estacionária por gravidade ou bombeamento (se a fase móvel é líquida) ou por pressão (no caso de a fase móvel ser gasosa). Dentro da cromatografia em coluna, é possível ainda realizar a classificação baseada no estado físico da fase móvel, como por exemplo cromatografia líquida (a fase móvel é um líquido), cromatografia gasosa (a fase móvel é um gás) e cromatografia de fluido supercrítico (a fase móvel é um fluido super crítico) (COLLINS, 1997). Neste trabalho, nos restringiremos a falar sobre a cromatografia líquida em coluna.

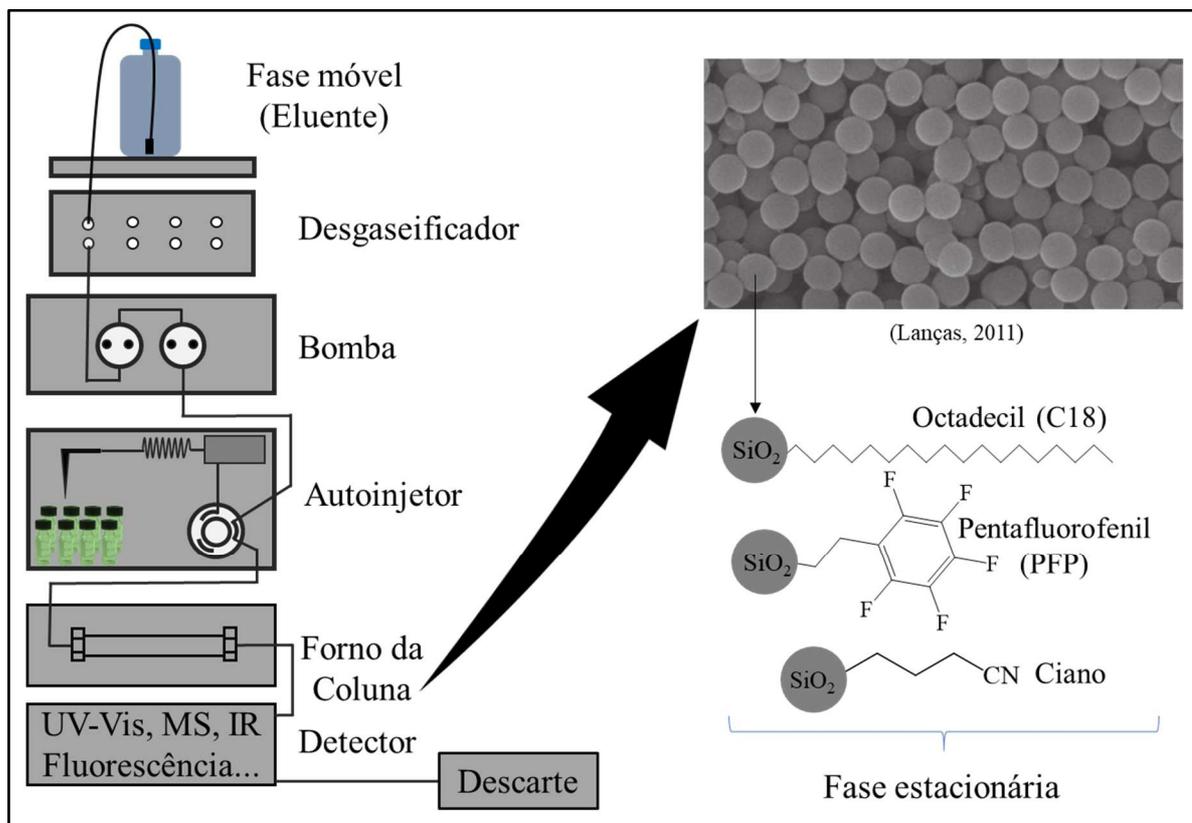
A cromatografia líquida em coluna, como inicialmente empregada por Michael Tswett, fazia uso da gravidade para promover um fluxo de fase móvel através da fase estacionária. Porém, o desenvolvimento da instrumentação em cromatografia, assim como o desenvolvimento de colunas cromatográficas contendo fase móvel com características apropriadas para a separação cromatográfica de substância com diversas propriedades, levou ao desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). O primeiro equipamento de CLAE comercialmente disponível foi inserido no mercado em 1960 pela Waters Associates e DuPont, sendo que deste então, a CLAE se consolidou como uma das técnicas de separação mais empregadas mundialmente (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010b).

Equipamentos modernos de CLAE são compostos por vários módulos controlados por um computador. Esquemáticamente, estas partes podem ser vistas na **Figura 6** e estão descritas na sequência:

1. **Reservatório de fase móvel:** parte responsável por acondicionar a fase móvel utilizada na separação cromatográfica.

2. **Desgaseificador:** modulo responsável por remover gases dissolvidos na fase móvel.
3. **Bomba:** módulo responsável por promover o fluxo de fase móvel no sistema cromatográfico.
4. **Injetor automático** (autoinjetor): módulo responsável por acondicionar e injetar as amostras no sistema cromatográfico.
5. **Forno da coluna:** módulo responsável por acondicionar a coluna cromatográfica sob temperatura controlada. A coluna cromatográfica tem formato cilíndrico, geralmente de aço inoxidável, que é preenchido com a fase estacionária, geralmente composta por partículas de sílica modificada.
6. **Detector:** módulo responsável por gerar um sinal analítico em decorrência da presença de uma substância. Sendo assim, o detector é responsável pela detecção, identificação ou quantificação das substâncias envolvidas.
7. **Reservatório para descarte:** após passar por todo sistema cromatográfico, transportando as substâncias a serem separadas, a fase móvel segue para o reservatório de descarte ou é coletada para outras finalidades.

Figura 6 - Esquema representando as partes integrantes de equipamentos modernos de HPLC com destaque para a fase estacionária empregada na coluna cromatográfica.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A grande versatilidade de aplicação da CLAE se origina, principalmente, nos diversos tipos de detectores existente, assim como na grande variedade de tipos de colunas disponíveis comercialmente. Entre os detectores largamente empregados em CLAE podem ser destacados os detectores baseados em espectrofotometria no UV-Visível, no índice de refração, fluorescência, amperometria, condutividade, espalhamento de luz evaporativo, espectrometria de massas, entre outros (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010a). Mais detalhes sobre a CLAE empregando a detecção por espectrometria de massas pode ser visto na seção 1.1.2.1. Já quanto as colunas cromatográficas disponíveis, a maioria delas se baseiam em partículas de sílica, podendo ou não ser quimicamente modificadas, material denominado fase estacionária quimicamente ligada (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

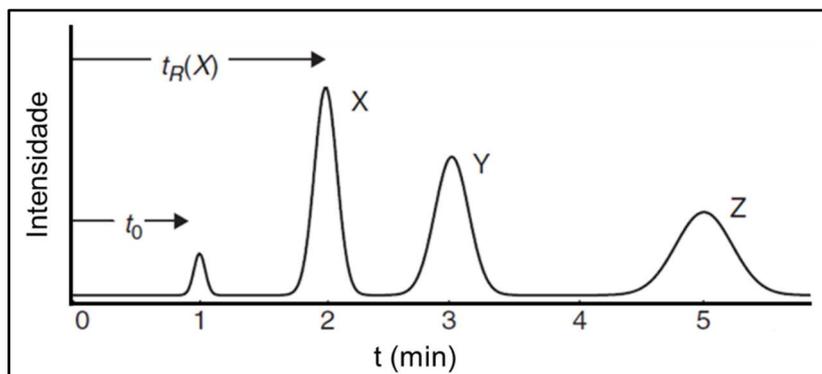
Além das classificações da CLAE já citadas, outras duas distinções são importantes para direcionar as discussões neste texto. A CLAE pode ser classificada como de fase reversa, CLAE-FR, (a qual emprega colunas com fase estacionária apolar e fase móvel polar, sendo uma mistura de água e outro solvente orgânico) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010c) e de fase normal (a qual emprega colunas com fase estacionária polar, como a sílica, e fase móvel menos

polar e livre de água) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010d). Vale destacar que, atualmente, a CLAE-FR é a modalidade mais empregada e a de fase normal tem seu emprego mais vantajoso em situações onde a baixa retenção da CLAE-FR inviabiliza seu emprego (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010d).

A CLAE-FR é uma técnica de separação cuja aplicação é bastante diversificada, e isso se dá devido a vasta gama de colunas cromatográficas disponíveis. As fases estacionárias quimicamente ligada, predominantes em CLAE-FR, contendo um grupo orgânico quimicamente ligado na superfície de um material suporte, geralmente a sílica, proporcionam diferentes possibilidades de interação com as moléculas alvo da separação. Desta forma, o recobrimento orgânico nas partículas de sílica possibilita a partição das moléculas em contato íntimo com a fase estacionária. Este fato não impede que outros tipos de interação, como a adsorção, ocorram, Porém, o mecanismo de partição é tido como o principal no processo de separação cromatográfica por CLAE-FR. Os grupos orgânicos mais comumente empregados como fase quimicamente ligadas são C8 (Octil), C18 (Octadecil), fenil, PFP (Pentafluorofenil), ciano, entre outros (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010e).

A migração diferencial dos analitos em uma coluna cromatográfica cria bandas cromatográficas que ao chegar no detector geram um sinal analítico que é registrado em função do tempo pelo sistema de aquisição de dados. Este registro é denominado cromatograma e um exemplo deste registro pode ser visto na **Figura 7** para a separação das substâncias X, Y e Z. No cromatograma mostrado nesta figura, o tempo de eluição de uma substância que não é retida pela fase estacionária está representado por t_0 . Este é o tempo que uma substância, que não é retida pela coluna, leva para se deslocar do injetor até o detector do cromatógrafo. Já substâncias que podem ser retidas pela coluna cromatográfica, devido às interações com a fase estacionária, apresentam um tempo de retenção maior, como pode ser visto na **Figura 7** os picos cromatográficos para as substâncias X, Y e Z, com destaque para $t_{R(X)}$, o tempo de retenção da substância X. O tempo de retenção de uma substância, associado ao sinal analítico gerado (espectro de absorção no UV-Visível ou espectro de massas, por exemplo) são importantes parâmetros qualitativos que permitem identificar uma substância. Além disso, a proporcionalidade entre sinal analítico e a concentração da substância é uma característica que permite realizar a quantificação de substâncias por meio a CLAE.

Figura 7 - Cromatograma genérico para as substâncias X, Y e Z.

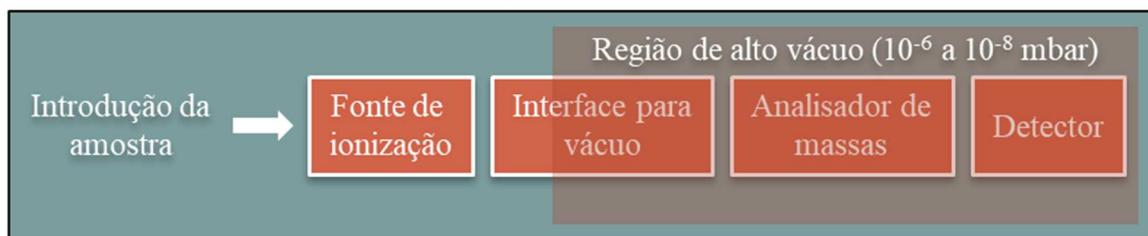


Fonte: adaptado de Snyder e colaboradores (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010c).

1.1.2.1 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (EM ou MS do inglês *Mass Spectrometry*) é uma técnica que permite a análise de íons (orgânicos e inorgânicos) em fase gasosa e sob vácuo utilizando um espectrômetro de massas. Desta forma, para que a espectrometria de massas seja apropriada para a análise de uma determinada molécula, necessariamente, esta deve ser passível de ionização (LANÇAS, 2009). O desenvolvimento da MS remonta os trabalhos de J.J. Thomson, com os experimentos realizados com tubos de raios catódicos em 1897, e tem um grande marco na década de 80, que foi a demonstração da aplicabilidade prática da ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray ionization*) realizada por John Fenn em 1984, o que acelerou o acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas (LANÇAS, 2009). O grande desafio no acoplamento da entre a CLAE e MS (denominado LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry*) foi o desenvolvimento de uma interface que possibilitasse a transferência do analito, que está na fase móvel que é líquida) para a fase gasosa na sua forma ionizado. Este desafio foi superado com o desenvolvimento das fontes de ionização a pressão atmosféricas, sendo as principais a ionização por *electrospray* (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e fotoionização a pressão atmosférica (APPI do inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*). De forma genérica, um espectrômetro de massas é formado pelas seguintes partes principais: fonte de ionização, interface para vácuo, analisador de massas e detector, como esquematizado na **Figura 8**.

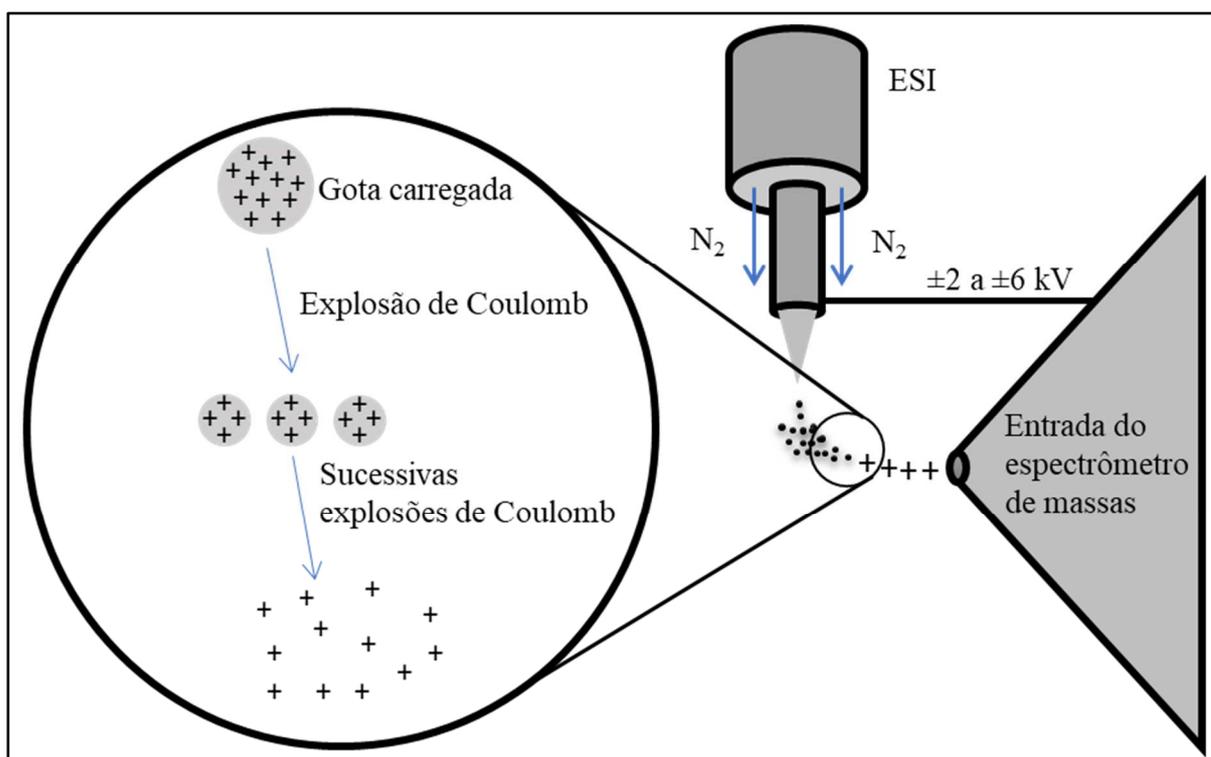
Figura 8 - Partes principais de um espectrômetro de massas.



Fonte: adaptado de Lanças e colaboradores (LANÇAS, 2009).

Entre as técnicas de ionização a pressão atmosférica, a ESI é de longe a mais empregada em LC-MS e entre os motivos está a sua aplicabilidade. A ESI é compatível com moléculas de média a alta polaridade contendo grupos químicos passíveis de ionização, podendo ter massa molecular de até 100.000 Da. Desta forma, a ESI é empregada tanto para análise de pequenas quanto para grandes moléculas, como por exemplo as proteínas (HOLČAPEK; JIRÁSKO; LÍSA, 2012). Em um sistema de LC-MS, a fonte de ionização é a parte responsável por transferir a molécula a ser analisada da fase líquida para a fase gasosa, sendo que a molécula pode ou não já estar ionizada na fase líquida. Na ESI, a ionização da molécula alvo ocorre principalmente na fase líquida, sendo que a fonte de ionização por ESI é então responsável pela separação destas cargas já existentes no efluente do cromatógrafo gerando gotículas com carga líquida diferente de zero. O efluente do cromatógrafo entra continuamente no espectrômetro de massas por meio da sonda do *electrospray*. Esta sonda consiste em um capilar metálico circundado por um fluxo de um gás (N_2 ou Ar, por exemplo) para promover a nebulização do efluente cromatográfico. Entre a entrada do espectrômetro de massas e o capilar metálico é aplicada uma diferença de potencial na faixa de ± 2 a ± 6 kV, que é responsável pela separação de cargas no efluente cromatográfico, e com isso é gerado um spray com gotículas carregadas (com carga líquida diferente de zero). Conforme ocorre a evaporação do solvente, as gotas geradas ficam com uma densidade de cargas cada vez maior, a ponto de que sucessivas explosões de Coulomb ocorrem levando à formação de íons em fase gasosa, os quais são direcionados para dentro do espectrômetro de massas (HOLČAPEK; JIRÁSKO; LÍSA, 2012; LANÇAS, 2009). Esquematicamente, os eventos que sucedem a saída do efluente em um cromatógrafo líquido, incluindo a formação de íons em fase gasosa e a posterior entrada destes no espectrômetro de massas, podem ser vistos na **Figura 9**.

Figura 9 - Processo de ionização por *electrospray*.



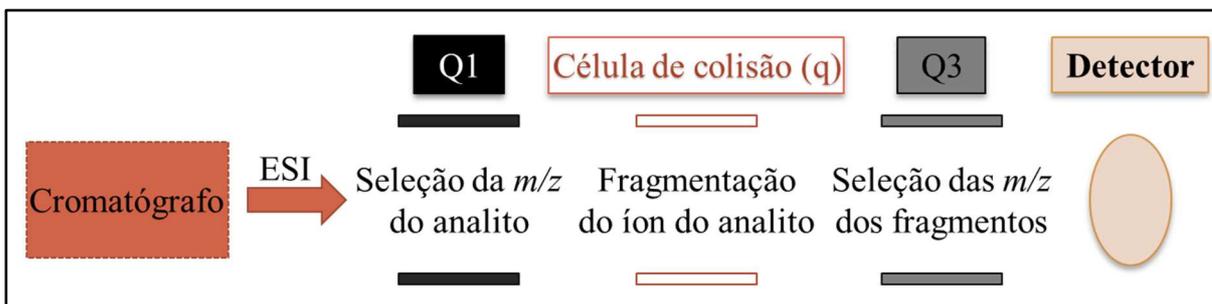
Fonte: elaborada pelo autor.

Uma vez vencida a etapa de ionização, os íons gerados na fonte de ionização entram no espectrômetro de massas por um orifício muito pequeno, passando por uma interface que separa uma região de pressão atmosférica de uma região de alto vácuo, sendo direcionados para o analisador de massas (AB SCIEX, 2011). Atualmente, diferentes analisadores de massas são empregados, sendo que cada um possui características próprias que definem sua aplicação. Entre os analisadores de massas disponíveis comercialmente podemos citar os com capacidade para alta resolução, como os analisadores do tipo tempo de voo (TOF, do inglês *Time-of-Flight*), setor magnético, ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR, do inglês *Fourier-transform ion cyclotron resonance*) e orbitrap. Já entre os analisadores de baixa resolução, podemos citar o quadrupolo linear (Q), armadilha de íons linear (LIT, do inglês *Linear Ion Trap*), armadilha de íons de Paul (QIT do inglês *Quadrupole ion Trap*) (GROSS, 2017). Além disso, mais de um analisador de massas podem ser utilizados em série em um espectrômetro de massas, dando origem a espectrometria de massas em sequencial no espaço, ou ainda, a analisadores de massas híbridos, que é quando mais de um tipo de analisador é empregado em série. Com isso, os equipamentos híbridos unem a potencialidade de mais de um analisador de massas, expandindo a capacidade da técnica (GROSS, 2017).

A espectrometria de massas em tandem no espaço geralmente apresenta dois estágios de análise de massas. O primeiro é responsável pela seleção de uma faixa de m/z (seleção dos íons precursores), e o segundo é responsável pela análise dos íons produtos, gerados na célula de colisão (q), localizada entre os dois analisadores de massas. Desta forma, uma das vantagens da espectrometria de massas em tandem está na possibilidade da obtenção de espectro de massas de íons produto, ou simplesmente espectro de MS^2 (GROSS, 2017). A abreviação LC-MS/MS é muito utilizada para designação da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, tendo seu uso mais empregado quando o analisador de massas é do tipo triplo quadrupolo (QqQ) (GROSS, 2017). Porém, abreviações como LC-QqLIT, LC-QqQ ou LC-QqTOF, entre outras, também são muito utilizadas para designar o tipo de analisador de massas presente no espectrômetro de massas (JAKIMSKA; KOT-WASIK; NAMIEŚNIK, 2014; PETROVIC, 2014).

As análises quantitativas empregando LC-MS são realizadas principalmente com sistemas do tipo como LC-QqQ e LC-QqLIT. Isso porque estes podem trabalhar no modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM, do inglês *Multiple reaction monitoring*) de aquisição de dados, conferindo elevada sensibilidade e seletividade aos métodos (JAKIMSKA; KOT-WASIK; NAMIEŚNIK, 2014; PETROVIC, 2014). De forma resumida, os eventos que ocorrem em um espectrômetro de massas operando no modo MRM podem ser vistos na **Figura 10**. Após a separação cromatográfica, o eluente contendo o analito entra na fonte de ionização, onde o analito ionizado é transferido da fase líquida para a fase gasosa. Desta forma, o valor de m/z previamente conhecido para o analito é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1), isso significa que apenas os íons que contêm o valor de m/z selecionado seguirão para a célula de colisão. Na célula de colisão (q), um fluxo de gás (geralmente N_2) colide com o íon selecionado no Q1 fragmentando o íon selecionado e gerando fragmentos denominados íons produto. Os íons produtos seguem para o Q3, onde 2 deles serão selecionado e atingirão o detector. Desta forma, o que atinge o detector são, na verdade, fragmentos do íon precursor (o analito) o que confere elevada sensibilidade, pois o equipamento trabalha focado em m/z específica, e seletividade, pois raras serão as moléculas que formam íons precursores e íons produtos com mesmas m/z (GROSS, 2017).

Figura 10 - Caminho percorrido por uma molécula e sequência de eventos em um LC-MS/MS.



Fonte: elaborada pelo autor.

A LC-MS/MS é uma técnica analítica que se destaca para análise de contaminantes orgânicos no ambiente e em amostras de interesse ambiental (efluente doméstico, hospitalares, industriais, entre outros) e em baixas concentração. De fato, esta técnica tem sido largamente utilizada para a análise compostos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, drogas de abuso, retardantes de chamas, aditivos industriais, surfactantes, agrotóxicos, inibidores de corrosão, entre outros, nas mais diversas matrizes (JAKIMSKA; KOT-WASIK; NAMIEŚNIK, 2014; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015; RICHARDSON; KIMURA, 2020; SILVA; COLLINS, 2011). Com isso, a LC-MS/MS aparece como primeira opção para a realização do estudo proposto.

1.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo é avaliar as técnicas de extração SPE, SALLE e SPE on-line para a extração de antibióticos em amostras de vinhaça e desenvolver método empregando LC-MS/MS para a quantificação dos antibióticos comumente utilizados na etapa de fermentação da produção de etanol combustível como a penicilina G, monensina, tetraciclina, eritromicina, virginiamicina S1 e virginiamicina M1.

1.3 Materiais e Métodos

Os padrões analíticos usados neste trabalho foram sal dissódico do ácido benzilpenicilóico (ABP) > 95% (Vetranal[®]), cloridrato de tetraciclina (TC) 98% (Vetranal[®]), penicilina G potássica (Pen) 99% (Vetranal[®]), monensina sódica (Mon) 86,3% (Vetranal[®]), virginiamicina M1 (VM) ~ 90% (Toronto Research Chemicals) e virginiamicina S1 (VS) ≥ 99% (Sigma), eritromicina A di-hidratada (Eri) (Vetranal[®]) e sesquisulfato de estreptomicina 97,7% (Vetranal[®]). Os padrões internos isotopicamente marcados (ILIS, do inglês *Isotopically Labeled Internal Standards*) usados foram penicilina G-d7 (Pen-d7), virginiamicina M1-d2

(VM-d2) e eritromicina-d6 (Ery-d6), todos da Toronto Research Chemicals. O reagente ácido fórmico ACS, 88-91% (Sigma-Aldrich) foi usado como modificador de fase móvel e sulfato de amônio > 99% (Sigma-Aldrich) como agente precipitante de proteína e agente de *salting-out*. O reagente Na₂EDTA ACS, 99,4-100,6% (Sigma-Aldrich) foi usado como agente quelante. Solventes de grau de cromatografia da J.T. Baker, acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e isopropanol foram utilizados no preparo das amostras e na análise cromatográfica. Água ultrapura foi obtida do sistema de purificação Simplicity® UV Milli-Q.

1.3.1 Preparo das Soluções dos Analitos.

As soluções estoques dos analitos foram preparadas pesando aproximadamente 10 mg do padrão em balança analítica e transferindo-se quantitativamente a massa pesada para um balão volumétrico de 10 mL. Após isso, foi adicionado metanol ao balão, exceto no caso da estreptomicina, cujo solvente utilizado foi uma mistura 1:1 de água:metanol. Completada a solubilização de cada analito, o menisco da respectiva solução foi ajustado na marcação do balão volumétrico, resultando em soluções de aproximadamente 1,0 mg mL⁻¹. Em seguida, a solução de cada analito foi fracionada em alíquotas de aproximadamente 1,5 mL, protegidos da luz e armazenados em freezer a -18 °C, ficando uma alíquota disponível para uso e as demais totalmente protegidas da luz e do aumento de temperatura.

1.3.2 Otimização da Detecção por Espectrometria de Massas.

A otimização da detecção por espectrometria de massas (MS) envolveu o estudo dos parâmetros *declustering potential* (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na célula de colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula de colisão (CXP). A otimização destes parâmetros foi realizada empregando a ionização por *electrospray* no modo positivo, ESI(+), e infusão direta da solução de cada analito por meio de uma bomba do tipo seringa com uma seringa de vidro de 1 mL e 4,6 mm de diâmetro e uma vazão de 10 µL/min. A solução dos analitos foi preparada em uma mistura água:acetonitrila (1:1 em volume) com 0,1% ácido fórmico na concentração de 2 µg mL⁻¹ para a estreptomicina e 0,3 µg mL⁻¹ para os demais. Os parâmetros da fonte de ionização utilizados foram: cortina de gás de 10 psi, voltagem do *ionspray* 5500 V, gás nebulizador 12 psi. Os parâmetros estudados, assim como a faixa e incremento estão reunidos na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Parâmetros otimizados para detecção por MS.

Parâmetros estudados	Faixa	Incremento
DP	1-400 V	5 V
EP	1-12 V	0,5 V
CEP	0-125 V	2 V
CE	5-130 V	2 V
CXP	0-58 V	3 V

1.3.3 Otimização dos Parâmetros da Fonte de Ionização

A otimização dos parâmetros da fonte de ionização, cortina de gás (CUR), voltagem do *ionspray* (IS), temperatura (TEM), gás de nebulização (GS1) e gás secante (GS2) foi realizada por FIA (do inglês *flow injection analysis*). A fase móvel empregada foi uma mistura 1:1 água:acetonitrila acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico a uma vazão de 0,7 mL min⁻¹. Neste estudo foram feitas injeções de 10 µL de uma solução de estreptomicina 150 µg mL⁻¹ em água:acetonitrila 1:1. A faixa de cada parâmetro estudada está resumida na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Parâmetros da fonte de ionização otimizados.

Parâmetros estudados	Faixa avaliada
CUR (psi)	12, 15 e 18
IS (V)	4500, 5000 e 5500
TEM (°C)	650 e 700
GS1 (psi)	40, 45 e 50
GS2 (psi)	40, 45 e 50

1.3.4 Otimização da Separação Cromatográfica

Após definidos os valores dos parâmetros para detecção de cada composto (DP, EP, CEP, CE e CXP) e os parâmetros da fonte de ionização (CUR, GS1, GS2, IS e TEM) a otimização da separação cromatográfica foi iniciada empregando um gradiente exploratório no sistema LC-MS/MS Agilent Series 1200 acoplado ao espectrômetro de massas API 3200 QTRAP SCIEX[®]. Neste estudo, foram testadas as colunas de fase reversa Kinetex[®] C18 (5 µm, 2,1 x 50 mm), Kinetex[®] PFP (5 µm, 4,6 x 150 mm) e Luna[®] Fenil-hexil (5 µm, 4,6 x 150 mm). Além disso, também foi realizado estudo com o reagente de pareamento iônico PFPA (97%, Sigma Aldrich). Exceto quando mencionado, nos experimentos de otimização da separação cromatográfica, o volume de injeção, a temperatura do forno da coluna e a vazão da fase móvel foram mantidos fixos em 10 µL, 30 °C e 0,7 mL min⁻¹ respectivamente.

1.3.5 Separação Cromatográfica sem Pareamento Iônico

Os métodos cromatográficos sem pareamento iônico foram estudados por meio da análise de uma solução dos analitos em água deionizada na concentração de 150 ng mL^{-1} . Como fase móvel foi utilizada água (A) e acetonitrila (B) ambos os solventes contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. As colunas estudadas foram a Kinetex[®] C18, Kinetex[®] PFP, e Luna[®] fenil-hexil. Os programas de solventes utilizados com cada coluna podem ser vistos na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Programa de solvente utilizado com as diferentes colunas estudadas.

Kinetex [®] C18			Kinetex [®] PFP			Luna [®] fenil-hexil		
Tempo (min)	A(%)	B(%)	Tempo (min)	A(%)	B(%)	Tempo (min)	A(%)	B(%)
0	95	5	0	85	15	0	80	20
15	0	100	0,5	85	15	1,0	80	20
16	0	100	1,5	55	45	5,0	10	90
17	95	5	3,2	46	54	8,0	0	100
22	95	5	5,2	46	54	10,0	0	100
			7,0	5	95	10,50	80	20
			12	5	95	14,0	80	20

1.3.6 Separação Empregando Pareamento Iônico com PFPA

Os testes com o reagente de pareamento iônico PFPA foram realizados com fase móvel binária (água e acetonitrila) inicialmente com o modificador apenas na fase aquosa na concentração de 2 mmol L^{-1} e posteriormente com o modificador nas duas fases, o programa de solvente utilizado pode ser visto na **Tabela 4**. Em seguida, foi estudado o efeito da concentração do modificador na fase móvel. As concentrações estudadas foram 2, 5, 10, 15 e 20 mmol L^{-1} de PFPA na água e na acetonitrila. A concentração dos analitos utilizada foi de 450 ng mL^{-1} para a estreptomicina e 150 ng mL^{-1} para os demais.

Tabela 4 - Programa de solvente empregado no estudo da concentração de PFPA na fase móvel.

t/min	%B
0	15
0,5	15
1,5	45
3,2	54
5,2	54
7,0	95
12	95
12,5	15
17,5	15

1.3.7 Estabilidade Térmica dos Antibióticos na Condição Térmica da Destilação

Os antibióticos em estudo, virginiamicina M1, monensina, penicilina G e eritromicina, foram submetidos a condição térmica de aproximadamente 100 °C, simulando a destilação, em um sistema em refluxo – composto por balão de fundo chato, condensador e aquecedor – por 3,0 h. Neste estudo foram utilizados 100 mL de solução de cada antibiótico na concentração de 1,0 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio aquoso. Durante o intervalo de 3 h de aquecimento (em ebulição), foram coletadas alíquotas da solução nos tempos $t = 0$ (controle), 30, 60, 90, 120 e 180 min.

Para verificar a estabilidade dos antibióticos e a formação de produtos de degradação/transformação devido à alta temperatura no processo, as alíquotas foram comparadas entre si, tendo como referência a alíquota coletada em $t = 0$, a qual não passou pelo processo de aquecimento. As alíquotas coletadas foram analisadas por LC-MS/MS com varredura nos modos EMS (do inglês *Enhanced Mass Spectrometry*), EPI (do inglês *Enhanced Product Ions*) e PI (do inglês *Precursor Ion*). As condições cromatográficas empregadas incluem volume de injeção de 20 μL , temperatura do forno de 30 °C, vazão de fase móvel 0,7 mL min^{-1} , coluna cromatográfica Kinetex[®] PFP. O programa de solvente empregado pode ser visto na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Programa de solvente empregado para virginiamicina M1, penicilina G, monensina e eritromicina. (A = água com 0,1% de ácido fórmico e B = acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico).

VM e Pen		Mon		Eri	
Tempo (min)	%B	Tempo (min)	%B	Tempo (min)	%B
0	20	0	50	0	30
10,0	95	10,0	95	10,0	95
12,0	95	12,0	95	12,0	95
12,1	20	12,1	50	12,1	50
16,0	20	16,0	50	16,0	30

1.3.8 Preparo de Amostra

1.3.8.1 Precipitação de Proteína

Em todos os experimentos de SPE foi realizada a precipitação de proteínas. O estudo da precipitação de proteínas foi realizado adicionando 1,64, 2,26, 2,91 e 3,61 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 4 diferentes alíquotas de 10,0 mL de vinhaça em tubo cônico de 15,0 mL. As quantidades do sal adicionadas são o equivalente a respectivamente 30, 40, 50 e 60% da concentração de saturação do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em água. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso por 30 min em banho de gelo e centrifugada em 4000 rpm (2594 x G). Após centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico e foi adicionado 0,60 e 0,62 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ às alíquotas correspondentes à saturações de 50 e 60% (BURGESS, 2009). Novamente, a mistura foi deixada em repouso por 30 min em banho de gelo (~1 °C) e centrifugada em 4000 rpm (2594 x G). A concentração de sal adequada para a precipitação foi escolhida ao não observar a formação de precipitado após a segunda adição do mesmo.

1.3.8.2 Extração em Fase Sólida

Todos os experimentos de SPE foram precedidos de precipitação das proteínas conforme condições definidas em estudo descrito no tópico 1.4.5.1 e diferentes cartuchos de extração, incluindo HLB Oasis[®] (200mg, 6 mL), HLB Supel[™]-Select (200 mg, 6 mL), Strata[™]-X (200 mg, 6 mL) e Strata[™] C18-E (500 mg, 3 mL) foram estudados. A SPE foi realizada utilizando um sistema composto por manifold de 20 canais Agilent[®] e uma bomba de vácuo Prismatic[®] modelo 121. Foram realizadas as etapas clássicas da SPE sendo condicionamento, passagem da amostra, limpeza e eluição. Nas duas primeiras etapas foram

tomados os devidos cuidados para que o sorvente do cartucho não secasse. Já após as duas últimas os cartuchos foram secos com o auxílio da bomba de vácuo. As etapas de condicionamento e eluição foram realizadas sem o auxílio da bomba de vácuo, já as etapas de passagem da amostra e limpeza foram realizadas empregando bomba de vácuo com o intuito de controlar a vazão em aproximadamente 1 a 2 gotas s⁻¹.

Para avaliar a recuperação obtida nos experimentos de SPE, duas configurações (A e B) de experimentos foram realizadas. Na configuração A, a amostra foi fortificada antes de ser percolada no cartucho de extração. Já na configuração B, a fortificação foi realizada no eluato (após eluição). Desta forma, a comparação do sinal analítico obtido nas duas configurações permite verificar a recuperação (RE) de cada analito por meio da equação $RE = \frac{A_A}{A_B} * 100\%$, sendo A_A a área do pico cromatográfico obtido para determinado analito na SPE com a configuração A e A_B a área do pico cromatográfico obtida para o mesmo analito na SPE com a configuração B (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003). As fortificações realizadas em todos os estudos de recuperação por SPE foram feitas nas concentrações de 60,0 ng mL⁻¹ para a monensina e virginiamicina M1, 180 ng mL⁻¹ para a penicilina e ácido benzilpenicilóico, 90,0 ng mL⁻¹ para a tetraciclina, 360,0 ng mL⁻¹ para a virginiamicina S1, 600,0 ng mL⁻¹ para a eritromicina e 120,0 ng mL⁻¹ para a anidrotetraciclina.

1.3.8.2.1 Estudo Inicial da Etapa de Limpeza Empregando Cartuchos HLB

Este estudo foi realizado empregando 5 mL de metanol seguido de 5 mL de solução aquosa contendo 0,18 g mL⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ na etapa de condicionamento. Em seguida 10,0 mL de vinhaça (fortificada e não fortificada) foi diluída com 10,0 mL de água ultrapura e foi percolada no cartucho com auxílio do sistema manifold-bomba de vácuo. A etapa de limpeza foi realizada percolando pelo cartucho 5,0 mL de água ultrapura e em seguida 1,0 mL de diferentes soluções de limpeza, contendo as seguintes porcentagens de metanol em água: 20, 40, 60, 80 e 100%. Em seguida, os cartuchos foram secos e a eluição foi realizada com 7 mL de metanol seguida da secagem dos cartuchos novamente.

Os eluatos foram coletados em tubos de ensaios e secos com o auxílio de fluxo de N₂, sendo os tubos mantidos a temperatura constante de 30° C em um concentrador de amostra. Após a secagem dos eluatos, os mesmos foram redissolvidos em uma mistura contendo 15% v/v de acetonitrila em água e analisados por LC-MS/MS.

1.3.8.2.2 Estudo do pH da Amostra

Neste estudo foram avaliados os pHs 2,6; 4,0 e 5,5 utilizando para isso o tampão citrato-fosfato, o qual foi preparado conforme literatura (GOMORI, 1955). Além disso, ao invés de 10,0 mL de vinhaça, utilizados no estudo anterior, neste estudo foram utilizados 5,0 mL de vinhaça. A SPE foi então realizada com o condicionamento dos cartuchos com 5 mL de metanol seguido de 5 mL de solução aquosa contendo 0,18 g mL⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. Em seguida 5,0 mL de vinhaça (fortificada e não fortificada) foram diluídos com 5,0 mL de tampão no pH desejado (2,6; 4,0 e 5,5) e foi percolada no cartucho com auxílio do sistema manifold-bomba de vácuo. A etapa de limpeza foi realizada percolando pelos cartuchos 5,0 mL de água ultrapura e 1,0 mL da solução de limpeza contendo 60% v/v de metanol em água. Os cartuchos foram então secados e a eluição foi realizada com 7 mL de metanol. Após a secagem dos eluatos, os mesmos foram redissolvidos em 1 mL uma mistura contendo 15% v/v de acetonitrila em água e analisados por LC-MS/MS.

1.3.8.2.3 Influência da Adição de EDTA

Neste estudo foi avaliado efeito da adição de EDTA nas concentrações 1,0 x 10⁻⁴ e 2,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ no tampão com pH 5,5 utilizado para diluir a vinhaça. A SPE foi então realizada com o condicionamento dos cartuchos com 5 mL de metanol seguido de 5 mL de solução aquosa contendo 0,18 g mL⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. Em seguida alíquotas de 5,0 mL de vinhaça (fortificada e não fortificada) foram diluídas com 5,0 mL de tampão citrato-fosfato no pH 5,5 sem a adição de EDTA e contendo as concentrações em estudo do mesmo (1,0 x 10⁻⁴ e 2,0 x 10⁻³ mol L⁻¹). A amostra resultante foi percolada no cartucho com auxílio do sistema manifold-bomba de vácuo. A etapa de limpeza foi realizada percolando pelo cartucho 5,0 mL de uma solução aquosa pH 5,5 de ácido fórmico e em seguida 1,0 mL da solução de limpeza contendo 60% v/v de metanol em água. Em seguida os cartuchos foram secados e a eluição foi realizada com 7 mL de metanol. Após a secagem dos eluatos, os mesmos foram redissolvidos em 1 mL da mistura de 15% v/v de acetonitrila em água e analisados por LC-MS/MS.

1.3.8.2.4 Estudo da Etapa de Limpeza com Soluções Ácida, Básica e Menor Concentração de Solvente Orgânico

Duas diferentes soluções de limpeza foram avaliadas por meio da adição de ácido fórmico e hidróxido de amônio na concentração de 0,1% v/v na solução 60% v/v de metanol

em água utilizada na limpeza nos estudos anteriores. Desta forma, a SPE foi então realizada com o condicionamento dos cartuchos com 5 mL de metanol seguido de 5 mL de solução aquosa contendo 0,18 g mL⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. Em seguida alíquotas de 5,0 mL de vinhaça (fortificada e não fortificada) foram diluídas com 5,0 mL de tampão no pH 5,5 sem a adição de EDTA. A amostra resultante foi percolada no cartucho com auxílio do sistema manifold-bomba de vácuo. A etapa de limpeza foi realizada percolando pelo cartucho 5,0 mL de uma solução aquosa pH 5,5 de ácido fórmico e em seguida 1,0 mL da solução de limpeza 60% v/v de metanol em água contendo o aditivo em estudo (0,1% ácido fórmico ou hidróxido de amônio). Em seguida os cartuchos foram secados e a eluição foi realizada com 7 mL de metanol seguida da secagem dos cartuchos novamente. Após a secagem dos eluatos, os mesmos foram redissolvidos em uma mistura contendo 15% v/v de acetonitrila em água e analisados por LC-MS/MS.

1.3.8.2.5 Comparação entre os Sorventes HLB SupelTM-Select, HLB Oasis®, StrataTM-X e C18-E

Diferentes sorventes foram comparados neste estudo partindo das condições estabelecidas nos experimentos anteriores. Os sorventes testados foram HLB SupelTM-Select, HLB Oasis®, StrataTM-X e StrataTM C18-E. As etapas de condicionamento, percolação da amostra e eluição foram iguais para todos os cartuchos, sendo o condicionamento feito com 5 mL de metanol seguido de 5 mL de solução aquosa contendo 0,18 g mL⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. 5,0 mL de vinhaça (fortificada e não fortificada) foram diluídas com 5,0 mL de tampão citrato-fosfato no pH 5,5 e percoladas no cartucho com auxílio do sistema manifold-bomba de vácuo e a eluição feita com 7 mL de metanol. Já a etapa de limpeza foi realizada com a percolação de 5,0 mL de uma solução aquosa pH 5,5 de ácido fórmico para todos os cartuchos seguida da percolação de 1mL das seguintes soluções:

- HLB SupelTM-Select: soluções contendo 60 e 40% de metanol em água.
- HLB Oasis®: soluções contendo 60, 70 e 80% de metanol em água.
- StrataTM-X: solução contendo 60% de metanol em água.
- StrataTM C18-E: soluções contendo 10, 20 e 30% de metanol em água.

Em seguida, os melhores valores de recuperação obtidos para cada analito nos diferentes sorventes foram comparados.

1.3.8.3 Preparo de Amostra com Extração líquido-líquido Assistida por *salting-out* (SALLE)

1.3.8.3.1 Estudo com Diferentes Solventes Extratores

Inicialmente três solventes foram avaliados para sua utilização como solvente extrator no preparo de amostra por SALLE. A utilização dos solventes acetonitrila, etanol e isopropanol como solvente extrator foi avaliada visualmente, com foco na obtenção de uma amostra mais limpa, fato evidenciado analisando a coloração da fase orgânica. Desta forma, 1,0 mL dos solventes citados foram misturados a 2,0 mL de vinhaça submetida anteriormente a precipitação de proteína contendo 0,36 g mL⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. A coloração da fase orgânica foi avaliada para a escolha do solvente extrator que forneceu menor extração de componentes da matriz.

1.3.8.3.2 Estudo Inicial de Recuperação

Após escolha do solvente extrator, foi realizado teste inicial para avaliar a recuperação dos analitos partindo de condições definidas por Moreno-González e colaboradores (MORENO-GONZÁLEZ; GARCÍA-CAMPAÑA, 2017). Neste teste, 1,0 mL de vinhaça (fortificada e não fortificada) foi adicionado a um tubo cônico de 15,0 mL contendo 1,25 g de (NH₄)₂SO₄ seguida da adição de 1,5 mL de tampão fosfato-citrato em pH 4,0. A mistura foi submetida a agitação por 20 s em agitador vórtex e após a dissolução do sal foram adicionados 3,2 mL de acetonitrila seguida de nova agitação por 20 s e repouso por 30 min em geladeira. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min em 4000 rpm (2594 x G) e uma alíquota de 800 µL foi coletada. A esta alíquota foram adicionados 36 µL do padrão contendo os analitos, quando se tratava de vinhaça não fortificada, ou 36 µL de metanol, quando se tratava de vinhaça fortificada antes da extração. Em seguida a amostra foi filtrada em filtro de PTFE 0,22 µm de poro e 1,2 cm de diâmetro e analisada por LC-MS/MS.

A concentração de fortificação para todos os estudos de SALLE foi de 300,0 ng mL⁻¹ para a monensina e virginiamicina M1, 900,0 ng mL⁻¹ para a penicilina e ácido benzilpenicilóico, 450 ng mL⁻¹ para a tetraciclina, 1.800,0 ng mL⁻¹ para a virginiamicina S1, 3.000,0 ng mL⁻¹ para a eritromicina e 600,0 ng mL⁻¹ para a anidrotetraciclina.

A recuperação da extração (RE) de cada analito foi calculada pela equação já citada: $RE = \frac{A_A}{A_B} * 100\%$, sendo A_A a área do pico cromatográfico obtido para determinado analito fortificado antes da realização da SALLE e A_B a área do pico cromatográfico obtida para o mesmo analito fortificado após a SALLE. O efeito matriz (EM) foi calculado pela equação

$EM = \frac{A_B}{A_C} * 100\%$, sendo A_B a área do pico cromatográfico obtido para determinado analito fortificado após a realização da SALLE e A_C a área do pico cromatográfico obtida com a análise de acetonitrila fortificada com a mesma concentração. Desta forma, $EM < 100\%$ indica supressão na ionização causada pela matriz, $EM = 100\%$ indica ausência de efeito matriz e $EM > 100\%$ indica aumento na ionização causada por efeito matriz.

1.3.8.3.3 Estudo de Diferentes Proporções entre Solvente Extrator e Amostra

O estudo da proporção entre o solvente extrator e a amostra (extrator:amostra) foi realizado mantendo as condições experimentais empregadas no estudo anterior, porém, variando o volume de solvente extrator de modo a obter as seguintes proporções: 3,2:1, 2:1, 1:1 e 0,5:1, sendo o volume de vinhaça 1,0 mL.

1.3.8.3.4 Estudo do pH

Este estudo foi realizado adicionando 1,0 mL de vinhaça a um tubo cônico de 15,0 mL contendo 1,25 g de $(NH_4)_2SO_4$ seguida da adição de 1,5 mL de tampão fosfato-citrato no pH em estudo, sendo 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0. A mistura foi submetida a agitação por 20 s em agitador vórtex e após a dissolução do sal foi adicionado 1 mL de acetonitrila seguida de nova agitação por 20 s e 30 min de repouso. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min em 4000 rpm (2594 x G) e uma alíquota de 800 μ L foi coletada. A esta alíquota foram adicionados 36 μ L do padrão contendo os analitos, quando se tratava de vinhaça não fortificada, ou 36 μ L de metanol, quando se tratava de vinhaça fortificada antes da extração. A amostra foi então filtrada em filtro de PTFE 0,22 μ m poro e 1,2 cm de diâmetro e analisada por LC-MSMS.

1.3.8.4 Preparo de Amostra por Extração em Fase Sólida on-line

Para a aplicação da extração em fase sólida on-line foram estudadas duas colunas de extração, uma com sorvente comercial a Oasis HLB[®] (2,1 x 20 mm, 5 μ m) uma coluna RAM (do inglês *Restricted Access Material*) composta do sorvente C18/BSA (2,1 x 50 mm, 10 μ m). Inicialmente foi verificada a retenção dos analitos em cada fase estacionária em modo isocrático para a escolha do solvente de carregamento da amostra. Os solventes compostos por 100% água, água com 5% de acetonitrila e água com 10% de acetonitrila foram estudados para este fim. A vazão empregada foi de 1,0 mL min⁻¹, com injeção de 10 μ L dos analitos em água na

concentração de 100 ng mL⁻¹. O programa de solvente utilizado foi o modo isocrático do solvente em estudo por 3 min, seguido de 2 min em 100% de solvente orgânico e mais 3 min de recondicionamento.

Após definido o solvente de carregamento da amostra na coluna de extração, o sistema bidimensional no modo *column switching* foi montado com uso de uma válvula comutadora de 6 pórticos (válvula da extração) como mostrado na **Figura 4** (seção 1.1.1.2). Para a comparação das duas colunas de extração foram analisados o formato e a área de pico obtidos para cada analito com cada uma delas analisando uma amostra de vinhaça fortificada com 130 ng mL⁻¹ de cada analito. Para a análise da vinhaça utilizando a SPE on-line o único manuseio da amostra empregado foi a centrifugação, realizada a 2,0 °C a 15.000 rpm (21.130 x G) seguida de diluição 1:1 de vinhaça:água ultrapura. O volume de injeção foi de 60 µL, a temperatura do forno da coluna foi de 30 °C. A separação cromatográfica foi realizada com a coluna Luna[®] fenil-hexil no modo gradiente utilizando como fase móvel água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B). O programa de solvente empregado na separação cromatográfica, a posição da válvula da extração e da válvula de desvio do espectrômetro de massas (*diverter valve*) no decorrer da análise pode ser visto na **Tabela 6**

Tabela 6 - Programa de solvente e posições das válvulas da extração e de desvio utilizados no método com extração em fase sólida *on-line*.

Programa de solvente			Válvula da extração		Válvula de desvio	
Tempo (min)	A (%)	B (%)	Tempo (min)	Posição	Tempo (min)	Posição
0	80	20	0	Carregamento	0	Descarte
3,0	80	20	2,0	Eluição	6,5	Espectrômetro de massas
7,0	10	90	15,0	Carregamento	14,0	Descarte
10,0	0	100				
13,0	0	100				
13,5	80	20				
17,0	80	20				

1.3.9 Validação do Método Analítico

A validação do método analítico foi realizada empregando no preparo de amostra a extração em fase sólida *on-line* com coluna RAM. Os parâmetros avaliados foram: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade) e seletividade. Este estudo foi realizado fortificando uma mistura composta por volumes iguais de 4 amostras

de vinhaça sem antibióticos. O emprego dos padrões internos deuterados penicilina G-d6, virginiamicina M1-d2 e eritromicina-d6 foi realizado na concentração de 50,0 ng mL⁻¹. Após cada fortificação realizada neste estudo a amostra foi agitada para homogeneização e deixada em repouso por 20 min para a ocorrência da interação nos analitos com a matriz.

O limite de detecção foi definido como sendo a concentração mínima de analito que proporcionou uma razão sinal/ruído ≥ 3 nos cromatogramas para cada analito e o limite de quantificação como sendo a concentração que proporcionou uma razão sinal/ruído ≥ 10 . A linearidade foi avaliada analisando o gráfico área de pico vs concentração para cada analito obtido analisando a mistura de vinhaça fortificada na região de 1,0 a 500 ng mL⁻¹ em triplicata. A seletividade foi avaliada monitorando a razão entre as transições monitoradas para cada analito. A análise da exatidão foi realizada por meio de estudo de recuperação realizado em uma mistura de amostras de vinhaça fortificada nas concentrações de 10 e 300 ng mL⁻¹ em triplicata. Para cálculo da recuperação (R) foi utilizada a equação $R = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \cdot 100\%$, sendo \bar{x} o valor médio obtido para a concentração na análise e x_{ref} a concentração de fortificação. A análise de precisão (repetibilidade) foi realizada por meio da análise do desvio padrão relativo obtido analisando uma mistura de vinhaça fortificada nas concentrações de 10 e 300 ng mL⁻¹ em triplicata. Para os analitos penicilina G, virginiamicina M1 e eritromicina foi utilizada a calibração por padrão interno, com os respectivos deuterados de cada analito, sendo penicilina G-d7, virginiamicina M1-d2 e eritromicina-d6. Para os demais analitos, a calibração por adição de padrão foi utilizada para a quantificação dos analitos.

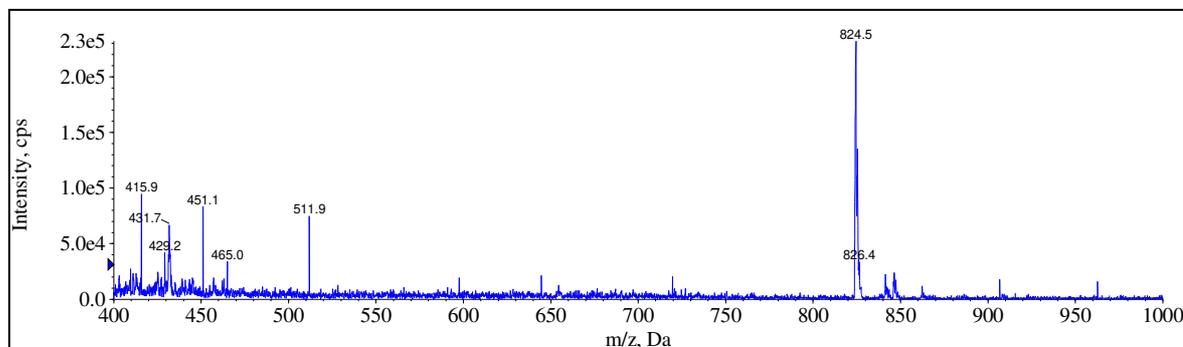
1.4 Resultados e Discussões

1.4.1 Otimização da Detecção por Espectrometria de Massas

A infusão direta da solução de cada analito permitiu verificar a presença do analito ionizado para cada caso, possibilitando definir o íon precursor para o desenvolvimento do método de MRM. A **Figura 11** mostra o espectro de massas em *full scan* obtido com a infusão direta de uma solução 0,3 µg mL⁻¹ virginiamicina S1 em meio 1:1 de água:acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. No caso da virginiamicina S1 é possível verificar a formação do íon [M+H]⁺ de m/z 824,4, sendo M a massa molecular da molécula neutra. Fazendo a mesma análise para os demais analitos, foi possível verificar a formação do mesmo tipo de íon para os demais

analitos $[M+H]^+$, exceto para a monensina, a qual foi ionizada pela formação do aduto de sódio $[M+Na]^+$ de m/z 693,4.

Figura 11 - Espectro de massas em *full scan* obtido por ESI(+) do antibiótico virginamicina S1.



Fonte: elaborada pelo autor.

Após definir o íon precursor de cada analito foi realizada a otimização dos parâmetros que dependem de cada composto (DP, EP, CEP, CE e CXP) para a construção do método MRM. Este estudo foi realizado de modo univariado, sendo que a escolha do valor de cada parâmetro foi feita com o objetivo de obter o maior sinal analítico. Além dos parâmetros citados, neste estudo foi possível definir as transições de maior intensidade para cada analito, as quais foram utilizados para compor o método MRM. A transição de sinal mais intenso foi utilizada para quantificação do analito e a segunda mais intensa foi utilizada como parâmetro qualitativo, aumentando a confiabilidade da identificação de cada analito. Os valores dos parâmetros otimizados, o íon precursor e os íons produtos (transições) monitorados de cada analito e padrão interno estão reunidos na **Tabela 7**, sendo que a transição para quantificação está em negrito. Após definidos os parâmetros da detecção por espectrometria de massas para cada composto, os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados utilizando os valores aqui definidos.

Tabela 7 - Valores obtidos na otimização da detecção de cada analito.

Analito	Íon precursor, (m/z)	Transições (m/z)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
STP	[M+H] ⁺ , 582,3	263,2; 246,3	111	8	22	37; 45	4; 4
Mon	[M+Na] ⁺ , 693,4	461,4; 479,4	96	10	24	49; 35	6; 8
Pen	[M+H] ⁺ , 335,1	160,2; 176,2	31	7,5	19	15; 17	4; 4
TC	[M+H] ⁺ , 445,2	410,2; 427,2	36	6	14	21; 17	6; 4
VM	[M+H] ⁺ , 526,3	355,2; 109,2	41	8	18	23; 47	6; 4
VS	[M+H] ⁺ , 824,3	205,2; 177,2	76	8	30	57; 101	4; 4
Eri	[M+H] ⁺ , 734,5	158; 83	46	5	26	37; 69	4; 4
ATC	[M+H] ⁺ , 427,1	410,2; 154,0	31	8	12	19; 44	4; 6
ABP	[M+H] ⁺ , 353,1	160,1; 309,1	31	6,5	16	17; 15	4; 4
Pen-7	[M+H] ⁺ , 342,2	160,1	31	6,5	16	17; 15	4; 4
VM-d2	[M+H] ⁺ , 528,4	510,4	31	8,0	24	15	4
Eri-d6	[M+H] ⁺ , 740,6	164,4	56	5,5	24	37	4

1.4.2 Otimização dos Parâmetros da Fonte de Ionização

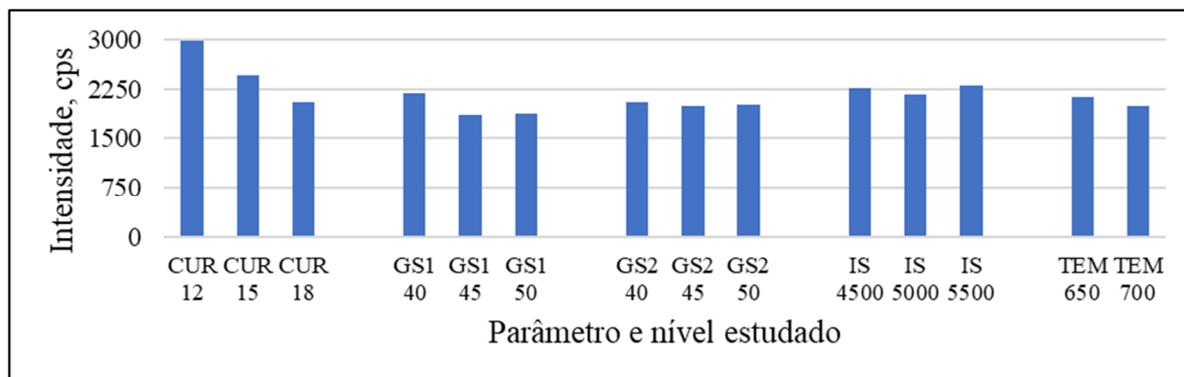
Os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados com o intuito de aumentar a detecção dos analitos pelo espectrômetro de massas. Este estudo foi realizado em função da estreptomicina, pois esta apresentou menor sinal analítico. A vazão de fase móvel escolhida foi de 0,7 mL min⁻¹, valor adequado para as dimensões da coluna a ser utilizada, partículas de 5 µm e diâmetro interno de 4,6 mm e compatível com a fonte de ionização do espectrômetro de massas.

A cortina de gás tem a função de proteger o espectrômetro de massas da entrada de espécies não carregadas e da contaminação por espécies não volatilizadas. O potencial do *ionspray* é o responsável pela separação de cargas no eluente e consequente formação de gotículas carregadas na fonte. O gás secante (ou gás auxiliar), geralmente em elevada temperatura, é o responsável por secar as gotículas formadas no *spray* pelo gás de nebulização.

Desta forma, fica evidente que estes parâmetros influenciam a transferência dos íons em fase líquida (inicialmente no eluente do sistema cromatográfico) para a fase gasosa, transferência necessária para a entrada dos íons no espectrômetro de massas que trabalha em condições de vácuo com pressão da ordem de 10⁻⁵ torr. O melhor valor da cortina de gás deve ser escolhido levando em consideração a proteção do sistema e a manutenção de um sinal analítico de intensidade apropriada. Valores altos para a cortina de gás protegem o equipamento, mas podem levar a diminuição do sinal analítico. Por outro lado, um valor baixo

pode deixar a entrada do espectrômetro de massas susceptível à contaminação por espécies não volatilizadas, sendo recomendado valores intermediários. A escolha dos demais parâmetros se baseiam na obtenção do maior sinal analítico e estabilidade. A resposta obtida na análise por FIA em cada nível para cada parâmetro pode ser vista na **Figura 12** e os valores escolhidos que permitiram a obtenção de maior sinal analítico estão sumarizados na **Tabela 8**.

Figura 12 - Intensidade de sinal obtida em cada nível dos parâmetros estudados. (n=3).



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 8 - Valores obtidos na otimização dos parâmetros da fonte de ionização.

Parâmetros estudados	Valor otimizado
CUR	15 psi
IS	5500 V
GS1	40 psi
GS2	50 psi
TEM	650 °C

Após definidos os parâmetros da fonte de ionização, foi dado início aos estudos para realizar a separação cromatográfica dos analitos.

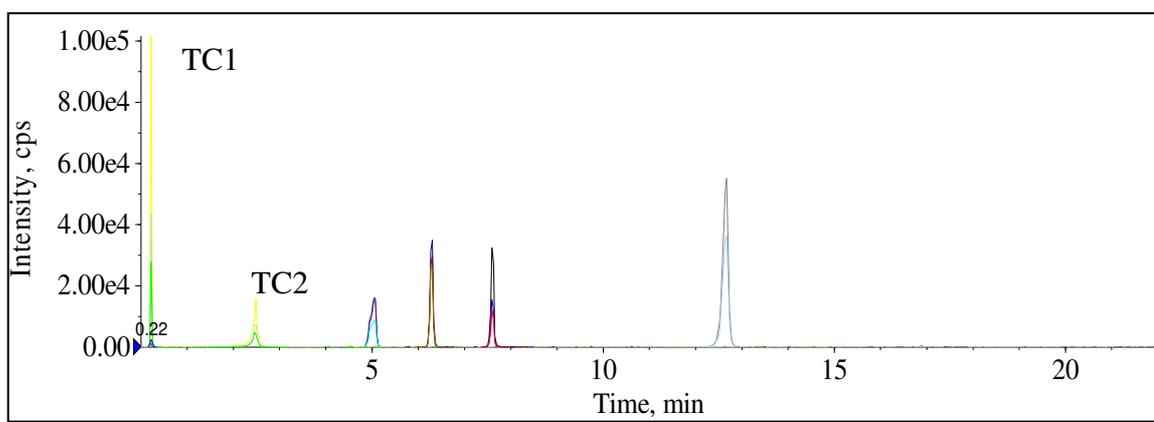
1.4.3 Otimização da Separação Cromatográfica

Na otimização da separação cromatográfica foi utilizado inicialmente um gradiente exploratório, que é uma excelente estratégia para iniciar o desenvolvimento de um método cromatográfico. Com esta estratégia, varia-se a força da fase móvel aumentando a porcentagem do solvente orgânico até aproximadamente 100% de forma linear. No caso de cromatografia de fase reversa, quanto maior a parte orgânica na fase móvel maior é sua força, e assim é possível verificar a faixa de retenção apresentada pelos analitos e traçar estratégias a partir desta informação para alcançar a separação apropriada (LEWIS; SNYDER; DOLAN, 1996).

1.4.3.1 Separação Cromatográfica com Coluna Kinetex® C18

No primeiro gradiente exploratório, 5 a 100% de B de 0 a 15 min, empregando como fase móvel água (A) e acetonitrila (B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico, foi possível verificar a retenção de cada analito, sendo a monensina a mais retida e a estreptomicina a menos retida, **Figura 13**. Como pode ser visto nesta figura, a estreptomicina apresentou tempo de retenção de 0,22 min, valor muito próximo ao tempo de retenção de um composto não retido teórico. Desta forma, deve-se buscar estratégias para aumentar a retenção deste analito.

Figura 13 - Cromatograma obtido no primeiro gradiente exploratório gradiente.



Fonte: elaborada pelo autor.

Outro fato que se destacou no cromatograma da **Figura 13**, foi a duplicação do pico cromatográfico da tetraciclina, marcados com o TC1 e TC2, a qual pode estar relacionada com a distribuição de tetraciclina entre as espécies monoprotonada e neutra (resultado de 1 carga negativa e 1 carga positiva). Desta forma, ajuste no pH poderia contribuir para a eliminação da duplicação do pico cromatográfico.

A baixa retenção da estreptomicina em colunas de fase reversa já é conhecida na literatura científica, sendo que a utilização de pareamento iônico e de colunas HILIC (do inglês *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) são as estratégias mais utilizadas para os aminoglicosídeos, classe de antibióticos a qual pertence a estreptomicina. Isso se dá devido a elevada polaridade desta classe de compostos, o que permite a utilização de colunas HILIC, e ao caráter básico, que permite o emprego do pareamento iônico com ácidos como HFBA (*heptafluorobutyric acid*) e PFPA (*pentafluoropropionic acid*) (ZHU et al., 2016).

Embora as colunas de fase reversa apresentem baixa retenção para a estreptomicina, a existência de trabalho publicado envolvendo a determinação de estreptomicina com a coluna de fase reversa bifenil (CHIESA et al., 2015) motivou a realização de testes utilizando outras

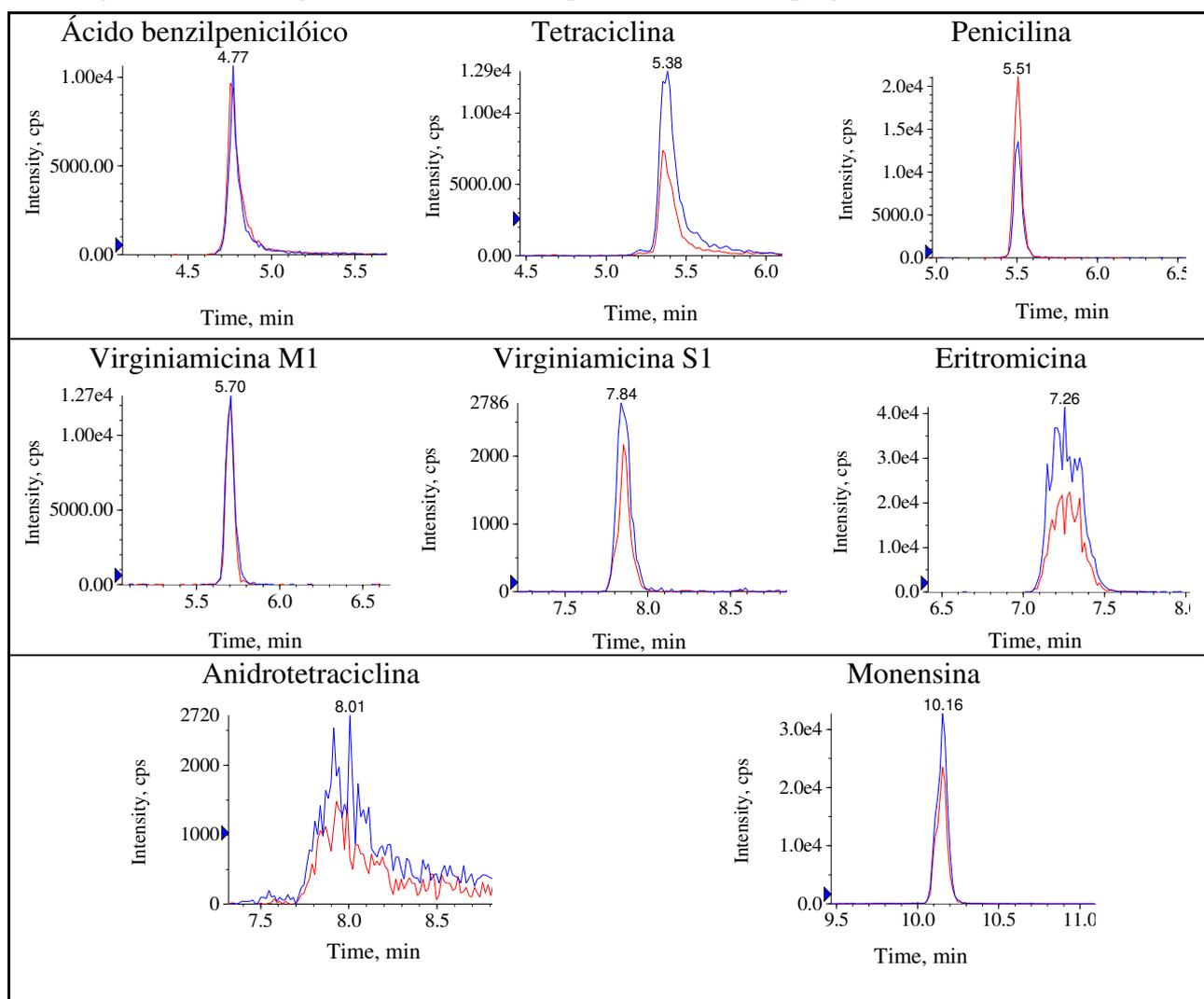
colunas de fase reversa, entre elas a PFP e a fenil-hexil. Mesmo sendo de fase reversa, estas colunas possuem maior retenção para compostos polares que as colunas C18 comuns.

1.4.3.2 Separação Cromatográfica com Coluna Kinetex® PFP

A coluna Kinetex® PFP possui como fase estacionária partículas de sílica do tipo *core-shell* (superficialmente porosas) com o grupo pentafluorofenil, (PFP do inglês *Pentafluorophenyl*), ligado em sua superfície e capeadas com o grupo trimetilsilil (TMS). Esta fase estacionária possui como característica principal a elevada seletividade para compostos aromáticos e halogenados. Além disso, também apresenta maior retenção para compostos polares, quando comparado com colunas com fase C18 (ZHANG, 2008). Com esta coluna foram obtidos picos cromatográficos bem definidos para a maioria dos analitos, sendo que duas exceções foram observadas, para a anidrotetraciclina e eritromicina. Além disso, a afinidade da estreptomicina por esta coluna também não possibilitou retenção apropriada. Os cromatogramas obtidos neste estudo podem ser vistos na **Figura 14**.

Vale destacar que no pH da fase móvel empregada, que é 2,7, a eritromicina encontra-se totalmente na forma monocarregada positivamente. Desta forma o formato de pico verificado não tem relação com a existência da molécula em diferentes estados de ionização. Já a anidrotetraciclina apresenta uma distribuição entre as duas espécies, sendo uma monocarregada positivamente e outra com carga líquida neutra (resultado de 1 carga positiva e 1 carga negativa) na proporção de 8:2 respectivamente, fato que pode contribuir para a não definição do pico cromatográfico. Desta forma, o emprego de pH 5,2, ponto isoelétrico da anidrotetraciclina, no qual esta encontra-se majoritariamente com carga líquida neutra, pode contribuir com a melhora no formato de pico deste analito.

Figura 14 - Cromatogramas de íons extraídos para cada analito empregando a coluna PFP Kinetex®.



Fonte: elaborada pelo autor.

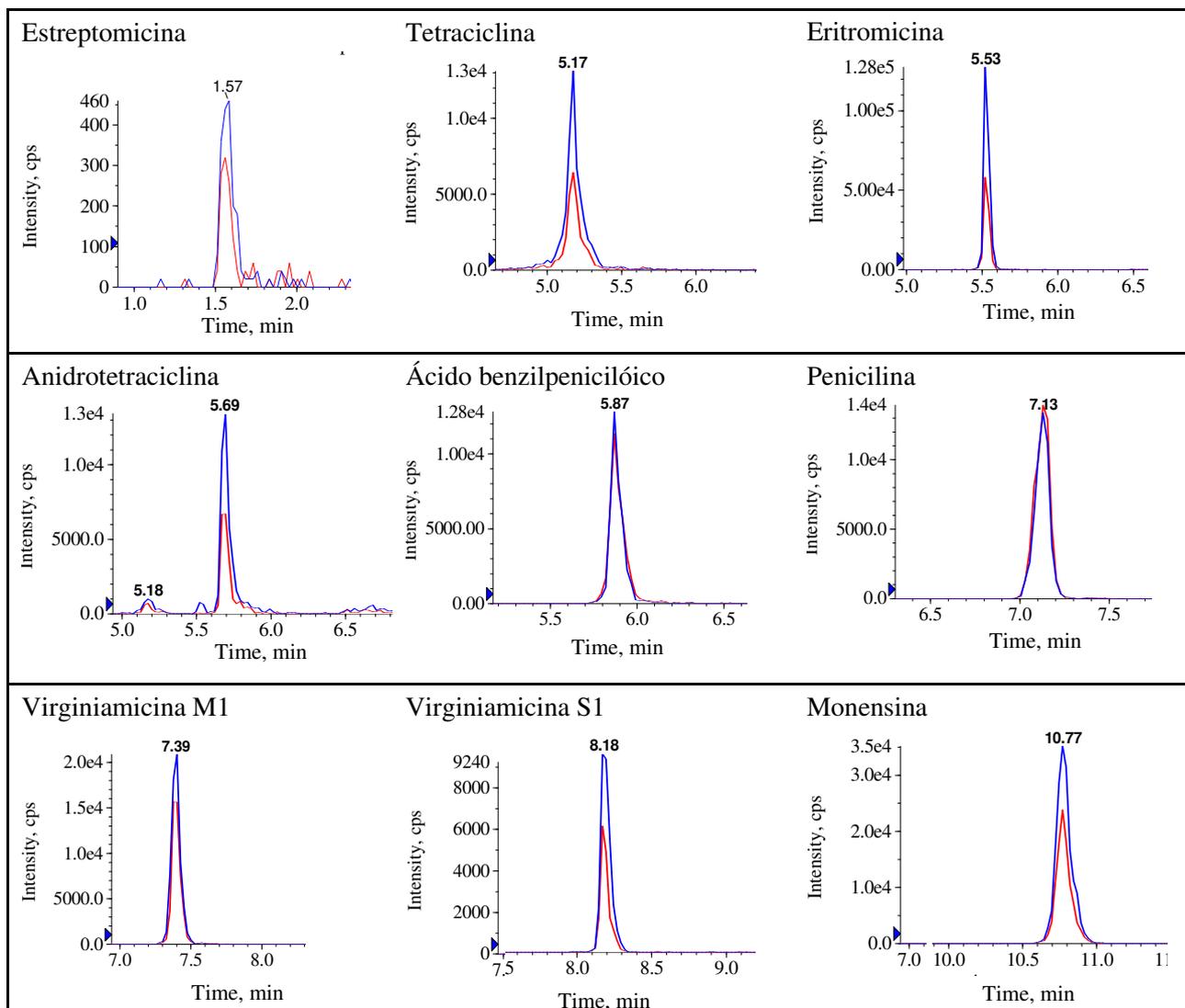
1.4.3.3 Separação Cromatográfica com Coluna Luna® fenil-hexil

Outra coluna estudada foi a coluna fenil-hexil Luna®. Na literatura, é possível verificar o emprego de coluna cromatográfica com fase estacionária fenil para a análise da maioria dos analitos estudados neste trabalho (DE ALWIS; HELLER, 2010), fato que motivou a realização deste teste. Com esta coluna foram obtidos picos cromatográficos bem definidos para todos os analitos, mostrando-se assim uma opção mais apropriada que a coluna PFP para a separação dos analitos estudados. Porém, a não retenção da estreptomicina persistiu, como pode ser visto na **Figura 15**.

Após verificar a não retenção da estreptomicina com as colunas de fase reversa testadas, foi dado início ao estudo da separação cromatográfica com o agente de pareamento iônico ácido

pentafluoropropiônico, PFPA. Vale destacar que cronologicamente, o estudo com a coluna fenil-hexil foi realizado posteriormente ao estudo com pareamento iônico.

Figura 15 - Cromatogramas de íons extraídos para cada analito empregando a coluna fenil-hexil Luna®.



Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.3.4 Separação Cromatográfica por Pareamento Iônico com PFPA

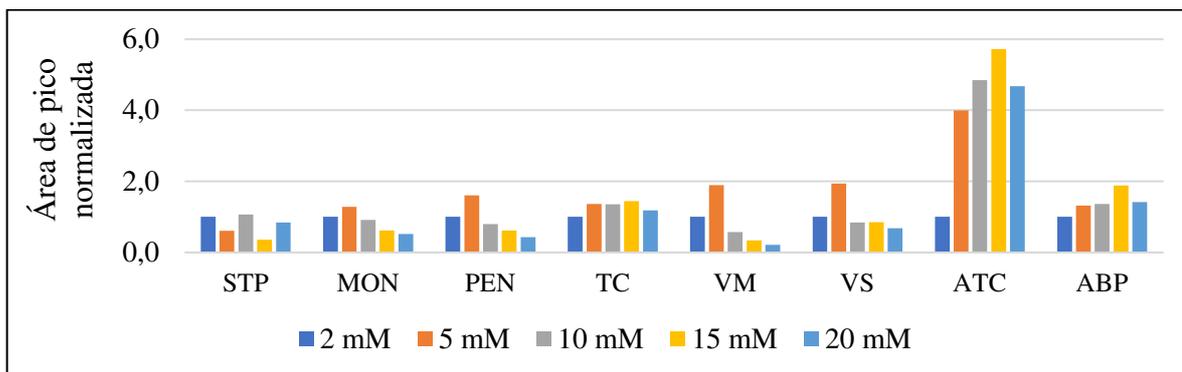
O primeiro estudo com PFPA foi realizado empregando 2 mmol L^{-1} deste modificador na fase aquosa e acetonitrila sem modificador. Com isso já foi possível observar maior retenção da estreptomicina, porém, ainda com pico cromatográfico mal definido, fato que foi superado com a adição de 2 mmol L^{-1} de PFPA também na acetonitrila. Após o bom resultado obtido empregando o pareamento iônico com PFPA para a retenção da estreptomicina em coluna de fase reversa (PFP), juntamente com os demais analitos em corrida cromatográfica única, foi

estudado o efeito da concentração deste modificador na fase móvel. A importância deste estudo se dá devido ao fato de que elevada concentração do agente de pareamento iônico geralmente leva à supressão da ionização (KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009), desta forma, deve-se avaliar o efeito da concentração deste modificador no sinal cromatográfico a fim de obter maior intensidade e apropriado formato de pico. Para este fim, foram avaliadas as concentrações de 2, 5 10, 15 e 20 mmol L⁻¹ de PFPA na fase aquosa e na acetonitrila.

Após a realização deste estudo foi possível verificar que a variação na concentração do modificador proporcionou relevante variação na área do pico para cada analito, com destaque para a anidrotetraciclina, a qual teve sua área aumentada em quase 6 vezes, comparando o uso de 2 e 15 mmol L⁻¹ de PFPA e para a virginiamicina M1, a qual teve sua área reduzida em quase 9 vezes, comparando as concentrações de 5 e 20 mmol L⁻¹. Seguindo o mesmo comportamento da anidrotetraciclina, porém menos intenso, a tetraciclina e o ácido benzilpenicilóico também apresentaram aumento da área de pico com o aumento da concentração de PFPA. Já os demais analitos, apresentaram o comportamento mais comum, queda de sinal, provavelmente associado a supressão de ionização.

A supressão da ionização em *electrospray* pelo uso de pareamento iônico está relacionada a questões como à instabilidade do *spray* (devido à alta condutividade da fase móvel), mascaramento de moléculas protonadas (devido à forte interação ânion-molécula protonada) e redução na eficiência de separação de cargas (como há muitas cargas em fase líquida, a separação perde eficiência)(KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009). Já o aumento de sinal, provavelmente está relacionado com a melhoria na formação da banda cromatográfica, por questões de equilíbrio ácido-base. O efeito da concentração de PFPA na área de pico para cada analito pode ser visto na **Figura 16**, na qual o termo área de pico normalizada refere-se a razão A_c/A_{2mM} , sendo A_c a área de pico obtida para cada analito na concentração em estudo de PFPA e A_{2mM} é a área de pico obtida na concentração de 2 mmol L⁻¹.

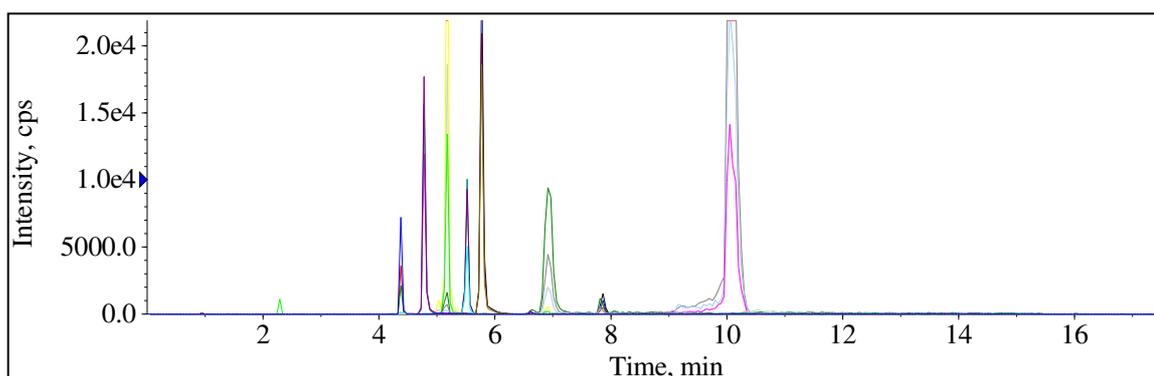
Figura 16 - Efeito da concentração de PFPA na área do pico cromatográfico. (Analitos em 450 ng mL⁻¹ para a estreptomicina e 150 ng mL⁻¹ para os demais. n=2).



Fonte: elaborada pelo autor.

No que diz respeito à intensidade de sinal, a concentração que proporcionou melhor resultado foi 5 mmol L⁻¹ de PFPA para a monensina, penicilina, virginiamicina M1 e S1, 10 mmol L⁻¹ para a estreptomicina, e 15 mmol L⁻¹ para a tetraciclina, anidrotetraciclina e ácido benzilpenicilóico. Desta forma, foi possível verificar que a concentração de modificador que produz maior sinal analítico não coincide para todos os analitos. Porém, quando analisamos os cromatogramas obtidos em cada uma das concentrações do modificador, esta escolha se torna mais fácil, pois os cromatogramas obtidos com 10, 15 e 20 mmol L⁻¹ de PFPA na fase móvel apresentaram picos cromatográficos mais bem definidos e ausência de coeluições, sendo que o resultado obtido com a concentração de 10 mmol L⁻¹ de PFPA na fase móvel, **Figura 17**, apresentou um equilíbrio entre separação cromatográfica e intensidade de sinal.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos empregando 10 mmol L⁻¹ de PFPA na fase móvel. (concentração dos analitos de 450 ng mL⁻¹ para a estreptomicina e 150 ng mL⁻¹ para os demais).



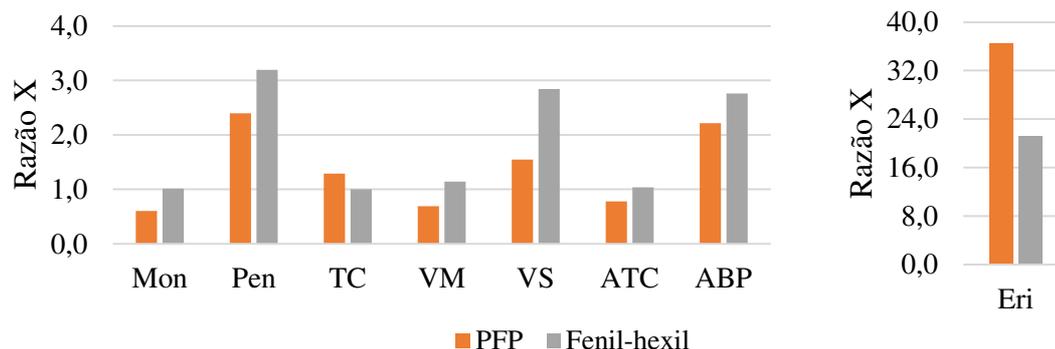
Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.3.5 Comparação dos Métodos com e sem Pareamento Iônico

Entre os analitos estudados, a estreptomicina possui características como elevada polaridade e basicidade que dificulta sua análise juntamente com os demais analitos empregando colunas de fase reversa. A utilização de pareamento iônico com PFPA permitiu superar esta dificuldade e esta estratégia tem sido realizada com sucesso para a análise de substâncias muito polares e básicas, como é o caso dos aminoglicosídeos, classe de antibióticos que inclui a estreptomicina (ZHU *et al.*, 2016). Porém, a supressão da ionização causada pelo aditivo de pareamento pode levar a diminuição de sinal analítico e inviabilizar seu uso. Entre os analitos alvos deste trabalho, apenas a estreptomicina requer a utilização do pareamento iônico para sua retenção em coluna cromatográfica de fase reversa, não sendo necessário para os demais analitos. Além disso, nos estudos do preparo de amostra não foi verificada a possibilidade de realizá-lo em etapa única, sendo necessário um método para a extração da estreptomicina e outro para os demais analitos, o que demanda duas análises cromatográficas para análise de todos os analitos. Desta forma, a utilização de um único método cromatográfico não necessariamente é a melhor opção de análise para os analitos em estudo.

Após os estudos com as colunas fenil-hexil e PFP, uma comparação em termos de área de pico cromatográfico pode mostrar os reais ganhos de sinal analítico obtidos com o método sem pareamento iônico. Esta comparação foi feita calculando a razão X, $X = A_{ce}/A_{pi}$, onde A_{ce} é a área de pico para um determinado analito obtida para a coluna em estudo e A_{pi} é a área de pico obtida para um determinado analito com pareamento iônico. Desta forma, se a razão X é maior que 1, indica que o método sem pareamento permite a obtenção de maior sinal analítico e se a razão X é menor que 1 indica que o método com pareamento iônico permite a obtenção de maior sinal analítico. Os resultados obtidos nesta comparação podem ser vistos na **Figura 18**.

Figura 18 - Comparação da área de pico dos analito utilizando os métodos sem pareamento iônico.



Fonte: elaborada pelo autor.

Analisando esta figura, pode-se verificar que a utilização de pareamento iônico trouxe pouca ou nenhuma supressão na ionização da monensina, tetraciclina, virginiamicina M1 e anidrotetraciclina quando utilizada a coluna fenil sem pareamento iônico. Por outro lado, moderada supressão foi observada para penicilina, virginiamicina S1 e ácido benzilpenicilóico, o que foi evidenciado com o aumento na área de pico para estes analitos de aproximadamente 3 vezes com os métodos sem PFPA. Já para a eritromicina a supressão da ionização foi bastante acentuada, pois sua área de pico aumentou em mais de 20 vezes com os métodos sem pareamento.

Com este estudo pode-se concluir que a utilização da coluna PFP permitiu a separação dos analitos monensina, penicilina, tetraciclina, ácido benzilpenicilóico, virginiamicina M1 e S1, sendo que houve ganho de sinal analítico para penicilina, virginiamicina S1 e ácido benzilpenicilóico. Porém, não foi obtido pico cromatográfico bem definido para a eritromicina e anidrotetraciclina. Já a utilização da coluna fenil-hexil permitiu a obtenção de picos cromatográficos bem definidos para todos os analitos e ganho de sinal analítico para penicilina, virginiamicina S1, ácido benzilpenicilóico e eritromicina, mostrando assim ser superior aos métodos com a coluna PFP e com o aditivo de pareamento. Porém, como o emprego do aditivo PFPA acarretou nenhuma ou moderada supressão na ionização de parte dos analitos, pode ser concluído ainda que este pode ser um bom aditivo para fase móvel quando se necessita fazer o uso de pareamento iônico para retenção de analitos básicos e polares em coluna de fase reversa.

1.4.4 Estudo da Estabilidade Térmica dos Antibióticos

Na etapa de destilação, o vinho (produto da fermentação) é levado à ebulição para esgotar o etanol presente, sendo provavelmente a principal fonte de degradação/transformação

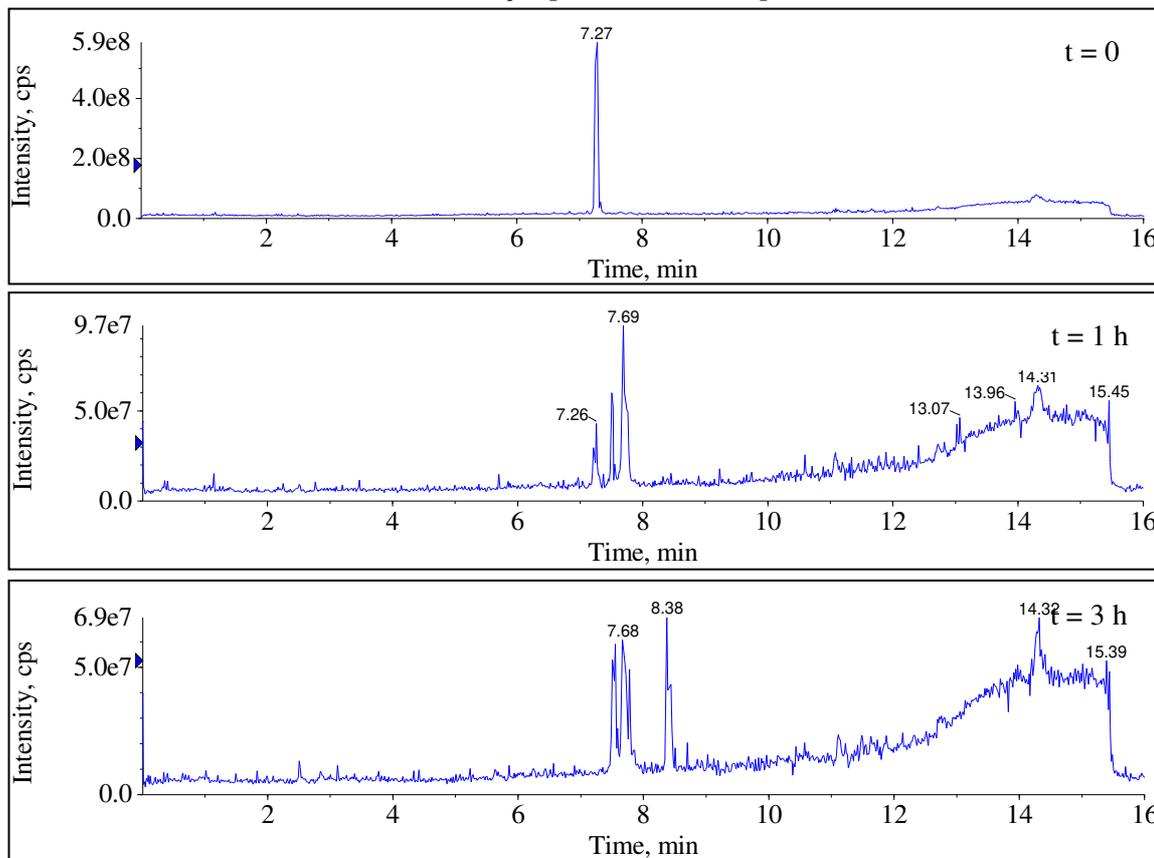
para os antibióticos devido a elevada temperatura. O tempo de residência da vinhaça na coluna de destilação é estimado em 20 min, podendo variar entre plantas industriais diferentes. Com isso, é necessário conhecer a estabilidade dos antibióticos frente a elevada temperatura (ebulição), com o intuito de avaliar os riscos ao meio ambiente associados ao uso de antibióticos na produção de etanol em virtude da fertirrigação, prática comum nas plantações de cana no Brasil.

A fim de estudar as transformações pelas quais os antibióticos passam durante o processo de produção do etanol combustível foi realizado um teste simulando as condições de temperatura da destilação para conhecer a estabilidade e os produtos de degradação/transformação gerados devido ao aquecimento. A estabilidade térmica dos antibióticos provavelmente terá uma relação direta com a sua capacidade de resistir ao processo de produção do etanol combustível. Como consequência da estabilidade térmica, os antibióticos capazes de resistir a altas temperaturas são mais prováveis de estarem presentes na vinhaça, caso sejam empregados na etapa de fermentação.

1.4.4.1 Virginiamicina M1

Após submetida uma solução $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico virginiamicina M1 às condições da destilação foi possível verificar que o mesmo foi detectado em solução até 2,0 h de destilação, indicando assim relevante estabilidade. Os cromatogramas de varredura de íons (EMS) das alíquotas coletadas em 0h, 1,0 h e 3,0 h podem ser vistos na **Figura 19**. Como pode ser visto nesta figura, o cromatograma referente à alíquota em $t = 0$ (sem passar pelo aquecimento) apresentou apenas 1 pico cromatográfico, que se refere a virginiamicina M1 em $t_R=7,27$ min. Já no cromatograma da alíquota referente a $t = 1,0$ h é possível observar o surgimento de dois picos cromatográficos, em $t_R = 7,50$ e $7,69$ min, evidenciando a formação de novos produtos. Já no cromatograma da alíquota de $t = 3,0$ h, é possível verificar o surgimento de um novo pico cromatográficos, em $t_R = 8,38$ min, e a completa extinção do pico referente à virginiamicina M1.

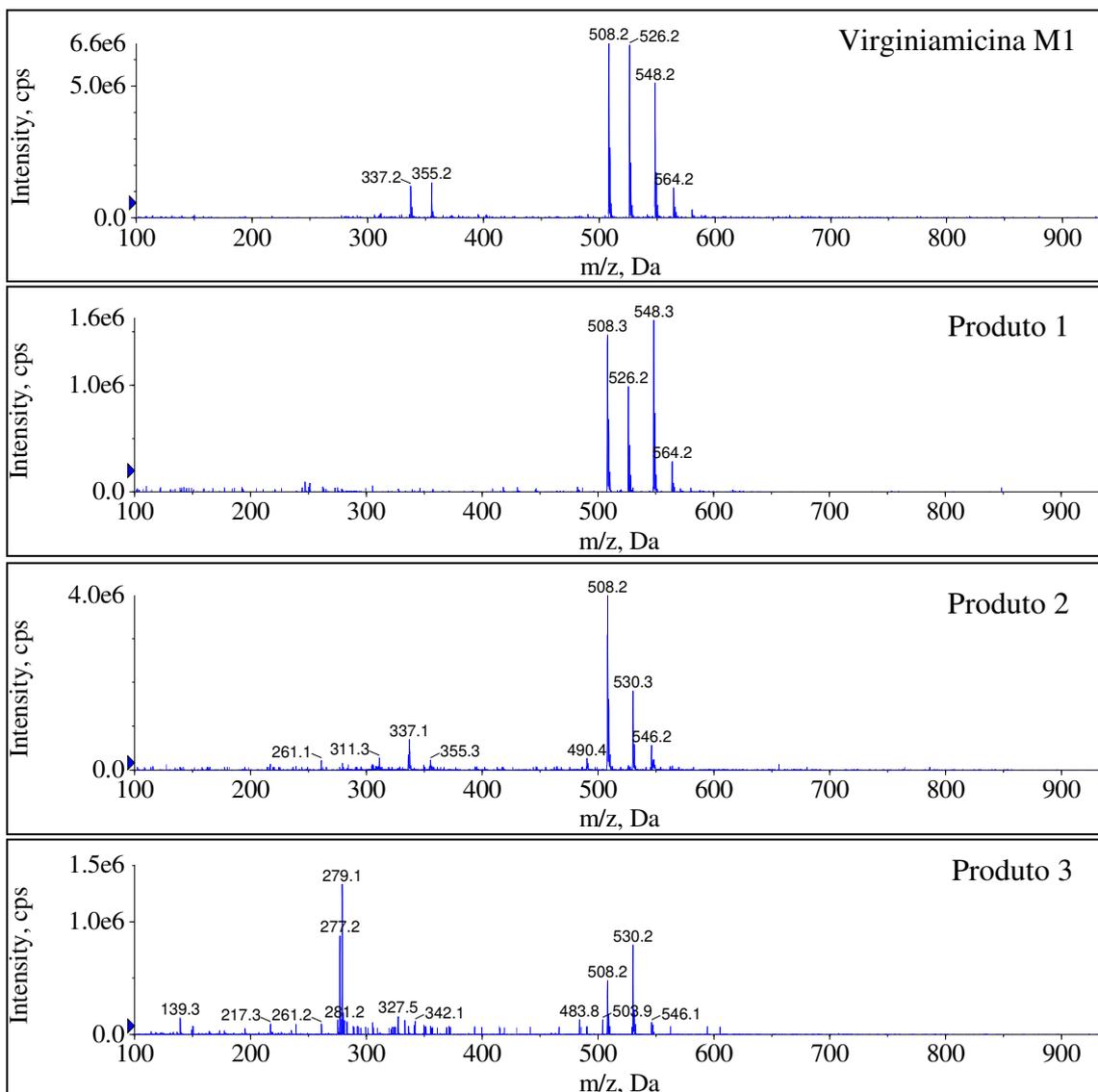
Figura 19 - Cromatograma no modo EMS obtido da solução de virginiamicina M1 submetida às condições da destilação por diferentes tempos.



Fonte: elaborada pelo autor.

A partir da análise da **Figura 19**, podemos identificar a formação de 3 novos produtos de transformação, os quais serão denominados a partir de agora de produto 1, produto 2 e produto 3 nos tempos de retenção respectivamente em 7,50, 7,69 e 8,38 min. Analisando o espectro de massas para cada um destes picos podemos identificar os íons responsáveis pela formação do pico. O espectro de massas para os picos da virginiamicina M1, produtos 1, 2 e 3 podem ser vistos na **Figura 20**.

Figura 20 - Espectro de massas referentes aos picos da virginiamicina M1 e aos produtos gerados.



Fonte: elaborada pelo autor.

Analisando esta figura, é possível verificar que os íons responsáveis pelo pico cromatográfico da virginiamicina M1 possuem m/z 337,2, 355,2, 508,2, 526,2, 548,2 e 564,2. Como estes íons coeluem, e trata-se de uma solução do padrão, podemos concluir que estes íons são formados na fonte de ionização a partir de uma molécula comum, por fragmentação ou formação de aduto. O íon esperado para a ionização da virginiamicina M1 por *electrospray* no modo positivo, $[M+H]^+$, possui m/z 526,2. Os íons com m/z inferiores a este valor foram verificados em experimento de MS^2 , e são, portanto, fragmentos gerados na fonte de ionização. Já os íons de m/z 548,2 e 564,2 são condizentes com os adutos de sódio e potássio respectivamente, sendo provavelmente íons do tipo $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$.

Analisando o espectro de massas do pico referente ao produto 1 é possível verificar elevada semelhança com o espectro da virginiamicina M1, com os íons comuns de m/z 508,2, 526,2, 548,2 e 564,2, indicando assim a formação de isômeros sendo o íon 508,2 um fragmento de 526,2 verificado por experimento de MS^2 no modo EPI, e os íons de m/z 548,2 e 564,2 adutos de sódio e potássio respectivamente.

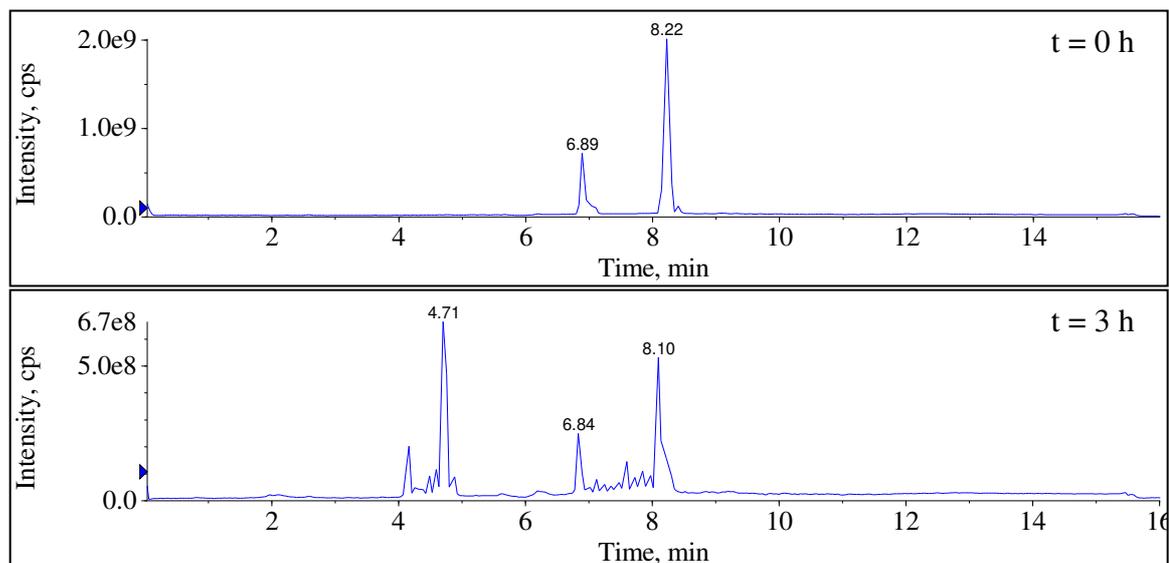
Quando comparamos os espectros de massas referentes aos produtos 2 e 3, também podemos observar uma semelhança entre estes, os íons de m/z 508,2, 530,3 e 546,2. Experimentos de EPI para os íons 530,3 e 546,2 não detectaram fragmentos de m/z 508,2, o que nos leva à conclusão de que o íon 508,2 neste caso não é fragmento, sendo então os produtos 2 e 3 ionizados na forma $[M+H]^+$ com $M = 507$ Da e os íons 530,3 e 546,2 adutos de sódio e potássio respectivamente ($507+23 = 530$ e $507+39 = 546$). Assim, considerando a diferença de 18 Da entre a virginiamicina M1 e os produtos 2 e 3 podemos concluir que estes são formas isoméricas da desidratação da virginiamicina M1 favorecida pela elevada temperatura.

Vale destacar ainda que o surgimento do produto 3, ausente até 1 h de destilação, se deu com a diminuição da área do pico referente ao produto 2. Como os produtos 2 e 3 possuem a mesma massa, podemos concluir que o produto 3 surge devido a isomerização do produto 1. Além disso, com este experimento foi possível verificar que a virginiamicina M1 resistiu no meio sob em ebulição por 2,0 h e sua transformação levou à formação de novos produtos com massa molecular de 525 Da (para o produto 1) e 507 Da (para os produtos 2 e 3).

1.4.4.2 Monensina

Após submetida uma solução $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de monensina, em meio aquoso, à ebulição por 3,0 h, foi possível verificar surgimento de novas espécies, por meio do surgimento de novos picos cromatográficos. Apesar da formação de novas espécies, foi possível verificar também que apenas parte da monensina se transformou durante as 3 h, os cromatogramas em EMS para as alíquotas em $t = 0$ e $t = 3$ h podem ser vistos na **Figura 21**. Analisando o cromatograma da alíquota em $t = 0$ é possível verificar a presença de um pico referente a monensina no $t_R = 8,22$ min e outro em $t_R = 6,89$, referente à uma impureza. Já no cromatograma da alíquota em $t = 3$ h, é possível verificar a formação de dois produtos, o produto 1 em $t_R 4,08$ min e o produto 2 em 4,71 min.

Figura 21 - Cromatograma em varredura de íons (EMS) da solução de monensina sem passar por aquecimento ($t = 0$) e após 3,0 h em ebulição.

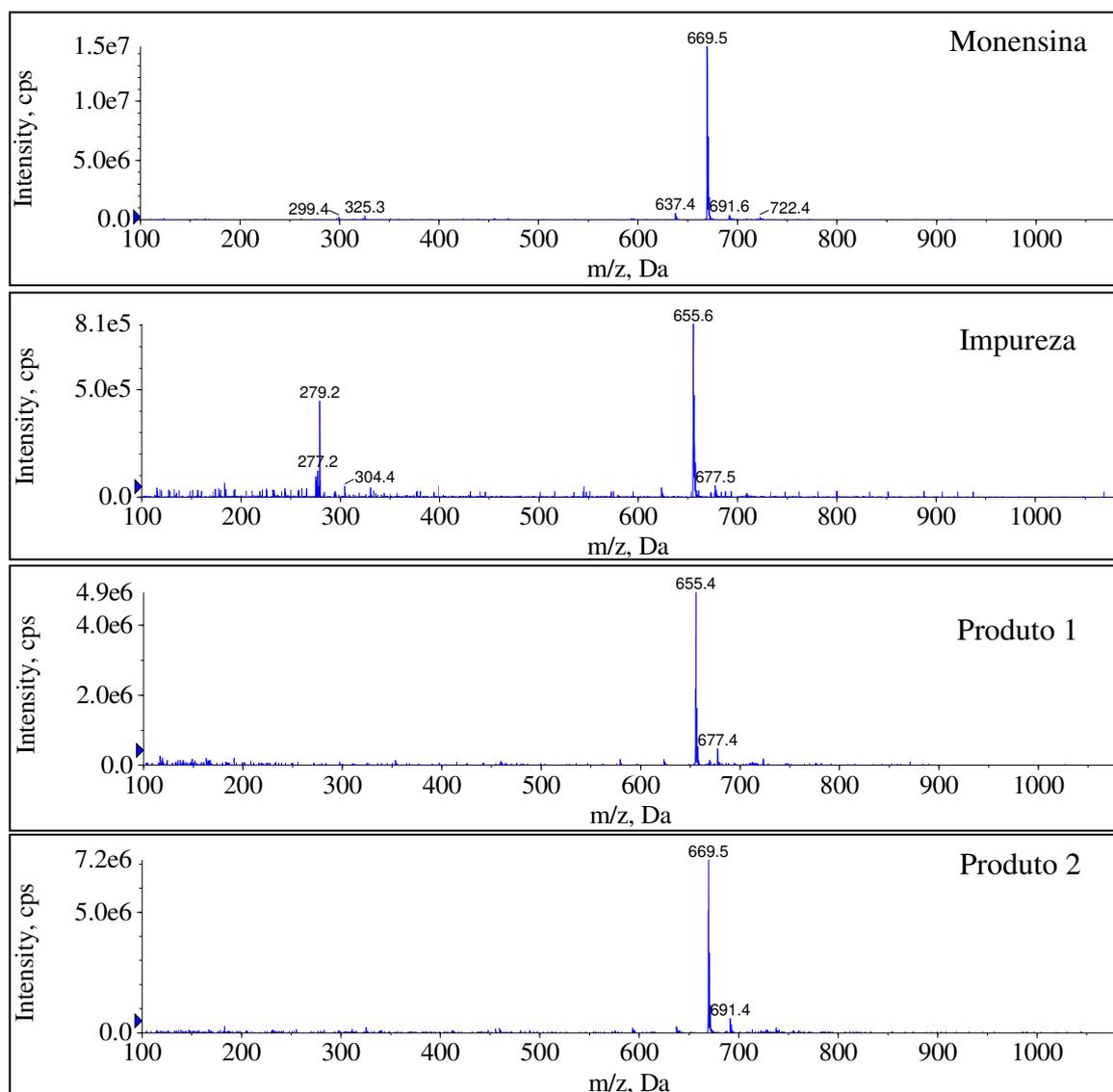


Fonte: elaborada pelo autor.

Analisando o espectro de massas referente aos picos cromatográficos observados na **Figura 21** podemos inferir algo sobre a identidade da impureza verificada. A monensina possui massa molecular de 670 Da, desta forma, espera-se um íon de m/z 669 com ionização por ESI(-) para este composto, o que foi confirmado na **Figura 22**. Já o íon responsável pelo pico da impureza apresentou m/z de 655, o que é compatível com a presença da monensina B, um homólogo da monensina. Como a pureza do padrão analítico utilizado é de 86% de monensina sódica, é provável que este contaminante seja a monensina B, pois ambas substâncias são produzidas a partir da mesma bactéria, *Streptomyces cinnamonensis* (BERAN *et al.*, 1983).

Já os picos cromatográficos referentes aos produtos 1 e 2 possuem m/z de 655 e 669 respectivamente. Isso sugere que ocorreu a isomerização da impureza e da monensina. Como há impureza no padrão, isso dificulta fazer afirmações a respeito da origem dos produtos formados, podendo ser oriundos tanto da transformação da monensina como da impureza, pois ambas tiveram suas áreas diminuídas com o tempo de exposição à elevada temperatura. Apesar disso, podemos concluir que a monensina apresentou elevada estabilidade, resistindo em meio aquoso em ebulição por 3 h, que foi o período monitorado.

Figura 22 - Espectros de massas referentes aos picos cromatográficos observados nos cromatogramas da Figura 21.

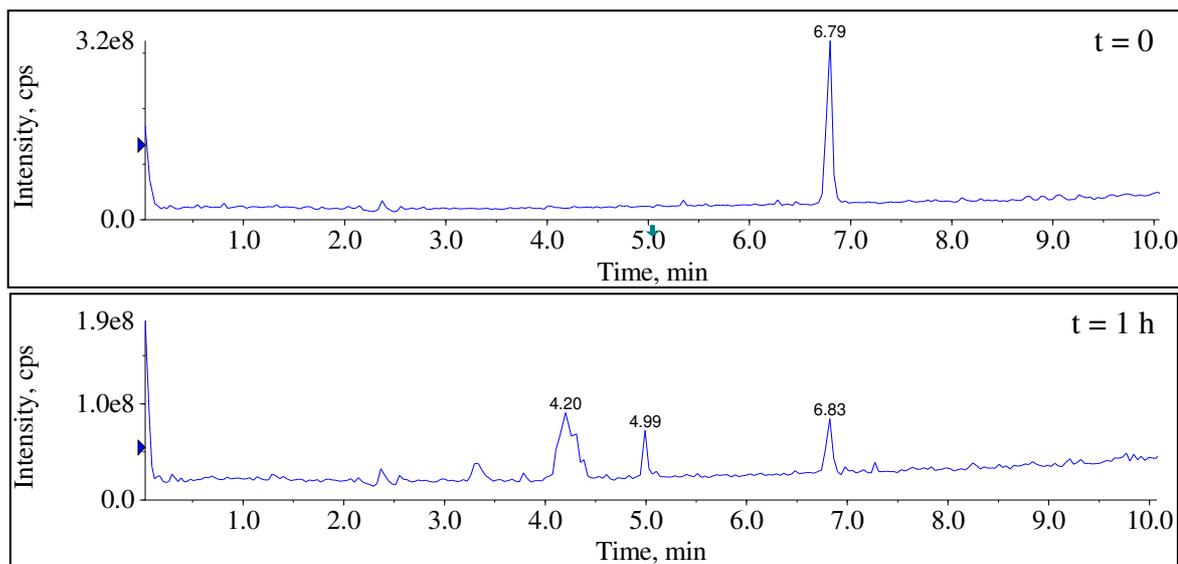


Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.4.3 Penicilina

Submetendo uma solução de penicilina $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ à condição da destilação, foi possível verificar que a mesma possui baixa estabilidade, resistindo no meio por tempo menor que 1,5 h. Além disso foi possível verificar a formação de 2 picos cromatográficos após processo de aquecimento, como podem ser vistos nos cromatogramas da **Figura 23**.

Figura 23 - Cromatograma no modo EMS da alíquota em t = 0 e em t = 1 h.



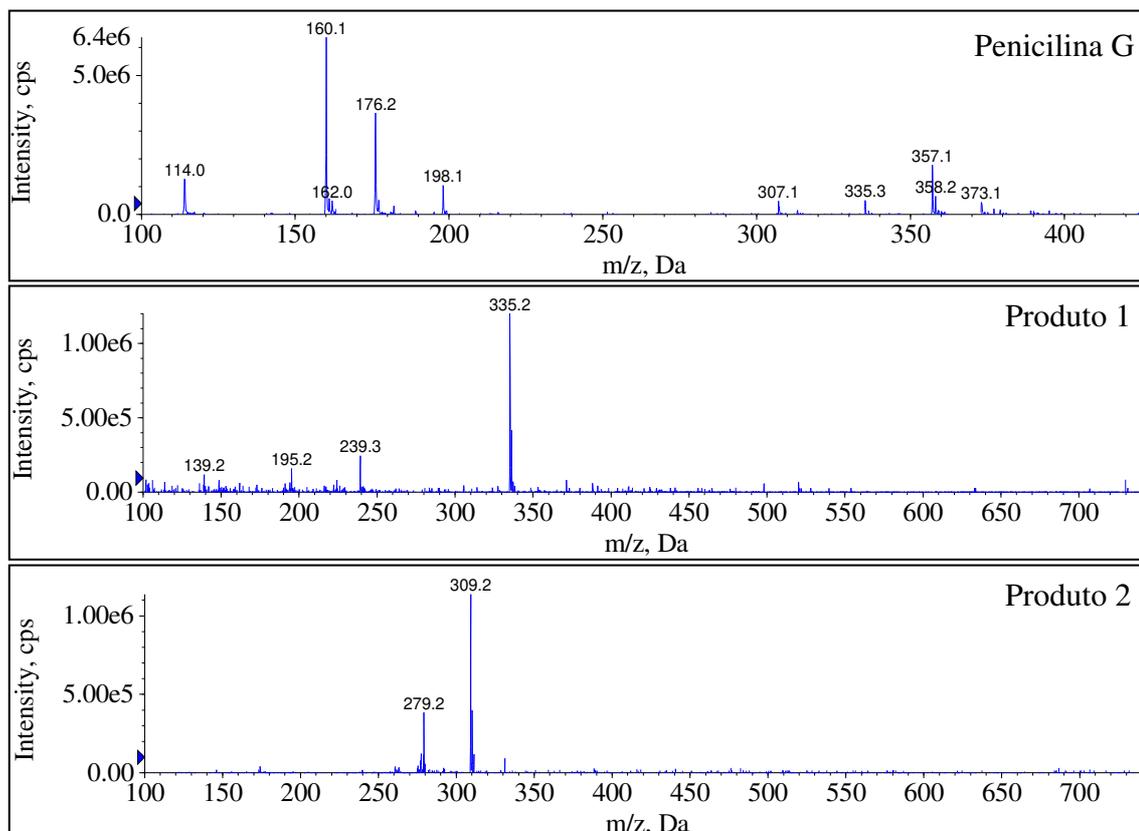
Fonte: elaborada pelo autor.

O pico referente a penicilina, t_R 6,79 min, não foi observado na amostra coletada com 1,5 h de aquecimento, indicando completa transformação. Esta transformação levou à formação de dois novos produtos, sendo o produto 1 no t_R 4,20 min e o produto 2 no t_R 4,99 min. O íon $[M+H]^+$ esperado para a penicilina possui m/z 335. Mas além da ionização por protonação, foi observado ionização por formação de aduto com sódio ($[M+Na]^+ = 357$), por potássio $[M+K]^+ = 373$ e fragmentos de m/z menores gerados na fonte de ionização verificados por experimentos de MS^2 , **Figura 24**.

Já o pico cromatográfico referente ao produto 1, $t_R = 4,20$ min, é formado pelo íon de m/z 335, mesmo m/z da penicilina indicando uma isomerização. Há na literatura científica produto de degradação conhecido para a penicilina G com massa molecular de 334 Da, sendo o ácido penílico. Além disso, o espectro de MS^2 obtido para este produto apresentou os principais íons produtos relatados na literatura para este composto (ALDEEK *et al.*, 2016).

O pico cromatográfico referente ao produto 2, $t_R = 4,99$ min, é formado pelo íon de m/z 309. Este íon é condizente com ácido penilóico, que também é um produto de degradação da penicilina conhecido (ALDEEK *et al.*, 2016). Além disso, o espectro de MS^2 obtido para este produto apresentou os principais íons produtos relatados na literatura para este composto (ALDEEK *et al.*, 2016). Em resumo, temos que, nas condições estudadas, a penicilina resiste em meio com elevada temperatura, aproximadamente 100 °C, por tempo entre 1,0 e 1,5 h, gerando 2 produtos de transformação, os ácidos penílico e penilóico.

Figura 24 - Espectro de massas referentes aos picos da penicilina ($t_R = 6,79$ min) em A, ao produto 1 ($t_R = 4,20$ min) em B, ao produto 2 ($t_R = 4,99$ min) em C.

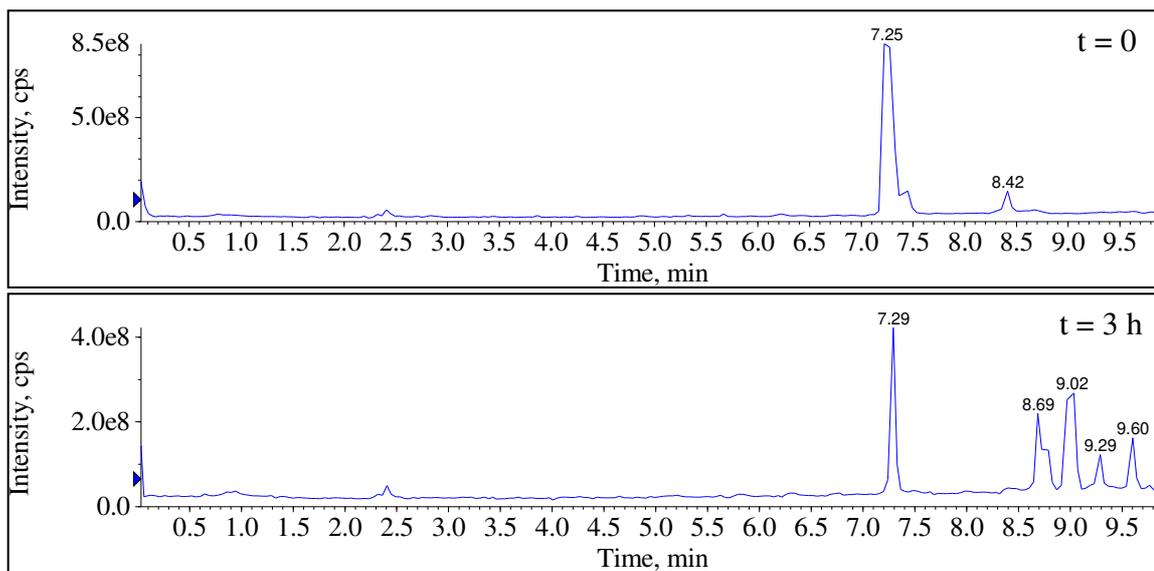


Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.4.4 Eritromicina

A análise das alíquotas da solução de eritromicina ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) permitiu verificar a estabilidade deste antibiótico em condição de elevada temperatura. Mesmo após o término do experimento (3,0 h em ebulição em sistema em refluxo) foi verificada a presença da eritromicina na solução, além de 4 novos picos cromatográficos, indicando a formação de 4 novos produtos. A comparação dos cromatogramas obtidos com a solução de eritromicina sem passar pelo tratamento térmico e após 3,0 h em ebulição pode ser vista na **Figura 25**. Como pode ser visto nesta figura, o cromatograma da solução de eritromicina sem passar pelo aquecimento apresentou 2 picos cromatográficos, um referente a eritromicina ($t_R = 7,25$ min) e outro referente a uma impureza ($t_R = 8,42$ min). Já o cromatograma da solução que ficou em ebulição por 3,0 h, apresentou 5 picos cromatográficos, um referente à eritromicina ($t_R = 7,29$ min), e outros quatro referentes aos produtos 1 ($t_R = 8,69$ min), 2 ($t_R = 9,02$ min), 3 ($t_R = 9,29$ min) e 4 ($t_R = 9,60$ min).

Figura 25 - Cromatograma no modo EMS da solução de eritromicina antes e após 3,0 h em ebulição.

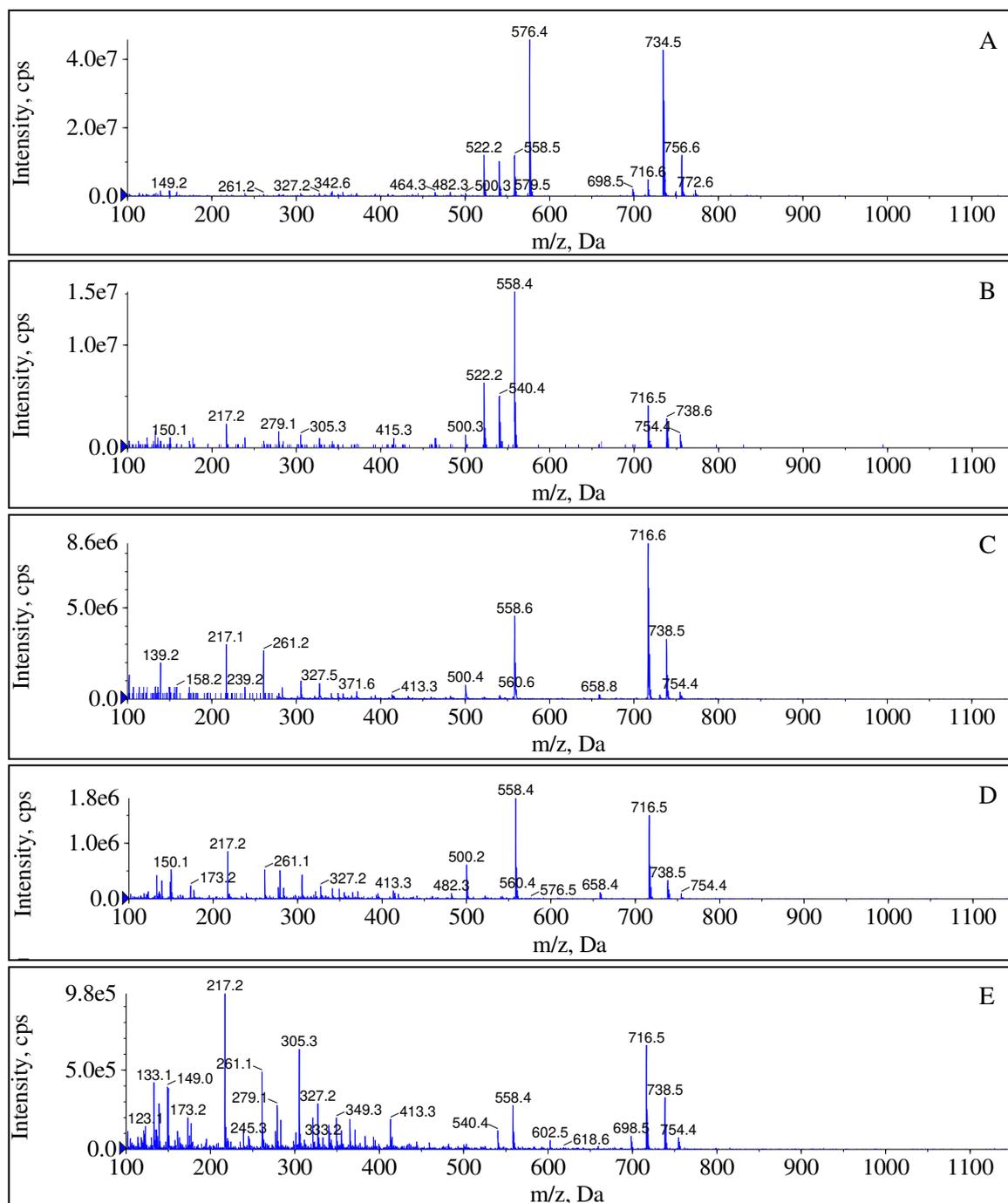


Fonte: elaborada pelo autor.

O pico referente a impureza (t_R 8,42 min) é formado pelos íons de m/z 716, 738 e 754, coerentes com íons do tipo $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ respectivamente, sendo $M = 715$ Da. Estes dados nos levam a concluir que se trata da anidroeritromicina, uma impureza comum. Já o pico referente a eritromicina, é composto pelos íons de m/z 734, 756 e 772, íons formados por protonação e por formação de adutos de sódio e potássio. Os espectros de massas referentes aos picos cromatográficos da eritromicina e dos produtos formados podem ser vistos na **Figura 26**.

Os picos referentes aos produtos formados durante o aquecimento de 3,0 h apresentaram a mesma composição, íons de m/z 716, 738 e 754, além de fragmentos gerados na fonte de ionização. Este fato chama muito a atenção, pois indica a formação de 4 isômeros de massa molecular de 715 Da, com diferença de massa de 18 Da, resultante da desidratação da eritromicina. Além da formação de 4 novos produtos, neste estudo foi possível verificar que a eritromicina apresenta estabilidade suficiente para resistir às condições da destilação (no que diz respeito à temperatura) e desta forma seu uso na fermentação durante a produção de etanol se torna um grande risco para ambientes nos quais é empregada a fertirrigação com vinhaça.

Figura 26 - Espectro de massas referente ao pico da eritromicina e aos produtos gerados. A) eritromicina em $t_R = 7,25$ min, B) produto 1 ($t_R = 8,69$ min), C) produto 2 ($t_R = 9,02$ min), D) produto 3 ($t_R = 9,29$ min) e E) produto 4 ($t_R = 9,60$ min).



Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.5 Otimização do Preparo de Amostra

A vinhaça é um subproduto formado na destilação, no processo de produção do etanol combustível. Na sua composição tem aproximadamente 82,3% de água, 10,6% de cinza, 6,2%

de proteína e 0,9% de carboidratos de massa molecular baixa. Esta possui cerca de $4,6 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos suspensos e $10,5 \text{ g L}^{-1}$ de sólidos dissolvidos, como as espécies inorgânicas sulfato, fosfato, nitrato, potássio, sódio, cobre, ferro, cálcio, manganês e alumínio (AHMED; SULIEMAN; ELHARDALLOU, 2013). Além disso, substâncias como melanoidinas, compostos fenólicos, caramelo e furfural contribuem para sua coloração marrom. (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000) mostrando-se assim uma matriz complexa. Com isso, um dos principais desafios deste trabalho é o preparo de amostra, o qual foi superado estudando técnicas como precipitação de proteínas, SPE, SALLE e SPE on-line.

1.4.5.1 Precipitação de Proteínas

A precipitação de proteína é uma técnica de preparo de amostra muito utilizada para análise de amostras biológicas por métodos cromatográficos. A presença de proteína na amostra pode levar a danos na coluna ou diminuição da sua vida útil, sendo então necessária sua remoção. Para isso, alguns agentes precipitantes como solventes orgânicos (metanol, etanol e acetonitrila), ácidos (tricloroacético e fosfórico) e sais (sulfato de amônio) tem sido empregados (POLSON *et al.*, 2003). Como a vinhaça é uma amostra rica em proteínas sua precipitação se faz necessária, sendo que o emprego de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi escolhido para esta finalidade. A precipitação de proteínas empregando sal se baseia no fato de que o sal diminui a disponibilidade de moléculas de água para solvatar as proteínas devido a hidratação preferencial resultante da interação íons do sal com as moléculas de água, desta forma a possibilidade de interação proteína-proteína aumenta e ocorre a precipitação (POLSON *et al.*, 2003).

Neste estudo, diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram estudadas, conforme metodologia disponível na literatura (BURGESS, 2009). Na primeira etapa de adição do sal foi possível observar a precipitação de uma maior quantidade de proteína para as amostras contendo a concentração do sal referente a 50 e 60% da concentração de saturação. Assim, após coleta do sobrenadante e nova adição de sal, para repetir o procedimento de precipitação nestas amostras, foi observada nova precipitação na alíquota contendo inicialmente a concentração de 50% de saturação. Já na alíquota contendo inicialmente 60% de saturação não foi observada nova precipitação. Desta forma, a concentração referente a 60% da concentração necessária para a saturação foi suficiente para realizar a precipitação, sendo esta concentração igual a $0,36 \text{ g mL}^{-1}$ ou $2,7 \text{ mol L}^{-1}$. O efeito da adição do sal na vinhaça pode ser visto na **Figura 27**. Como pode ser visto nesta figura, após a adição do sal e repouso por 30 min a $\sim 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$, houve a

formação de um agregado de proteínas na parte superior do tubo e a mistura ficou visualmente mais limpa.

Figura 27 - Vinhaça bruta (5 mL) sem (esquerda) e com a adição de 1,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e incubação por 30 min a $\sim 1,0^\circ\text{C}$ (direita).



Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.5.2 Extração em Fase Sólida

O emprego de sorventes poliméricos contendo sítios de interação hidrofílica e lipofílica é uma opção que deve ser considerada quando há a necessidade de extração de compostos com grande faixa de polaridade. Além disso, é uma ótima opção para eliminar interações com silanóis residuais, problema comum na extração de composto polares quando se utiliza sorvente a base de sílica. A obtenção de polímeros modificados formados pelos monômeros N-vinilpirrolidona, estireno e divinilbenzeno/N-vinilpirrolidona dão origem a sorventes amplamente utilizados como, respectivamente, StrataTM-X, HLB SupelTM-Select e HLB Oasis[®] (PHENOMENEX, 2010; SUPELCO, [s. d.]; WATERS CORPORATION, [s. d.]). Apesar das características dos sorventes poliméricos, os sorventes a base de sílica funcionalizada com octadodecil (C18) compõem uma extensa lista de opções de sorventes para SPE. No caso do C18, este é a primeira opção quando os analitos alvos são compostos de média a baixa polaridade.

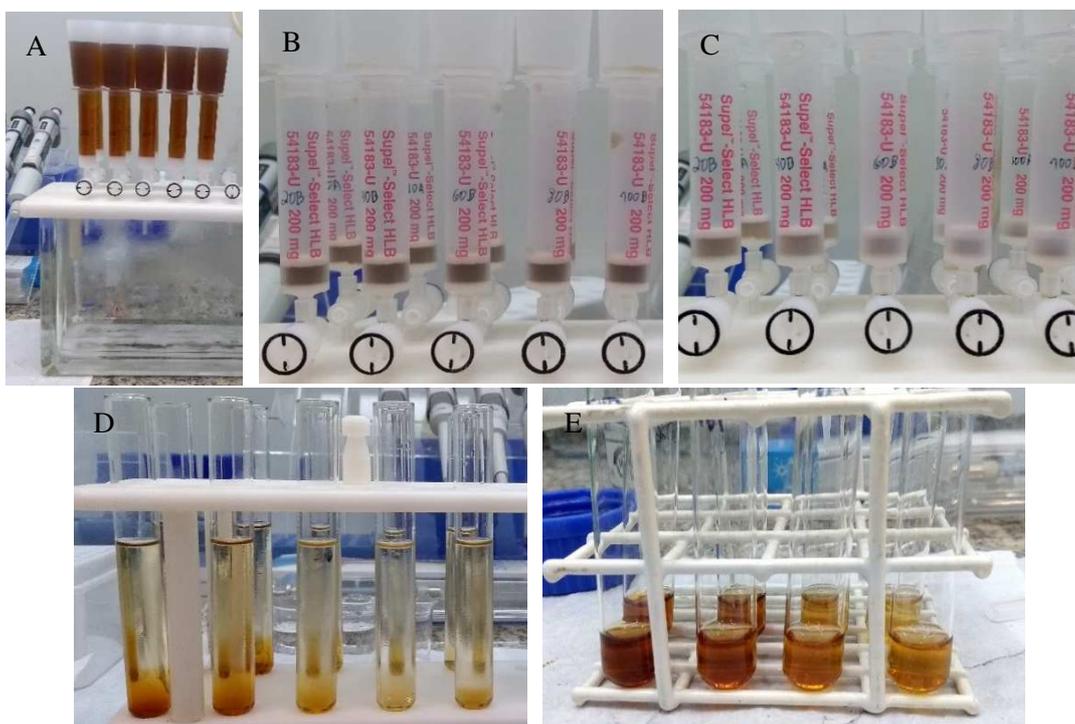
1.4.5.2.1 Estudo Inicial da Etapa de Limpeza Empregando Cartuchos HLB

A vinhaça é uma matriz complexa, contendo muitos sais, carboidratos, proteínas, melanoidinas, compostos fenólicos, ácidos carboxílicos, entre outros (AHMED; SULIEMAN; ELHARDALLOU, 2013). Desta forma, a etapa de limpeza da amostra é um desafio no preparo de amostra. Este desafio ficou evidenciado no primeiro estudo de limpeza realizado com cartuchos HLB SupelTM-Select. Neste estudo, 1,0 mL de diferentes soluções de limpeza

contendo (metanol-água) 100, 80, 60, 40, 20 e 0% de metanol foram utilizadas nesta etapa e foi possível verificar a elevada retenção de componentes da matriz nos cartuchos, **Figura 28**.

Como pode ser visto nesta figura, a retenção dos componentes da matriz pode ser visualmente confirmada pela intensa cor marrom do sorvente após passagem da amostra, **Figura 28 B**. Por meio de uma inspeção visual, é possível ver que a limpeza realizada com 1 mL de metanol (100%) resultou em um cartucho com coloração mais clara do que a solução contendo 20% de metanol. Porém, a etapa de limpeza impõe a necessidade de eluir a maior quantidade de componentes da matriz sem perdas de analitos, buscando assim um valor compromisso entre limpeza da amostra e recuperação dos analitos.

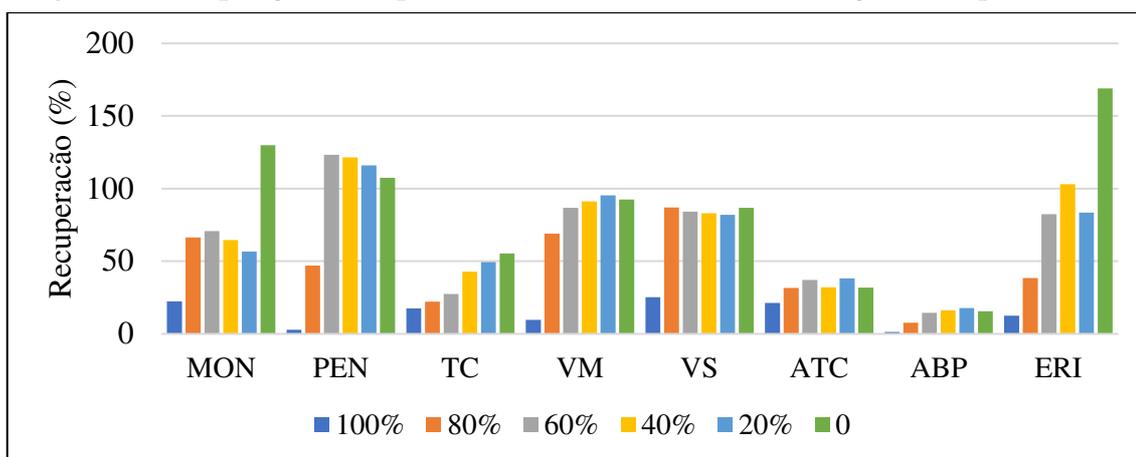
Figura 28 - SPE realizada com soluções de limpeza contendo 20, 40, 60, 80 e 100% de metanol (da esquerda para direita). Em A: 10 mL de vinhaça diluída 2x. Em B: cartuchos HLB após passagem da vinhaça. Em C: após diferentes soluções de limpeza. Em D: eluato obtido com 7 mL de metanol. Em E: eluato após secagem e redissolução em 1 mL contendo 15% de ACN em água.



Fonte: elaborada pelo autor.

A recuperação obtida com as diferentes soluções de limpeza pode ser verificada na **Figura 29**. Como pode ser visto nesta figura, a recuperação empregando soluções de limpeza contendo 100 e 80% de metanol apresentaram os piores resultados, o que está de acordo com a força de eluição das soluções testadas, sendo 100% a mais forte e 0% a mais fraca. Recuperações acima de 60% foram obtidas para a maioria dos analitos cujas soluções de limpeza utilizadas foram as soluções contendo 60, 40, 20 e 0% de metanol.

Figura 29 - Recuperação obtida para cada antibiótico em diferentes soluções de limpeza no SPE.



Fonte: elaborada pelo autor.

A principal exceção foi a estreptomicina (não mostrada na **Figura 29**) para a qual não foi observada recuperação alguma, o que sugere a necessidade de outro sorvente, como troca catiônica por ser muito básica, por exemplo. Os analitos que apresentaram recuperações baixas, mesmo para as soluções de limpeza com menor força de eluição, foram a tetraciclina, a anidrotetraciclina, o ácido benzilpenicilóico. Os dois últimos apresentaram recuperações similares tanto com a solução de limpeza com 60 e 0% de metanol, indicando que este fato foi independente a solução de limpeza. Já a tetraciclina apresentou recuperação de 55% com solução de limpeza contendo 0% de metanol e 27% de recuperação com a solução de limpeza contendo 60% de metanol, o que indica que a solução de limpeza teve influência na recuperação. Apesar da solução de limpeza contendo 60% de metanol ter resultado em uma recuperação para a tetraciclina inferior às soluções com menor concentração de metanol, esta solução proporcionou uma limpeza superior na amostra. Por isso, esta foi escolhida para prosseguir os estudos com SPE na expectativa de aumentar a recuperação dos analitos com baixa recuperação por meio de controle de pH e adição de espécies complexantes. Além disso, o volume de vinhaça utilizada nos estudos posteriores foi reduzido para 5 mL, com intuito de obter um eluato mais limpo.

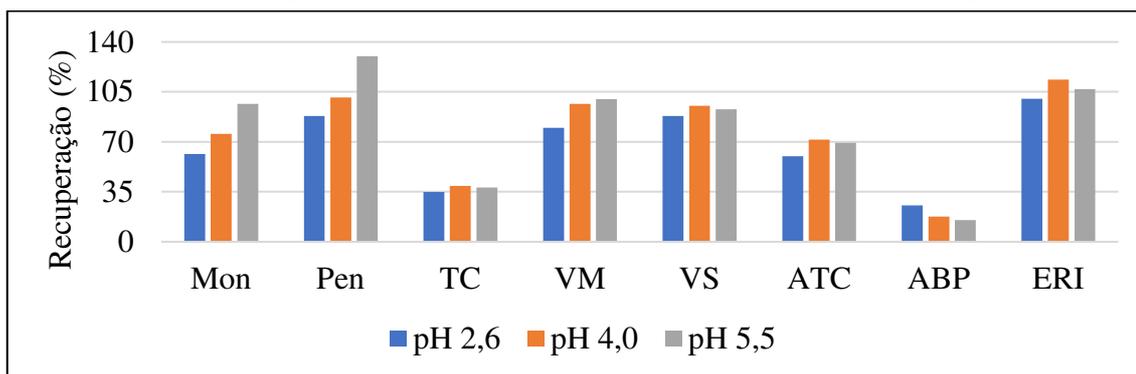
1.4.5.2.2 Estudo do pH da Amostra

O íon citrato é um agente complexante para íons metálicos e por isso o tampão citrato-fosfato (também conhecido como tampão McIlvaine) é muito empregado na extração de tetraciclina (ANDERSON; RUPP; WU, 2005). Além disso, este tampão fornece uma ampla faixa de tamponamento abrangendo a faixa de pH de 2,6 até 7,0 (GOMORI, 1955). Desta forma,

este tampão foi escolhido para estudar o efeito do pH da amostra na recuperação dos analitos, com enfoque naqueles que apresentaram baixa recuperação (ácido benzilpenicilóico, anidrotetraciclina e tetraciclina). Os pHs estudados foram 2,6; 4,0 e 5,5. O pH de 2,6 foi escolhido com o objetivo de diminuir a ionização do ácido benzilpenicilóico, apesar de aumentar a chance de degradação da maioria dos analitos devido ao pH baixo. O pH 4,0 é o pH mais empregado para a extração de tetraciclina, assim como pH 5,5 que é o seu ponto isoelétrico. pH maior que 5,5 favorece a formação do ânion bivalente da tetraciclina, o que levaria a uma menor retenção no cartucho de extração e por isso esta faixa de pH não foi estudada.

A adição do tampão citrato-fosfato aumentou a recuperação da tetraciclina e da anidrotetraciclina nos três pHs estudados, fato citado na literatura como tendo origem na capacidade o íon citrato atuar com agente complexante para íons metálicos, competindo com a tetraciclina e conseqüentemente a mesma fica então em sua forma não complexada, o que favorece sua retenção no sorvente do cartucho de SPE (ANDERSON; RUPP; WU, 2005). Apesar da melhoria alcançada, a recuperação da tetraciclina foi de ~38%, valor que pode ser melhorado para aumentar a capacidade de pré-concentração da extração. O pH 2,6 favoreceu a recuperação do ácido benzilpenicilóico, porém, neste pH foi alcançado uma recuperação de 25%, valor inferior ao desejável. Os valores das recuperações obtidos para os analitos nos pHs estudados podem ser vistos na **Figura 30**.

Figura 30 - Recuperação obtida em diferentes pHs utilizando o cartucho HLB Supel™-Select.



Fonte: elaborada pelo autor.

Como pode ser visto nesta figura, recuperações maiores que 60% foram obtidas para a maioria dos analitos, ficando apenas a tetraciclina e o ácido benzilpenicilóico em valores mais baixos. Apesar do pH 2,6 melhorar a recuperação do ácido benzilpenicilóico, neste pH houve maior retenção de componentes da matriz, fato indesejável e que pode ser verificado

observando a maior intensidade na coloração do eluato obtido, **Figura 31**. Este fato indica a presença de componentes de caráter ácido na matriz, que em pH baixo, menor que o pKa, estão não ionizados e são mais retidos pelo sorvente. Por isso, o pH 5,5 foi escolhido para continuar os estudos. Além disso, este pH prioriza a recuperação da monensina, um dos antibióticos mais empregados na produção de etanol.

Figura 31 - Eluatos obtidos com amostras no pHs 5,5; 4,0 e 2,6 (da esquerda para direita).

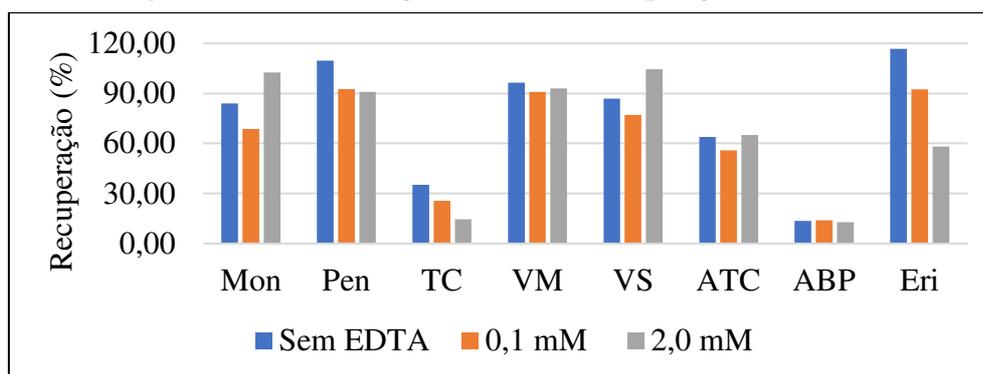


Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.5.2.3 Influência do EDTA na Recuperação dos Analitos

O uso de EDTA no preparo de amostras para a extração de tetraciclina tem sido uma prática recorrente cujo fundamento se encontra na capacidade do EDTA complexar íons metálicos. Desta forma, ocorre uma competição entre o EDTA e a tetraciclina para complexar os íons metálicos presentes na amostra e como resultado ocorre a liberação da tetraciclina que estava na forma de complexo, deixando-a mais susceptível a interação com a fase extratora (ANDERSON; RUPP; WU, 2005). Porém, não foi verificada melhoria no resultado obtido quando comparado com a extração realizada sem a adição de EDTA. A adição de EDTA nas concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ e $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na amostra teve um efeito negativo na recuperação da tetraciclina, como pode ser visto na **Figura 32**. Com este resultado, a adição de EDTA na amostra não foi adotada.

Figura 32 - Efeito da adição de EDTA na recuperação dos analitos.

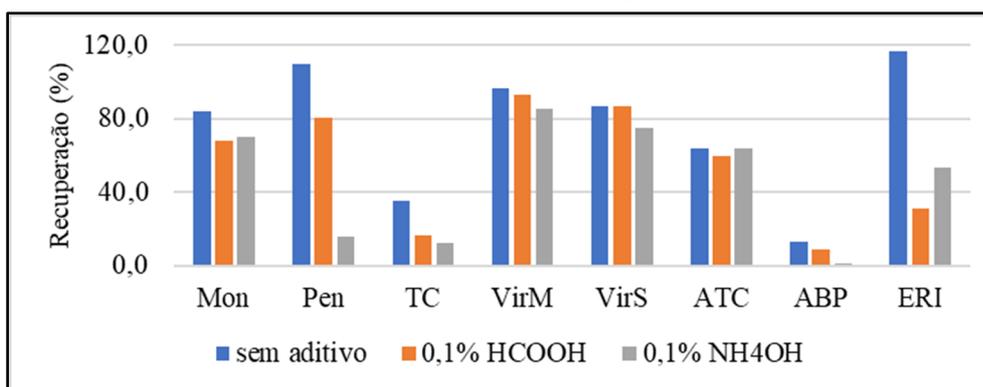


Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.5.2.4 Estudo da Etapa de Limpeza com Soluções Ácida, Básica e Menor Concentração de Solvente Orgânico.

Com o intuito de explorar um pouco mais a etapa de limpeza, foram testadas limpezas com solução 60% de metanol contendo 0,1% de ácido fórmico e 0,1% de hidróxido de amônio. A utilização da solução de limpeza contendo base levou a obtenção de um eluato mais limpo, de coloração mais clara. Este fato indica presença de compostos ácidos na amostra, pois em pH elevado os componentes da amostra possuem menor interação com o sorvente, resultado da desprotonação, como já citado anteriormente. Porém, tanto a solução ácida quanto a solução básica levaram a menor recuperação para os analitos, como pode ser visto na **Figura 33**.

Figura 33 - Recuperação obtida empregando soluções de limpeza contendo 0,1% de ácido fórmico, 0,1% de hidróxido de amônio e sem a adição de aditivo.

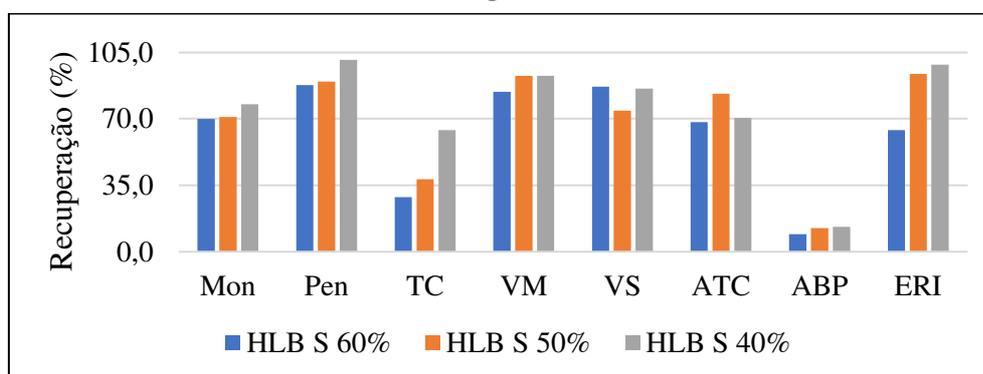


Fonte: elaborada pelo autor.

Desta forma, a estratégia inicial de utilizar uma solução de limpeza com elevado proporção de metanol (60% v/v) visando a limpeza da amostra mostrou-se inapropriada para tetraciclina e ácido benzilpenicilóico. Assim, foram testadas limpezas com soluções contendo 50 e 40% de metanol, visando melhorias na recuperação destes analitos.

Neste teste foi observado um aumento na coloração do eluato com a diminuição do solvente orgânico na limpeza, como já esperado. Porém, empregando a solução de limpeza contendo 40% de metanol foi possível alcançar uma recuperação de 64% para a tetraciclina. Já para o ácido benzilpenicilóico, a recuperação alcançada continuou baixa. Desta forma, o emprego de 1 mL da solução de limpeza contendo 40% de metanol permitiu alcançar um melhor equilíbrio entre limpeza da amostra e recuperação da tetraciclina. Os valores de recuperação obtidos para os analitos neste estudo podem ser vistos na **Figura 34**.

Figura 34 - Recuperação obtida empregando soluções de limpeza contendo 60, 50 e 40% de metanol em água.



Fonte: elaborada pelo autor.

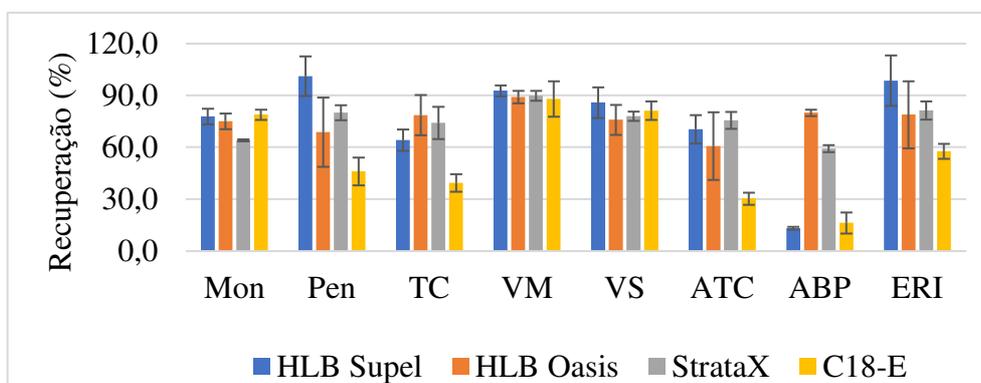
1.4.5.2.5 Comparação entre os Sorventes HLB Supel™-Select, HLB Oasis®, Strata™-X e C18-E

A variedade de sorventes poliméricos que possibilitam interações hidrofílicas e lipofílicas disponível no mercado fornece opções para que diante de determinada necessidade, o analista tenha a possibilidade da escolha mais apropriada para a análise. Além da diversidade em termos de composição/propriedades química, vale ressaltar a diferença em termos de custo. Entre os sorventes testados, em ordem crescente de custo tem-se: HLB Supel™-Select > Strata™-X > HLB Oasis®, sendo que o primeiro tem o preço cerca de 2-3 vezes menor que os demais, fator decisivo em muitos casos.

Neste teste foi verificada uma maior retenção dos analitos, assim como dos componentes da matriz, para os sorventes Strata™-X e HLB Oasis®, os quais possibilitaram recuperações acima de 59% para todos os analitos mesmo sendo empregada uma solução de limpeza contendo 60% de metanol. Já o sorvente HLB Supel™-Select apresentou uma recuperação similar para a maioria dos analitos, empregando solução de limpeza contendo 40% de metanol, exceto para o ácido benzilpenicilóico, cuja recuperação foi de 13%.

Já com o sorvente Strata™ C18-E foram obtidos menores valores de recuperação para a penicilina, tetraciclina, ácido benzilpenicilóico e anidrotetraciclina. Para este cartucho foram testadas soluções de limpeza contendo 10, 20 e 30% de metanol em água e o melhor resultado foi obtido com a solução de limpeza contendo 10% de metanol. Os resultados de recuperação obtidos neste teste, considerando as melhores condições experimentais para cada cartucho, podem ser vistos na **Figura 35**. Desta forma, buscando um equilíbrio entre custo e benefício, o sorvente HLB Supel™-Select é mais vantajoso que os demais. Porém, para a análise específica de vinhaça contendo penicilina (e conseqüentemente seu produto de degradação ácido benzilpenicilóico), o emprego do sorvente Strata™-X ou HLB Oasis® é mais adequado.

Figura 35 - Recuperação obtida com cartuchos de extração HLB Supel™-Select, HLB Oasis®, Strata™-X e Strata™ C18-E. n = 2.



Fonte: elaborada pelo autor.

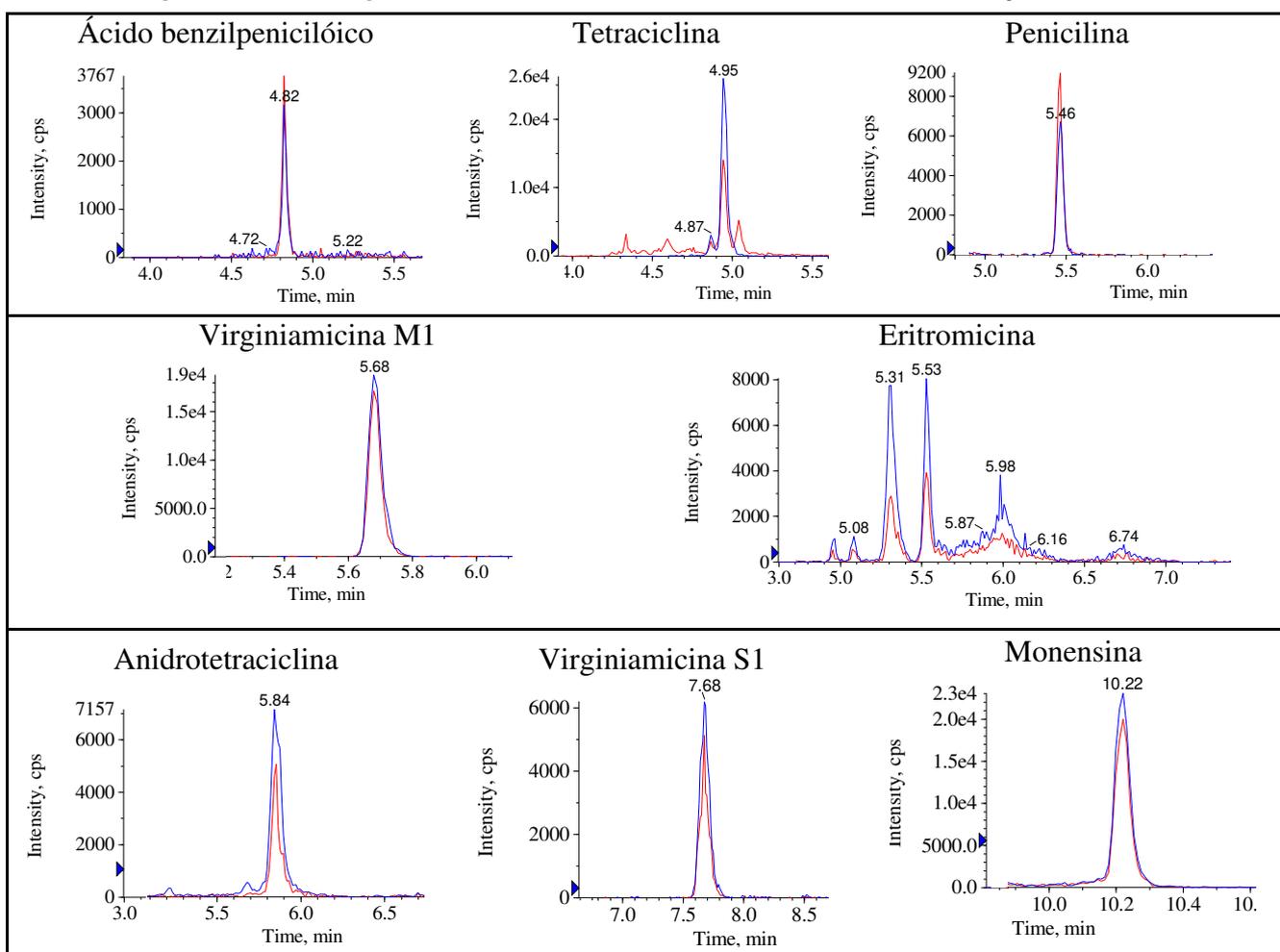
Além dos valores de recuperação, o formato do pico cromatográfico de cada analito deve ser analisado para a escolha do melhor sorvente para a extração dos analitos. Os cromatogramas de íons extraídos contendo duas transições para cada analito obtidos na análise de amostra de vinhaça fortificadas e preparadas por SPE com o sorvente HLB Supel™-Select e empregando na etapa de limpeza 1,0 mL da solução aquosa contendo 40% de metanol podem ser vistos na **Figura 36**. As concentrações de fortificação para cada analito foram 60,0 ng mL⁻¹ para a monensina e virginiamicina M1, 180 ng mL⁻¹ para a penicilina e ácido benzilpenicilóico, 90,0 ng mL⁻¹ para a tetraciclina, 360,0 ng mL⁻¹ para a virginiamicina S1, 600,0 ng mL⁻¹ para a eritromicina e 120,0 ng mL⁻¹ para a anidrotetraciclina.

Como pode ser visto na **Figura 36**, foram obtidos picos bem definidos para a maioria dos analitos em vinhaça. Valendo destacar a exceção ocorrida com a eritromicina, cujo pico cromatográfico em 5,53 min foi acompanhado de outros picos ao seu redor. Este comportamento foi verificado para todos os sorventes estudados. É importante observar que

para a eritromicina foram monitoradas duas transições (dois íons produtos oriundos do mesmo íon precursor) que foram $734 \rightarrow 158$ e $734 \rightarrow 83$. É esperado que apenas moléculas muito parecidas apresentem transições idênticas e ainda com mesmas proporções em intensidade de sinal. Com isso foi considerada a possibilidade de ocorrência de isomerização da eritromicina durante o preparo de amostra.

Assim, foi possível concluir que o método de extração em fase sólida empregando cartuchos de extração HLB-Supel™-Select mostrou-se apropriado para a extração dos analitos tetraciclina, anidrotetraciclina, penicilina, virginiamicina M1, virginiamicina S1 e monensina, apresentou baixa recuperação para o ácido benzilpenicilóico, o que pode ser superado com o emprego de cartuchos Strata™-X e HLB Oasis®, e mostrou-se inapropriado para o preparo de amostra para a eritromicina devido ao surgimento de picos cromatográficos não identificados.

Figura 36 - Cromatogramas de íons extraídos de cada analito obtidos em vinhaça fortificada.



Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.5.3 Preparo de Amostra com Extração Líquido-Líquido Assistida por *Salting-Out* (SALLE)

O emprego SALLE para análise de compostos orgânicos envolvendo análises por LC-MS ganhou evidência em 2009 no trabalho de Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2009), no qual foi mostrada a compatibilidade da SALLE com LC-MS e o desenvolvimento de método de alta frequência analítica. Entre as características que fazem desta técnica uma opção viável e atraente para análises por LC-MS está a possibilidade de automação, boa capacidade de limpeza da amostra, possibilidade de extração de analitos com ampla faixa de polaridade e baixo custo se comparado com SPE (ZHANG *et al.*, 2009).

1.4.5.3.1 Estudo com Diferentes Solventes Extratores

Para alcançar adequada recuperação empregando SALLE alguns parâmetros devem ser estudados, como o solvente extrator, concentração de sais, uso de aditivos e proporção amostra:solvente extrator. Inicialmente foi verificado o efeito do solvente extrator, tendo com condições gerais de partida o trabalho de Moreno-González e colaboradores (MORENO-GONZÁLEZ; GARCÍA-CAMPAÑA, 2017), o qual utilizou o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como agente *salting-out*. Neste teste foram estudados os solventes acetonitrila, etanol e isopropanol, sendo que todos são miscíveis em água e a separação de fase é obtida com *salting-out*. A partir de uma inspeção visual dos resultados obtidos, **Figura 37**, foi possível concluir que a acetonitrila apresentou menor extração de componentes da matriz, baseado na coloração da fase orgânica, e por isso foi escolhida para seguir com os estudos de extração.

Figura 37 - SALLE empregando como solventes extratores acetonitrila, etanol e isopropanol.

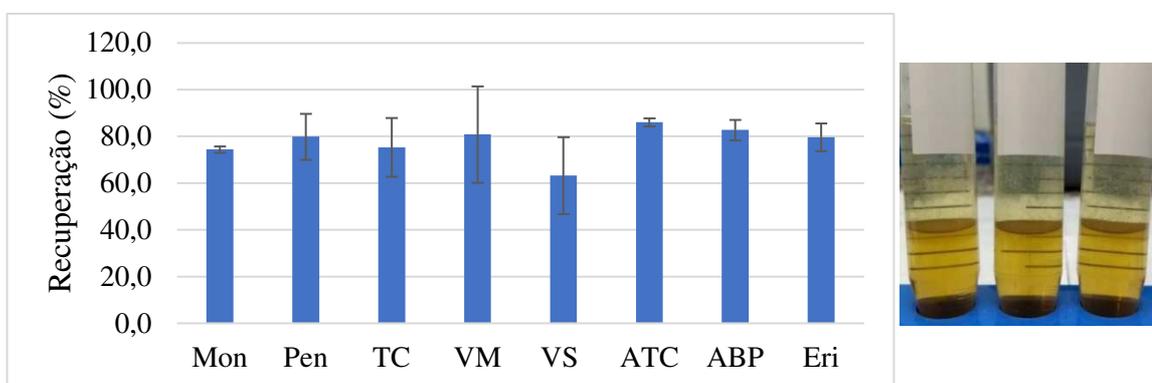


Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.5.3.2 Estudo Inicial de Recuperação

Após verificada a menor extração de componentes da matriz utilizando acetonitrila como solvente extrator, foi realizado o estudo de recuperação utilizando 1,0 mL de vinhaça, 1,25 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 mL de tampão citrato-fosfato pH 4,0 e centrifugação (2800 rpm por 10 min) após a mistura ficar em repouso por 10 min em banho de gelo. Após este procedimento foi verificada uma boa recuperação para todos os analitos, maior que 63%. Além disso, foi possível verificar também elevada limpeza na amostra, no que diz respeito à baixa coloração da fase extratora. Os valores de recuperação obtidos para os analitos, assim como a amostra após etapa de centrifugação, podem ser vistos na **Figura 38**.

Figura 38 - Recuperação obtida (esquerda) e separação de fase após centrifugação (direita) empregando SALLE. n = 3.



Fonte: elaborada pelo autor.

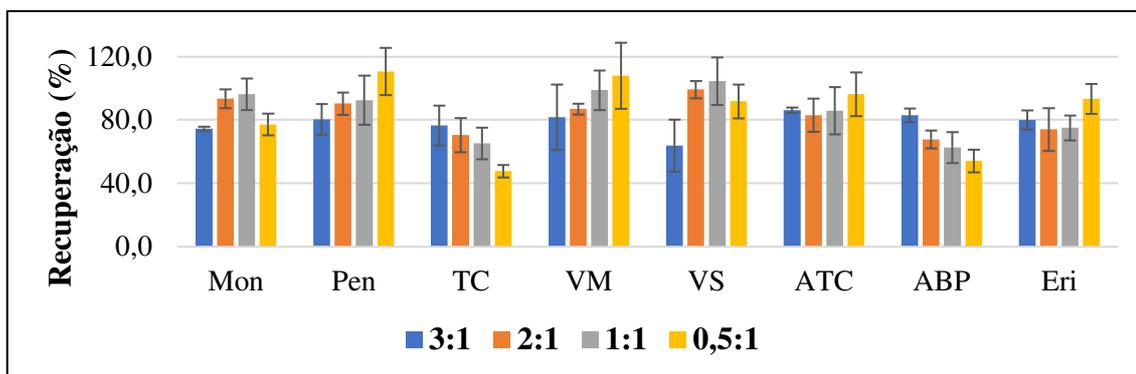
1.4.5.3.3 Estudo de Diferentes Proporções entre Solvente Extrator e Volume de Amostra

Estudar a proporção entre o volume de amostra e volume de solvente extrator é uma etapa importante, pois permite explorar a capacidade de pré-concentração do método. Considerando um mesmo valor de recuperação para um determinado analito, quando se emprega menor volume de solvente extrator um maior sinal analítico será obtido em virtude da maior concentração de analito no solvente extrator. Porém, pode ser esperado o mesmo efeito para componentes da matriz. Por isso, foram avaliados os parâmetros recuperação e efeito matriz empregando as proporções 3:1, 2:1, 1:1 e 0,5:1 entre acetonitrila:amostra utilizando 1 mL de vinhaça.

Valores de recuperação maiores que 62% para todos os analitos foram favorecidos nas extrações realizadas com proporções contendo maior volume de acetonitrila e com a proporção 1:1. Já empregando a proporção com menor volume de acetonitrila (0,5:1), foi verificado menor

recuperação para a tetraciclina (47%) e para o ácido benzilpenicilóico (54%). Para estes analitos foi verificada uma queda na recuperação dos mesmos seguindo a diminuição no volume do extrator, indicando assim uma saturação destes na fase orgânica. Vale destacar que em termos de log K_{ow} (log do coeficiente de partição octanol-água), a tetraciclina e o ácido benzilpenicilóico são os analitos mais polares do grupo estudado, sendo respectivamente -1,9 e -1,2, o que limita a solubilidade destes em acetonitrila. A recuperação obtida para cada analito empregando as diferentes proporções extrator:amostra pode ser vista na **Figura 39**.

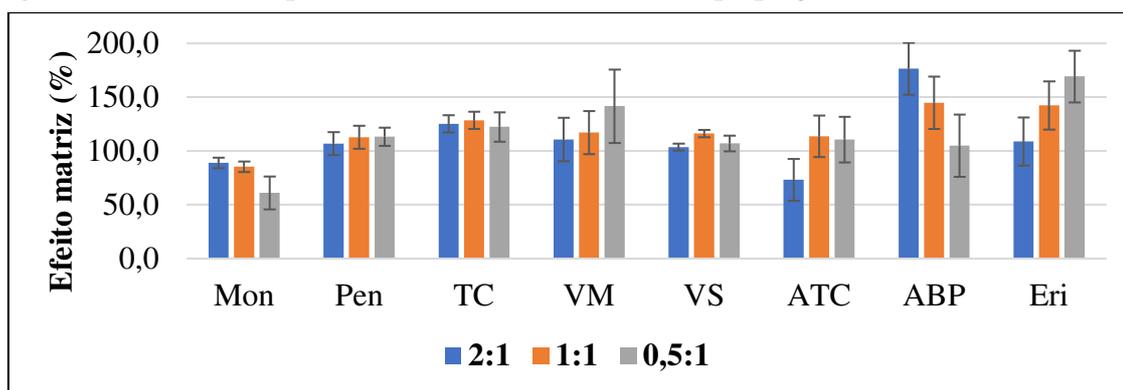
Figura 39 - Recuperação dos analitos empregando diferentes proporções de acetonitrila:vinhaça.



Fonte: elaborada pelo autor.

Com relação ao efeito matriz, vale a pena destacar o comportamento divergente entre alguns analitos. Enquanto para analitos como penicilina, tetraciclina e virginiamicina S1 a proporção entre extrator e amostra teve pouca influência no efeito matriz, para os analitos virginiamicina M1 e eritromicina foi verificado um aumento na ionização com a diminuição do volume de extrator. Já para a monensina houve diminuição na ionização e para o ácido benzilpenicilóico foi verificada diminuição no efeito matriz com a diminuição do volume de extrator. Os resultados obtidos para o efeito matriz empregando diferentes proporções solvente extrator:amostra podem ser vistos na **Figura 40**. Como pode ser visto nesta figura, para todas as proporções estudadas o efeito matriz se manifestou para a maioria dos analitos. Desta forma, a utilização de métodos analíticos capazes de corrigir o efeito matriz como, por exemplo, adição de padrão ou padronização interna com padrão isotopicamente marcado é requerida para esta matriz.

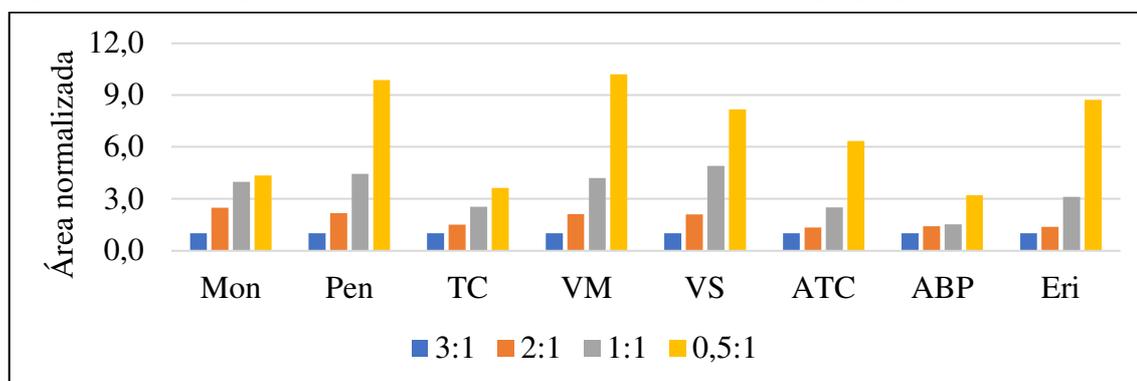
Figura 40 - Efeito matriz para os analitos utilizando diferentes proporções solvente extrator:amostra.



Fonte: elaborada pelo autor.

Como resultado do efeito matriz e da recuperação obtida empregando diferentes proporções extrator:amostra tem-se o sinal analítico, aqui expresso em área de pico cromatográfico. Avaliar o sinal analítico absoluto é um passo importante, quando se tem o foco em alcançar menores limites de detecção. A intensidade de sinal obtida foi avaliada em termos de área de pico normalizada (A_n) em função da área de pico obtida para a proporção 3:1. Esta normalização foi feita utilizando a razão $A_n = A_{\text{extrator:amostra}} / A_{3:1}$, sendo que $A_{\text{extrator:amostra}}$ é a área de pico de cada analito obtida na proporção em estudo e $A_{3:1}$ é a área de pico obtida para cada analito utilizando a proporção 3:1. Os resultados podem ser vistos na **Figura 41**.

Figura 41 - Área de pico normalizada para cada analito nas diferentes proporções extrator:amostra.



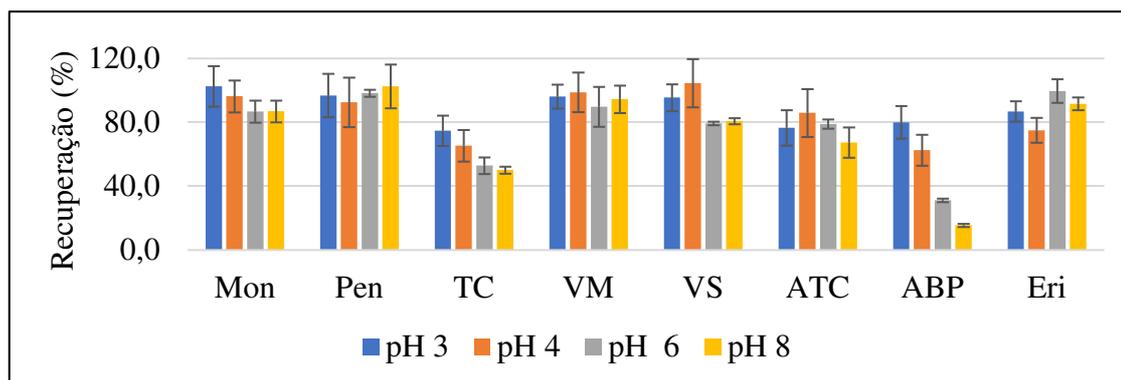
Fonte: elaborada pelo autor.

Como pode ser visto nesta figura, a proporção que permitiu alcançar maior sinal analítico foi 0,5:1, como já esperado. Porém, nesta proporção, a recuperação da tetraciclina e do ácido benzilpenicilóico alcançaram os menores resultados, de 47% e 54% respectivamente. Com o objetivo de manter um equilíbrio entre recuperação e sinal analítico a proporção de 1:1 é a mais apropriada para a extração, permitindo uma recuperação maior que 62% para todos os analitos.

1.4.5.3.4 Estudo do pH

O pH de uma solução influencia o grau de ionização de substâncias ionizáveis, e como consequência, tem influência em sua solubilidade. Desta forma, em SALLE, o pH do meio pode influenciar tanto a extração dos analitos como a extração de componentes da matriz, justificando assim o estudo deste parâmetro. Neste estudo foram avaliados os pHs 3,0 4,0, 5,0 e 6,0. Nos pHs 3,0 e 4,0 foram obtidos valores de recuperação maiores que 61% para todos os analitos. Nos pHs 6 e 8 foi observada menor recuperação para a tetraciclina, ~52%, e para o ácido benzilpenicilóico, menor que 31%, o que torna estes pHs menos apropriados que os demais, no que diz respeito a recuperação. Desta forma, os resultados obtidos no estudo de recuperação indicam que os pHs 3,0 e 4,0 são mais adequados para realizar a extração, sendo que no pH 3,0 foi alcançado uma recuperação maior que 74% para todos os analitos. Os valores de recuperação obtidos nos diferentes pHs para os analitos podem ser vistos na **Figura 42**.

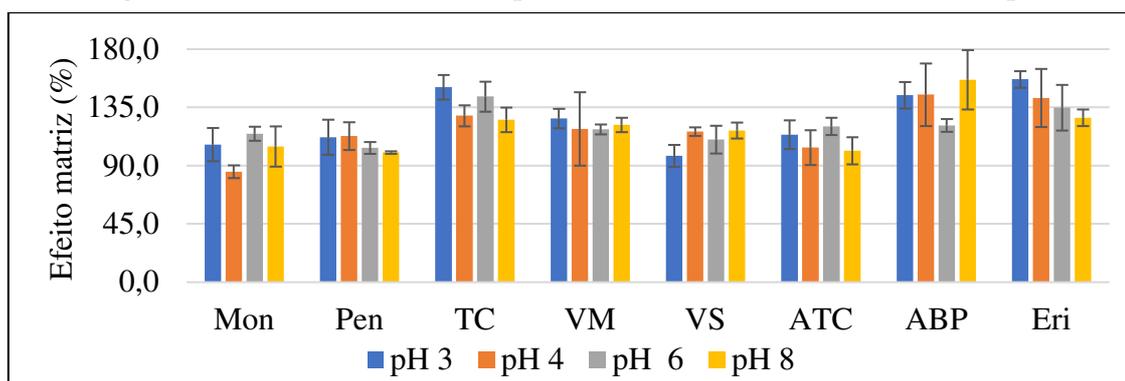
Figura 42 - Recuperação para cada analito nos diferentes valores de pH. (n = 3).



Fonte: elaborada pelo autor.

Como o pH pode afetar a extração de componente da matriz, é plausível imaginar que o efeito matriz é também dependente do pH. Sendo assim, foi verificada a influência do pH no efeito matriz para cada analito. De forma geral, foi observado um aumento na área de pico como resultado do efeito matriz para todos os analitos, com especial destaque para a tetraciclina, ácido benzilpenicilóico e eritromicina, os quais tiveram efeito matriz na faixa de 125 e 156%, considerando os pHs estudados. Porém, a variação do pH teve pouca influência no efeito matriz, o que pode ser visto na **Figura 43**.

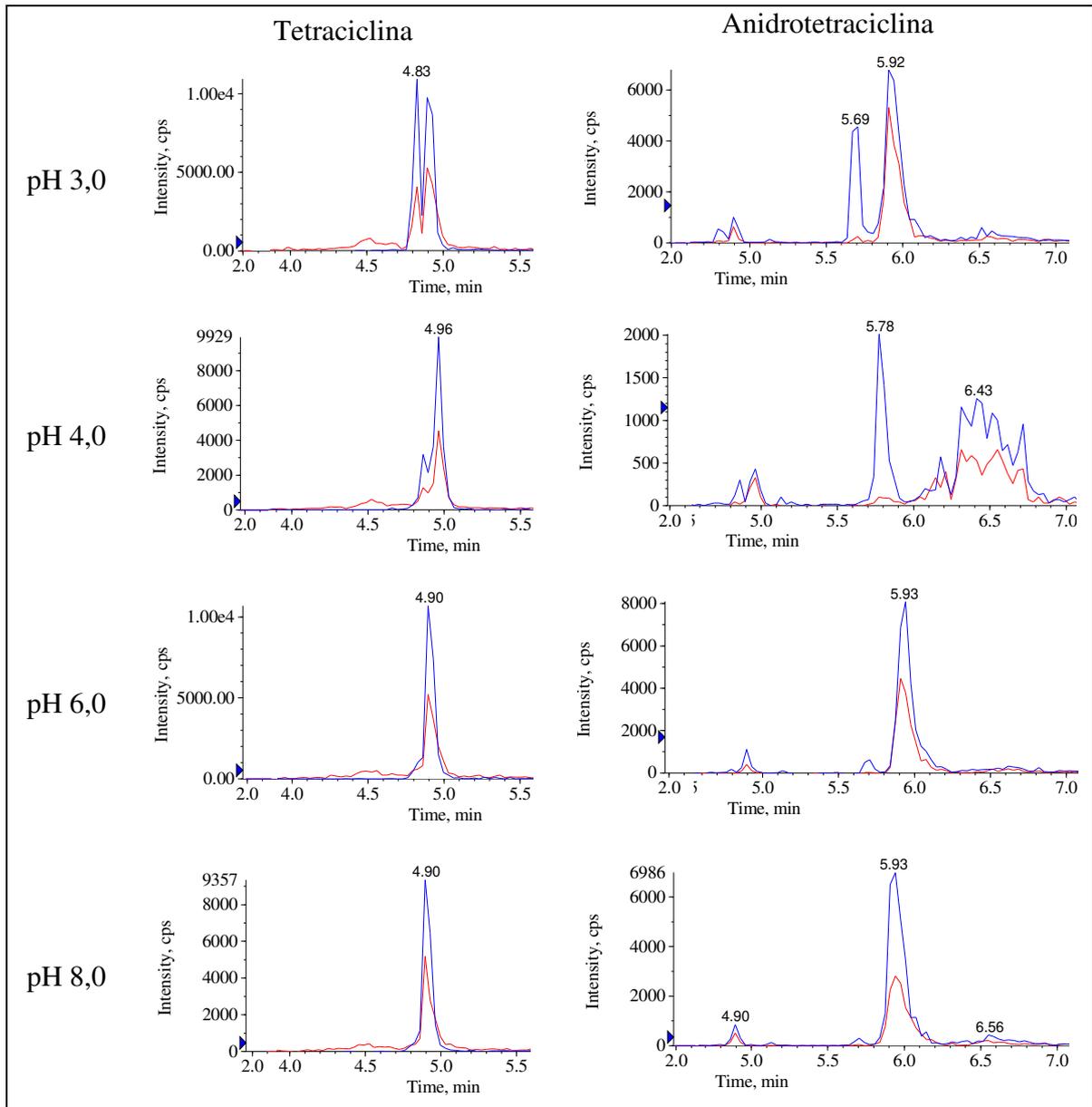
Figura 43 - Efeito matriz observado para cada analito nos diferentes valores de pH.



Fonte: elaborada pelo autor.

Os cromatogramas obtidos para cada analito na análise de vinhaça fortificada preparada por SALLE apresentaram em sua maioria picos bem definidos, sendo que apenas duas exceções foram observadas, referente a tetraciclina e anidrotetraciclina. No caso da tetraciclina, foi observada a formação de um pico cromatográfico adjacente ($t_R = 4,83$ min) ao esperado para este analito, assim como para a anidrotetraciclina, para a qual foi observada formação de um pico cromatográfico em 5,69 min. Este fato dificulta a integração da área do pico para estes analitos. Além disso, o formato do pico obtido mostrou relação com o pH utilizado na SALLE, como pode ser visto na **Figura 44**. Estes cromatogramas foram obtidos empregando o método cromatográfico com pareamento iônico como descrito no item **1.4.3.4** e as concentrações de fortificação de $300,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para a monensina e virginiamicina M1, $900,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para a penicilina e ácido benzilpenicilóico, 450 ng mL^{-1} para a tetraciclina, $1.800,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para a virginiamicina S1, $3.000,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para a eritromicina e $600,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para a anidrotetraciclina.

Figura 44 - Cromatogramas de íons extraídos para tetraciclina e anidrotetraciclina em diferentes pHs.

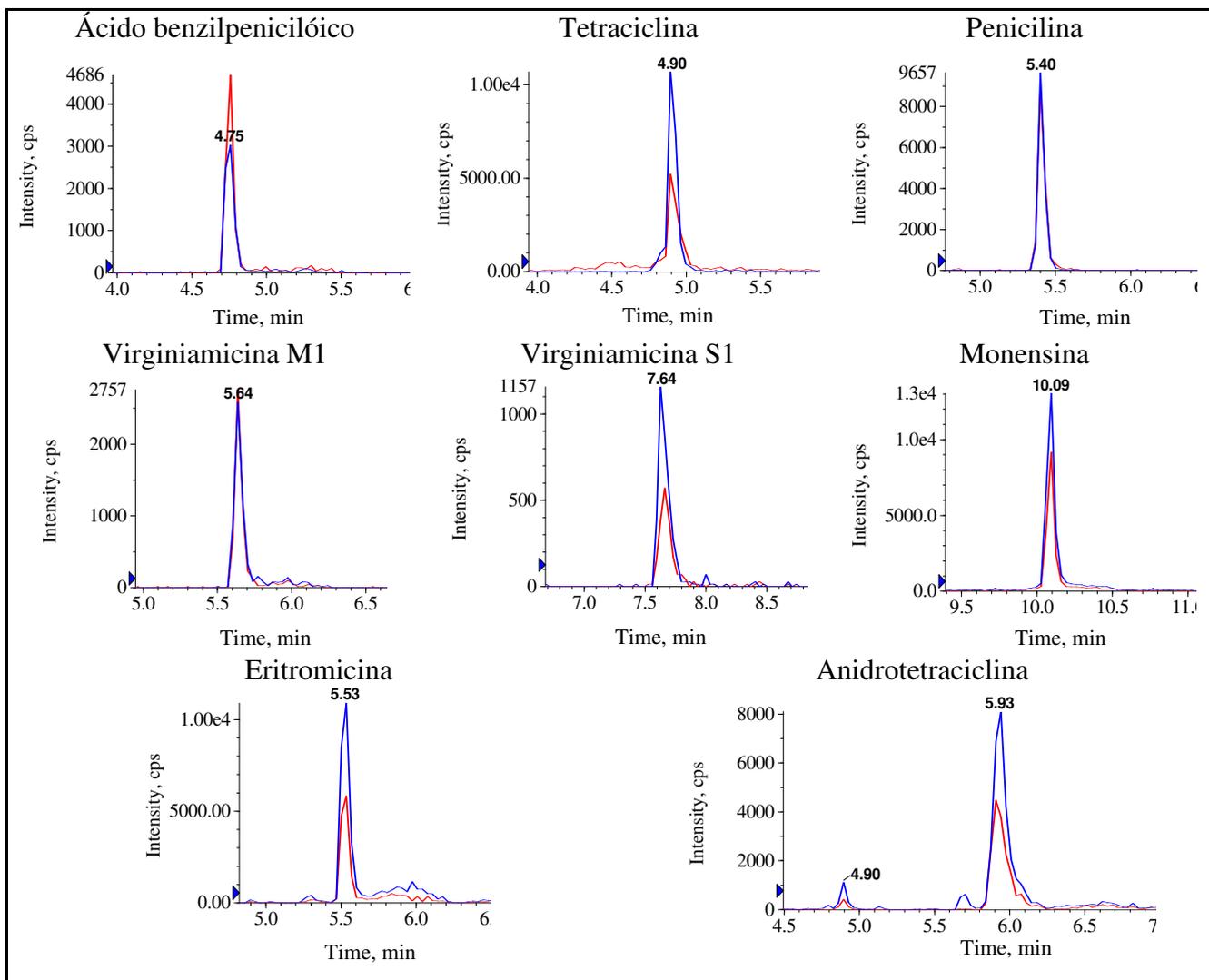


Fonte: elaborada pelo autor.

A partir da análise dos cromatogramas na **Figura 44**, é possível verificar que o preparo de amostra realizado nos pHs 3,0 e 4,0 levou a obtenção de formato de pico inadequado para análise quantitativa dos analitos tetraciclina e anidrotetraciclina. Por outro lado, é possível verificar que no pH 6,0 foi alcançado melhor formato de pico, sendo o pH apropriado para realizar o preparo de amostra por SALLE. Os cromatogramas obtidos para os demais analitos com o preparo de amostra realizado no pH 6,0 mostraram picos bem definidos e podem ser vistos na **Figura 45**. Com isso, a recuperação alcançada para a extração realizada em pH 6,0

foi maior que 78% para a maioria dos analitos, sendo a tetraciclina e o ácido benzilpenicilílico exceções com recuperações respectivamente de 52 e 31%.

Figura 45 - Cromatogramas de íons extraídos para cada analito em pH 6,0.



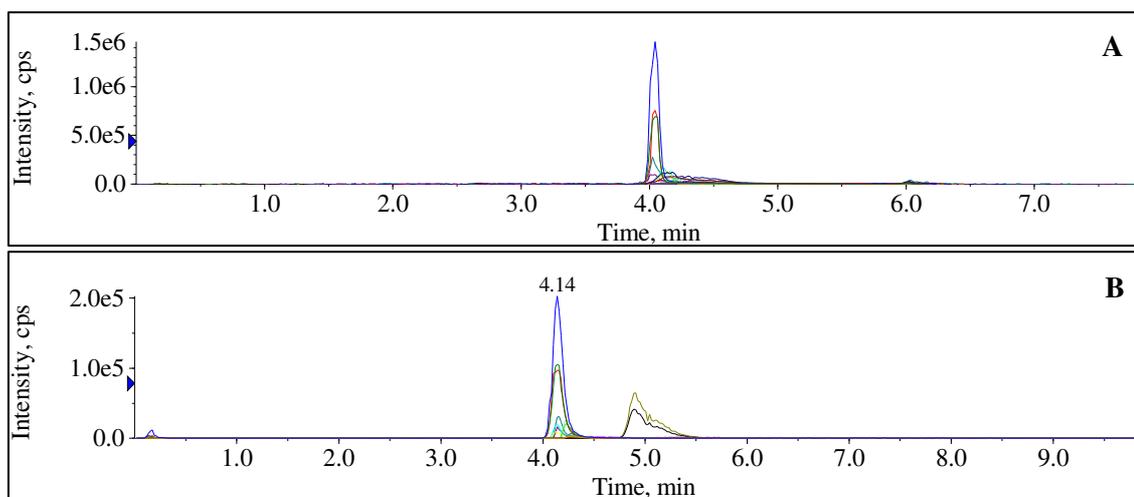
Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.5.4 Preparo de Amostra por SPE on-line

No desenvolvimento de método de extração empregando a SPE on-line a escolha do solvente de percolação (ou carregamento da amostra) da amostra deve ser feita de modo a permitir a retenção dos analitos e possibilitar a eluição dos componentes da matriz da amostra, buscando assim um equilíbrio entre a reter os analitos e limpar a amostra. Com este objetivo, os solventes contendo 100% água, água com 5 e 10% de acetonitrila foram estudados como solventes de carregamento. Para a coluna RAM, os analitos apresentaram adequada retenção

empregando os solventes de carregamento contendo 100% de água e água com 5% de acetonitrila, sendo este último mais apropriado para favorecer a limpeza da amostra. Com o solvente composto por água com 10% de acetonitrila a coluna RAM não foi capaz de reter a tetraciclina. Já a coluna HLB Oasis®, apresentou adequada retenção dos analitos apenas com o emprego de 100% de água como o solvente de percolação da amostra. Com os outros solventes, a retenção do ácido benzilpenicilóico foi comprometida. O cromatograma obtido para cada coluna com o apropriado solvente de percolação da amostra pode ser visto na **Figura 46**.

Figura 46 - Cromatograma obtido com as colunas HLB Oasis®, em A, e RAM, em B.

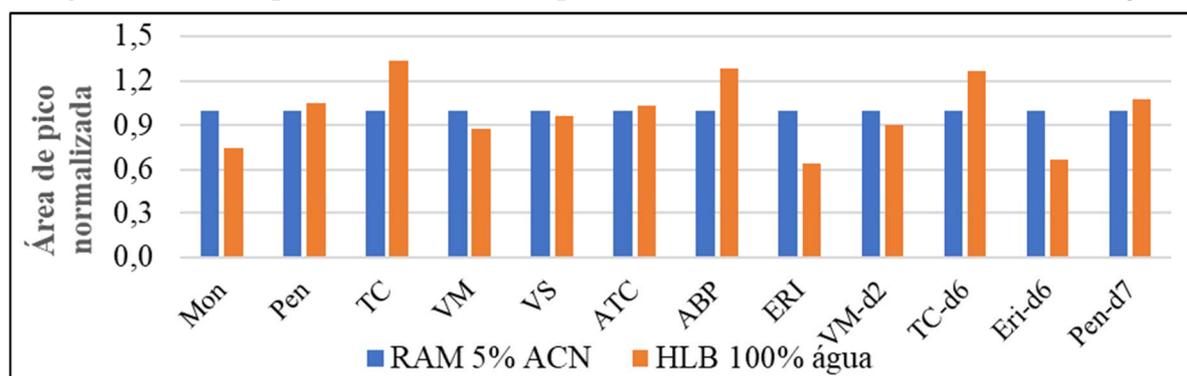


Fonte: elaborada pelo autor.

Como pode ser visto nesta figura, os analitos permaneceram retidos nas colunas durante os 3 primeiros minutos da análise, período no qual a retenção foi avaliada. A eluição se deu apenas após a mudança da fase móvel para 100% de acetonitrila. Após este estudo foi definido o tempo de percolação da amostra na coluna de extração de 2,0 min, tempo superior a 10 vezes o volume da coluna, contribuindo assim para a etapa de limpeza da amostra.

Após definida etapa de percolação da amostra, foi possível avaliar a aplicação das duas colunas na análise de uma amostra de vinhaça fortificada com $130,0 \text{ ng mL}^{-1}$ dos analitos utilizando o sistema configurado no modo bidimensional (*Column Switching*). Neste estudo foi observado pouca diferença em termos de formato e área de pico cromatográfico. A comparação entre a área de pico obtida empregando as duas colunas na análise de uma amostra de vinhaça fortificada com os analitos pode ser vista na **Figura 47**, comparação realizada por meio da análise da área normalizada pela área obtida com a coluna RAM.

Figura 47 - Área de pico normalizada obtida para cada analito com diferentes colunas de extração.



Fonte: elaborada pelo autor.

O aspecto negativo da aplicação da SPE on-line neste trabalho foi a ocorrência de efeito memória (*carryover*) para os analitos tetraciclina e anidrotetraciclina. Vale destacar que estes dois analitos possuem estruturas e propriedades semelhantes, sendo que ambos estão sujeitos a interações hidrofílicas e iônicas por estarem protonados no pH da fase móvel utilizada na separação cromatográfica. Foi observado um efeito memória de 3,5% para a tetraciclina e 17,6% para anidrotetraciclina, calculados comparando a área de pico obtida na análise de uma solução dos analitos em água na concentração de $50,0 \text{ ng mL}^{-1}$ com a área obtida com a injeção de acetonitrila na sequência.

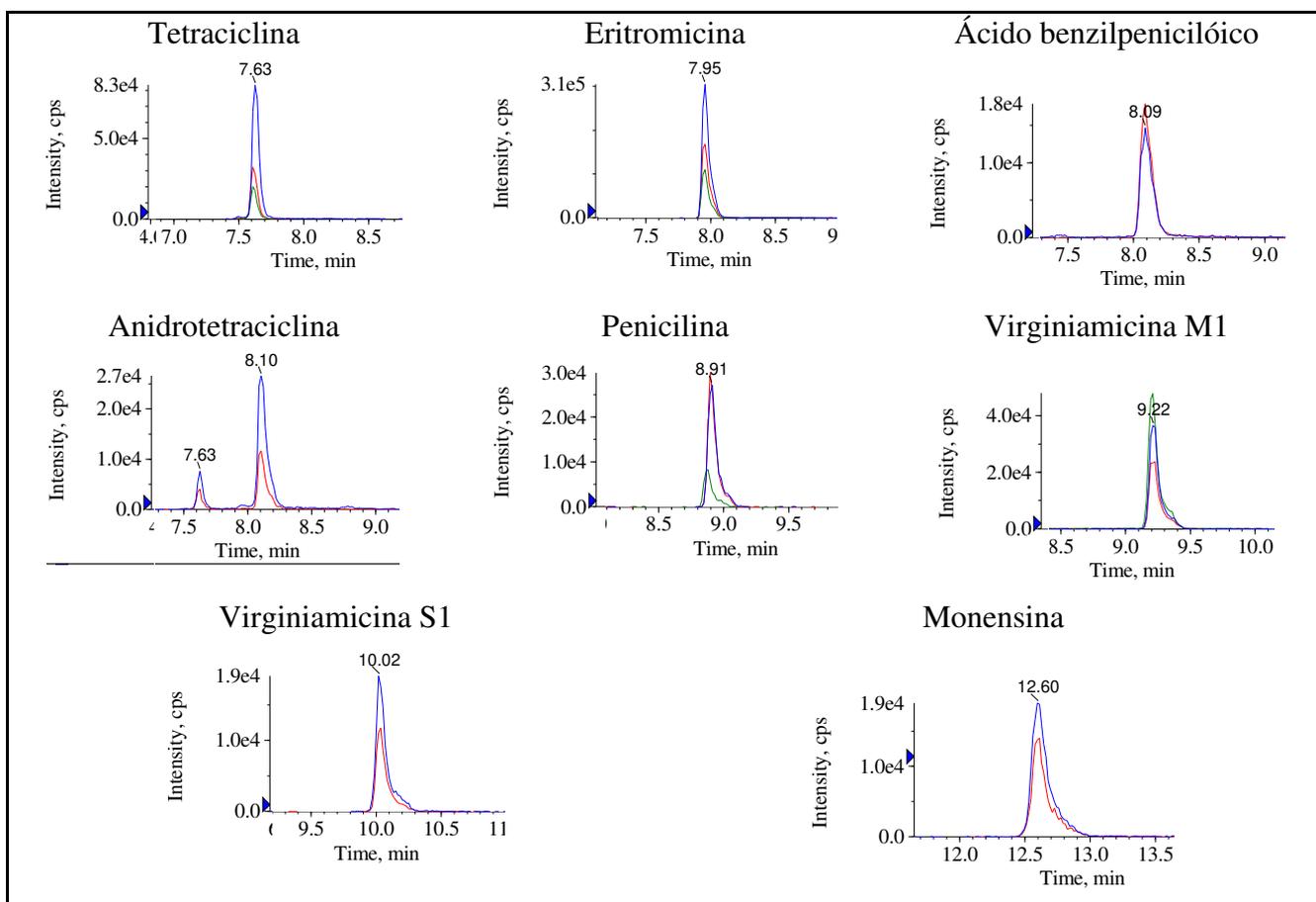
Várias estratégias para a eliminação do efeito memória foram empregadas, como as citadas abaixo:

- Utilização de diferentes solventes (acetonitrila, metanol, isopropanol) com e sem aditivos como ácido fórmico e hidróxido de amônio na limpeza da agulha do autoinjeter.
- Utilização de programa de solvente com gradiente na bomba da injeção após etapa de percolação da amostra com e sem aditivos como ácido fórmico e hidróxido de amônio.
- Aumento no tempo de limpeza com 100% de solvente orgânico no final da corrida cromatográfica.

Estas tentativas não resultaram na eliminação do efeito memória. Porém, para a coluna RAM, foi observada, a completa extinção do efeito memória para a tetraciclina após 2 ou 3 injeções de acetonitrila. Desta forma, foi adotada a estratégia da realização de 2 injeções de acetonitrila antes das análises, viabilizando assim a utilização do método com a coluna RAM.

Os cromatogramas obtidos analisando uma vinhaça fortificada com 130,0 ng mL⁻¹ dos antibióticos alvo deste trabalho podem vistos na **Figura 48**.

Figura 48 - Cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de vinhaça fortificada com 130,0 ng mL⁻¹ dos analitos utilizando SPE on-line com coluna RAM.



Fonte: elaborada pelo autor.

1.4.6 Validação no Método Analítico

Após estudos de preparo de amostra com SPE, SALLE e SPE on-line, e definição das condições cromatográfica, o método empregando SPE on-line com LC-MS/MS foi validado e os resultados podem ser vistos na sequência.

1.4.6.1 Limites de Detecção e Quantificação

Após analisar uma mistura de vinhaças fortificadas com os antibióticos em estudo na região de concentração de 0,5 a 20 ng mL⁻¹ foi possível verificar experimentalmente a concentração para cada analito que proporcionou uma razão sinal/ruído ≥ 3 ou 10 para

determinar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) respectivamente. Os resultados obtidos podem ser vistos na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Limites de detecção e quantificação obtidos para os analitos estudados.

Analito	LD (ng mL⁻¹)	LQ (ng mL⁻¹)
Monensina	1,0	2,5
Penicilina G	3,0	6,0
Tetraciclina	2,0	6,0
Virginiamicina M1	3,0	6,0
Virginiamicina S1	3,0	7,0
Anidrotetraciclina	3,0	5,0
Ácido benzilpenicilóico	5,0	10,0
Eritromicina	0,5	2,5

Como pode ser visto nesta tabela, foram obtidos limites de quantificação na faixa de 2,5 a 10 ng mL⁻¹. Levando em consideração a faixa de concentração de antibiótico utilizada na etapa da fermentação na produção de etanol, que é de 1.000 a 10.000 ng mL⁻¹, os limites de quantificação alcançados indicam que o método desenvolvido terá a capacidade de quantificar os antibióticos na vinhaça mesmo que ocorra degradação dos mesmos de aproximadamente 99% em relação ao utilizado inicialmente na etapa de fermentação.

1.4.6.2 Estudo da Região Linear

Diferentes regiões lineares foram obtidas para os analitos estudados. O elevado coeficiente de determinação (r^2), > 0,99 para todos os analitos, mostrou o apropriado ajuste entre o modelo descrito pela equação da reta e os dados experimentais. Vale destacar ainda que a região linear obtida para os analitos ficou na faixa de concentração 2,5 a 370 ng mL⁻¹. Os valores obtidos para faixa linear, equação da reta e coeficiente de determinação para cada analito pode ser visto na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Dados obtidos para faixa linear, equação da reta e coeficiente de determinação no estudo de linearidade.

Analito	Faixa linear (ng mL⁻¹)	Equação da reta	r²
Monensina	2,5 - 370,0	$y = 540,36x + 326,53$	0,9977
Penicilina G	6,0 - 370,0	$y = 486,24x + 390,31$ $*y = 0,0253x + 0,0231$	0,9983 0,999
Tetraciclina	6,0 - 370,0	$y = 1552,9x + 329,31$	0,9992
Virginiamicina M1	6,0 - 250,0	$*y = 0,0052x + 0,0287$	0,9927
Virginiamicina S1	7,0 - 310,0	$y = 247,83x - 1022,1$	0,9986
Anidrotetraciclina	5,0 - 370,0	$y = 614,37x + 998,51$	0,9994
Ácido benzilpenicilóico	10,0 - 370,0	$y = 418,17x + 867,9$	0,9995
Eritromicina	2,5 - 310,0	$y = 1141,1x - 1892,9$ $*y = 0,0201x - 0,0204$	0,9961 0,9989

*regressão linear obtida utilizando calibração por padrão interno.

1.4.6.3 Seletividade

A seletividade é um parâmetro que garante que a origem do sinal analítico é proveniente somente do analito. Desta forma, é um parâmetro importante de ser avaliado. Entre as formas de avaliar a seletividade para métodos LC-MS/MS, está a definição da abundância relativa entre duas transições monitoradas para o analito (MRM1/MRM2) (96/23/EC, 2002; BERENDSEN *et al.*, 2015). Desta forma, espera-se verificar a mesma abundância relativa entre as transições monitoradas para o analito, tanto em solvente quanto na amostra. Para abundância relativa > 50%, espera-se uma diferença máxima de 20% entre abundância relativa obtida para o analito na amostra e em solvente. Já para abundância relativa inferior a 50%, espera-se uma diferença máxima de 25% (96/23/EC, 2002). Os valores obtidos para a abundância relativa entre as transições monitoradas para cada analito em solvente e em amostra fortificada podem ser vistos na **Tabela 11**. Como pode ser visto nesta figura, foi verificado abundância relativa das transições monitoradas dentro da faixa esperada, comparando análises realizadas com os analitos em solvente e na amostra fortificada. Desta forma, foi verificada seletividade apropriada para o método.

Tabela 11 - Abundância relativa das transições monitoradas para cada analito obtida em solvente e em amostra fortificada. n = 5.

Analito	MRM1/MRM2 (solvente)	MRM1/MRM2 (amostra fortificada)
Monensina	75,8 ± 3,2	73,8 ± 2,6
Penicilina G	110,3 ± 6,5	103,2 ± 2,7
Tetraciclina	45,5 ± 2,6	49,5 ± 8,0
Virginiamicina M1	68,1 ± 4,4	72,9 ± 4,6
Virginiamicina S1	57,3 ± 4,0	66,1 ± 11,5
Anidrotetraciclina	43,2 ± 5,2	44,3 ± 6,6
Ácido benzilpenicilóico	83,6 ± 6,1	86,1 ± 7,9
Eritromicina	58,4 ± 3,8	55,8 ± 2,8

1.4.6.4 Exatidão e Precisão

Estudos de exatidão devem preferencialmente ser realizados por meio da análise de materiais certificados de referência ou por comparação com outro método. No caso deste trabalho, ambas as situações não são aplicáveis. Desta forma, o estudo de recuperação é a única forma de estimar a exatidão do método.

Para ambas concentrações é esperado uma recuperação na faixa de 80 a 110% para um adequado desempenho do método seguindo normativas e guias de validação reconhecidos mundialmente (96/23/EC, 2002). Para a maioria dos analitos esta faixa de recuperação foi alcançada, mostrando assim um bom desempenho. Apenas para a anidrotetraciclina os valores de recuperação obtidos nas duas concentrações ficaram fora da faixa esperada. Vale destacar que no caso da anidrotetraciclina a ocorrência de efeito memória (*carryover*) pode ser a causa de uma recuperação superestimada, indicando assim que o método é inadequado para sua quantificação. Além disso, neste estudo foi obtido um desvio padrão relativo (DPR) no intervalo de 2,7 a 16%, mostrando assim uma adequada repetibilidade. Os valores obtidos para recuperação e repetibilidade podem ser vistos na **Tabela 12**.

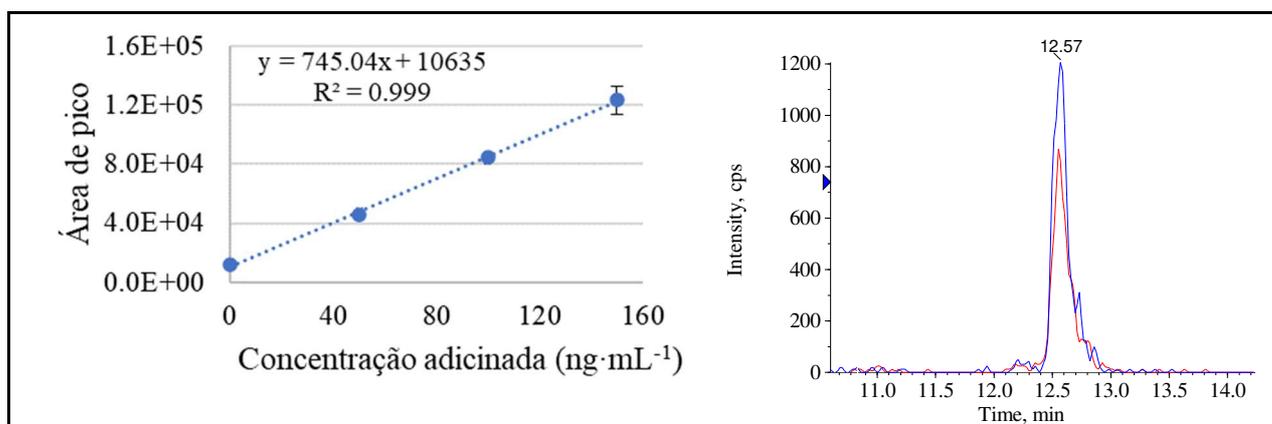
Tabela 12 - Recuperação e repetibilidade obtida por adição de padrão (AP) ou padrão interno (PI).

Analito	Recuperação (%) / Precisão (DPR)	
	10 ng mL ⁻¹	300 ng mL ⁻¹
Monensina (AP)	94,9% / 3,6%	103,8% / 6,0%
Penicilina (PI)	109,0% / 9,2%	77,0% / 9,2%
Tetraciclina (AP)	87,0% / 4,0%	85,2% / 7,6%
Virginiamicina M1 (PI)	88,0% / 16%	86,7% / 3,0%
Virginiamicina S1 (AP)	83,3% / 5,1%	134,1% / 7,6%
Anidrotetraciclina (AP)	163,3% / 8,9%	131,1% / 9,2%
Ácido benzilpenicilóico (AP)	118,8% / 12,6%	103,8% / 3,0%
Eritromicina (PI)	107,0% / 4,4%	83,9% / 2,7%

1.4.7 Análise das Amostras de Vinhaça

Nesta etapa foram analisadas 5 amostras de vinhaça de diferentes usinas. Apesar da tentativa de obter a informação se havia sido utilizado algum antibiótico na etapa de fermentação do processo que gerou a vinhaça coletada, esta informação não foi disponibilizada pelas usinas. Entre as amostras analisadas, foi encontrado antibiótico apenas em uma delas, sendo o antibiótico monensina na concentração de 14,3 ng mL⁻¹. A curva de adição de padrão e o cromatograma obtido para esta amostra pode ser vista na **Figura 49**. Como pode ser visto nesta figura, adequada linearidade e um pico cromatográfico bem definido foi obtido para a monensina. Além disso, foi verificada abundância relativa entre as transições monitoradas de $69,1 \pm 5,7$, dentro da faixa esperada para a monensina (**Tabela 11**).

Figura 49 - Curva de adição de padrão e cromatograma obtido na análise de monensina em amostra de vinhaça.



Fonte: elaborada pelo autor.

Comparando o valor da concentração de monensina detectada na vinhaça com a dosagem recomendada para a fermentação, que é de no mínimo 3000 ng mL⁻¹ (REAL

QUÍMICA, 2021) podemos concluir que o valor detectado corresponde a no máximo 0,5% do total inicialmente utilizado, sendo que o restante pode ter sido degradado durante o processo de produção do etanol ou ficou adsorvido na matéria sólida em suspensão. Esta segunda hipótese encontra subsídios no trabalho de Hoff e colaboradores, que detectaram monensina em levedura comercial, oriunda da produção de etanol, para a alimentação de animais, na faixa de 0,47 a 263,5 mg kg⁻¹ (HOFF *et al.*, 2021). Os resultados do trabalho de Hoff e colaboradores indicam alta adsorção da monensina nas leveduras durante o processo de fermentação, fato em acordo com o log k_{ow} da monensina, que é de 5,43. Desta forma, podemos concluir que futuros trabalhos de análise de antibióticos em vinhaça devem levar em consideração a análise dos sólidos suspensos presentes na matriz. Apesar da baixa concentração detectada podemos concluir ainda que este antibiótico apresenta estabilidade suficiente para resistir ao processo de fermentação e destilação e seu uso no processo fermentativo representa uma fonte de contaminante ao ambiente decorrente da prática de fertirrigação dos canaviais com vinhaça.

1.5 Conclusões

Neste capítulo foi desenvolvido um método cromatográfico para a determinação de antibióticos em vinhaça de etanol de cana de açúcar. O método desenvolvido alcançou limites de quantificação na faixa de 2,5 a 10,0 ng mL⁻¹ e exatidão na faixa de 80 a 110% para a maioria dos analitos. As técnicas de preparo de amostra estudadas, SPE, SALLE e SPE on-line, mostraram-se apropriadas para a extração da maioria dos analitos estudados na vinhaça, sendo que a SPE on-line foi utilizada para o desenvolvimento do método devido sua maior capacidade de automatização e menor custo. O estudo da estabilidade térmica dos antibióticos virginiamicina M1, monensina, penicilina e eritromicina mostrou que todos possuem estabilidade suficiente, no que diz respeito à temperatura, para resistir à destilação. Mostrando assim os riscos associados a fertirrigação com vinhaça contaminada. A aplicação do método em 5 amostras de vinhaça permitiu verificar a presença de monensina em uma delas na concentração de 14,3 ng mL⁻¹. A partir deste resultado evidenciou-se a necessidade da realização de monitoramento de antibióticos em vinhaças com o objetivo de dimensionar a quantidade de antibiótico que tem sido dispersada no ambiente por meio da fertirrigação. Além disso, fica claro também a necessidade de realizar a análise de antibióticos em solo tratado com vinhaça e em águas subterrâneas nas regiões em que a fertirrigação é empregada para verificar a ocorrência destes contaminantes.

Capítulo 2: Avaliação da Contaminação da Vinhaça, Solo e Água Subterrânea de Áreas Fertirrigadas com Vinhaça Empregando Abordagem Alvo e Investigação de Compostos Suspeitos

2.1 Introdução

O reaproveitamento de resíduos orgânicos na agricultura pode ser uma forma adequada para a destinação e para o gerenciamento destes resíduos, contribuindo para a reposição de macro e micronutrientes nos solos das lavouras. No entanto, sua reciclagem inadequada pode ser uma importante fonte de contaminação para o meio ambiente (JIANG *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-PIERNAS *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2017, 2019). Entre os resíduos amplamente utilizados na fertilização das plantações de cana-de-açúcar no Brasil está a vinhaça (OLIVEIRA, 2011), sendo que anualmente, aproximadamente 400 bilhões de litros de vinhaça são empregados na fertirrigação das plantações de cana-de-açúcar (MORAES *et al.*, 2014). Assim como ocorre com outros fertilizantes orgânicos, como esterco animal ou biossólidos, o uso indiscriminado de vinhaça como fertilizante pode causar efeitos adversos ao meio ambiente e à saúde humana (FU *et al.*, 2016; GARCÍA-GALÁN *et al.*, 2010; SULEIMAN *et al.*, 2018).

O uso de resíduos orgânicos como fertilizantes pode ser uma fonte de dispersão de contaminantes orgânicos no meio ambiente, sendo que estes podem ser transportados do solo para os corpos d'água. Este transporte depende de vários fatores, como por exemplo, das propriedades físico-químicas do contaminante, que vão refletir em sua solubilidade, capacidade de sorção e reatividade (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015). Desta forma, para entender o destino de um contaminante, uma vez inserido no meio ambiente, se faz necessário a análise dos diferentes compartimentos ambientais (BOY-ROURA *et al.*, 2018; PAN *et al.*, 2017). No contexto da fertirrigação com vinhaça, três matrizes devem ser investigadas quanto a possíveis contaminações, sendo a vinhaça, solo e água subterrânea das áreas fertirrigadas. Entre estas matrizes, a água subterrânea desperta mais atenção, pois a qualidade das águas subterrâneas é uma questão de saúde pública, e especialmente no Estado de São Paulo, onde 5,5 milhões de pessoas dependem das águas subterrâneas para abastecimento de água potável (CETESB, 2019). Vale destacar que o estado de São Paulo é responsável pela produção de aproximadamente 50% da produção nacional de etanol combustível (ANP, 2019), e por consequência, é onde se emprega a maior quantidade de vinhaça na fertirrigação das lavouras de cana-de-açúcar.

Tradicionalmente, a avaliação da contaminação de uma amostra se dá por meio do desenvolvimento de método analítico específico para uma lista definida de contaminantes. Esta abordagem, denominada *target*, em inglês, e neste trabalho, abordagem do tipo alvo, proporciona métodos capazes de identificar ou quantificar um número muito restrito de analitos, frente à quantidade de outros contaminantes possíveis de estarem presentes na amostra. Além disso, estes métodos são inapropriados para a investigação de contaminantes desconhecidos, ou cuja presença na amostra não foi prevista anteriormente. Em um contexto em que uma visão mais holística sobre o grau de contaminação de uma amostra é necessária, abordagens do tipo não alvo (*Non-targeted*) e investigação de compostos suspeitos (*Suspect screening*), podem direcionar o desenvolvimento de métodos específicos mais coerentes com a realidade da amostra e a aquisição de padrões analíticos para a comprovação e quantificação dos contaminantes detectados (GAGO-FERRERO *et al.*, 2018; OBERACHER *et al.*, 2020).

O emprego da investigação de compostos suspeitos, utilizando uma lista abrangente de contaminantes suspeitos, no contexto da fertirrigação com vinhaça, é uma abordagem que permite uma visão mais completa sobre o grau de contaminação das amostras de vinhaça, solo e água subterrânea das áreas fertirrigadas. Além disso, a verificação de um mesmo contaminante em mais de uma matriz seria um dado que poderia ser utilizado para fazer inferências sobre a origem e sobre a transferência deste contaminante de uma matriz para outra, podendo assim indicar se vinhaça é um vetor importante de contaminantes para o ambiente.

Desta forma, neste trabalho foi empregada união de duas abordagens, análise do tipo alvo com LC-MS/MS e investigação de compostos suspeitos com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry*). O preparo das amostras líquidas foi realizado por SPE conforme literatura (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013) e para as amostras de solo foram estudadas as técnicas extração por líquido pressurizado (ELP) e QuEChERS (acrônimo para *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*). Mais detalhes sobre as técnicas de preparo de amostra por QuEChERS e ELP e sobre a abordagem de análise de compostos suspeitos por LC-HRMS serão abordados na sequência.

2.1.1 Preparo de Amostra Empregando ELP

A análise de contaminantes orgânicos, como antibióticos, em solo agrícola tem sido realizada por meio de diferentes técnicas tradicionais de preparo de amostras, como extração

por Soxhlet, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas e extração por líquido pressurizado. Dentre as técnicas tradicionais, a ELP trouxe diversos avanços como o menor consumo de solvente orgânico, automação e altas recuperações de extração (JELIĆ; PETROVIĆ; BARCELÓ, 2009). No entanto, depende de instrumentação cara (RASHID *et al.*, 2010) sendo que sua disponibilidade é restrita a poucos laboratórios.

A extração por ELP faz uso de líquido aquecido e pressurizado para promover a extração de analitos presentes em amostras sólidas ou semissólidas contidas em uma célula de extração de aço inox. Geralmente, a amostra é manualmente misturada com um suporte sólido, como terra diatomáceas, para preencher todo o volume da célula e inserida na célula de extração contendo membranas filtrante na parte superior e inferior. O líquido aquecido e pressurizado é percolado na célula de extração e o extrato resultante é coletado. O aquecimento do líquido aumenta a solubilidade dos analitos, além de promover a diminuição da viscosidade, favorecendo a interação com a amostra, facilitando a quebra de interações entre o analito e a amostra (HOFF; PIZZOLATO, 2018).

Na extração por ELP, vários parâmetros são importantes para obter elevada recuperação, como por exemplo, o solvente de extração, temperatura, número de ciclos de extração e duração do ciclo (ANDREU; PICÓ, 2019). A temperatura é um parâmetro importante para a extração, pois a alta temperatura melhora a solubilidade e a taxa de difusão dos analitos. Por outro lado, o mesmo efeito pode ocorrer com os demais componentes da amostra e, portanto, podem aumentar o efeito de matriz. Outro efeito esperado com altas temperaturas é a degradação potencial de analitos sensíveis à temperatura, portanto, a temperatura pode ser um fator limitante no procedimento de extração. O pH da extração com solvente tem um efeito importante na solubilidade dos analitos, assim como na natureza dos solventes. Assim, é importante considerar a influência desses parâmetros para obter maiores recuperações de extração. Neste trabalho, os parâmetros instrumentais foram definidos de acordo com a literatura (JELIĆ; PETROVIĆ; BARCELÓ, 2009), sendo otimizados os parâmetros temperatura, composição do solvente de extração e pH.

2.1.2 Preparo de Amostra Empregando QuEChERS

A extração de contaminantes orgânicos empregando QuEChERS foi originalmente desenvolvida para a análise de agrotóxicos em produtos agrícolas, como frutas (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003). Desde então, esta abordagem foi submetida a

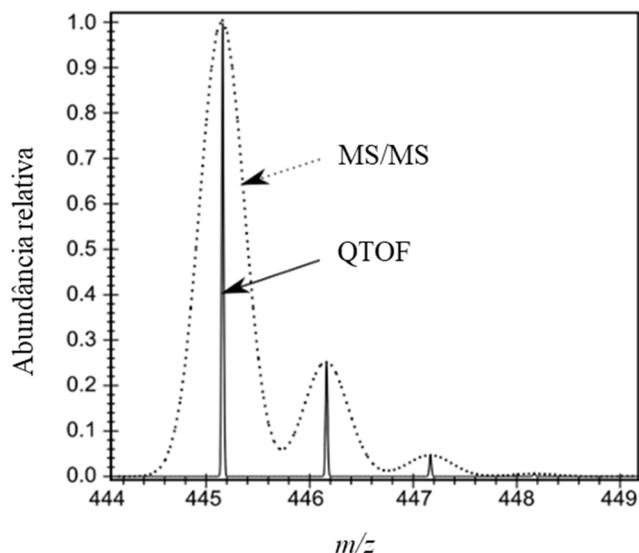
diversas alterações e hoje existem mais de 2.000 publicações mostrando o potencial da técnica para a extração de diferentes classes de compostos, como antibióticos, hormônios, micotoxinas, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e vários poluentes orgânicos persistentes em um grande número de matrizes como alimentos (leite, carne, ovos, cereais, frutos do mar, frutas, vegetais), pólen de abelha, bem como amostras ambientais (solo, sedimento) entre outros. As principais vantagens da extração por QuEChERS é a redução do tempo e do consumo de solventes utilizados durante a extração, em comparação outras técnicas de extração, como a SPE, por exemplo. Além disso, a técnica também é adequada para a extração de uma ampla gama de classes de compostos (MARTÍNEZ-PIERNAS *et al.*, 2018), devido a diversidade de solventes de extração disponíveis como acetona, acetato de etila e acetonitrila em combinação com o controle de pH, utilizando um tampão apropriado. Os tampões frequentemente utilizados para as extrações por QuEChERS são o citrato e acetato (KIM *et al.*, 2019a), os quais são usados no método padrão CEN EN 15662 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION (CEN), 2018) e no método Oficial AOAC (LEHOTAY *et al.*, 2007), respectivamente. Além disso, os sais de partição são de extrema importância e devem ser escolhidos corretamente, sendo o NaCl e o MgSO₄ os mais utilizados (KIM *et al.*, 2019a).

2.1.3 Investigação de Compostos Suspeitos Empregando LC-HRMS

O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) tem sido apontada como a ferramenta mais completa para investigar o grau de contaminação de amostras de interesse ambiental (GAGO-FERRERO *et al.*, 2018; HOLLENDER *et al.*, 2019). O grande diferencial da HRMS em relação à espectrometria de massas de baixa resolução está em sua capacidade em diferenciar íons com uma diferença de m/z muito pequena. Enquanto que sistemas LC-MS/MS de baixa resolução são capazes de diferenciar íons que apresentam uma diferença de m/z de 1 unidade, as técnicas de LC-HRMS podem chegar a diferenciar íons com diferença de m/z na quarta casa decimal (JAKIMSKA; KOT-WASIK; NAMIEŚNIK, 2014).

O resultado direto da alta resolução alcançada, é a possibilidade de obter a fórmula molecular de um analito com erros inferiores a 0,001 Da (JAKIMSKA; KOT-WASIK; NAMIEŚNIK, 2014). Uma comparação entre um sistema de baixa resolução e outro de alta resolução pode ser visto no espectro de massas mostrado na **Figura 50**.

Figura 50 - Espectro de massas de baixa resolução (MS/MS) vs alta resolução (QTOF) para tetraciclina.



Fonte: adaptada de (JAKIMSKA; KOT-WASIK; NAMIEŚNIK, 2014).

Como pode ser visto na **Figura 50**, os três íons detectados, referentes ao padrão isotópico da tetraciclina, são claramente discriminados entre si empregando HRMS, enquanto o mesmo efeito é menos pronunciado na espectrometria de massa de baixa resolução.

Como consequência da alta capacidade de diferenciar valores de m/z muito similares, um conceito muito importante em HRMS é o conceito de massa exata. A massa exata de um íon ou molécula é sua massa calculada com relação a apenas um isótopo específico de cada átomo. Quando a massa exata é calculada com relação ao isótopo de ocorrência natural mais abundante, a massa exata é denominada massa monoisotópica (VESSECCI *et al.*, 2011). Muitas vezes, os conceitos massa exata e massa monoisotópica são utilizados como sinônimos. Aplicando o conceito de massa exata, a explicação para a detecção de três íons para a tetraciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8$), como mostrado na **Figura 50**, é facilmente explicada. O primeiro íon (m/z aproximadamente 445), é decorrente de moléculas de tetraciclina contendo apenas o ^{12}C como átomos de carbono. Já o segundo íon (m/z aproximadamente 446) e o terceiro (m/z aproximadamente 447) são decorrentes de moléculas contendo respectivamente 1 e 2 átomos de ^{13}C em sua constituição.

Equipamentos de HRMS híbridos, baseados nos analisadores de massas TOF ou orbitrap, unem a capacidade de obtenção de espectros de massas em *full scan* com elevada sensibilidade com a possibilidade de obtenção de espectros de fragmentação. Com isso, o grau de confiança na identificação de um analito é potencializado, em relação à espectrometria de baixa resolução (96/23/EC, 2002). A elevada sensibilidade e seletividade obtida com a HRMS

tem aumentado as possibilidades de análise de contaminantes orgânicos fora do escopo das análises do tipo alvo.

A LC-HRMS tem possibilitado a realização de análises do tipo não alvo, notadamente, análises de investigação de compostos suspeitos (*Suspect screening*) empregando extensas listas de contaminantes (GAGO-FERRERO *et al.*, 2015, 2019; MARTÍNEZ-PIERNAS *et al.*, 2018). A lista de compostos a serem investigados pode ser construída pelo próprio analista, baseado no conhecimento que se tem sobre a amostra, ou ainda, empregar listas abrangentes (com milhares de compostos), com o intuito de minimizar erros de tendência na elaboração da lista e evitar que contaminantes importantes sejam negligenciados por falta de informação sobre a amostra (GAGO-FERRERO *et al.*, 2015). Para o segundo caso, no qual uma lista abrangente é empregada, é importante que se tenha disponível ferramentas computacionais apropriadas para o processamento dos dados (ALYGIZAKIS *et al.*, 2018, 2019).

Entre as ferramentas computacionais disponíveis, a *Norman Digital Sample Freezing Platform* (DSFP) foi desenvolvida com o intuito de proporcionar uma ferramenta capaz de realizar de forma automatizada análises retrospectivas de dados de milhares de contaminantes orgânicos utilizando dados brutos de LC-HRMS convertidos em formato apropriado. A DSFP possui uma extensa lista de produtos químicos e, associados a esta, metadados como a massa exata, previsão de tempos de retenção baseada na estrutura química, ajuste isotópico, fragmento qualificador, identificadores das substâncias como o número CAS, SMILES (do inglês *Simplified Molecular-Input Line-Entry System*) e InChIKey (Identificador compacto derivado do InChI - do inglês *International Chemical Identifier*), entre outros. Desta forma, esta ferramenta apresenta grande potencial para a investigação do grau de contaminação das amostras analisadas neste trabalho.

2.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar se o reaproveitamento da vinhaça na fertirrigação é um dos principais vetores de contaminantes orgânicos para o solo e água subterrânea em áreas fertirrigadas. Para atingir este objetivo, amostras de vinhaça, solo e água subterrânea foram analisadas seguindo duas abordagens diferentes: (i) análise do tipo alvo, baseada em LC-MS/MS, para a determinação de 32 antibióticos de múltiplas classes, incluindo penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, quinolonas, macrolídeos, tetraciclina, lincosamidas, sulfonamidas, ionóforos e estreptograminas. (ii) análise de compostos suspeitos empregando

estratégias avançadas com base LC-HRMS para avaliar a presença de 7811 contaminantes, incluindo pesticidas, produtos farmacêuticos e uma ampla gama de produtos químicos industriais, entre outras substâncias.

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Reagentes

Solventes grau HPLC da Lichrosolv, acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e água, foram utilizados no preparo dos padrões analíticos, no preparo das amostras e nas análises do tipo alvo por UHPLC-QqLIT. Nas análises por LC-HRMS, foram utilizados solventes grau espectrometria de massas da Fisher Scientific. O hidróxido de amônio 30% (PA-ACS), ácido cítrico anidro, ácido acético glacial grau HPLC, ácido clorídrico 37% e 1,0 mol L⁻¹, EDTA dissódico 0,1 mol L⁻¹ utilizados foram da Scharlau. O citrato de sódio diidratado foi adquirido da Panreac. O ácido fórmico 98% foi adquirido da Merck, o acetato de sódio e o sulfato de sódio (≥99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Os padrões analíticos utilizados neste trabalho foram comprados da Sigma-Aldrich com pureza ≥ 93%. Padrões internos isotopicamente marcados (ILIS – do inglês *Isotopically Labelled Internal Standards*) foram obtidos da Sigma-Aldrich e da Toronto Research Chemicals. Soluções estoque individuais dos padrões analíticos dos antibióticos e ILIS foram preparadas na concentração de 1000 mg L⁻¹ em metanol, com exceção das quinolonas e fluoroquinolonas, que foram preparadas com a adição de 100 µL de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ e metanol, da cefalexina, que foi preparada em água, da ampicilina, penicilina V e ceftiofur, que foram preparadas em ACN:Água (1:1, v/v). Além disso, a solução estoque de ceftiofur foi preparada na concentração de 100 mg L⁻¹. Uma solução intermediária de 20 mg L⁻¹ contendo todos os analitos foi preparada e utilizada para preparar as soluções de trabalho nas concentrações 500, 50 e 10 µg L⁻¹ em metanol:água (20:80, v/v). A lista dos antibióticos e os respectivos ILIS utilizados podem ser consultados na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Lista dos analitos e respectivos ILIS utilizados no trabalho.

Classe do antibiótico	Composto	Fórmula Molecular	ILIS
Penicilinas	Amoxicilina	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	Amoxicilina -d4
	Ampicilina	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	Ampicilina -d5
	Penicilina V	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	Penicilina V-d5
Cefalosporinas	Cefalexina	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	Cefuroxima -d3
	Ceftiofur	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₃	Ceftiofur -d3
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Ciprofloxacina -d8
	Enrofloxacina	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	Enrofloxacina -d5
	Norfloxacina	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Norfloxacina -d5
	Marbofloxacina	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	Norfloxacina -d8
Quinolonas	Ácido pipemídico	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₃	Ácido oxolínico-d5
Macrolídeos	Azitromicina	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	Azitromicina-d3
	Claritromicina	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	Claritromicina-d3
	Tilmicosina	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	Tilmicosina-d3
Tetraciclina	Tetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	Tetraciclina-d6
	Doxiciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	Doxiciclina-d3
	Clortetraciclina	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	Tetraciclina-d6
	Oxitetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	Tetraciclina-d6
Lincosamidas	Lincomicina	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	Lincomicina-d3
	Clindamicina	C ₁₈ H ₃₃ ClN ₂ O ₅ S	Clindamicina-d3
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	Sulfametoxazol-d4
	Sulfametazina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	Sulfametazina-d4
	Sulfadiazina	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	Sulfadiazina-d4
	Sulfapiridina	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	N-acetilsulfapiridina-d4
Inibidor da Dihidrolato reductase	Trimetoprima	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	Trimetoprima-d3
Nitroimidazólicos	Metronidazol	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	Metronidazol-d4
	Metronidazol-OH	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄	Metronidazol-OH-d4
Pleuromutilinas	Tiamulina	C ₂₈ H ₄₇ NO ₄ S	Tiamulina- ¹³ C4
Anfenicóis	Florfenicol	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ FNO ₄ S	Florfenicol -d3
Ionóforos	Monensina	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₁	-
	Salinomicina	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₁	-
Estreptograminas	Virginiamicina M1	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₇	Virginiamicina M1-d2
	Virginiamicina S1	C ₄₃ H ₄₉ N ₇ O ₁₀	Virginiamicina M1-d2

2.3.2 Coleta das Amostras de Água Subterrânea, Solo e Vinhaça

As amostras de água subterrânea e solo foram coletadas no período de agosto a outubro de 2018 em áreas fertirrigadas com vinhaça localizadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais. As informações sobre localização, tipo de fonte de água e tipo de solo estão reunidos na **Tabela 14**. As amostras de água subterrâneas foram coletadas em seis pontos distintos, sendo quatro deles poços artesianos e dois deles nascentes. Em todos os casos, as fontes de água são utilizadas para abastecimento de água potável em fazendas e em um caso para abastecimento público. As amostras AS1-AS5 foram coletadas em fazendas contendo plantações de cana-de-açúcar que são fertirrigadas com vinhaça. A amostra AS6 foi coletada em um poço artesiano na cidade de Araraquara que é utilizado no abastecimento público da cidade. Vale destacar que a cidade de Araraquara está rodeada por plantações de cana-de-açúcar.

As coletas das amostras oriundas dos poços artesianos foram realizadas por bombeamento descartando a água bombeada nos primeiros 2 min. As amostras foram acondicionadas em frascos âmbar de poli(tereftalato de etileno) (PET) sob refrigeração em caixa térmica com gelo e transportadas para o laboratório, onde foram armazenadas a -20 °C. Para as amostras de água foram realizadas medidas de pH e condutividade.

As amostras de solo (n=9) foram coletadas em diferentes plantações de cana-de-açúcar fertirrigadas com vinhaça. As coletas foram realizadas após remoção da palha na superfície do solo coletando as amostras a uma profundidade de 10-20 cm com o auxílio de um enxadão e armazenadas em sacos plásticos selados com zíper. As amostras foram transportadas para o laboratório sob refrigeração em caixa térmica com gelo, liofilizadas e armazenadas a -20 °C.

Tabela 14 - Localização dos pontos de coletas, fonte de água e tipo de solo nas áreas de coleta.

Local da coleta (Coordenadas geográficas)	Município	Água Subterrânea	Solo*
Fazenda 1 (-21.887975, -48.465981)	Boa Esperança do Sul – SP	AS1 (Nascente)	Solo1 e Solo2 (Latossolo-Argissolo)
Fazenda 2 (-21.795361, -48.544417)	Nova Europa – SP	AS2 (Poço artesiano)	Solo3 (Latossolo-Argissolo)
Fazenda 3 (-21.081345, -48.952063)	Catanduva – SP	AS3 (Nascente)	Solo4 e Solo5 (Argissolo-Latossolo)
Fazenda 4 (-19.858240, -48.761268)	Pirajuba – MG	AS4 (Poço artesiano)	Solo6 e Solo7 (Latossolo- Neossolo Quartzarênico)
Fazenda 5 (-20.074489, -48.771057)	Frutal – MG	AS5 (Poço artesiano)	Solo8 e Solo9 (Latossolo)
Cidade de Araraquara-SP (-21.769108, -48.170334)	Araraquara – SP	AS6 (Poço artesiano)	-

*Classificação do solo baseada no mapa de solos do Brasil (SANTOS *et al.*, 2011).

As amostras de vinhaça (n = 5) foram fornecidas por diferentes usinas sucroalcooleiras localizadas no estado de São Paulo. As amostras foram coletadas em frascos PET âmbar, transportadas até o laboratório sob refrigeração em caixa térmica com gelo e armazenadas a -20 °C.

2.3.3 Otimização do Preparo das Amostras de Solo

A metodologia empregada para o preparo de amostra para a análise das amostras de solo foi definida após a avaliação de duas abordagens. A primeira abordagem avaliada foi o emprego da técnica de extração QuEChERS, empregando o kit Dispersive SPE Vet Drugs in Foods (contendo 50 mg PSA, 150 mg C18EC e 900 mg Na₂SO₄) da Agilent Technologies e a segunda foi o emprego da técnica extração por líquido pressurizado (ELP).

2.3.3.1 Otimização da Técnica de Extração por Líquido Pressurizado

Assim como descrito para os estudos com QuEChERS, uma mistura de nove diferentes solos foi utilizada para a otimização da técnica ELP. As amostras foram extraídas utilizando o sistema Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 equipado com células de extração de aço

inoxidável de 22 mL empregando diferentes solventes de extração, temperaturas e pHs, como resumido na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Diferentes testes realizados utilizando a técnica de extração ELP.

Teste	Solvente extrator (1:1)	Temperatura °C
ELP-A	Tampão citrato pH 4,0*: ACN	50
ELP -B	Tampão citrato-fosfato pH 2.6*: ACN	70
ELP -C	Tampão citrato pH 4,0*: ACN	70
ELP -D	Tampão citrato-fosfato pH 7.0*: ACN	70
ELP -E	Tampão citrato-fosfato pH 2.6*: MeOH	70
ELP -F	Tampão citrato pH 4,0*: MeOH	70
ELP -G	Tampão citrato-fosfato pH 7.0*: MeOH	70

*O preparo das soluções tampão foi realizado conforme literatura (GOMORI, 1955).

Para a realização da extração, 1,0 g de amostra homogeneizada em almofariz foi pesada em frascos de vidro âmbar de 20 mL e homogeneizado com terras diatomáceas (Dionex™ ASE® Prep DE) em quantidade suficiente para o total preenchimento da célula de extração. Dois filtros de fibra de vidro foram colocados na parte inferior e um na parte superior da célula de extração. Os parâmetros instrumentais utilizados na extração foram: pré-aquecimento de 5,0 min, 3 ciclos de extração de 5 min cada e 60 s de purga com nitrogênio, de acordo com literatura (JELIĆ; PETROVIĆ; BARCELÓ, 2009). Após a extração por ELP, os extratos foram diluídos com 500 mL de água ultrapura e 15 mL de Na₂EDTA 0,1 mol L⁻¹. Os extratos diluídos foram filtrados em membrana de PVDF de 0,45 µm e submetidos a SPE utilizando o cartucho de extração Oasis® HLB (200 mg, 6 cc) da Waters Corporation (Milford, MA, U.S.A.). Antes da realização da SPE, os cartuchos foram condicionados com 5,0 mL de metanol seguidos de 5,0 mL de água grau HPLC. Os extratos diluídos oriundos da extração por ELP foram percolados nos cartuchos com uma vazão de 3-4 gotas/s com o auxílio de um manifold Agilent 20 canais e sistema de vácuo. Em seguida, foi percolada uma solução para a limpeza dos cartuchos (5,0 mL de água grau HPLC) e os cartuchos foram secados sob vácuo por 25 min para a eliminação da água. Os extratos foram eluídos com 2 porções de 4,0 mL de metanol, secados sob vazão suave de nitrogênio e redissolvidos com 500 µL de metanol:água (20:80, v/v) contendo os ILIS na concentração de 25,0 µg L⁻¹ e transferidos para vials de vidro âmbar de 1,5 mL.

2.3.3.2 Otimização da Técnica de Extração QuEChERS

Diferentes parâmetros foram investigados para a otimização da extração por QuEChERS, incluído o tipo de tampão, emprego de Na₂EDTA e diferentes pHs, como pode ser visto na **Tabela 16**. Para os estudos de otimização foi utilizada uma mistura de 9 amostras de solo, sendo que 1,0 g desta mistura foi pesada, homogeneizada com o auxílio de um almofariz e transferido para um tubo de centrifuga em PPL de 50,0 mL. Em seguida, 5,0 mL do solvente 1 foi adicionado seguido de intensa agitação por vórtex durante 30 s para hidratar e homogeneizar a amostra. Na sequência, 6,0 mL do solvente 2 foi adicionando e a mistura foi agitada manualmente por 5,0 min. Após a agitação, foi adicionado o sal para promover a separação de fase seguido de intensa agitação por vórtex durante 30 s. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min a 4 °C e 4,0 mL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de centrifuga de 15,0 mL contendo 50 mg PSA, 150 mg C18 e 900 mg de Na₂SO₄ seguido novamente de agitação por vórtex durante 30 s. A mistura foi centrifugada novamente e 3,0 mL do sobrenadante foi coletado em um tubo de vidro e evaporado sob fluxo suave de nitrogênio. O extrato foi redissolvido com 500 µL de metanol:água (20:80, v/v) contendo os ILIS na concentração 25 µg L⁻¹, filtrado em filtro de seringa PVDF 0,22 µm (Merck Millipore) e transferidos para vial de vidro âmbar.

Tabela 16 - Solventes e sais empregados na otimização das extrações por QuEChERS.

Teste	Solvente 1	Solvente 2	Separador de fases
Q-A	Água grau HPLC	ACN com 1% HAc	1.5 g NaOAc + 6 g Na ₂ SO ₄
Q-B	EDTA 0,1 mol L ⁻¹	ACN com 1% HAc	1.5 g NaOAc + 6 g Na ₂ SO ₄
Q-C	Tampão citrato-fosfato pH 2.6*	ACN	6.0 g Na ₂ SO ₄
Q-D	Tampão citrato-fosfato pH 4.0*	ACN	6.0 g Na ₂ SO ₄
Q-E	Tampão citrato-fosfato pH 7.0*	ACN	6.0 g Na ₂ SO ₄

*O preparo das soluções tampão foi realizado conforme literatura (GOMORI, 1955).

2.3.4 Preparo de Amostras para as Análises de Água Subterrânea e Vinhaça

As amostras de água subterrânea foram filtradas em membranas de fibra de vidro de 1 µm (Whatman, UK) e de PVDF 0,45 µm (Merck Millipore) e 500 mL de cada amostra, em triplicata, foram submetidos a SPE conforme procedimento descrito por Gros e colaboradores (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013) utilizando o cartucho de extração Oasis[®] HLB (200 mg, 6 cc) da Waters Corporation. De forma resumida, o preparo de amostra envolveu o ajuste de pH em 2,5 com ácido clorídrico 37% e adição de 15 mL de Na₂EDTA 0,1 mol L⁻¹

antes da realização da SPE. Para a realização da SPE, os cartuchos foram condicionados com 5,0 mL de metanol seguidos de 5,0 mL de água acidificada com pH 2,5. As amostras foram percoladas no cartucho a uma vazão de 3-4 gotas/s com o auxílio de um manifold Agilent 20 canais e sistema de vácuo. Em seguida, foi percolada uma solução para a limpeza dos cartuchos (5,0 mL de água acidificada com pH 2,5) e os cartuchos foram secados sob vácuo por 25 min para a eliminação da água. Os extratos foram eluídos com 2 porções de 4,0 mL de metanol, secados sob vazão de nitrogênio e redissolvidos com 500 μL de metanol:água (20:80, v/v) contendo os ILIS na concentração de 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para as amostras de vinhaça, um volume de 5,0 mL de amostra foi submetido a centrifugação a 5.000 rpm por 10 min a 5,0 °C seguida de filtração em filtro seringa de PVDF de 0,22 μm (Merck Millipore) e 4,5 mL foram diluídos com o mesmo volume de água acidificada com ácido clorídrico com pH 2,5. Em seguida, cada amostra foi dividida em três alíquotas de 3,0 mL com a adição de 45 μL de Na_2EDTA 0,1 mol L^{-1} em cada alíquota antes da realização da SPE. Na sequência, foi realizada a SPE conforme já descrito para as amostras de água, sendo que na etapa de redissolução do extrato, um volume de 200 μL de metanol:água (20:80, v/v) contendo os ILIS na concentração de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi utilizado.

2.3.5 Análises Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando duas abordagens: (i) análise direcionada para a quantificação de antibióticos nas amostras utilizando UHPLC-QqLIT e (ii) investigação de compostos suspeitos (abordagem denominada *suspect screening* em inglês) utilizando LC-HRMS.

2.3.5.1 Análise Quantitativa por UHPLC-QqLIT

As análises quantitativas foram realizadas utilizando o sistema UHPLC Acquity da Waters Corporation acoplado ao espectrômetro de massas 5500 QTRAP da SCIEX (Foster, CA, USA) com ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI(+)) de acordo com o método de Gros e colaboradores (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013). A separação cromatográfica foi realizada empregando a coluna Acquity HSS T3 (50 mm x 2,1 mm) com partículas de 1,8 μm da Waters Corporation. A eluição foi realizada no modo gradiente com a fase móvel composta por acetonitrila (A) e água grau HPLC acidificada com 0,1% de ácido fórmico (B) a uma vazão de 0,5 mL min^{-1} . O programa de solvente utilizado iniciou com 5%

de A alcançando 70% em 3,0 min e 100% em 3,5 min. Esta composição de fase móvel foi mantida até 5,0 min retornando à condição inicial em 5,1 min. A condição inicial foi mantida até 6,0 min para equilibrar a coluna para a próxima injeção e o volume de injeção utilizado foi 5,0 μ L.

A detecção por espectrometria de massas foi realizada no modo *Scheduled* MRM (do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) com um *target scan time* de 0,25 s e uma janela de detecção de 20 s. Os parâmetros da fonte de ionização utilizados foram: temperatura de 650 °C, voltagem do *ionspray* de 5500 V, cortina de gás de 30 psi, gás de nebulização de 60 psi e gás secante de 50 psi. O tempo de retenção para a detecção por *Scheduled* MRM, a *m/z* para os íons precursores e as transições monitoradas (MRM1 e MRM2) estão reunidas na **Tabela 17**.

Tabela 17 - Tempo de retenção (t_R) para a detecção por *Scheduled* MRM, íons precursor e transições monitoradas dos analitos.

Antibióticos	t_R (min)	Íon precursor (m/z)	MRM-1	MRM-2
Ácido pipemídico	1,0	304,0	217,0	189,1
Amoxicilina	0,7	366,0	113,9	349,1
Ampicilina	1,0	350,0	106,0	113,9
Azitromicina	1,4	749,0	591,5	116,0
Cefalexina	1,0	348,0	158,0	106,0
Ceftiofur	1,8	529,9	240,9	124,8
Clortetraciclina	1,5	479,0	444,1	260,0
Ciprofloxacina	1,2	332,0	288,0	245,1
Claritromicina	2,1	748,0	158,1	590,4
Clindamicina	1,5	425,0	126,2	377,0
Doxiciclina	1,6	445,0	429,0	154,0
Enrofloxacina	1,2	360,1	316,3	245,2
Florfenicol	1,7	358,0	340,0	241,0
Lincomicina	1,0	407,0	359,0	389,0
Marbofloxacina	1,1	362,1	72,1	320,2
Metronidazol	0,9	172,0	128,0	82,0
Metronidazol-OH	0,7	188,0	126,0	123,0
Monensina	5,5	693,2	675,2	461,1
Norfloxacina	1,1	320,0	276,2	233,0
Oxitetraciclina	1,2	461,0	426,2	443,2
Penicilina V	2,2	350,9	160,0	114,1
Salinomicina	4,8	773,3	431,2	531,2
Sulfadiazina	1,0	251,0	156,0	92,0
Sulfametazina	1,3	278,9	185,9	91,9
Sulfametoxazol	1,7	254,0	156,1	92,0
Sulfapiridina	1,1	250,0	156,0	92,0
Tetraciclina	1,3	445,0	410,0	427,0
Tiamulina	2,1	494,2	192,0	118,9
Tilmicosin	1,6	869,4	696,3	88,0
Trimetoprima	1,1	291,0	230,2	261,1
Virginiamicina M1	2,4	526,1	508,1	355,0
Virginiamicina S1	2,9	824,3	177,1	122,0

2.3.5.2 Investigação de Compostos Suspeitos por LC-HRMS

As análises por LC-HRMS foram realizadas empregando o sistema HPLC Aria TLX-1 acoplado ao espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos™ (Thermo Fisher Scientific) com ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo (ESI(+)) e ESI(-)). A separação cromatográfica foi realizada com a coluna Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm x 4,6 mm) com partículas de 5 µm da Agilent Technologies. A eluição foi realizada no modo gradiente utilizando fase móvel com composição distinta para as análises com ionização no modo ESI(+)) e ESI(-)). Para as análises no modo positivo, a fase móvel foi composta por solução aquosa contendo 10 mmol L⁻¹ de formiato de amônio (A) e por acetonitrila (B). Para as análises no modo negativo, a fase móvel foi composta por solução aquosa contendo 6,5 mmol L⁻¹ de acetato de amônio (A) e acetonitrila (B). Nos dois casos foi utilizada uma vazão de 0,5 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e o mesmo programa de solvente. O programa de solvente utilizado iniciou com 5% de B e foi mantido até 1,0 min. De 1,0 min até 10,0 min a porcentagem de B alcançou 95% e atingiu 100% em 13 min. A composição inicial foi restabelecida em 16 min e mantida até 17 min.

A aquisição de dados foi realizada no modo DIA (do inglês *Data Independent Acquisition*) sendo realizadas duas varreduras sequenciais. A primeira varredura (*full scan*) foi realizada na faixa de *m/z* de 60-1000 em baixa energia de colisão (4 eV) e utilizando uma resolução de 60.000 FWHM (do inglês *Full Width at Half Maximum*). A segunda varredura (*full scan*) foi realizada na faixa de *m/z* de 60-750 utilizando alta energia de colisão (35 ± 15 eV) com resolução de 30.000 FWHM. Os parâmetros utilizados para a fonte de ionização foram 350 °C e 300 °C para a temperatura do capilar e da fonte, respectivamente, 40 psi para o gás nebulizador, 20 psi o gás auxiliar, 3,5 kV e -2,5 kV para a ionização nos modos positivo e negativo respectivamente.

2.3.6 Avaliação da Performance dos Métodos Analíticos

A performance dos métodos analíticos quantitativos por UHPLC-QqLIT para a análise de antibióticos em água subterrânea, vinhaça e solo foi avaliada por meio da determinação da recuperação (RE), repetibilidade, dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), efeito matriz (EM) e da linearidade. A recuperação foi calculada por meio da fortificação das amostras com uma concentração conhecida (C_c) dos analitos antes do processo de extração e comparando este valor com a concentração obtida (C_o) após o emprego do procedimento analítico. O valor

de C_o foi determinado por calibração por padrão interno utilizando padrão interno isotopicamente marcados (ILIS do inglês *Isotopically Labeled Internal Standards*) e a recuperação foi determinada utilizando a equação $RE = (C_o/C_c) * 100\%$. A repetibilidade foi determinada calculando o desvio padrão relativo (DPR) obtido no teste de recuperação. Os limites de detecção e quantificação foram definidos a partir da determinação da concentração responsável por gerar uma razão sinal ruído de 3 e 10 respectivamente. A linearidade foi avaliada empregando o modelo de regressão linear por mínimos quadrados na faixa de 0,5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Um padrão de calibração foi injetado repetidamente a cada 20-25 injeções para verificar a estabilidade de sinal do equipamento.

Para as análises qualitativas por LC-HRMS, o espectrômetro de massas foi calibrado nas duas polaridades no dia de cada análise. A calibração foi realizada utilizando padrões de calibração seguindo as recomendações do fabricante para garantir a exatidão de massa. A presença dos ILIS nas amostras injetadas foi monitorada para garantir a adequada performance do sistema LC-HRMS. Brancos do procedimento analítico, incluindo todas as etapas analíticas, foram analisados para descontar qualquer sinal analítico que possa gerar falso positivo.

2.3.7 Processamento dos Dados de HRMS

A investigação de compostos suspeitos foi realizada utilizando a *NORMAN Digital Samples Freezing Platform* (DSFP) (ALYGIZAKIS *et al.*, 2019) por meio da análise retrospectiva. Os dados brutos obtidos diretamente das análises por LC-HRMS foram convertidos para o formato mzML utilizando o programa ProteoWizard (CHAMBERS *et al.*, 2012). Nesta conversão, foram obtidos arquivos separados para as duas varreduras sequenciais adquiridas em cada análise, sendo um arquivo para a varredura em baixa energia de colisão e outro para alta energia. Os arquivos convertidos, assim como seus metadados (incluindo um índice de tempo de retenção calculado com padrões de calibração) foram carregados na DSFP. Na sequência, foi realizada a análise retrospectiva para 7811 composto de relevância ambiental (5459 em ESI(+) e 2352 no modo ESI(-)). A análise retrospectiva foi realizada baseada na (i) exatidão de massa, (ii) no uso de modelo de predição de tempo de retenção (AALIZADEH *et al.*, 2016; AALIZADEH; NIKA; THOMAIDIS, 2019) e na inspeção dos fragmentos MS/MS gerados (assim como outros metadados relacionados a indicadores comerciais) (GAGO-FERRERO *et al.*, 2018).

Apenas os compostos que atenderam os critérios de exatidão de massa (2 mDa), tempo de retenção em concordância com modelo preditivo e presença de ao menos um fragmento característico foram considerados para posterior investigação. Vale destacar que apenas compostos representativos (detectados na maioria das amostras) foram levados em consideração baseando-se na frequência de detecção (FD) da seguinte forma: $FD \geq 80\%$ para vinhaça, $FD \geq 50\%$ para água subterrânea e solo. Além disso, todos os compostos detectados nos brancos foram excluídos. O grau de confiança na identificação dos compostos detectados foi realizada seguindo os níveis de confiança descritos por Schymanski e colaboradores (SCHYMANSKI *et al.*, 2014).

2.4 Resultados e Discussões

2.4.1 Análises Quantitativas por UHPLC-QqLIT

2.4.1.1 Otimização da Extração dos Antibióticos em Solo por ELP

A eficiência da técnica de extração ELP depende de vários parâmetros experimentais. Entre os parâmetros mais importantes para a obtenção de uma recuperação apropriada estão a composição do solvente de extração, temperatura, número de ciclos de extração e duração de cada ciclo (ANDREU; PICÓ, 2019). Neste trabalho, os parâmetros número de ciclo e duração de cada ciclo foram definidos como três ciclos de 5,0 min baseado no trabalho de Jelić e colaboradores (JELIĆ; PETROVIĆ; BARCELÓ, 2009). Já os parâmetros como temperatura e composição do solvente de extração foram estudados, conforme **Tabela 15**, permitindo avaliar o efeito da temperatura, do pH e do emprego de metanol e acetonitrila na recuperação dos analitos.

O uso de alta temperatura em ELP aumenta a solubilidade e a taxa de difusão dos analitos, favorecendo a extração. Porém, o aumento da temperatura pode levar à degradação de analitos termolábeis. Desta forma, a temperatura é um parâmetro importante que deve ser avaliado durante o desenvolvimento de métodos de extração por ELP. O efeito da temperatura foi avaliado a 50 e 70 °C utilizando como solvente extrator a mistura tampão citrato pH 4,0:ACN (1:1) e os resultados estão reunidos na **Tabela 18** (testes ELP-A a 50 °C e ELP-C a 70° C). Como pode ser visto na **Tabela 18**, o emprego da temperatura maior levou a um aumento na eficiência da extração da maioria dos antibióticos. Este resultado mostra que os efeitos positivos do aumento da temperatura na extração, como aumento da solubilidade e

difusão dos analitos, superaram possíveis efeitos negativos, como a degradação, por exemplo. Desta forma, a temperatura de 70 °C foi escolhida como a temperatura de extração no preparo de amostra por ELP.

Outro parâmetro que tem influência no processo de solubilidade e adsorção dos analitos é o pH do solvente de extração. Este fato está relacionado com o estado de ionização de uma molécula que em muitos casos é dependente do pH do meio. Desta forma, o pH também é um parâmetro que deve ser estudado durante o desenvolvimento do método de extração por ELP. Para verificar a influência do pH, os pHs 2,6, 4,0 e 7,0 foram avaliados empregando tampão citrato e tampão citrato-fosfato. No caso das amostras de solo, o emprego de tampão contendo íons citrato tem função adicional, pois este íon atua como agente quelante para íons metálicos, prevenindo a formação de complexos metálicos entre os antibióticos e íons metálicos favorecendo desta forma a extração (MORENO-GONZÁLEZ; GARCÍA-CAMPAÑA, 2017). Além disso, o tampão citrato-fosfato possui uma extensa faixa de tamponamento, indo de 2,6 a 7,0 (GOMORI, 1955), o que permite avaliar a influência de uma extensa faixa de pH na extração dos analitos.

Nos testes envolvendo os diferentes valores de pHs, uma mistura tampão:ACN (1:1) foi empregada, sendo que os pHs 2,6, 4,0 e 7,0 foram avaliados respectivamente nos testes ELP-B, ELP-C e ELP-D, como descrito na **Tabela 15**. De forma geral, os pHs 4,0 e 7,0 levaram a obtenção de maiores recuperações, quando comparados com o pH 2,6. Porém, o pH 7,0 levou a uma melhor recuperação para a salinomicina, que é um antibiótico importante no contexto deste trabalho, e por isso, o pH 7,0 foi definido como o mais apropriado para a realização da ELP. A recuperação obtida para cada analito nos diferentes pHs podem ser vistos na **Tabela 18** nos testes ELP-B, ELP-C e ELP-D.

O estudo do pH também foi realizado utilizando a mistura tampão:metanol (1:1) como solvente de extração. Os resultados obtidos foram similares aos obtidos com tampão:ACN, sendo que o melhor resultado também foi obtido em pH 7,0. Os resultados obtidos com os pHs 2,6, 4,0 e 7,0, empregando como solvente de extração tampão:metanol (1:1), podem ser vistos respectivamente nos testes ELP-E, ELP-F e ELP-G na **Tabela 18**. Comparando os resultados obtidos empregando as duas combinações de solventes em pH 7,0 (teste ELP-D realizado com tampão:ACN e ELP-G realizado com tampão:metanol) é possível verificar que o emprego de metanol ao invés de acetonitrila leva a melhores recuperações. Desta forma, a mistura tampão citrato-fosfato pH 7,0:methanol foi escolhida como solvente de extração em ELP.

Tabela 18 - Recuperação obtida para cada analitos nos diferentes testes realizados com ELP.

Antibióticos	%Recuperação (%DPR) n=2						
	ELP-A	ELP-B	ELP-C	ELP -D	ELP-E	ELP -F	ELP -G
Cefalexina	4,0 (0,4)	4,5 (3,8)	4,3 (4,5)	4,1 (2,1)	6,4 (0,9)	5,4 (5,0)	5,5 (5,6)
Ceftiofur	0	0	0	0	0	0	30,5 (9,2)
Trimetoprima	14,0 (0,7)	22,0 (2,6)	38,6 (22,0)	61,5 (2,5)	84,0 (5,4)	86,9 (3,7)	90,3 (0,5)
Ciprofloxacina	8,1 (2,1)	16,3 (3,7)	18,9 (16,3)	15,9 (18,8)	6,6 (14,3)	8,8 (0,0)	17,8 (9,1)
Enrofloxacina	32,7 (16,9)	27,8 (6,1)	22,8 (27,8)	59,8 (1,9)	3,3 (24,6)	6,5 (2,6)	41,6 (5,4)
Marbofloxacina	5,7 (10,2)	10,6 (15,7)	13,5 (10,6)	19,6 (0,8)	6,6 (35,6)	8,9 (3,3)	54,6 (5,2)
Monensina	0	0	0	0	0	0	21,2 (3,0)
Salinomicina	19,8 (21,8)	0	9,4 (26,8)	65,6 (8,6)	0	4,7 (38,5)	62,2 (9,5)
Clindamicina	21,9 (11,0)	30,1 (15,5)	45,0 (9,4)	77,2 (1,8)	76,2 (5,2)	75,0 (5,7)	90,7 (2,3)
Lincomicina	1,3 (6,5)	1,7 (5,6)	1,8 (1,7)	4,4 (5,2)	4,9 (18,4)	10,1 (3,8)	61,8 (2,3)
Azitromicina	0	0	25,4 (0,0)	7,2 (26,2)	23,3 (56,8)	0	19,2 (29,6)
Claritromicina	87,3 (1,6)	82,6 (5,8)	88,3 (1,2)	77,1 (10,6)	80,6 (2,8)	80,0 (2,7)	61,6 (17,9)
Metronidazol	1,8 (7,2)	1,3 (10,0)	2,5 (11,2)	1,2 (3,4)	14,9 (0,7)	15,7 (0,9)	15,6 (0,4)
Metronidazol-OH	0,8 (1,5)	0,8 (2,7)	1,1 (7,0)	0,8 (3,1)	4,2 (0,7)	4,1 (0,7)	4,1 (1,0)
Florfenicol	90,7 (0,8)	75,9 (2,4)	79,5 (1,2)	77,3 (5,7)	74,9 (3,6)	73,5 (2,5)	76,0 (8,2)
Tiamulina	64,7 (2,8)	63,1 (5,6)	64,8 (0,9)	50,7 (2,5)	78,5 (1,6)	77,5 (3,5)	62,9 (17,8)
Ácido Pipemídico	10,3 (1,5)	12,0 (0,4)	12,1 (12,0)	10,8 (0,8)	13,1 (11,3)	12,6(2,2)	27,8 (2,0)
Virginiamicina M	35,5 (2,8)	65,8 (3,4)	65,0 (6,1)	55,1 (8,0)	61,9 (2,5)	62,6 (0,9)	55,3 (1,3)
Virginiamicina S	40,3 (6,0)	44,3 (1,6)	41,3 (3,8)	39,4 (1,4)	45,8 (10,5)	39,0 (9,4)	33,3 (26,8)
Sulfadiazina	14,4 (2,3)	10,6 (9,8)	18,7 (10,3)	5,8 (7,5)	44,9 (10,5)	45,4 (1,7)	50,6(3,8)
Sulfametazina	59,2 (2,9)	48,5(2,6)	70,0 (1,6)	54,1 (6,0)	68,4 (0,8)	71,2 (14,3)	81,1 (8,2)
Sulfametoxazol	70,0 (4,0)	78,0 (2,5)	78,7 (0,9)	45,1 (5,3)	73,6 (6,1)	70,7 (9,8)	83,5 (4,9)
Sulfapiridina	34,2 (23,2)	61,1 (18,3)	73,1 (3,3)	33,3 (3,8)	104,4 (18,2)	122,3 (1,0)	88,2 (19,9)
Clortetraciclina	24,4 (3,5)	19,4 (5,6)	23,8 (19,4)	25,8 (3,3)	16,8 (12,0)	15,8 (8,4)	20,6 (10,8)
Doxiciclina	50,5 (3,1)	45,2 (2,5)	45,9 (17,6)	55,1 (2,8)	24,9 (1,7)	31,3 (11,3)	52,1 (0,8)
Oxitetraciclina	4,1 (17,7)	4,7 (28,0)	7,7 (4,7)	0	16,3 (8,1)	16,3 (5,0)	11,4 (9,0)
Tetraciclina	11,2 (0,5)	11,6 (12,4)	17,5 (11,6)	9,1 (0,5)	24,0 (7,1)	26,8 (8,4)	53,6 (2,1)

2.4.1.2 Otimização da Extração dos Antibióticos em Solo por QuEChERS

A eficiência da extração realizada por QuEChERS é dependente de vários parâmetros, como por exemplo, da adequada escolha da composição do solvente extrator e do sal para a promoção do efeitos *salting-out*. Além disso, o emprego de aditivos como EDTA para prevenir a formação de complexos metálicos entre os analitos e íons metálicos presentes nas amostras também pode ser uma estratégia importante (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013). O sal utilizado neste trabalho para promover a separação da fase aquosa da fase orgânica (ACN) foi o Na₂SO₄. Este sal foi escolhido, ao invés do MgSO₄, com o intuito de prevenir a formação de complexos entre os íons Mg²⁺ e antibióticos, em especial as tetraciclinas e fluoroquinolonas, o que poderia afetar negativamente a extração destas espécies (GROS *et al.*, 2019).

Inicialmente foi avaliado o efeito do uso de EDTA na extração dos antibióticos, conforme **Tabela 16**, nos testes QA e QB. Comparando os resultados obtidos nos testes QA e QB, ambos tamponados com tampão acetato e com a adição de EDTA em QB, é possível verificar que o uso do EDTA não proporcionou melhores valores de recuperação, **Tabela 19**. Desta forma, o emprego de EDTA na extração por QuEChERS foi descartado.

Além do emprego do tampão acetato, o tampão citrato-fosfato em diferentes pHs também foi avaliado. As vantagens do uso do tampão citrato-fosfato já foram citadas na otimização das extrações por ELP e, seguindo a mesma lógica, os pHs 2,6, 4,0 e 7,0 foram avaliados nos testes QC, QD e QE, respectivamente. Os resultados obtidos nestes testes mostraram que o tampão citrato-fosfato é mais apropriado que o tampão acetato para realizar a extração por QuEChERS, sendo que o emprego do tampão citrato-fosfato favoreceu a extração das tetraciclinas, fluoroquinolonas, cefalosporinas e do ácido pipemídico. De forma geral, o pH 7,0 proporcionou maiores valores de recuperação, como por exemplo para lincomicina, tetraciclinas, sulfonamidas, salinomicina e monensina. Desta forma, as condições descritas no teste QE, empregando como solvente de extração uma mistura tampão citrato-fosfato pH 7,0:ACN (1:1), proporcionaram os maiores valores de recuperação para os analitos.

Tabela 19 - Recuperação obtida para cada analitos nos diferentes testes empregando QuEChERS.

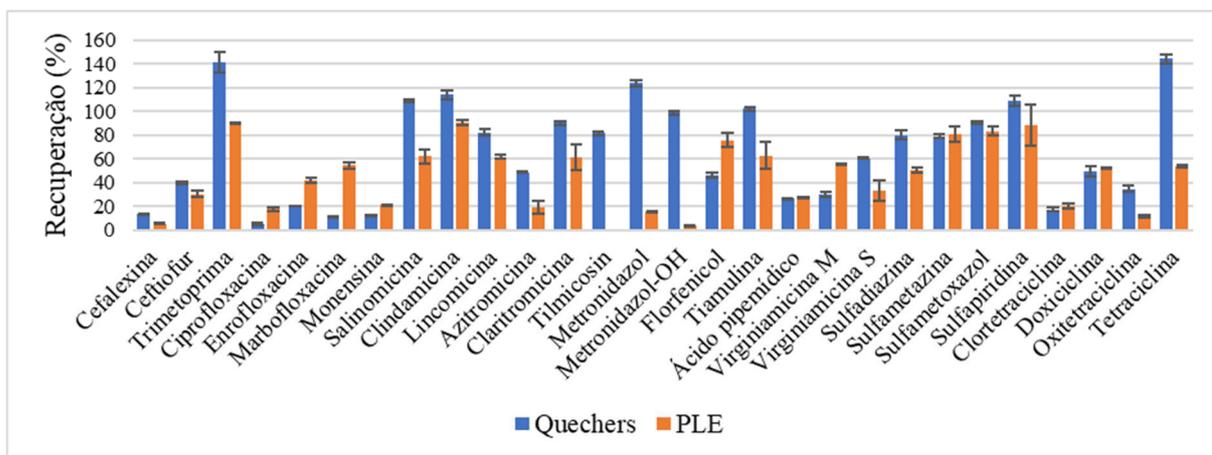
Antibiotics	%Recuperação (%RSD) n=3				
	QA	QB	QC	QD	QE
Cefalexina	0	0	9,2 (11,5)	7,7 (14,8)	13,5 (2,3)
Ceftiofur	0	0	41,0 (2,2)	43,6 (1,6)	39,7 (3,6)
Trimetoprima	87,6 (0,6)	84,8 (2,0)	99,8 (8,0)	99,5 (9,8)	141,7 (6,3)
Ciprofloxacina	0	0	13,2 (9,1)	11,9 (4,3)	5,2 (13,6)
Enrofloxacina	0	0	19,2 (30,3)	25,3 (25,6)	20,4 (0)
Marbofloxacina	0	0	17,6 (4,4)	20,5 (10,1)	10,8 (4,4)
Monensina	0	0	0	0	12,4 (0,4)
Salinomicina	40,4 (8,4)	42,3 (16,4)	0	0	108,7 (0,9)
Clindamicina	105,2 (0,8)	102,4 (1,1)	80,8 (8,5)	90,1 (10,9)	114,3 (3,3)
Lincomicina	22,9 (4,3)	18,1 (5,5)	49,7 (6,5)	53,9 (7,9)	82,5 (3,1)
Azitromicina	78,2 (0,7)	79,4 (5,0)	46,6 (14,7)	74,9 (10,1)	48,8 (0,5)
Claritromicina	103,1 (7,0)	100,3 (0,4)	91,4 (4,9)	92,7 (4,5)	90,2 (1,3)
Tilmicosin	114,5 (5,3)	117 (1,9)	67,4 (6,2)	95 (5,7)	81,7 (2,3)
Metronidazol	92,2 (5,6)	97,1 (0,4)	128,3 (2,7)	134,2 (1,6)	123,8 (2,1)
Metronidazol-OH	53,5 (3,4)	54,3 (1,3)	95,3 (1,5)	99,5 (0,8)	98,8 (1,7)
Florfenicol	130,0 (3,5)	130,9 (2,1)	29,5 (5,6)	36,4 (4,2)	45,8 (4,6)
Tiamulina	110,9 (3,7)	109,1 (1,7)	98,8 (2,9)	107,3 (1,6)	102,3 (1,8)
Ácido pipemídico	0	0	28,5 (1,1)	28,4 (0,6)	27,1 (0,4)
Virginiamicina M	14,3 (22,5)	5,8 (41,7)	38,2 (1,0)	42,9 (2,9)	29,7 (6,8)
Virginiamicina S	39,5 (18,3)	26,1 (10,3)	28,2 (7,1)	31,4 (12,3)	60,8 (0,4)
Sulfadiazina	43,1 (2,3)	27,8 (14,2)	39,2 (5,5)	47,9 (7,1)	80,2 (4,4)
Sulfametazina	73,8 (3,4)	39 (16,0)	31,6 (8,5)	39,0 (3,4)	78,8 (2,1)
Sulfametoxazol	77,6 (7,7)	53 (6,4)	53,0 (8,1)	59,2 (3,0)	90,7 (1,6)
Sulfapyridine	53,8 (0,0)	27,7 (14,8)	30,8 (9,0)	39,0 (7,0)	109,2 (4,1)
Clortetraciclina	0	0	45,6 (2,8)	54,2 (4,8)	17,6 (9,1)
Doxiciclina	0	0	36,7 (14,4)	50,4 (10,1)	49,3 (8,6)
Oxitetraciclina	0	0	41,3 (16,8)	54,4 (8,7)	34,6 (7,2)
Tetraciclina	0	0	27,7 (8,2)	34,8 (4,9)	144,7 (2,6)

2.4.1.3 Comparação entre as Técnicas de Extração ELP e QuEChERS

O melhor resultado obtido com cada uma das duas técnicas de extração avaliadas, QuEChERS (QE) e ELP (ELP-G) estão reunidos na **Figura 51**. Os resultados obtidos mostram que ambas as metodologias são capazes de fornecer adequada recuperação para a maioria dos antibióticos estudados. Porém, não foram capazes de realizar a extração das penicilinas e da

norfloxacina. A metodologia baseada na técnica QuEChERS é mais apropriada para a análise dos macrolídeos azitromicina e tilmicosina, nitroimidazóis, tetraciclina e da estreptogramina virginiamicina S, enquanto a metodologia baseada em ELP é mais apropriada para a extração das fluoroquinolonas, da monensina, do florfenicol e da estreptogramina virginiamicina M1. Em termos gerais, foram obtidos melhores resultados com QuEChERS, sendo que para 14 compostos foram obtidas recuperações $\geq 60\%$, enquanto que com ELP este valor foi obtido apenas para 10 compostos. No entanto, a escolha da metodologia a ser utilizada depende da aplicação e da importância de cada analito no estudo a ser realizado. No nosso caso, a melhor recuperação obtida para a monensina, um dos principais antibióticos empregados no processo de produção do etanol combustível, com ELP foi um motivador para a escolha da metodologia ELP-G para a realização da extração dos antibióticos nas amostras de solo. Desta forma, foi realizada a validação do método analítico utilizando a condições de extração definidas no testes ELP-G, utilizando a mistura tampão citrato-fosfato pH 7,0:metanol como solvente de extração.

Figura 51 - Comparação dos resultados de recuperação obtidos por ELP (n=2) e QuEChERS (n=3).



Fonte: elaborada pelo autor.

Vale destacar ainda que, em termos gerais, a recuperação obtida tanto por QuEChERS quanto por ELP neste trabalho foram similares aos obtidos por outros estudos já relatados anteriormente (BIEL-MAESO; CORADA-FERNÁNDEZ; LARA-MARTÍN, 2017; GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2013; MARTÍNEZ-PIERNAS *et al.*, 2018), sendo que representa avanços para a extração de sulfonamidas em solo quando comparado com alguns trabalhos (GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2013; MARTÍNEZ-PIERNAS *et al.*, 2018). Além disso, foram avaliadas diversas classes de antibióticos, e foi realizada a comparação entre duas técnicas de extração (ELP e QuEChERS), o que não foi abordado em estudos anteriores (BIEL-MAESO; CORADA-FERNÁNDEZ; LARA-MARTÍN, 2017;

CHITESCU *et al.*, 2012; GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2013; MARTÍNEZ-PIERNAS *et al.*, 2018; POPOVA; MORRA; PARIKH, 2019; XU *et al.*, 2015).

2.4.1.4 Validação dos Métodos Analíticos

O método analítico baseado em SPE e UHPLC-QqLIT para a análise de água subterrânea e o método baseado em ELP e UHPLC-QqLIT para a análise de solo foram submetidos à validação para verificar a adequabilidade dos mesmos para a análise dos analitos em estudo nas respectivas matrizes. Para isso, foi realizada a determinação dos parâmetros recuperação, repetibilidade, efeito matriz, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Os métodos analíticos foram capazes de realizar a análise simultânea de diferentes classes de antibióticos. Os valores de recuperação obtidos foram maiores que 60% para a maioria dos analitos. A repetibilidade obtida foi menor que 20% para a maioria dos analitos, indicando boa precisão dos métodos. O efeito matriz (EM), que pode causar supressão no sinal analítico (quando <100%) ou aumento (quando >100%) variou de 44 a 386% para água subterrânea e de 22,1 a 281,2% para solo. Estes resultados mostram que alguns dos analitos estão sujeitos a intenso efeito matriz, e que por conta disso o método de quantificação deve ser capaz de corrigir este problema. Por isso, neste trabalho foi empregada a calibração por padrão interno isotopicamente marcado, estratégia reconhecidamente capaz de fazer a correção do efeito matriz (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013). Desta forma, foi utilizado para cada analito o respectivo composto análogo isotopicamente marcado como padrão interno. Para os casos em que o composto análogo não estava disponível, um composto estruturalmente relacionado, com grupos funcionais semelhantes, foi utilizado, garantindo assim a correção do efeito matriz. A linearidade obtida para os analitos ficaram na faixa de 0,5 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ com $r^2 > 0,99$ mostrando bom ajuste dos dados experimentais com o modelo matemático da regressão linear. Foram obtidos LDs na faixa de 0,06 a 2,26 ng L^{-1} para água subterrânea e 0,03 a 3,1 ng g^{-1} para solo, indicando capacidade para a detecção dos analitos em estudo em baixa concentração. Já os LQs obtidos, ficaram na faixa de 0,19 a 7,54 ng L^{-1} para água subterrânea e 0,1 e 10,2 ng g^{-1} para solo. As informações detalhadas contendo os valores dos parâmetros de validação para cada analito estão reunidas na **Tabela 20** para água subterrânea e na **Tabela 21** para solo.

Tabela 20 - Parâmetros da validação para água subterrânea. n=3.

Antibióticos	Recuperação, %	EM, %	Linearidade (r ²)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)
	(DPR, %) 10,0 ng L ⁻¹				
Tiamulina	72,7 (9,7)	80,8	0,9978	0,06	0,19
Florfenicol	97,2 (4,2)	91,2	0,9968	0,25	0,82
Clindamicina	46,8 (18,7)	80,0	0,9971	0,19	0,64
Trimetoprima	105,4 (9,9)	55,0	0,9967	0,06	0,20
Tetraciclina	66,8 (14,4)	123,1	0,9967	0,37	1,24
Oxitetraciclina	64,8 (22,6)	131,1	0,9913	0,67	2,22
Doxiciclina	59,8 (4,5)	140,2	0,9939	2,26	7,54
Clortetraciclina	71,5 (4,4)	133,4	0,9969	0,51	1,70
Ciprofloxacina	50,4 (15,0)	263,8	0,9954	0,42	1,39
Enrofloxacina	39,5 (15,6)	150,4	0,9955	0,15	0,50
Marbofloxacina	40,9 (17,7)	87,4	0,9988	0,14	0,45
Norfloxacina	44,5 (9,3)	378,2	0,9982	0,41	1,36
Cefalexina	68,5 (12,9)	109,6	0,9985	0,18	0,60
Ceftiofur	64,1 (22,9)	96,5	0,9996	0,16	0,52
Ampicilina	48,3 (36,4)	84,7	0,9941	0,98	3,26
Penicilina V	30,3 (19,8)	89,4	0,9948	0,67	2,15
Amoxicilina	13,3 (19,1)	95,2	0,9960	0,85	0,25
Ácido pipemídico	44,7 (9,0)	122,6	0,9926	0,10	0,34
Azitromicina	76,5 (35,4)	313,8	0,9941	0,11	0,36
Claritromicina	73,3 (3,9)	67,2	0,9901	0,13	0,43
Tilmicosina	107,2 (6,5)	268,2	0,9955	0,10	0,34
Sulfametoxazol	49,6 (24,1)	78,5	0,9962	0,14	0,48
Sulfametazina	45,1 (22,3)	66,3	0,9979	0,09	1,92
Sulfadiazina	49,6 (23,0)	44,1	0,9975	0,58	1,92
Sulfapiridina	61,9 (33,8)	46,3	0,9757	0,13	0,43
Metronidazol	27,3 (3,3)	76,2	0,9972	0,10	0,32
Metronidazol-OH	13,2 (5,7)	96,0	0,9982	0,89	0,27
Virginiamicina M	75,6 (13,7)	92,8	0,9978	0,76	2,52
Virginiamicina S	106,1 (8,5)	78,4	0,9987	0,08	0,28

Tabela 21 - Parâmetros da validação para solo. n=3.

Antibióticos	Recuperação, % (DPR, %)			EM, %	Linearidade (r^2)	LD (ng g ⁻¹)	LQ (ng g ⁻¹)
	10,0 ng g ⁻¹	30,0 ng g ⁻¹	50,0 ng g ⁻¹				
Ceftiofur	42,9 (2,8)	48,2 (3,8)	30,5 (9,2)	96,3	0,9993	0,2	0,8
Trimetoprima	128,7 (7,2)	151,1 (3,1)	138,9 (8,8)	59,4	0,9987	0,1	0,4
Enrofloxacina	35,5 (14,0)	32,9 (18,1)	26,7 (15,7)	281,2	0,9925	0,5	1,7
Marbofloxacina	34,7 (4,4)	39,2 (15,1)	38,6 (15,6)	123,7	0,9964	0,3	0,9
Monensin	22,5 (15,9)	23,2 (8,0)	21,2 (3,0)	29,1	0,9991	0,06	0,2
Salinomycin	31,4 (27,9)	55,8 (5,0)	55,1 (3,4)	82,5	0,9988	0,3	0,9
Clindamicina	127,7 (4,7)	154,4 (2,6)	152,4 (4,5)	96,8	0,9983	0,1	0,3
Lincomicina	109,0 (2,8)	120,3 (7,1)	115,5 (1,5)	74,8	0,9986	0,5	1,7
Claritromicina	116,3 (11,7)	157,1 (4,1)	151,3 (6,9)	56,9	0,9958	0,2	0,8
Metronidazol	25,9 (16,7)	27,8 (3,6)	27,3 (9,5)	76,5	0,9976	0,2	0,8
Florfenicol	50,8 (6,1)	61,8 (10,3)	66,9 (6,8)	70,3	0,9978	0,4	1,2
Tiamulina	99,3 (9,1)	129,3 (4,0)	131,7 (9,1)	63,8	0,9982	0,06	0,2
Ácido pipemídico	10,0 (0,6)	10,3 (3,5)	11,3 (3,9)	168,2	0,9868	0,7	2,4
Virginiamicina M	66,2 (2,3)	63,1 (7,2)	72,5 (2,1)	120,0	0,9970	0,03	0,1
Virginiamicina S	72,7 (3,6)	82,4 (0,6)	87,9 (0)	96,5	0,9989	0,4	1,2
Sulfadiazina	114,7 (4,8)	127,7 (14,2)	121,4 (2,9)	61,0	0,9969	0,09	0,3
Sulfametazina	106,2 (1,8)	111,7 (1,3)	112,4 (5,4)	72,4	0,9987	0,06	0,2
Sulfametoxazol	119,7 (2,9)	139,3 (2,1)	142,8 (4,1)	79,5	0,9976	0,06	0,2
Sulfapiridina	122,3 (19,6)	140,0 (11,5)	117,3 (8,7)	60,8	0,9957	0,1	0,5
Clortetraciclina	18,4 (6,5)	24,3 (3,6)	29,3 (26,0)	22,1	0,9983	0,7	2,5
Doxiciclina	73,4 (4,4)	64,0 (13,1)	66,3 (19,7)	180,3	0,9962	1,4	4,8
Oxitetraciclina	18,8 (10,0)	14,8 (11,3)	21,9 (38,9)	117,5	0,9935	3,1	10,2
Tetraciclina	42,7 (12,3)	53,8 (8,7)	52,9 (21,8)	137,0	0,9983	2,1	7,0

2.4.1.5 Ocorrência dos Antibióticos nas Amostras Analisadas

Após a validação dos métodos analíticos, seis amostras de água subterrânea, cinco de vinhaça e nove de solo foram analisadas. Porém, nenhum dos antibióticos alvo deste estudo foi detectado. A ausência destes contaminantes nas amostras pode ser atribuída a vários fatores como a sua degradação durante o processo de produção de etanol combustível (WALTER *et al.*, 2020) ou à baixa frequência de uso de antibióticos neste processo. Na literatura científica há pouca informação sobre a degradação dos antibióticos durante o processo de fermentação. Porém, no processo de produção de etanol combustível a fermentação é realizada a uma temperatura de 32-34 °C em um pH de 3,8-4,5 com uma duração de 6-12 h (AMORIM *et al.*,

2011; DE OLIVA-NETO *et al.*, 2013) e essas condições favorecem a degradação de vários antibióticos, como tetraciclina (PENA *et al.*, 2000) e penicilinas (ISLAM; TOLEDO; HAMDY, 1999). Além disso, é bem conhecido que vários antibióticos são termolábeis (SVAHN; BJÖRKLUND, 2015), e a etapa de destilação ocorre a uma temperatura próxima de 110 °C (NASCIMENTO, 2015). Neste sentido, Walter e colaboradores estudaram a cinética de degradação da virginiamicina M1 em condições de destilação e verificaram uma degradação de 70% deste antibiótico submetido a 95 °C por 180 min (WALTER *et al.*, 2020). Outro estudo recente mostrou que a cefalosporina C pode ser removida de resíduos de fermentação quando submetido a alta temperatura, com uma redução de 72 e 87% a 60 e 90 °C respectivamente (CHU *et al.*, 2020). Outro exemplo, o ácido clavulânico, um antibiótico da classe dos β -lactâmicos, também apresenta rápida degradação quando submetido a alta temperatura (GÓMEZ-RÍOS *et al.*, 2019).

Desta forma, a ausência de antibióticos nas amostras pode ser devido a degradação ou pode ser ainda que as amostras analisadas não foram expostas a antibiótico devido ao fato de que a vinhaça empregada na fertirrigação era proveniente de etanol no qual não foi empregado o uso de antibiótico em sua produção. Com isso, os resultados obtidos neste estudo, são um indicativo pontual da ausência destes antibióticos, não servindo para a generalização do fato de que a fertirrigação com vinhaça não é uma fonte relevante de antibióticos para o meio ambiente. Como visto no Capítulo 1, no qual método específico para análise de antibiótico em vinhaça foi desenvolvido, a monensina foi detectada em amostra de vinhaça a uma concentração de 14,3 ng mL⁻¹. Para conclusões mais robustas a respeito do impacto do uso de vinhaça contaminada com antibióticos seria necessário realizar amostragem de vinhaça em quantidade representativa com o objetivo de se conhecer o montante de vinhaça contaminada que anualmente é dispersada nas plantações de cana-de-açúcar.

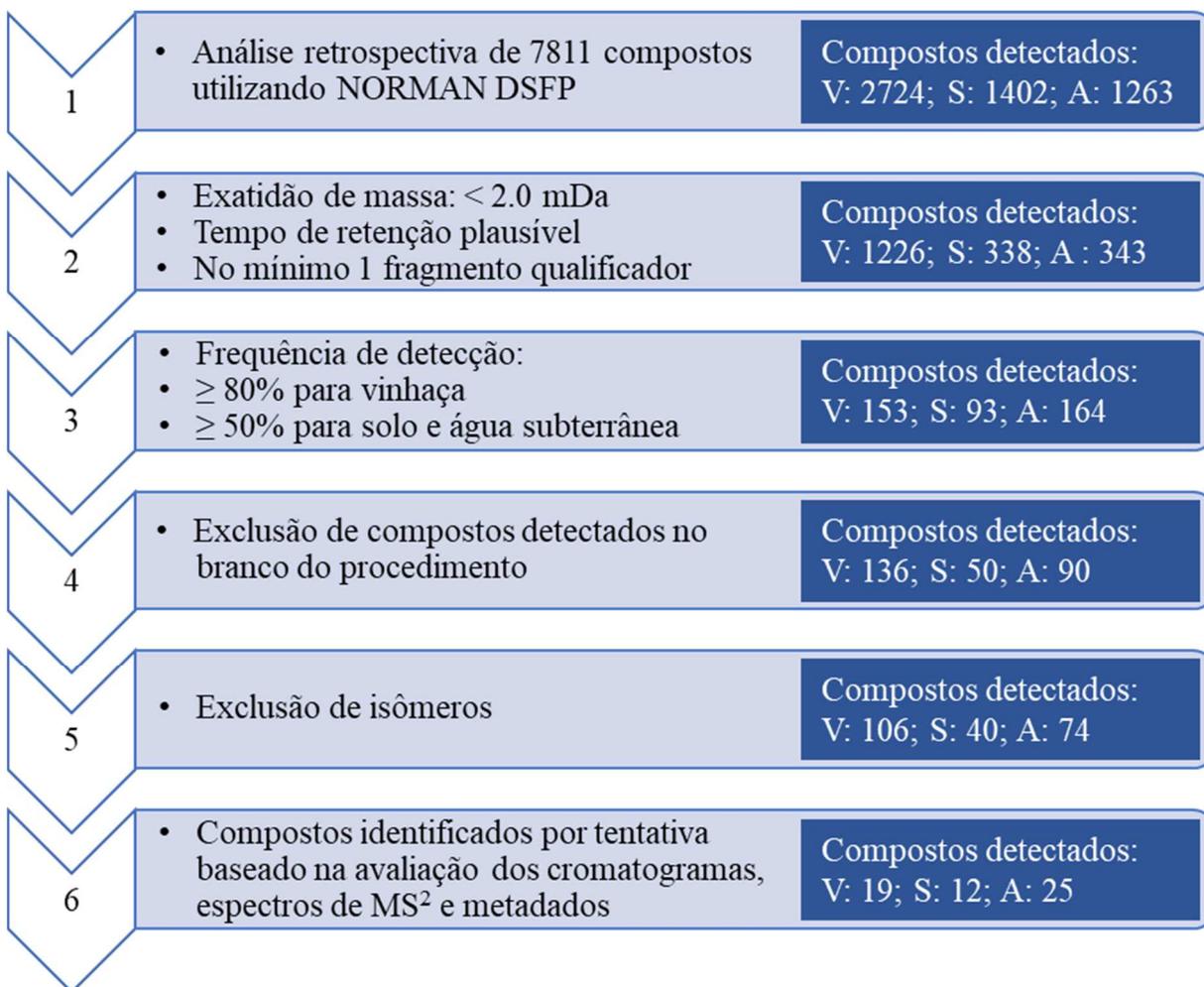
2.4.2 Análises Qualitativas por LC-HRMS

2.4.2.1 Identificação de Compostos Suspeitos em Vinhaça, Solo e Água Subterrânea

A presença de 7811 compostos de relevância ambiental como pesticidas, compostos farmacêuticos, conservantes, corantes, surfactantes e uma longa lista de compostos químicos industriais e produtos de transformação foram investigados nas amostras analisadas por meio da análise retrospectiva utilizando a plataforma Norman DSFP, como descrito na **seção 2.3.7**.

As etapas do processo de identificação, juntamente com o número de compostos detectados na vinhaça (V), solo (S) e água subterrânea (A) em cada etapa de identificação, estão resumidas na **Figura 52**.

Figura 52 - Etapas do processo de identificação e número de suspeitos detectados após cada etapa em cada matriz.



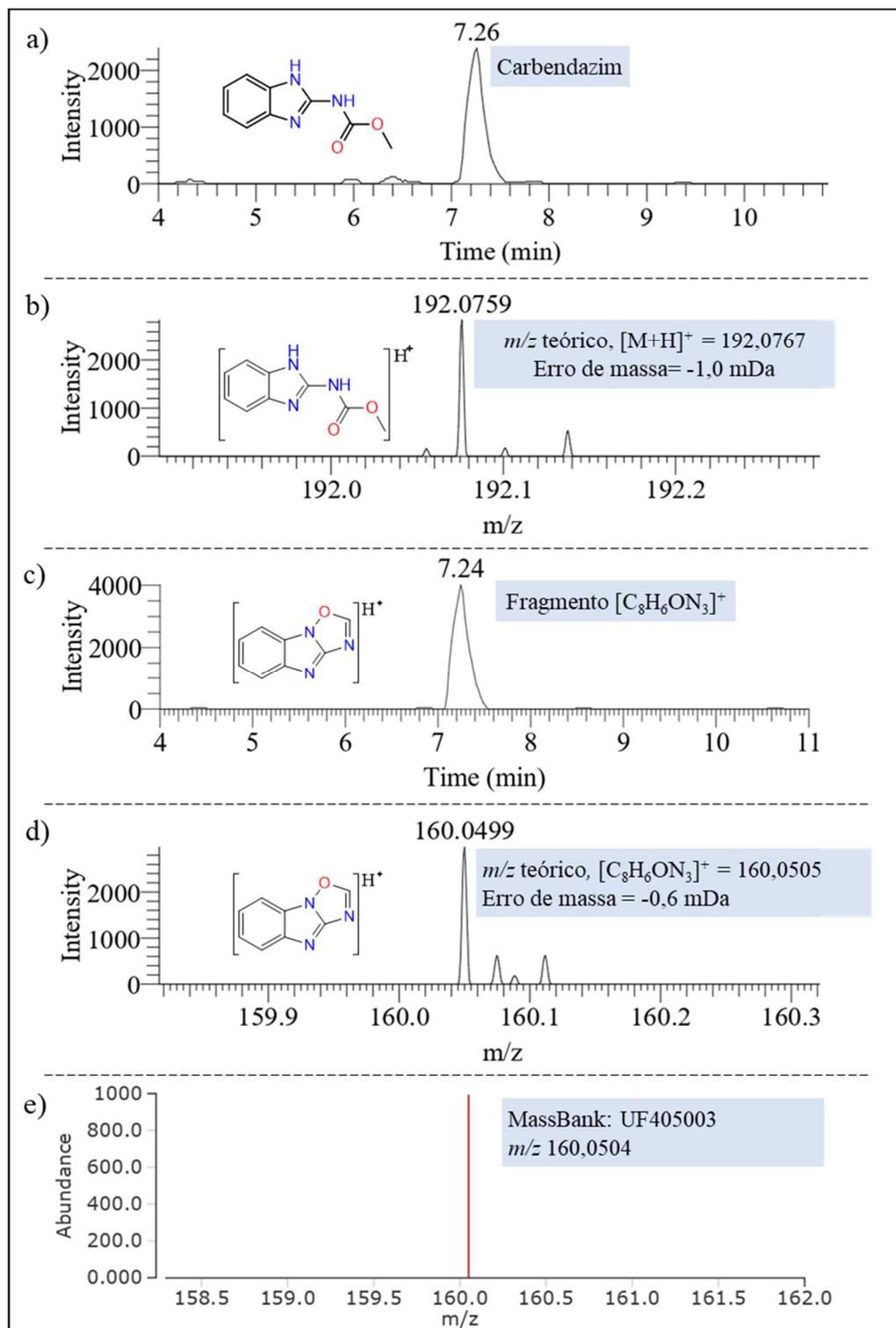
Como pode ser visto na **Figura 52**, 1226 compostos suspeitos foram detectados na vinhaça, atendendo aos requisitos (*threshold*) de exatidão de massa, tempo de retenção plausível de acordo com o modelo de predição de tempo de retenção, e a presença de no mínimo um fragmento qualificador esperado para o composto. No caso do solo e da água subterrânea, nesta etapa foram detectados 338 e 343 compostos respectivamente. Devido ao grande número de compostos suspeitos detectados, e com o objetivo de focar os esforços na identificação de compostos de grande incidência nas amostras, e desta forma com maior relevância ambiental, a frequência de detecção (FD) foi utilizada como um critério para priorizar os compostos a serem avaliados em maior profundidade. Após esta etapa, e após a exclusão dos compostos

suspeitos detectados no branco do procedimento, o número de compostos suspeitos detectados foram 136 na vinhaça, 50 no solo e 90 na água subterrânea. Nesta etapa, foi possível verificar a detecção de compostos suspeitos tendo a mesma fórmula molecular, tempo de retenção e alguns fragmentos comuns. Para estes compostos, apenas uma estrutura foi priorizada para posterior avaliação. Esta priorização foi feita considerando os dados de espectros de MS² e os dados de mercado disponíveis para cada suspeito, como descrito na literatura por Gago-Ferrero e colaboradores (GAGO-FERRERO *et al.*, 2018). Por último, os cromatogramas e espectros de MS² para cada composto suspeito, remanescente após as várias etapas de seleção baseada em critérios pré-estabelecidos, foram avaliados em profundidade. Parâmetros como pico cromatográfico bem definido, tempo de retenção coincidente para um mesmo composto detectado em amostras diferentes, presença do fragmento qualificador no tempo de retenção do respectivo composto suspeito e comparação com biblioteca de MS² do MassBank (quando disponível) foram utilizados para a conclusão final do processo de identificação por tentativa. Após este processo, foi possível a identificação por tentativa de 19 compostos na vinhaça, 12 no solo e 25 nas amostras de água subterrânea. A metodologia, para a identificação por tentativa dos compostos suspeitos, descrita anteriormente segue exemplificada a seguir para o composto carbendazim, identificado por tentativa nas amostras de solo.

O carbendazim (C₉H₉N₃O₂) é um fungicida que não tem registro no Brasil para uso na cultura da cana-de-açúcar. Porém, este composto é um metabólito do fungicida tiofanato-metílico, fungicida registrado para uso no Brasil na cultura de cana-de-açúcar, o qual foi detectado em seis das nove amostras de solo analisadas. O aduto protonado do carbendazim [C₉H₁₀N₃O₂]⁺ (*m/z* 192,0767) foi detectado dentro da exatidão de massa definida de 2 mDa, no modo *full scan* em baixa energia de colisão, com um pico cromatográfico bem definido no tempo de retenção de 7,26 min, como pode ser visto na **Figura 53-a** (cromatograma) e na **Figura 53-b** (espectro de massas). Este composto apresentou um tempo de retenção em concordância com o modelo de predição de tempo de retenção e o fragmento qualificador (diagnóstico) *m/z* 160,0499 correspondente ao fragmento [C₈H₆ON₃]⁺ também foi detectado no mesmo tempo de retenção que o carbendazim **Figura 53-c**. O fragmento [C₈H₆ON₃]⁺ aparece como sendo o único íon produto gerado na fragmentação do carbendazim em todas os registros presentes no MassBank obtidos em energia de colisão similar. A comparação entre o fragmento detectado para o carbendazim e o fragmento contido na biblioteca do MassBank (registro UF405003) pode ser vista na **Figura 53-d** e **Figura 53-e**. Desta forma, este composto foi identificado por tentativa no nível 2 (provável estrutura) de acordo com os critérios definidos

por Schymanski e colaboradores (SCHYMANSKI *et al.*, 2014). Além disso, a maioria dos compostos suspeitos foram identificados até o nível 3 (*tentative candidates*) devido à ausência de bibliotecas para a comparação.

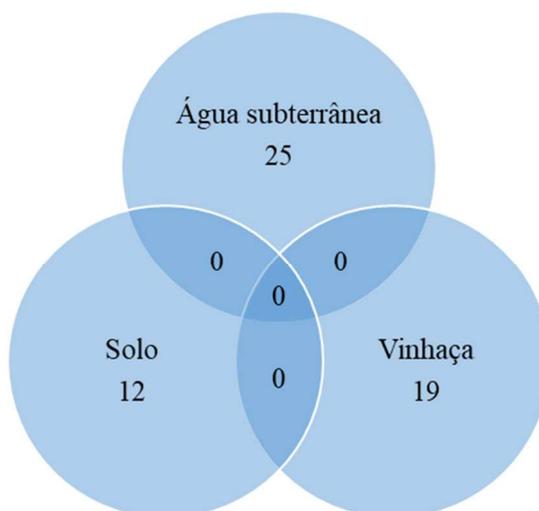
Figura 53 - Identificação do carbendazim nas amostras de solo: a) cromatograma de íons extraídos (XIC) para o correspondente $[M+H]^+$ (± 2 mDa); b) espectro de massas contendo o correspondente $[M+H]^+$; c) XIC para o fragmento qualificador (m/z 160.0499) em alta energia de colisão (35eV) e o respectivo espectro de massas em d. e) Espectro de MS^2 do carbendazim obtido do MassBank (registro UF405003).



2.4.2.2 Relevância Ambiental e Distribuição dos Compostos Identificados por Tentativa na Vinhaça, Solo e Água Subterrânea.

No total, 56 compostos foram identificados nas diferentes matrizes estudadas, sendo que a distribuição destes compostos pode ser vista na **Figura 54**. Como pode ser visto nesta figura, nenhum dos compostos identificados foi detectado simultaneamente em mais de uma matriz. Desta forma não foram obtidas evidências da transferência de contaminantes orgânicos da vinhaça para as matrizes ambientais. Apesar disso, a metodologia aplicada para a investigação de compostos suspeitos permitiu a identificação de vários contaminantes orgânicos com diferentes propriedades e usos, fornecendo uma visão qualitativa da ocorrência destes contaminantes nas amostras analisadas.

Figura 54 - Distribuição dos compostos detectados nas matrizes.



Os compostos detectados nas amostras de solo e de água subterrânea não estão diretamente relacionados com o uso da vinhaça como fertilizante. Na realidade, a principal origem destes contaminantes parece estar relacionada com as práticas da agricultura moderna, sendo que a maioria dos contaminantes detectados são agrotóxicos ou substâncias relacionadas. Além de agrotóxicos ou substâncias relacionadas, também foram detectados aditivos alimentares, compostos de ocorrência natural e outros compostos de uso industrial. Informações detalhadas sobre os compostos detectados em cada matriz e sua relevância ambiental podem ser obtidas na sequência.

2.4.2.2.1 Vinhaça

Nas amostras de vinhaça, 19 contaminantes foram identificados por tentativa incluindo diferentes classes como aditivos alimentares (2), metabólitos de organismos vivos (8) agrotóxicos ou compostos relacionados (6) e 3 outros compostos. A lista dos compostos detectados nas amostras de vinhaça, incluindo o tempo de retenção, fórmula molecular, o aduto e os fragmentos de MS² detectados e outras informações relacionadas ao uso de cada composto pode ser vista na **Tabela 22**. Entre os contaminantes detectados, compostos como fenuron, isoxabem e 3-cetocarbofurano (um produto de transformação dos agrotóxicos carbosulfano, carbofurano e benfuracarbe) estão entre os compostos detectados que geram maior preocupação ambiental, pois são classificados como Classe III de acordo com o Limiar de Preocupação Toxicológica (TTC - do inglês *Threshold of Toxicological Concern*) (LEWIS *et al.*, 2016), sugerindo significativa toxicidade.

Estes compostos são utilizados na agricultura moderna para combater organismos que podem trazer dano à agricultura como ervas daninhas, insetos e nematoides. Embora sua transferência para os corpos de água seja possível, estes compostos são classificados como não persistentes no ambiente, como resultado da sua degradação (CAMPER; KIM; RILEY, 2001; LEWIS *et al.*, 2016). Desta forma, sua detecção nas amostras de água e solo é pouco provável e pode explicar o fato destes compostos não terem sido detectados nas amostras de solo e água. Assim, apesar da vinhaça conter resíduos de agrotóxicos, seu uso na fertirrigação não representa um risco adicional para a disseminação destes compostos no meio ambiente.

Os compostos detectados na vinhaça classificados como aditivos alimentares correspondem a compostos fenólicos e metabólitos de plantas, os quais são utilizados na indústria de alimentos como aromatizantes e conservantes (KIM *et al.*, 2019b). Sua ocorrência na vinhaça está explicada no fato de que estas substâncias ocorrem naturalmente na cana-de-açúcar ou são formadas durante a produção de etanol (BARRERA; BETORET; SEGUÍ, 2020; RÍOS LEAL; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ; GALINDO, 1994). Por se tratar de substâncias de ocorrência natural e baixa toxicidade, sua dispersão nas plantações por meio da fertirrigação, a primeiro momento, não despertam preocupação. Outro grupo de substância detectadas foram os metabólitos de organismos vivos. Estas substâncias são de ocorrência natural no meio ambiente, sendo metabólitos de organismos vivos, como plantas, bactérias e fungos, como pode ser visto na **Tabela 22**. Algumas destas substâncias, como o ácido cafeico, e ácido p-cumárico já foram detectados anteriormente em cana-de-açúcar (BARRERA; BETORET; SEGUÍ,

2020), assim como as micotoxinas, que tem sua origem na contaminação da cana-de-açúcar por fungos durante o armazenamento antes de moagem para a extração do caldo. (IAMANAKA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019). A presença das micotoxinas aflatoxina B e citrinina na vinhaça gera preocupação ambiental devido prática de fertirrigação, pois estas substâncias são reconhecidamente tóxicas (OSTRY; MALIR; RUPRICH, 2013). Porém, nenhuma evidência da transferência destas micotoxinas para o solo e águas subterrâneas foi obtida.

Tabela 22 - Detalhes dos compostos identificados por tentativa na vinhaça, nível de confiança 3 (*tentative candidate*) (SCHYMANSKI *et al.*, 2014).

Composto, fórmula e aduto detectado	t_R (min)	Fragmentos (MS²)	Principal uso / Ocorrência	Classe
Fenuron, C ₉ H ₁₂ N ₂ O, [M+H] ⁺	6,04	120,0438 72,04378	Herbicida	Agrotóxico
Ácido indolacético, C ₁₀ H ₉ NO ₂ , [M+H] ⁺	6,18	158,0591 130,0642	Regulador de crescimento. Também é um metabólito de plantas, atuando como hormônio.	Agrotóxico
Isoxabem, C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₄ , [M-H] ⁻	9,84	93,0334	Herbicida	Agrotóxico
Ácido quinolínico, C ₇ H ₅ NO ₄ , [M-H] ⁻	2,53	94,02846	Usado na fabricação do herbicida imazapir e do ácido nicotínico.	Relacionado com agrotóxico
Acetoacetato de metila, C ₅ H ₈ O ₃ , [M-H] ⁻	3,77	99,04357 85,02793	Agente aromatizante. Utilizado na síntese de substâncias como antibiótico, herbicida, entre outras.	Relacionado com agrotóxico
5-metoxindol, C ₉ H ₉ NO, [M+H] ⁺	6,23	133,0512	Utilizado na síntese de produtos como perfumes, agrotóxicos, fármacos e corantes.	Relacionado com agrotóxico
3-ceto-carbofurano, C ₁₂ H ₁₃ NO ₄ , [M+H] ⁺	6,36	177,0533 179,0687 133,064	Produto de transformação dos agrotóxicos carbofurano, carbosulfano e benfuracarbe.	Relacionado com agrotóxico
Bendiocarbe, C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ , [M+H] ⁺	5,90	167,0683 109,0278 81,0330	Inseticida utilizado na saúde pública.	Pesticida
4-hidroxibenzaldeído, C ₇ H ₆ O ₂ , [M+H] ⁺	5,60	95,04854	Agente aromatizante. Metabólito de plantas.	Aditivo alimentar
Etil 3,4-dihidroxibenzoato, C ₉ H ₁₀ O ₄ , [M+H] ⁺	6,23	121,0641 111,0435 137,0224	Antioxidante. Metabólito de plantas.	Aditivo alimentar
Glucoronolactona, C ₆ H ₈ O ₆ , [M-H] ⁻	2,45	157,012 113,0226 131,033	Substância de ocorrência natural. É um componente estrutural presente no tecido conjuntivo.	Metabólito de organismos vivos
Ácido cafeico, C ₉ H ₈ O ₄ , [M+H] ⁺	3,78	163,038	Encontrado em todas as plantas.	Metabólito de organismos vivos
Leucilprolina, C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃ , [M+H] ⁺	3,93	116,0700 70,06482	Dipeptídeo.	Metabólito de organismos vivos
2,5-Dihidroxibenzaldeído, C ₇ H ₆ O ₃ , [M-H] ⁻	5,00	109,0281 109,0314	Ocorre em todos os organismos vivos, desde bactérias até humanos.	Metabólito de organismos vivos

Composto, fórmula e aduto detectado	t_R (min)	Fragmentos (MS²)	Principal uso / Ocorrência	Classe
3,4-Diidroxifenilacetona C ₉ H ₁₀ O ₃ , [M+H] ⁺	5,79	149,0592 121,0641 131,0483	Encontrado em alimentos de origem animal. Componente de fumaça de madeira.	Metabólito de organismos vivos
3,3,4,5,7-pentahidroxiavona, C ₁₅ H ₁₀ O ₇ , [M-H] ⁻	5,95	229,0512	Onipresente em fontes de alimentos vegetais. Usado em tinturas, como medicamento veterinário e antioxidante em cosméticos.	Metabólito de organismos vivos
Aflatoxina B1, C ₁₇ H ₁₂ O ₆ , [M+H] ⁺	7,06	157,0639	Micotoxina	Metabólito de organismos vivos
Citrinina C ₁₃ H ₁₄ O ₅ , [M-H] ⁻	7,4	175,0375 135,0792 189,0543	Micotoxina	Metabólito de organismos vivos
Etil 5-amino-1-(1,3-dimetil-4-nitropirazol-5-il) pirazol-4-carboxilato, C ₁₁ H ₁₄ N ₆ O ₄ , [M+H] ⁺	6,41	162,0537 175,0854 107,0486	-	Outros

2.4.2.2.2 Solo e Água Subterrânea

No total, foram identificados por tentativa 12 compostos nas amostras de solo e 25 nas amostras de água subterrânea. A lista dos compostos identificados contendo detalhes como tempo de retenção, fórmula molecular, adutos e fragmentos de MS^2 detectados e informações relacionadas ao uso de cada composto pode ser vista na **Tabela 23** para solo e na **Tabela 27** para água subterrânea. Como mencionado anteriormente, nenhum destes compostos foram detectados nas amostras de vinhaça, da mesma forma que a detecção de nenhum composto coincidiu nas amostras de água subterrânea e solo **Figura 54**. Isso pode ser explicado pelo transporte e ocorrência dos compostos ao longo da coluna de solo que são influenciados pelas propriedades do solo (tipo de solo e teor de matéria orgânica presente, sendo que os poluentes orgânicos apresentam baixo potencial de lixiviação em solos com elevada quantidade de matéria orgânica), condições climáticas (a quantidade de chuva afeta a lixiviação), ou mesmo pela limitação dos métodos analíticos empregados, os quais utilizaram diferentes métodos de preparo de amostras para as matrizes, o que afeta diretamente a detectabilidade. Além disso, as amostras de água subterrânea analisadas estão susceptíveis a outras fontes de contaminação devido à destinação rudimentar do esgoto doméstico realizada nas propriedades rurais.

O transporte de compostos orgânicos ao longo da coluna de solo depende de vários fatores, como sua reatividade, solubilidade, capacidade de ionização (predita pelo pK_a) e, portanto, da interação eletrostática entre o composto ionizado e sítios de adsorção também carregados no solo, ou ainda, da hidrofobicidade (predita por $\log K_{ow}$ e $\log K_{oc}$). Compostos com alta solubilidade em água, elevada polaridade ($\log K_{ow} < 1$) e ionizáveis no pH do solo, tem maior capacidade para migrar ao longo da coluna de solo e alcançar a água subterrânea. Por outro lado, compostos com baixa solubilidade em água, baixa polaridade ($\log K_{ow} > 1$) e neutros no pH do solo tende a adsorver no solo (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015).

Como indicado na **Tabela 25**, a maioria dos compostos detectados no solo tem valores de $\log K_{ow}$ maiores que 1, indicando baixa polaridade e por consequência baixa mobilidade ao longo da coluna de solo. Além disso, os compostos detectados estão protonadas ou na forma neutra no pH do solo, potencializando sua adsorção e retenção no solo. Por outro lado, os compostos detectados com os menores valores de $\log K_{ow}$ e maior solubilidade em água foram detectados nas amostras de água subterrânea, como indicado na **Tabela 26**. Outros compostos, com $\log K_{ow}$ maiores que 1 e moderada ou baixa solubilidade, como pirimicarbe, propiconazol e crotamiton, também foram detectados nas amostras de água subterrâneas, fato já relatado em trabalhos anteriores (GONÇALVES; DA SILVA; ALPENDURADA, 2007; KURODA *et al.*, 2012; MILHOME *et al.*, 2015), refletindo assim, a

complexidade dos múltiplos fatores que afetam a mobilidade de contaminantes orgânicos no meio ambiente.

Nas amostras de solo, 58% dos compostos identificados por tentativa são agrotóxicos ou compostos relacionados com agrotóxicos, como descrito na **Tabela 23**. Já nas amostras de água subterrânea, 36% dos compostos identificados pertencem a esta classe de contaminantes (**Tabela 24**), refletindo assim o impacto das atividades agrícolas nas áreas estudadas. Alguns destes compostos são largamente utilizados na agricultura brasileira, como o herbicida metribuzin e o fungicida carbendazim, que também é um produto de transformação do fungicida tiofanato-metílico, os quais já foram detectados em amostras ambientais em estudos anteriores (DORES *et al.*, 2006; SCHEEL; TEIXEIRA TARLEY, 2020). Desta forma, estes resultados indicam a presença de contaminantes relacionados à atividade agrícola. Porém, é necessário a implementação de estudos regulares de monitoramento da contaminação das águas subterrâneas, empregando métodos quantitativos, para avaliar o risco imposto pela contaminação desta matriz por agrotóxicos. Além dos contaminantes de origem agrícola, outras substâncias de uso industrial, presentes em produtos de uso doméstico, também foram identificados por tentativa nas amostras de água subterrâneas, indicando que há múltiplas fontes de contaminação, além das atividades agrícolas, como esgoto doméstico.

Tabela 23 - Detalhes dos compostos identificados por tentativa no solo, nível de confiança 3 (*tentative candidate*) (SCHYMANSKI *et al.*, 2014).

Composto, fórmula e aduto detectado	t _R (min)	Fragmentos (MS ²)	Principal uso / Ocorrência	Classe
Metamitron C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O, [M+H] ⁺	6,00	175,0979	Herbicida.	Agrotóxico
Simeton C ₈ H ₁₅ N ₅ O, [M+H] ⁺	7,16	114,0662	Herbicida.	Agrotóxico
Carbendazim* C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ , [M+H] ⁺	7,26	160,0504	Fungicida. Também um produto de transformação do fungicida tiofanato-metílico.	Agrotóxico
Atraton C ₉ H ₁₇ N ₅ O, [M+H] ⁺	7,31	170,1032 / 114,0661	Herbicida.	Agrotóxico
Ácido indolbutírico C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ , [M+H] ⁺	7,55	186,0915 / 130,0647	Regulador de crescimento vegetal.	Agrotóxico
2,6-xilidina C ₈ H ₁₁ N, [M+H] ⁺	5,98	107,0731	Ocorre naturalmente em algumas folhas de tabaco e é usado na produção de outros produtos químicos, como pesticidas, corantes, medicamentos e fragrâncias	Relacionado com agrotóxico
Metamitron-desamino C ₁₀ H ₉ N ₃ O, [M+H] ⁺	6,23	160,0867 / 119,0601	Produto de transformação herbicida metamitron	Relacionado com agrotóxico
Butanoato de butila C ₈ H ₁₆ O ₂ , [M+H] ⁺	8,54	89,05957	Agente aromatizante	Aditivo alimentar
Ácido 2-hidroxicinâmico C ₉ H ₈ O ₃ , [M-H] ⁻	4,02	119,0496	Agente aromatizante ou adjuvante. Presente em todos os organismos vivos.	Metabólito de organismos vivos
Diacetoxiscirpenol, C ₁₉ H ₂₆ O ₇ , [M+H] ⁺	6,10	123,0804	Micotoxina	Metabólito de organismos vivos
Daidzeína C ₁₅ H ₁₀ O ₄ , [M-H] ⁻	8,54	224,0470 / 209,0602	Isoflavona. Encontrado em várias plantas, com destaque para a soja.	Metabólito de organismos vivos
Formononetina C ₁₆ H ₁₂ O ₄ , [M-H] ⁻	8,56	252,0419	Abundante em vegetais	Metabólito de organismos vivos

* Identificado com nível de confiança 2 (provável estrutura), de acordo com (SCHYMANSKI *et al.*, 2014).

Tabela 24 - Detalhes dos compostos identificados por tentativa em água subterrânea, nível de confiança 3 (*tentative candidate*) (SCHYMANSKI *et al.*, 2014).

Composto, fórmula e aduto detectado	t_R (min)	Fragmentos (MS²)	Principal uso / Ocorrência	Classe
Pirimicarbe C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂ , [M+H] ⁺	6,29	109,0755	Inseticida.	Agrotóxico
Aminocarbe C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂ , [M+H] ⁺	6,65	152,1057	Inseticida.	Agrotóxico
Sebutilazina C ₉ H ₁₆ Cl ₁ N ₅ , [M+H] ⁺	12,01	174,0525	Herbicida.	Agrotóxico
Propiconazol C ₁₅ H ₁₇ C ₁₂ N ₃ O ₂ , [M+H] ⁺	13,07	158,9751	Fungicida.	Agrotóxico
Trietanolamina C ₆ H ₁₅ NO ₃ , [M+H] ⁺	2,70	70,0647	Utilizado na fabricação de agroquímicos, cosméticos, detergentes domésticos, processamento de papel e madeira, plastificantes e outros usos.	Relacionado com agrotóxico
Hexametilenotetramina C ₆ H ₁₂ N ₄ , [M+H] ⁺	2,82	85,07558	Utilizado na produção de plástico, borracha e produtos agrícolas.	Relacionado com agrotóxico
Tolifluanida DMST C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₂ S, [M+H] ⁺	6,35	151,1216	Produto de transformação do fungicida Tolifluanida.	Relacionado com agrotóxico
Diceto metribuzin C ₇ H ₁₂ N ₄ O ₂ , [M+H] ⁺	6,46	69,06931	Produto de transformação do herbicida metribuzin	Relacionado com agrotóxico
Óxido de decilamina C ₁₂ H ₂₇ NO, [M+H] ⁺	9,44	184,2045	Tensoativo, produtos agrícolas (não pesticidas), produtos para lavagem de roupa e louça, entre outros.	Relacionado com agrotóxico
Óxido de decilamina 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzil álcool C ₁₅ H ₂₄ O ₂ , [M-H] ⁻	12,42	217,1572 160,0871	Aditivo alimentar: antioxidante.	Aditivo alimentar
Pentaetilenoglicol C ₁₀ H ₂₂ O ₆ , [M+H] ⁺	6,29	151,0954 107,0696	Fluidos funcionais, ajustadores de viscosidade.	Uso industrial
Tetrapropilenoglicol C ₁₂ H ₂₆ O ₅ , [M+H] ⁺	7,79	117,0902	Fluidos industriais, mineração.	Uso industrial
Sebacato de dimetila C ₁₂ H ₂₂ O ₄ , [M+H] ⁺	7,88	95,08503	Utilizado na produção de estabilizadores de luz. Plastificante, amaciante e solvente para resinas celulósicas, resinas sintéticas e borrachas.	Uso industrial
Pentapropilenoglicol C ₁₅ H ₃₂ O ₆ , [M+H] ⁺	8,29	117,0905	Anticongelante, anticorrosão, fabricação de resina.	Uso industrial
2-(2-(2-butoxi) etoxi) etanol C ₁₀ H ₂₂ O ₄ , [M+H] ⁺	8,62	151,0952	Utilizado em combustíveis e aditivos, fluidos funcionais, lubrificantes, exploração de petróleo e gás, fabricação de tintas, solventes, agentes tensoativos.	Uso industrial

Composto, fórmula e aduto detectado	t_R (min)	Fragmentos (MS²)	Principal uso / Ocorrência	Classe
Hexapropilenglicol C ₁₈ H ₃₈ O ₇ , [M+H] ⁺	8,86	117,0905 233,1725	Fluido de freio.	Uso industrial
Óxido de trifetilfosfina C ₁₈ H ₁₅ OP, [M+H] ⁺	10,70	201,0449 95,04862	Utilizado em retardantes de chama, como um catalisador de cura epóxi e, mais recentemente, para produzir nanoestruturas.	Uso industrial
Linoleato de glicerila C ₂₁ H ₃₈ O ₄ , [M+H] ⁺	13,25	263,2351 245,2242	Emoliente, emulsificante.	Uso industrial
Glicilprolina C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₃ , [M+H] ⁺	2,75	116,0700 70,06456	Metabólito.	Metabólito de organismos vivos
Ácido urocânico C ₆ H ₆ N ₂ O ₂ , [M+H] ⁺	4,06	121,039 93,04437	Metabólito.	Metabólito de organismos vivos
Verrucarol C ₁₅ H ₂₂ O ₄ , [M+H] ⁺	6,88	97,06424 143,0884	Micotoxina.	Metabólito de organismos vivos
Perilartine C ₁₀ H ₁₅ NO, [M+H] ⁺	7,54	124,0748 91,05399	Agente adoçante. É um composto orgânico natural encontrado nas plantas.	Metabólito de organismos vivos
Metil-(S)-3-(terc-butoxicarbonil)- 2,2-dimetil-4- oxazolidinocarboxilato C ₁₂ H ₂₁ NO ₅ , [M+H] ⁺	6,34	74,05965 100,0387	Utilizado na síntese de fármacos e esfingolipídios, é o amino açúcar encontrado na caliqueamicina. É um potente agente antitumoral.	Composto farmacêutico
Crotamiton C ₁₃ H ₁₇ NO, [M+H] ⁺	10,39	91,05383 134,059	Medicamento antipruriginoso e escabicida.	Composto farmacêutico
Desoxicarbadox C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ₂ , [M+H] ⁺	6,94	156,0576	Produto de transformação do agente de promoção de crescimento, antimicrobiano, carbadox.	Composto veterinário

Tabela 25 - Propriedades físico-químicas dos compostos detectados no solo (CHEMICALBOOK, 2020; CHEMSPIDER, 2020; KIM *et al.*, 2019b; WISHART *et al.*, 2018).

Composto, fórmula molecular	Log K_{ow}	K_{oc} (pH 5,5)	pK_a	Solubilidade em água
2,6-xilidina, C ₈ H ₁₁ N	1,86	174,11	3,95	8,2 g L ⁻¹ (25 °C)
Ácido 2-hidroxicinâmico, C ₉ H ₈ O ₃	0,751	9,16	4,04	1,15 g L ⁻¹
Atraton, C ₉ H ₁₇ N ₅ O	1,9	475,04	4,31	1,67 g L ⁻¹ (25 °C)
Butanoato de butila, C ₈ H ₁₆ O ₂	2,83	558,03	-	1,36 g L ⁻¹
Carbendazim, C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	1,52	47,3	4,48	<0,01 g L ⁻¹ (21 °C)
Daidzeína, C ₁₅ H ₁₀ O ₄	1,124	882,49	7,01	Insolúvel
Diacetoxiscirpenol, C ₁₉ H ₂₆ O ₇	1,33	138,36	-	Moderadamente solúvel
Formononetina, C ₁₆ H ₁₂ O ₄	1,44	993,92	6,99	Praticamente insolúvel
Ácido indolbutírico, C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	2,34	79,96	4,83	0,25 g L ⁻¹
Metamitron, C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O	0,83	70,57	1,54	1,8 g L ⁻¹ (20 °C)
Metamitron-Desamino, C ₁₀ H ₉ N ₃ O	2,1	10,15	-	0,4 g L ⁻¹ (20 °C)
Simeton, C ₈ H ₁₅ N ₅ O	2,21	335,75	4,6	3,2 g L ⁻¹ (21 °C)

Tabela 26 - Propriedades físico-químicas dos compostos detectados na água subterrânea (CHEMICALBOOK, 2020; CHEMSPIDER, 2020; KIM *et al.*, 2019b; WISHART *et al.*, 2018).

Composto, fórmula molecular	Log K_{ow}	K_{oc} (pH 5,5)	pK_a	Solubilidade em água
Pentapropilenoglicol, C ₁₅ H ₃₂ O ₆	-1,97	4,14	-	Miscível com água
Glicilprolina, C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₃	-1,34	1,0	3,61; 8,13	279 g L ⁻¹
Trietanolamina, C ₆ H ₁₅ NO ₃	-1,11	1,0	7,76	Solúvel
Pentaetilenoglicol, C ₁₀ H ₂₂ O ₆	-0,85	44,51	-	196,6 g L ⁻¹
Tetrapropilenoglicol, C ₁₂ H ₂₆ O ₅	-0,84	31,99	-	90,1 g L ⁻¹
Ácido urocânico, C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	-0,138	1,0	3,85; 6,13	1,5 g L ⁻¹ (17 °C)
Diceto metribuzin, C ₇ H ₁₂ N ₄ O ₂	0,22	8,65	10,06	12,4 g L ⁻¹
2-(2-(2-butoxi)etoxi) etanol, C ₁₀ H ₂₂ O ₄	0,28	37,08	-	Solúvel
Hexapropilenoglicol, C ₁₈ H ₃₈ O ₇	0,5	1190	-	20,8 g L ⁻¹
Tolifluanida DMST, C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	0,55	128,9	-	2,38 g L ⁻¹
Verrucarol, C ₁₅ H ₂₂ O ₄	0,7	88,87	-	6,25 g L ⁻¹
Pirimicarbe, C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	1,7	185,02	4,34	3,1 g L ⁻¹
Desoxicarbadox, C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ₂	1,72	188,07	8,36	
Metil-(S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidinocarboxilato, C ₁₂ H ₂₁ NO ₅	1,74	201,51	-	33,4 g L ⁻¹
Aminocarbe, C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	2,01	198,26	12,25	0,9 g L ⁻¹ (20 °C)
Crotamiton, C ₁₃ H ₁₇ NO	2,17	454,77	1,14	Praticamente insolúvel
Hexametilenotetramina, C ₆ H ₁₂ N ₄	2,17	51,53	5,1	895 g L ⁻¹ (20 °C)
Óxido de trifenilfosfina, C ₁₈ H ₁₅ OP	2,87	2374,32	-	0,40 g L ⁻¹
Sebacato de dimetila, C ₁₂ H ₂₂ O ₄	2,92	1091,47	-	Insolúvel em água
Óxido de decilamina 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzil álcool, C ₁₅ H ₂₄ O ₂	3,0	3191,23	-	0,13 g L ⁻¹
Sebutilazina, C ₉ H ₁₆ Cl ₁ N ₅	3,16	942,64	2,50	0,12 g L ⁻¹
Perilartine, C ₁₀ H ₁₅ NO	3,33	652,65	11,4; 3,51	0,26 g L ⁻¹
Propiconazol, C ₁₅ H ₁₇ C ₁₂ N ₃ O ₂	3,88	1941,84	2,94	0,10 g L ⁻¹ (20 °C)
Óxido de decilamina, C ₁₂ H ₂₇ NO	4,15	517,13	4,79	0,55 g L ⁻¹
Linoleato de Glicerila, C ₂₁ H ₃₈ O ₄	6,81	38079,21	13,16	Praticamente insolúvel

2.5 Conclusão

Não foram detectados antibióticos nas amostras de vinhaça, solo e água subterrânea, indicando que estes compostos não são regularmente utilizados na produção de etanol ou que os mesmos se degradam no processo. No entanto, estudos contendo maior amostragem são necessários para confirmar estas hipóteses. A ampla investigação de compostos suspeitos permitiu a identificação por tentativa de 19 contaminantes de preocupação ambiental na vinhaça, 12 no solo e 25 na água subterrânea. Nenhum destes compostos foram detectados coincidindo em mais de uma matriz. Desta forma, não foram obtidas evidências da transferência destes compostos da vinhaça para o solo ou água subterrânea. Os resultados mostraram que existem outras fontes potenciais de contaminação, principalmente associada à atividade agrícola moderna. No geral, não foram verificados riscos ambientais decorrentes do reaproveitamento da vinhaça em termos de disseminação de contaminantes orgânicos.

Capítulo 3: Avaliação da Inibição da Biodigestão Anaeróbia da Vinhaça por Antibióticos Utilizados na Produção de Etanol Combustível

3.1 Introdução

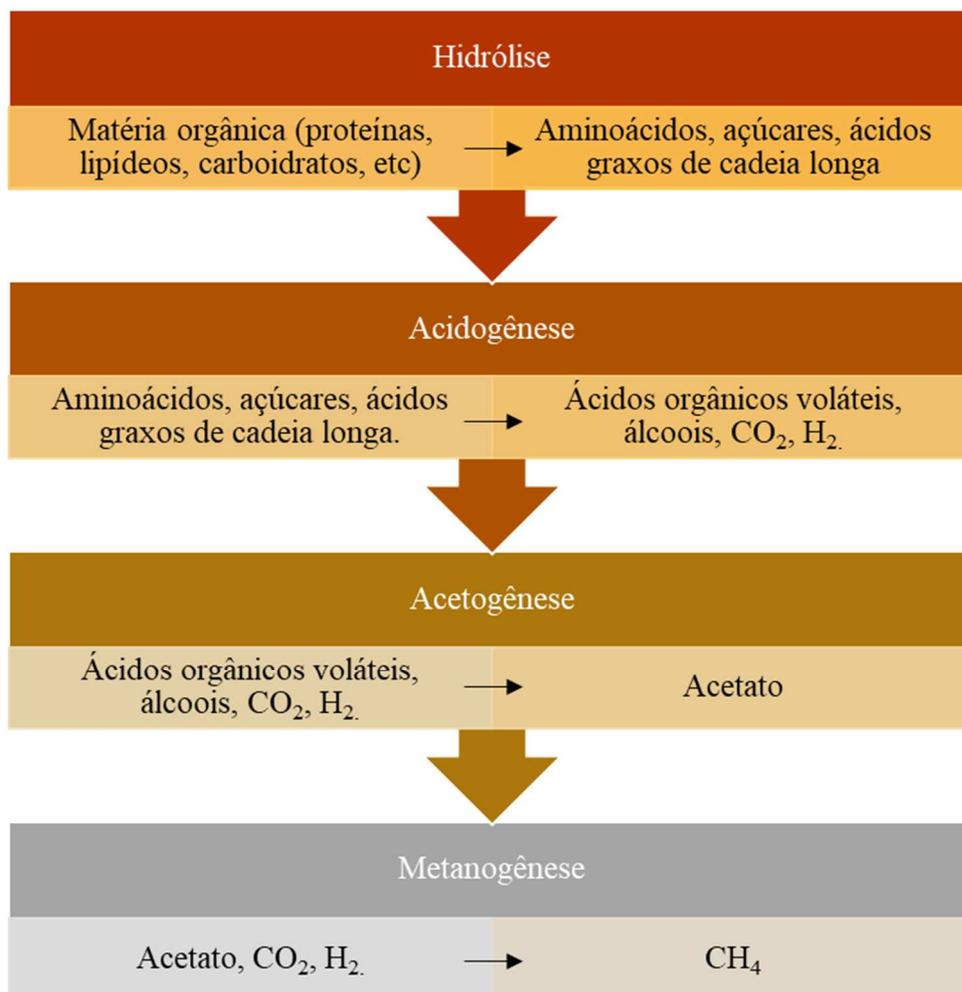
A biodigestão anaeróbia é um processo biológico natural que na ausência de oxigênio leva à decomposição da matéria orgânica. Este processo tem sido utilizado para o tratamento de efluentes, resíduos orgânicos, entre outros, se mostrando um processo ambientalmente vantajoso, unindo tratamentos de resíduos potencialmente tóxicos e geração de energia. A geração de energia por meio da biodigestão anaeróbia ocorre devido à produção de gases como hidrogênio (H_2) e metano (CH_4). Estes gases são produzidos por um consórcio de microrganismos capazes de transformar moléculas complexas em moléculas menores (LAIQ UR REHMAN *et al.*, 2019; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014; ZHANG; HU; LEE, 2016). Neste trabalho, será abordada a biodigestão anaeróbia apenas para a produção de metano.

A composição do biogás produzido na biodigestão anaeróbia é variável, porém é uma mistura de gases rica em CH_4 , principal componente do gás natural. Além do CH_4 , outros gases como CO_2 (gás carbônico), H_2S (gás sulfídrico), NH_3 (amônia) e vapor de água integram sua composição. O processo de biodigestão anaeróbia se dá de forma sequencial e envolve diferentes tipos de bactérias e arqueias. A conversão da matéria orgânica (substrato) ocorre, de forma simplificada, em etapas sequenciais denominadas hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. O produto de cada uma das etapas serve de substrato para a etapa seguinte, sendo importante um equilíbrio entre elas para a estabilidade e autorregulação do processo. Cada uma destas etapas é realizada por um grupo de microrganismos diferentes (LAIQ UR REHMAN *et al.*, 2019; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014; ZHANG; HU; LEE, 2016).

A primeira etapa, a hidrólise, é realizada por bactérias hidrolíticas, responsáveis pela digestão de moléculas complexas (proteínas, carboidratos e lipídios) em moléculas menores e solúveis (aminoácidos, açúcares e ácidos graxos de cadeia longa) que ficam assim disponíveis para a segunda etapa, a acidogênese. Nesta etapa, os produtos da hidrólise são convertidos em moléculas menores como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO_2 , H_2 . Na acetogênese, os produtos oriundos da acidogênese são oxidados a acetato. Na última etapa, a metanogênese, é produzido o CH_4 por meio da redução do acetato realizada pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas ou utilizando como substrato o CO_2 e H_2 pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (LAIQ UR REHMAN *et al.*, 2019; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-

LEITÃO, 2014; ZHANG; HU; LEE, 2016). De forma resumida, as etapas envolvidas no processo de biodigestão anaeróbia que levam à produção de CH₄ pode ser vista na **Figura 55**.

Figura 55 - Representação simplificada das etapas da biodigestão anaeróbia levando à formação de CH₄.



Fonte: elaborada pelo autor.

Entre os grupos de microrganismos mais frequentemente envolvidos em processos de biodigestão anaeróbia estão as bactérias hidrolíticas dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, as bactérias acidogênicas dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, e *Actinobacteria*, as bactérias acetogênicas do gênero *Syntrophomonas* e as arqueias metanogênicas dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* (LAIQ UR REHMAN et al., 2019). A atividade metabólica destes microrganismos em um reator de biodigestão anaeróbia é dependente de vários parâmetros como temperatura, pH, composição do substrato, disponibilidade de nutrientes, presença de agentes inibidores, tempo de detenção hidráulica, carga orgânica, entre outros (LAIQ UR REHMAN et al., 2019; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014). Desta

forma, para o funcionamento contínuo e estável da biodigestão anaeróbia, é necessário controle adequado sobre as variáveis que afetam a eficiência do processo.

A biodigestão anaeróbia tem sido apontada como uma solução tecnológica, sustentável e economicamente viável para o reaproveitamento da vinhaça produzida pela indústria do etanol combustível no Brasil. Atualmente, a fertirrigação dos canaviais com vinhaça é a principal prática adotada pela indústria sucroalcooleira no Brasil para realizar a destinação final da vinhaça gerada na produção de etanol combustível. Como já citado anteriormente, esta prática pode levar a problemas como salinização do solo (FUESS; GARCIA, 2014), aumento na emissão de gases de efeito estufa (N_2O e CH_4) (OLIVEIRA *et al.*, 2013, 2015), contaminação de águas subterrâneas (GONZÁLEZ; MEJÍA, 2015) e, como verificado nos resultados do Capítulo 1 e na literatura, dispersão de antibióticos para o meio ambiente (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; SULEIMAN *et al.*, 2018).

O uso da vinhaça para produção de biogás por meio da biodigestão anaeróbia já é realizada no Brasil por algumas usinas, porém, não representa uma fonte de renda concreta. Alguns exemplos de usinas que produzem ou já produziram biogás por meio da biodigestão da vinhaça são a Usina São João da Boa Vista-SP, a Usina São Martinho em Pradópolis-SP e a Usina Bonfin (Raízen) em Guariba-SP (BIOENERGIA, 2020). Entre as dificuldades encontradas para a implementação de plantas produtoras de biogás integradas às usinas pode-se citar o alto custo de investimento, dificuldade em financiamento e a falta de um programa nacional de biogás (FUESS; GARCIA, 2015). Apesar disso, a biodigestão anaeróbia é apontada como a alternativa mais promissora que o tratamento da vinhaça, com manutenção de sua propriedade de fertilização, e produção de energia. Considerando o emprego de toda a vinhaça gerada no país, a vinhaça tem um potencial energético estimado equivalente a 7,5% da produção de energia elétrica da usina hidrelétrica de Itaipu (MORAES *et al.*, 2014).

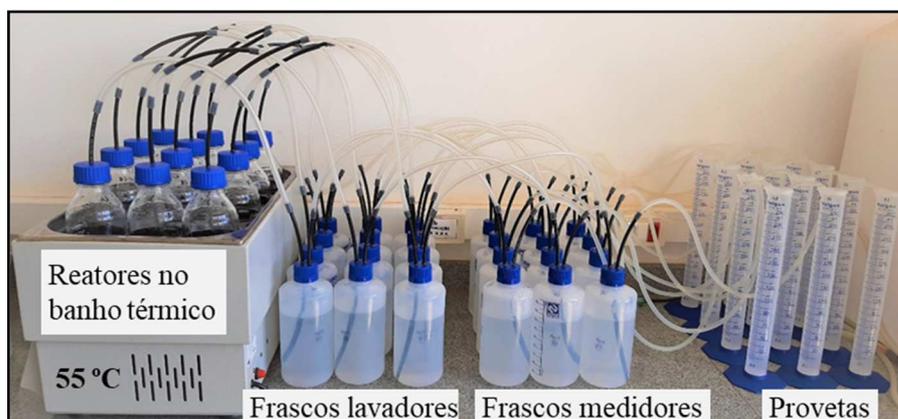
Apesar do potencial energético da vinhaça, muitos são os gargalos a serem superados para o seu adequado aproveitamento. Além das dificuldades encontradas pelo setor sucroalcooleiro para a ampla implementação de plantas produtoras de biogás, há na literatura científica preocupações sobre o impacto que o uso de antibióticos na produção do etanol combustível possa ter em um processo de biodigestão da vinhaça integrado à usina (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). Isso porque, já é conhecido na literatura que a presença de antibióticos no substrato da biodigestão pode comprometer a atividade metabólica dos microrganismos responsáveis pela produção do biogás, levando à inibição do processo (ÁLVAREZ *et al.*, 2010; SANZ *et al.*, 1996). Por outro lado, nem todos os antibióticos levam

a este efeito e em muitos casos, a concentração é um fator decisivo (GURMESSA *et al.*, 2020). Desta forma, surge a necessidade de avaliar se os antibióticos utilizados na produção de etanol combustível representam um risco a um processo de produção de biogás integrado à usina.

Uma metodologia de fácil implementação para avaliar a capacidade de inibição da biodigestão anaeróbia devido a uma substância tóxica é o teste de biodegradabilidade anaeróbia. O teste de biodegradabilidade anaeróbia é similar ao teste de atividade metanogênica específica, que é capacidade máxima de produção de CH₄ realizada por um consórcio de microrganismos por meio da biodigestão anaeróbia de um substrato específico em condições controladas de laboratório. Com isso, a comparação do sistema (lodo + substrato) com e sem a presença de um potencial agente inibidor permite avaliar a capacidade deste agente em inibir o processo de biodigestão (AQUINO *et al.*, 2007; BERTOLINO; CARVALHO; AQUINO, 2008; HUSSAIN; DUBEY, 2017).

O aparato utilizado no teste de biodegradabilidade pode ser um sistema simples ou até mais completo, sendo que basicamente podem ser constituídos para a simples finalidade de medir produção de biogás, por um reator (frasco de incubação), um frasco de lavagem (solução de NaOH), um frasco medidor (contendo água) e uma proveta para medir o volume deslocado pelo metano produzido. Um exemplo do simples aparato citado pode ser visto na **Figura 56**.

Figura 56 - Sistema utilizado nos testes de AME.



Fonte: elaborada pelo autor.

Neste sistema, o biogás é gerado no reator implica no aumento da pressão interna e deslocamento do mesmo para o frasco lavador. No frasco, contendo uma solução aquosa de NaOH, gases como CO₂, NH₃ e H₂S são solubilizados no meio líquido, sendo que o CH₄ produzido, que não é solubilizado, segue para o frasco medidor. O aumento da pressão no frasco medidor, devido à produção de CH₄, promove o deslocamento da água do frasco para a proveta,

na qual é realizada a leitura do volume de água deslocado, que equivale ao volume de CH₄ produzido.

Desta forma, é possível monitorar a produção de CH₄ em função do tempo e determinar a AME de forma simplificada (AQUINO *et al.*, 2007). Baseado na simplicidade do aparato descrito, e na necessidade de avaliar o impacto que os antibióticos utilizados na produção de etanol combustível possam causar na biodigestão da vinhaça, a determinação da atividade metanogênica se apresenta como uma estratégia viável para avaliar o impacto citado.

3.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo é avaliar a influência causada por antibióticos comumente empregados na produção de etanol combustível (penicilina G, monensina e tetraciclina) na biodigestão anaeróbia da vinhaça.

3.3 Materiais e Métodos

O lodo utilizado nos testes de biodigestão foi obtido de um reator do tipo UASB (do inglês *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) em operação em condições termofílicas (55 °C) para a produção de biogás a partir da vinhaça oriunda da produção de etanol. Vale destacar que este lodo não está sujeito a contato com antibióticos, pois o reator do qual foi coletado é alimentado com vinhaça que tem origem em um processo industrial que não faz uso de antibióticos na produção de etanol. Após a coleta do lodo, o mesmo foi mantido sob refrigeração até o momento de seu uso. Vinhaça livre de antibióticos foi obtida de uma usina produtora de etanol combustível que não emprega antibióticos no processo de produção. A caracterização físico-química realizada na vinhaça foi pH e demanda química de oxigênio (DQO). No lodo foram determinados pH, sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (STV) conforme literatura (APHA, 2005).

3.3.1 Testes de Biodigestão Anaeróbia

Os testes de biodigestão em condições termofílicas foram realizados empregando um sistema em batelada composto por banho térmico, reator (frasco reagente Phox de 500 mL) um frasco lavador (frasco de polipropileno, Nalgon de 1 L contendo solução de NaOH 15% m/v e indicador fenolftaleína), um frasco medidor de gás (frasco de polipropileno, Nalgon, de 1L contendo 850 mL de água) e uma proveta de polipropileno, Nalgon, de 250,0 mL para coleta e

leitura do volume de água deslocado decorrente da produção de metano. Cada uma das tampas dos frascos foi furada para encaixe de um ou 2 tubos de nylon de 6 mm de diâmetro externo seguida de vedação com selante a base de resina sintética (SelaMais®). As tampas do frasco lavador e do frasco medidor de gás também foram totalmente seladas com SelaMais®. A conexão entre as partes do sistema foi feita com mangueira de silicone de 4 mm de diâmetro interno. O sistema utilizado para a realização dos testes de biodigestão pode ser visto na **Figura 56**.

Antes do início de cada experimento, o oxigênio presente no reator foi eliminado borbulhando nitrogênio gasoso (N₂) por 1 min no reator. A influência da endogenia/mineralização do lodo anaeróbio, para a produção de biogás, em relação aos outros experimentos foi avaliada por meio da incubação do lodo sem a adição da vinhaça no frasco reator (branco). O volume deslocado no frasco medidor no tempo de 4,0-5,5 h (V₀) foi descontado por meio da subtração deste volume no volume deslocado em função do tempo (V_t), verificado em cada leitura do volume deslocado. Desta forma, o volume de metano produzido (V_m) foi calculado pela equação $V_m = V_t - V_0$.

Para avaliar o eventual efeito inibitório de cada antibiótico na produção de metano foi utilizado 150 mL de inóculo e 50 mL de vinhaça em todos dos experimentos. Um grupo controle, sem a adição de antibiótico, foi submetido ao teste de biodigestão juntamente com outros grupos contendo concentrações conhecidas dos antibióticos em estudo. O volume de metano produzido foi monitorado em função do tempo, sendo que cada grupo foi estudado em triplicata. As concentrações de antibióticos estudadas foram definidas de acordo com a concentração de uso na produção de etanol combustível e estão resumidas na **Tabela 27**. Neste texto, será utilizada a unidade de concentração ppm (parte por milhão) pois esta é a unidade utilizada nas bulas dos produtos à base de antibióticos empregados na produção de etanol combustível.

Tabela 27 - Concentrações de antibióticos estudadas.

	2,5 ppm	1,0 ppm	0,5 ppm	0,1 ppm	0,01 ppm	0,001 ppm
Controle	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
Penicilina	x	N.R.	x	x	x	x
Tetraciclina	x	x	x	N/R	N/R	N/R
Monensina	x	x	x	N/R	N/R	N/R

S/A = sem antibiótico; N/R = não realizado

3.3.2 Análises Cromatográficas

O monitoramento da degradação dos antibióticos ao longo do período de biodigestão foi realizado empregando LC-MS/MS (método descrito na seção 1.3.5 com coluna Luna[®] fenil-hexil) e extração por SALLE (método descrito na seção 1.3.8.3) para o preparo de amostra.

3.4 Resultado e Discussões

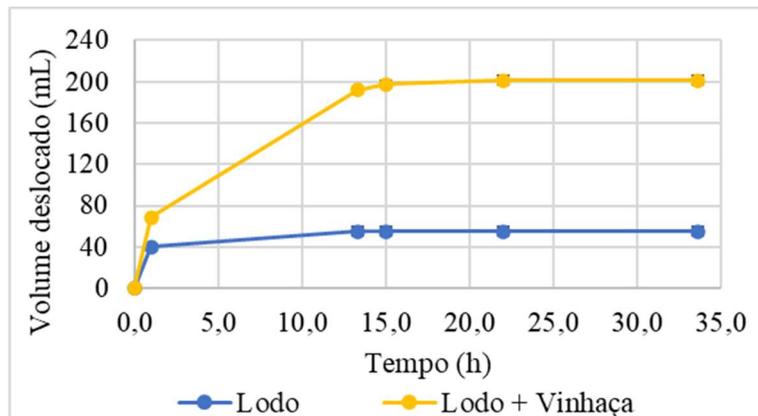
A vinhaça é um efluente com característica ácida e elevada quantidade de matéria orgânica, o que resulta em um efluente com uma elevada demanda química de oxigênio (DQO), tendo sido encontrados valores de DQO na faixa de 1,2 a 51,0 g L⁻¹ na literatura científica (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013; FUESS; RODRIGUES; GARCIA, 2017; RIBAS *et al.*, 2009). A partir da caracterização parcial da vinhaça utilizada neste estudo foi possível verificar o pH e a DQO, sendo respectivamente 4,8 e 36,6 g L⁻¹. Os valores encontrados estão dentro da faixa já relatada por outros trabalhos na literatura.

O lodo (inóculo) utilizado neste trabalho foi caracterizado quanto ao pH, sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SVT). O pH verificado foi de 8,1, valor adequado para os microrganismos envolvidos na biodigestão anaeróbia (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014). Os valores obtidos para ST e SVT foram $11,2 \pm 0,1$ e $2,6 \pm 0,3$ g L⁻¹ (n=3), respectivamente. A relação SVT/ST é uma medida indireta do quantitativo da biomassa ativa presente em um lodo, sendo que o valor ideal para esta razão é um valor maior que 0,6 ou 60%. Valores inferiores a 60% indica uma baixa população de microrganismos no lodo. A razão SVT/ST verificada para o lodo utilizado foi 0,23 ou 23% indicando assim baixa quantidade de biomassa ativa.

Após a caracterização parcial da vinhaça e do lodo, foi dado início aos estudos de biodigestão. A quantidade de lodo e vinhaça utilizados resultou em um processo de biodigestão de aproximadamente 15 h e uma relação de 4,8 gDQO/gSVT. Os resultados do teste preliminar, no qual foram incubados em triplicata um sistema contendo 150 mL de lodo e 50 mL de vinhaça e outro contendo somente 150 mL de lodo, podem ser vistos na **Figura 57**. Conforme apresentado na Figura, nota-se que houve um deslocamento de volume de água em ambos os sistemas. No sistema contendo somente lodo foi verificado um deslocamento total de 55 mL. Este volume pode ser atribuído a dois fatores. O primeiro pela produção de CH₄ pelo lodo via endogenia (AQUINO *et al.*, 2007) e o segundo pela pressurização do sistema decorrente do aumento da temperatura no reator (temperatura ambiente até 55 °C). No sistema contendo lodo

e vinhaça foi verificado um deslocamento de 201 mL de água, sendo que a diferença de 146 mL ($201 - 55 = 146$ mL) foi atribuída à produção de CH_4 devido a biodigestão da vinhaça.

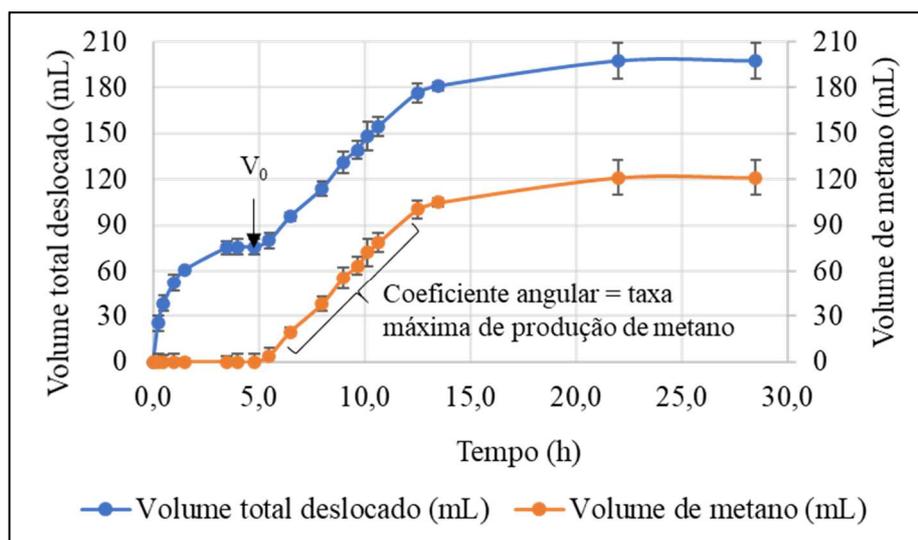
Figura 57 - Biodigestão preliminar: volume deslocado em função do tempo.



Fonte: elaborada pelo autor.

Após verificada a atividade do lodo e a duração da biodigestão no teste preliminar, foi possível definir os intervalos de leitura do volume deslocado e nova incubação foi realizada com tempos de leitura inferiores a 1 h nas primeiras horas de experimento, até observar diminuição da produção de CH_4 . Neste caso foi possível definir o V_0 (volume de água deslocado devido à pressurização do sistema e à endogenia) para que o mesmo possa ser descontado do volume total de água deslocado e o volume de CH_4 produzido possa ser obtido. Como exemplo da definição do V_0 , temos a **Figura 58**.

Figura 58 - Definição do V_0 , curva corrigida da produção de metano em função do tempo e taxa máxima de produção de metano.



Fonte: elaborada pelo autor.

O V_0 foi definido como o volume deslocado no tempo imediatamente anterior à segunda região de crescimento da curva Volume total deslocado vs Tempo. Com isso, foi possível subtrair o valor de V_0 de todas as leituras de volume deslocado e construir a curva Volume de metano vs Tempo, a qual foi utilizada para avaliar o impacto dos antibióticos na produção de metano. O impacto dos antibióticos na produção de metano foi avaliado analisando o tempo gasto pelo sistema para iniciar a produção de metano (T_0) e a taxa máxima de produção de metano em cada incubação contendo os antibióticos. A taxa máxima de produção de metano foi obtida conforme representado na **Figura 58**. Ambos os fatores avaliados estão relacionados com a duração do processo de biodigestão e são altamente afetados por agentes tóxicos ao processo.

3.4.1 Avaliação da Inibição do Processo de Biodigestão por Antibióticos

Após verificado o funcionamento do sistema montado (**Figura 56**) para a realização dos testes de biodigestão, foi dado início aos estudos realizando sempre um conjunto controle (lodo + vinhaça) e outros três conjuntos contendo antibióticos em diferentes concentrações, sendo que cada conjunto foi realizado em triplicata. Para a monensina e tetraciclina foi estudada a faixa de 0,5 a 2,5 ppm de antibióticos. Já para a penicilina foi estudada a faixa de 0,001 a 2,5 ppm.

O conjunto controle apresentou uma taxa máxima de produção de metano de $15,4 \pm 1,2 \text{ mL h}^{-1}$ (resultado de 4 testes em dias distintos). Considerando o intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$ e $n = 4$), valores fora da faixa de 14,2 a 16,5 mL h^{-1} foram associados ao efeito da presença do antibiótico em estudo na biodigestão. A taxa máxima de produção de metano obtida para os conjuntos contendo diferentes antibióticos e em diferentes concentrações pode ser vista na **Tabela 28**.

Tabela 28 - Taxa máxima de produção de metano (mL h^{-1}) na ausência e na presença de diferentes concentrações de antibióticos.

Concentração (ppm)	Monensina	Tetraciclina	Penicilina G
2,5	8,5 mL h^{-1}	5,8 mL h^{-1}	Inibição completa
1,0	11,2 mL h^{-1}	13,8 mL h^{-1}	-
0,5	12,5 mL h^{-1}	14,0 mL h^{-1}	6,1 mL h^{-1}
0,1	-	-	5,4 mL h^{-1}
0,01	-	-	12,0 mL h^{-1}
0,001	-	-	16,3 mL h^{-1}

Como pode ser visto nesta tabela, todos os antibióticos estudados afetaram a taxa máxima de produção de metano, sendo que o efeito foi dependente da concentração do antibiótico. Entre os antibióticos estudados, a monensina é conhecida pela inibição de bactérias produtoras de hidrogênio, formiato e acetato, levando a redução da produção de metano em processo de biodigestão anaeróbia (SPIRITO *et al.*, 2018). Já a tetraciclina, é capaz de inibir a metanogênese acetoclástica e o metabolismo do butirato (XIAO *et al.*, 2021), o que também contribui para a redução na produção de metano em processos anaeróbios.

Nos estudos de biodigestão da vinhaça contendo monensina, as três concentrações estudadas levaram à inibição parcial da biodigestão, sendo que a concentração mais baixa estudada (0,5 ppm) ainda foi capaz de afetar negativamente a taxa máxima de produção de metano. Resultado similar também foi verificado em outros trabalhos, nos quais foi verificada inibição parcial da produção de metano na biodigestão de estrume suíno e bovino devido à monensina (ARIKAN *et al.*, 2018; SPIRITO *et al.*, 2018; THAVEESRI; BOUCNEAU; VERSTRAETE, 1994), porém em condições mesofílicas.

A tetraciclina foi capaz de promover grande inibição na concentração de 2,5 ppm, porém, na concentração de 0,5 ppm pouca inibição foi observada. Na literatura, também já foi relatada a inibição da produção de metano em processos de biodigestão anaeróbia devido a presença de tetraciclina (CETECIOGLU *et al.*, 2013; GARTISER *et al.*, 2007; MASSÉ *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2018).

Outro antibiótico estudado, a penicilina, apresentou os efeitos mais severos para a biodigestão. Na concentração de 2,5 ppm foi observada inibição total, no período monitorado (28,5 h). Mesmo a uma concentração de 0,01 ppm ainda foi capaz de diminuir a taxa de produção máxima de metano para 12,0 mL h⁻¹. A inibição da produção de metano devido a presença de penicilina G também já foi verificada em outros processos de biodigestão (MASSÉ *et al.*, 2000).

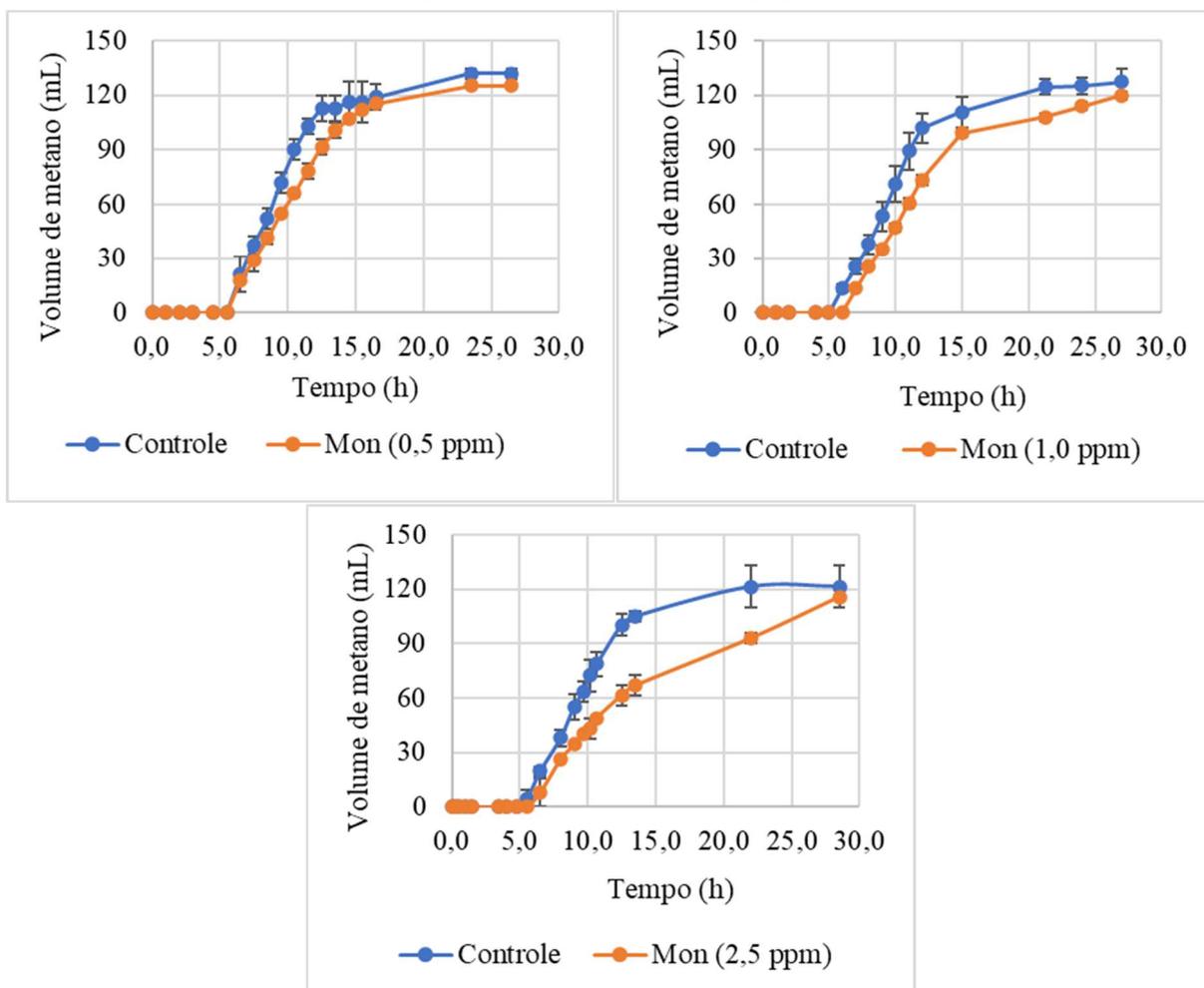
Além da diminuição na taxa máxima de produção de metano, outro efeito negativo causado pelos antibióticos foi o aumento do T₀. Isso se reflete no aumento do tempo inicial para que o sistema inicie a produção de metano. O aumento do T₀ não tem impacto direto em reatores contínuos já em funcionamento, e sim em sistema em fase de adaptação do lodo para o posterior início da produção de biogás. Entre os antibióticos estudados, a monensina foi capaz de atrasar o início da produção de metano em aproximadamente 1 h nas concentrações de 2,5 e 1,0 ppm, assim como a tetraciclina na concentração de 2,5 ppm. Já a penicilina, levou a grande atraso no início da produção de metano, sendo 11,5 h na concentração de 0,5 ppm e 7,0 h na concentração

de 0,1 ppm. Os valores de T_0 obtidos para os testes realizados podem ser vistos na **Tabela 29** e as curvas de Volume de metano vs Tempo obtidas em cada teste para a monensina, tetraciclina e penicilina podem ser vistas na **Figura 59**, **Figura 60** e **Figura 61** respectivamente.

Tabela 29 - Tempo gasto pelo sistema para iniciar a produção de metano (T_0) nas biodigestões realizadas sem antibióticos e com antibióticos.

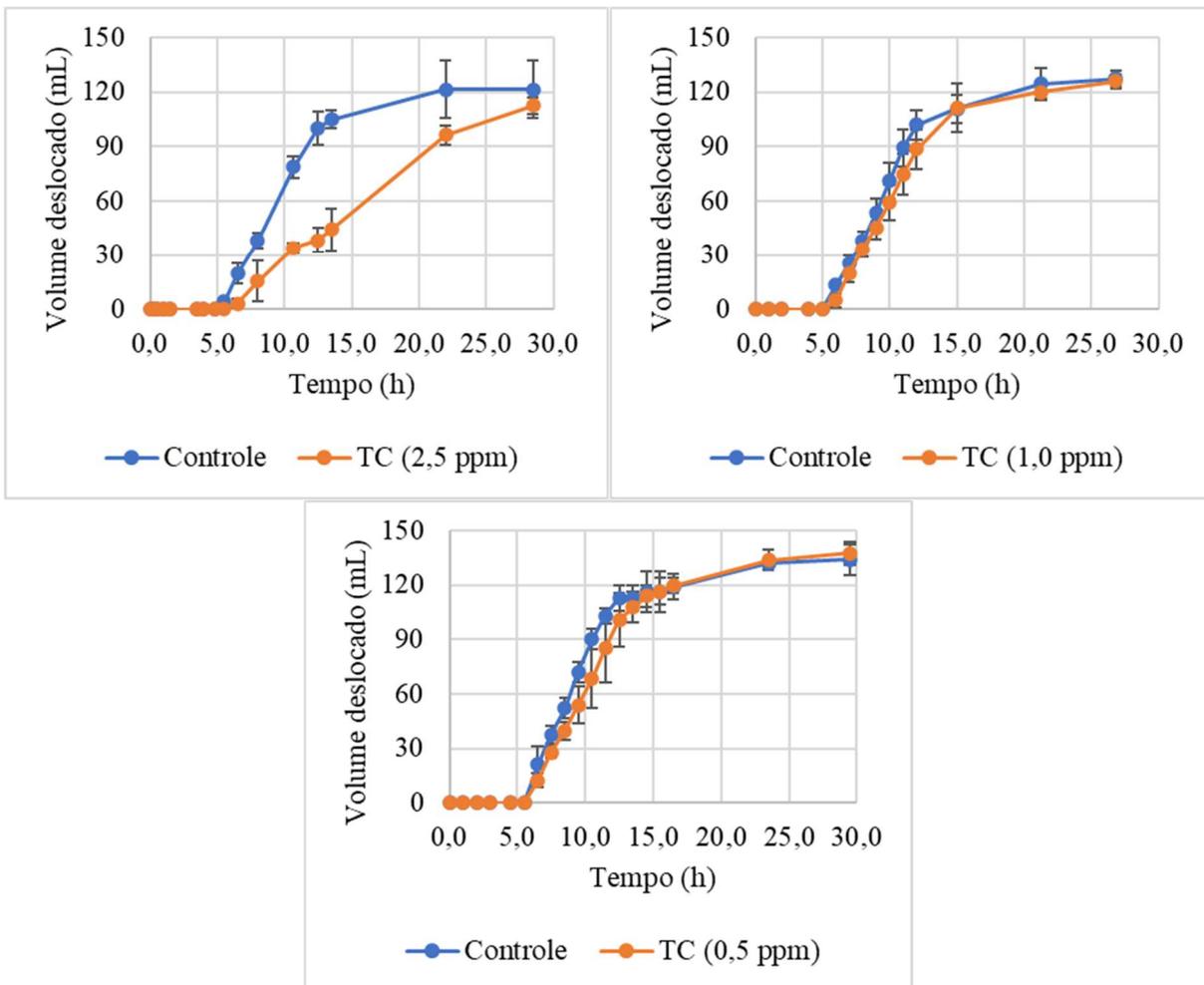
Concentração (ppm)	Sem antibiótico	Monensina	Tetraciclina	Penicilina G
2,5	4,8 h	5,5 h	5,5 h	Inibição completa
1,0	5,0 h	6,0 h	5,0 h	-
0,5	5,5 h	5,5 h	5,5 h	16,5 h
0,1	5,0 h	-	-	12,0 h
0,01	4,5 h	-	-	4,5 h
0,001	4,5 h	-	-	4,5 h

Figura 59 - Volume de metano produzido em função do tempo para os estudos com monensina.



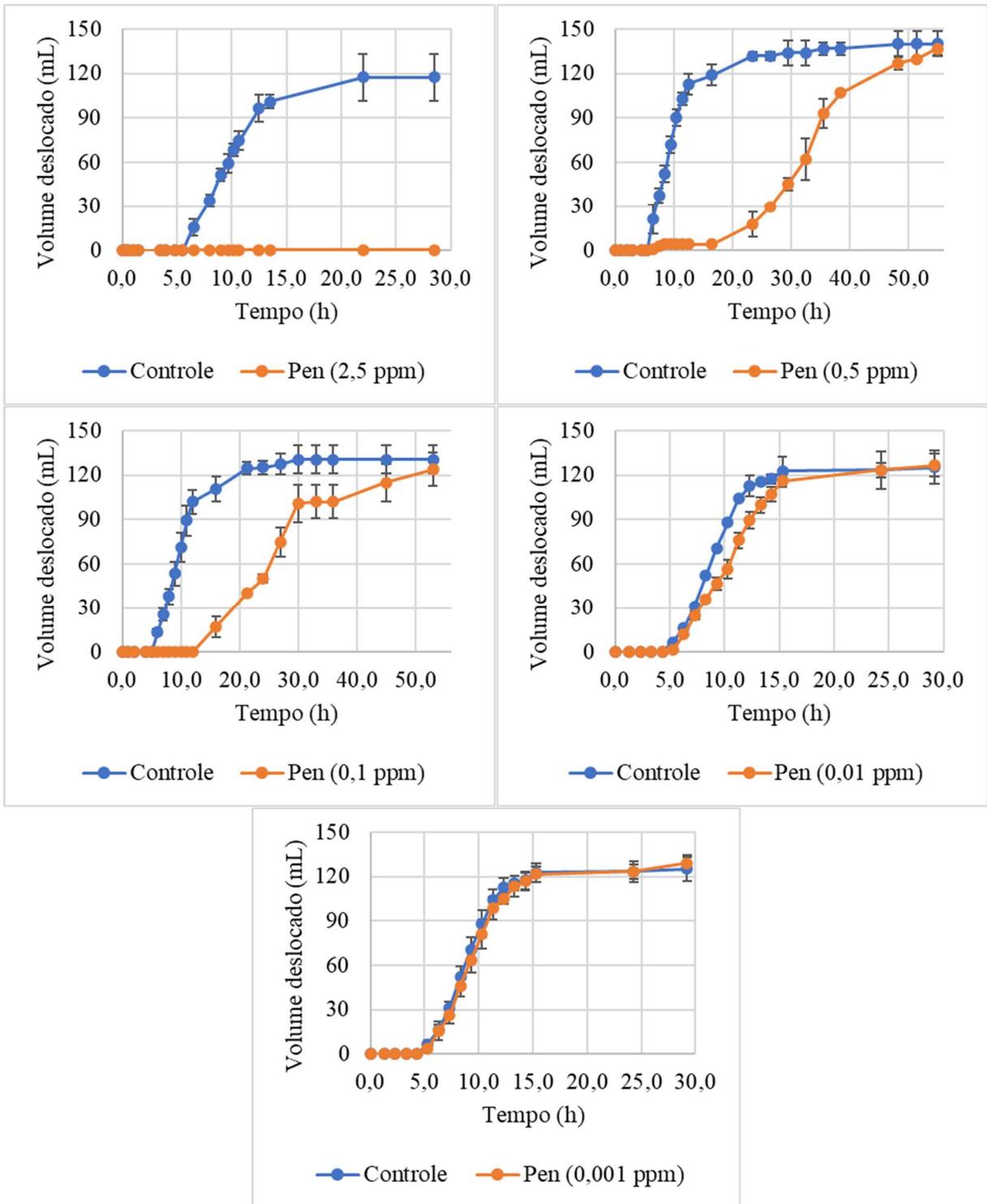
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 60 - Volume de metano produzido em função do tempo para os estudos com tetraciclina.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 61 - Volume de metano produzido em função do tempo para os estudos com penicilina.



Fonte: elaborada pelo autor.

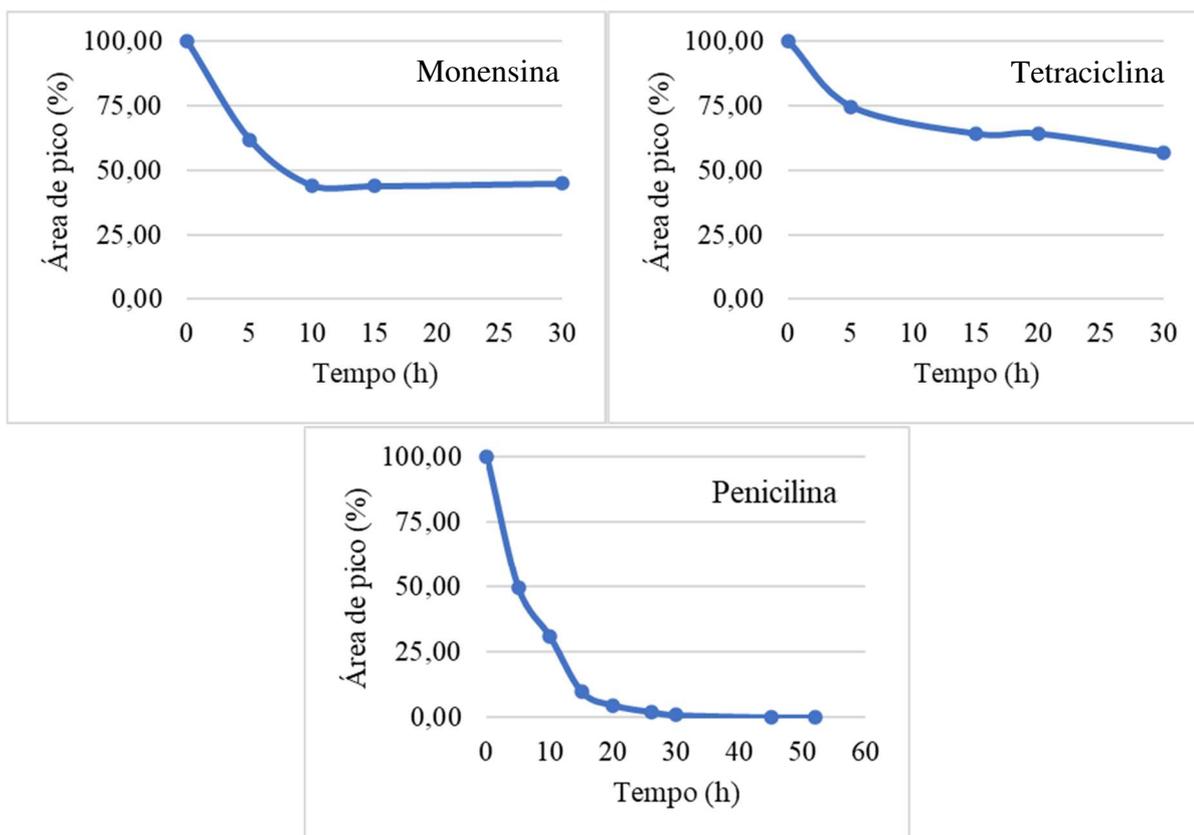
Vale destacar, que o uso de antibióticos na produção de etanol combustível é feito somente quando é detectada contaminação de microrganismos que podem levar a diminuição no rendimento da fermentação. Desta forma, um reator para produção de biogás a partir da vinhaça integrado a uma usina produtora de etanol estaria sujeito a vinhaça possivelmente

contaminada com antibiótico de forma pontual. Este tipo de situação leva a dificuldade para a obtenção de lodos adaptados aos antibióticos e faz da metodologia empregada no estudo de inibição apropriada a investigação proposta.

3.4.2 Monitoramento dos antibióticos durante a biodigestão

Durante a realização da biodigestão foi avaliada se o processo de biodigestão seria capaz de promover a degradação dos antibióticos estudados. Por meio do monitoramento da área do pico cromatográfico para cada antibiótico durante a realização da biodigestão (**Figura 62**) foi possível verificar a fração remanescente de cada antibiótico no final da biodigestão.

Figura 62 - Decaimento da área de pico cromatográfico referente a cada antibióticos durante a biodigestão.



Fonte: elaborada pelo autor.

Como pode ser visto na **Figura 62**, 45% da monensina, inicialmente presente no reator, ainda permaneceu ao final da biodigestão. Este resultado mostra que a monensina é apenas parcialmente degradada durante a biodigestão, sendo que quase metade da quantidade inicial ainda estava presente no meio biodigerido no final do processo. Este resultado está de acordo

com outros estudos de biodigestão, como o realizado por Varel e colaboradores (VAREL *et al.*, 2012). Neste trabalho, foi verificado que uma parcela muito pequena da monensina era degradada no final da biodigestão de esterco bovino. Desta forma, a conclusão dos autores foi que a biodigestão mostrou-se ineficiente para a remoção do antibiótico.

Para a tetraciclina, a fração remanescente após o processo de biodigestão foi de 57%. Estes números indicam que o processo de biodigestão não foi capaz de eliminar uma fração significativa dos antibióticos presentes. Desta forma, assim como também foi verificado por Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2018), a biodigestão não representa um processo promissor para a remoção deste antibiótico de uma possível vinhaça contaminada.

Já para a penicilina, foi verificada a degradação quase completa, restando menos de 1% da quantidade inicialmente presente no processo de biodigestão após 30 h. Porém, como visto anteriormente, a penicilina se mostrou altamente tóxica para o processo, indicando que a biodigestão anaeróbia também não representa um processo promissor para a remoção de penicilina de uma vinhaça possivelmente contaminada.

3.5 Conclusão

Os estudos de biodigestão conduzidos na presença e ausência de antibióticos em diferentes concentrações permitiram verificar que os antibióticos estudados são capazes de inibir parcialmente a produção de metano. A concentração mais baixa que levou a inibição parcial da produção de metano foi 0,5 ppm para a monensina, 1,0 ppm para tetraciclina e 0,01 ppm para a penicilina. Inibição total foi verificada apenas para a penicilina na concentração de 2,5 ppm. O monitoramento da fração remanescente de cada antibiótico ao longo da biodigestão mostrou que aproximadamente 50% da quantidade inicial da monensina e da tetraciclina ainda estavam presentes no meio biodigerido. Já para a penicilina, menos de 1% da quantidade inicialmente adicionada no reator permaneceu ao final da biodigestão. Tendo em vista a baixa degradação da monensina e da tetraciclina e a elevada toxicidade da penicilina, os resultados alcançados neste trabalho indicam que a biodigestão anaeróbia de vinhaça contaminada com antibióticos pode ser altamente prejudicada, levando à baixa produção de metano, ao aumento na duração do processo e à baixa degradação dos antibióticos presentes.

Conclusão Geral e Perspectivas Futuras

Os estudos realizados permitiram avaliar as técnicas de extração SPE, SALLE e SPE on-line para a extração dos antibióticos em vinhaça, sendo a SPE on-line se mostrou a opção mais vantajosa devido a pouca manipulação das amostras e conseqüente maior frequência analítica. Com o método analítico desenvolvido foi verificada a presença de monensina em uma das amostras de vinhaça analisadas, confirmando a hipótese de que a fertirrigação com vinhaça, oriunda da produção de etanol combustível na qual foi feito o uso de antibióticos, é uma fonte de dispersão de antibióticos para no meio ambiente. As análises realizadas nas amostras de água subterrânea e solo de áreas sujeitas à fertirrigação não detectaram contaminação de antibióticos nestas amostras. Porém, a abordagem de análise de compostos suspeitos mostrou-se uma ferramenta importante para a investigação do grau de contaminação das amostras analisadas, pois foi possível obter evidências de que a agricultura moderna é a principal fonte de contaminação para as amostras de solo e água subterrânea. Os resultados obtidos nos estudos de biodigestão anaeróbia evidenciaram que o uso de antibióticos na produção de etanol combustível tem potencial para comprometer a produção de biogás em sistemas integrados de produção de etanol e de biogás por biodigestão anaeróbia da vinhaça. Desta forma, fica claro a necessidade da implementação de tecnologias alternativas ao uso de antibióticos para o controle microbiológico no processo produtivo de etanol combustível.

Como perspectivas futuras relacionadas ao tema estudado neste trabalho, é possível citar a necessidade de estudos para a análise de antibióticos no material particulado da vinhaça. Com isso, a análise da fração líquida e do material em suspensão permitirá alcançar maior acurácia com relação aos valores de concentração detectados nesta matriz. Além disso, fica evidente a necessidade da realização de estudos envolvendo programas de monitoramento de antibióticos em vinhaça para dimensionar o possível impacto da dispersão de antibióticos no meio ambiente devido à fertirrigação. Com relação a biodigestão, futuros estudos poderiam focar na investigação das etapas da biodigestão que são afetadas com a presença dos diferentes antibióticos utilizados na produção de etanol, com o intuito de investigar os mecanismos envolvidos na inibição. Além disso, o impacto de adições pontuais de vinhaça contaminada com antibióticos em reatores contínuos em operação para a biodigestão da vinhaça também é algo que necessita de investigação.

Referências Bibliográficas

2009/28/EC, DIRECTIVE. **DIRECTIVE 2009/28/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL.** [S. l.], 2009.

96/23/EC, Council Directive. 96/23/EC COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044)(Text with EEA relevance) (2002/657/EC). **Official Journal of the European Communities**, [S. l.], p. 1–29, 2002.

AALIZADEH, Reza *et al.* Quantitative Structure-Retention Relationship Models to Support Nontarget High-Resolution Mass Spectrometric Screening of Emerging Contaminants in Environmental Samples. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 56, n. 7, p. 1384–1398, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00752>

AALIZADEH, Reza; NIKA, Maria Christina; THOMAIDIS, Nikolaos S. Development and application of retention time prediction models in the suspect and non-target screening of emerging contaminants. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 363, n. August 2018, p. 277–285, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.09.047>

AB SCIEX. **Hardware guide: 3200 QTRAP® LC/MS/MS System.** Concord, Ontário, Canadá: AB Sciex, 2011.

AHMED, O.; SULIEMAN, Abdel Moneim E.; ELHARDALLOU, Sirelkhatim B. Physicochemical, chemical and microbiological characteristics of vinasse, a by-product from ethanol industry. **American Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 80–83, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5923/j.ajb.20130303.03>

ALDEEK, Fadi *et al.* Identification of Penicillin G Metabolites under Various Environmental Conditions Using UHPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 64, n. 31, p. 6100–6107, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b06150>

ÁLVAREZ, J. A. *et al.* The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 22, p. 8581–8586, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.075>

ALYGIZAKIS, Nikiforos A. *et al.* Exploring the Potential of a Global Emerging Contaminant Early Warning Network through the Use of Retrospective Suspect Screening with High-Resolution Mass Spectrometry. **Environmental Science and Technology**, [S. l.], v. 52,

n. 9, p. 5135–5144, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00365>

ALYGIZAKIS, Nikiforos A. *et al.* NORMAN digital sample freezing platform: A European virtual platform to exchange liquid chromatography high resolution-mass spectrometry data and screen suspects in “digitally frozen” environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 115, p. 129–137, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.008>

AMORIM, Henrique V. *et al.* Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>

ANASTASSIADES, MICHELANGELO; LEHOTAY, STEVEN J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL**, [S. l.], v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANDERSON, Collin R.; RUPP, Heidi S.; WU, Wen-Hsin. Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1075, n. 1, p. 23–32, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.013>. Acesso em: 21 jul. 2016.

ANDRADE-EIROA, Auréa *et al.* Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 80, p. 641–654, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>

ANDREU, Vicente; PICÓ, Yolanda. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 118, p. 709–721, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.038>

ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. [s. l.], 2019. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/arquivos/central-conteudos/anuario-estatistico/2019/2019-anuario-versao-impressao.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2020.

ANP. **CENTRAL DE SISTEMAS ANP (CSA)**. [s. l.], 2020a. Disponível em: <http://app.anp.gov.br/anp-cpl-web/public/etanol/consulta-produtores/consulta.xhtml>. Acesso em: 12 out. 2020.

ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. [s. l.], 2020b. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5809-anuario-estatistico-2020>. Acesso em: 12 out. 2020.

ANP. **Painel Dinâmico de Produtores de Etanol**. [s. l.], 2020c.

APHA, American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 2005. *E-book*.

AQUINO, Sérgio F. *et al.* Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-41522007000200010>

ARIKAN, Osman A. *et al.* The fate and effect of monensin during anaerobic digestion of dairy manure under mesophilic conditions. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192080>

BARRERA, Cristina; BETORET, Noelia; SEGUÍ, Lucía. Phenolic profile of cane sugar derivatives exhibiting antioxidant and antibacterial properties. **Sugar Tech**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00817-y>

BENKE, M. B.; MERMUT, A. R.; CHATSON, B. Carbon-13 CP / MAS NMR and DR-FTIR spectroscopic studies of sugarcane distillery waste. [S. l.], 1998.

BERAN, M. *et al.* Preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography of monensin A and B sodium salts. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 268, p. 315–320, 1983. Disponível em: [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)95423-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)95423-8)

BERENDSEN, Bjorn J. A. *et al.* The assessment of selectivity in different quadrupole-orbitrap mass spectrometry acquisition modes. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 337–346, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1021-x>

BERTOLINO, Sueli M.; CARVALHO, Cornélio F.; AQUINO, Sérgio F. Characterization and biodegradability of wastewater produced in university campus. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 271–277, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-41522008000300005>

BICALHO, Tereza; SAUER, Ildo; PATIÑO-ECHEVERRI, Dalia. Quality of data for estimating GHG emissions in biofuel regulations is unknown: A review of default values related to sugarcane and corn ethanol. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 239, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.117903>

BIEL-MAESO, Miriam; CORADA-FERNÁNDEZ, Carmen; LARA-MARTÍN, Pablo A. Determining the distribution of pharmaceutically active compounds (PhACs) in soils and sediments by pressurized hot water extraction (PHWE). **Chemosphere**, [S. l.], v. 185, p. 1001–

1010, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.094>

BIOENERGIA, Canal-Jornal da. **Produção de biogás e o setor sucoenergético**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.canalbioenergia.com.br/setor-sucoenergetico-e-a-producao-de-biogas/>. Acesso em: 21 fev. 2021.

BORDONAL, Ricardo de Oliveira *et al.* Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, [S. l.], v. 38, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0490-x>

BORGES, Keyller Bastos; PEREIRA, Arnaldo César; MANO, Valdir. Fundamentos do preparo de amostras. *In*: FIGUEIREDO, Eduardo Costa de; BORGES, Keyller Bastos; QUEIROZ, Maria Eugênicia C. (org.). **Preparo de Amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 1–8. *E-book*.

BOY-ROURA, M. *et al.* Towards the understanding of antibiotic occurrence and transport in groundwater: Findings from the Baix Fluvià alluvial aquifer (NE Catalonia, Spain). **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 612, p. 1387–1406, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.012>

BURGESS, Richard R. Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. *In*: BURGESS, Richard R.; DEUTSCHER, Murray P. (org.). **Guide to Protein Purification**. 2. ed. on-line: Methods in Enzymology Elsevier Inc., 2009. v. 463p. 331–342. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63020-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63020-2)

CAMPER, N. D.; KIM, J. H.; RILEY, M. B. Degradation of isoxaben in soils and an aqueous system. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 729–739, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/PFC-100107407>

CERÓN, Vanessa Zúñiga; AYERBE, MARIO ANDRÉS GANDINI. ENVIRONMENTAL CHARACTERIZATION OF STILLAGE FROM SUGAR CANE WASTE FROM THE PRODUCTION OF ETHANOL. **Dyna**, [S. l.], n. 177, p. 124–131, 2013.

CETECIOGLU, Z. *et al.* Chronic impact of tetracycline on the biodegradation of an organic substrate mixture under anaerobic conditions. **Water Research**, [S. l.], v. 47, n. 9, p. 2959–2969, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.053>

CETESB. **Águas subterrâneas**. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-subterraneas/>. Acesso em: 24 out. 2019.

CHA, J. M.; YANG, S.; CARLSON, K. H. Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography

with ion trap tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1065, n. 2, p. 187–198, 2005. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.091>

CHAMBERS, Matthew C. *et al.* A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 918–920, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>

CHEMICALBOOK. **No Title**. [S. l.], 2020. Disponível em: https://www.chemicalbook.com/ProductIndex_EN.aspx. Acesso em: 18 maio. 2020.

CHEMSPIDER. **Royal Society of Chemistry**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.chemspider.com/>. Acesso em: 18 maio. 2020.

CHIESA, Luca *et al.* Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, [S. l.], v. 185, p. 7–15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.098>. Acesso em: 7 nov. 2015.

CHITESCU, Carmen Lidia *et al.* Ultrasonic or accelerated solvent extraction followed by U-HPLC-high mass accuracy MS for screening of pharmaceuticals and fungicides in soil and plant samples. **Talanta**, [S. l.], v. 88, p. 653–662, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.054>

CHRISTOFOLETTI, Cintya Aparecida *et al.* Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, [S. l.], v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>

CHU, Libing *et al.* Degradation of antibiotics and inactivation of antibiotic resistance genes (ARGs) in Cephalosporin C fermentation residues using ionizing radiation, ozonation and thermal treatment. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 382, n. May 2019, p. 121058, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121058>

COLLINS, Carol H. Princípios básicos de cromatografia. *In*: COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. (org.). **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1997. p. 11–26. *E-book*.

COLLINS, Carol H. I. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. **Scientia Chromatographica**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 7–20, 2009. Disponível em: <http://iicweb.org/scientiachromatographica/v1n1a1/>

CONAB. Cana-de-açúcar: Acompanhamento da safra brasileira. **Companhia Nacional de Abastecimento**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 64, 2020.

CRESPI, Marisa S. *et al.* Characterization and thermal behavior of residues from

industrial sugarcane processing. **JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY**, VAN GODEWIJCKSTRAAT 30, 3311 GZ DORDRECHT, NETHERLANDS, v. 106, n. 3, p. 753–757, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1397-9>

DASENAKI, Marilena E.; THOMAIDIS, Nikolaos S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, [S. l.], v. 880, p. 103–121, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.013>. Acesso em: 2 nov. 2015.

DE ALWIS, Hemakanthi; HELLER, David N. Multiclass, multiresidue method for the detection of antibiotic residues in distillers grains by liquid chromatography and ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, [S. l.], v. 1217, n. 18, p. 3076–3084, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.081>. Acesso em: 2 nov. 2015.

DE OLIVA-NETO, Pedro *et al.* The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. **Formatex**, [S. l.], p. 371–379, 2013.

DE SOUZA DIAS, Marina Oliveira *et al.* Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, [S. l.], v. 15, p. 35–51, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>

DELAHAUT, Ph. *et al.* Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC–MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 801–809, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440040903552408>

DOELSCH, Emmanuel *et al.* Spectroscopic characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation. **Waste Management**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1929–1935, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.12.009>

DORES, Eliana F. G. C. *et al.* Multiresidue determination of herbicides in environmental waters from Primavera do Leste region (Middle West of Brazil) by SPE-GC-NPD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 866–873, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000500008>

DUELGE, Kaleb J.; NISHSHANKA, Upul; DE ALWIS, Hemakanthi G. An LC–MS/MS method for the determination of antibiotic residues in distillers grains. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 1053, p. 81–86, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.037>. Acesso em: 8 maio. 2017.

ESPANA-GAMBOA, E. *et al.* Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, [S. l.], v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0734242X10387313>

EUGÊNIA, Maria; QUEIROZ, Costa. Cromatografia Líquida no modo Column Switching para Bioanálises. **Scientia Chromatographica**, [S. l.], v. 9, p. 73–82, 2017.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION (CEN). **Foods of plant origin - Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - Modular QuEChERS-method (CEN - EN 15662)**. Brussels, Belgium: [s. n.], 2018.

FACETTI, Juan Francisco *et al.* Methyl tert-butyl ether (MtBE) in deep wells of the Patiño Aquifer, Paraguay: A preliminary characterization. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 647, p. 1640–1650, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.062>

FERRER, Imma; THURMAN, E. Michael. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1259, p. 148–157, 2012. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.059>

FU, Qiuguo *et al.* Meta-analysis of biosolid effects on persistence of triclosan and triclocarban in soil. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 210, p. 137–144, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.003>

FUESS, Lucas T.; RODRIGUES, Isabella J.; GARCIA, Marcelo L. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, [S. l.], v. 52, n. 11, p. 1063–1072, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1338892>

FUESS, Lucas Tadeu; GARCIA, Marcelo Loureiro. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 145, p. 210–229, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.003>

FUESS, Lucas Tadeu; GARCIA, Marcelo Loureiro. Bioenergy from stillage anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 162, p. 102–114, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.046>. Acesso em: 6 out. 2015.

GAGO-FERRERO, Pablo *et al.* Extended Suspect and Non-Target Strategies to Characterize Emerging Polar Organic Contaminants in Raw Wastewater with LC-HRMS/MS. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 49, n. 20, p. 12333–12341, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03454>

GAGO-FERRERO, Pablo *et al.* Suspect Screening and Regulatory Databases: A Powerful Combination To Identify Emerging Micropollutants. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 52, n. 12, p. 6881–6894, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06598>

GAGO-FERRERO, Pablo *et al.* Wide-scope target screening of >2000 emerging contaminants in wastewater samples with UPLC-Q-ToF-HRMS/MS and smart evaluation of its performance through the validation of 195 selected representative analytes. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 387, n. July 2019, p. 121712, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121712>

GARCÍA-GALÁN, Ma Jesús *et al.* Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain). **Journal of Hydrology**, [S. l.], v. 383, n. 1–2, p. 93–101, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.06.042>

GARCÍA-GALÁN, María Jesús; DÍAZ-CRUZ, Silvia; BARCELÓ, Damià. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1275, p. 32–40, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.004>

GARTISER, Stefan *et al.* Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. **Chemosphere**, [S. l.], v. 66, n. 10, p. 1839–1848, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.040>

GÓMEZ-PÉREZ, María Luz *et al.* Analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by high-resolution mass spectrometry: comparison between time-of-flight and Orbitrap. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [S. l.], v. 32, n. 10, p. 1637–1646, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1023742>

GÓMEZ-RÍOS, David *et al.* Degradation kinetics of clavulanic acid in fermentation broths at low temperatures. **Antibiotics**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 12–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010006>

GOMORI, G. [16] Preparation of buffers for use in enzyme studies. *In*: **Methods in**

Enzymology. [S. l.: s. n.]. v. 1p. 138–146. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01020-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01020-3)

GONÇALVES, Carlos M.; DA SILVA, Joaquim C. G. Esteve.; ALPENDURADA, Maria F. Evaluation of the pesticide contamination of groundwater sampled over two years from a vulnerable zone in Portugal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 55, n. 15, p. 6227–6235, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf063663u>

GONZÁLEZ, Luis; MEJÍA, Miguel. Impact of Ferti-Irrigation with Vinasse on Groundwater Quality. **Irrigation and Drainage**, [S. l.], v. 64, n. 3, p. 400–407, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ird.1873>

GRECCO, Caroline Fernandes *et al.* Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 99–110, 2018. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5935/sc.2018.006>

GROS, Meritxell *et al.* Veterinary pharmaceuticals and antibiotics in manure and slurry and their fate in amended agricultural soils: Findings from an experimental field site (Baix Empordà, NE Catalonia). **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 654, p. 1337–1349, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.061>

GROS, Meritxell; RODRÍGUEZ-MOZAZ, Sara; BARCELÓ, Damià. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1292, p. 173–188, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>

GROSS, Jürgen H. **Mass Spectrometry**. 3. ed. Cham: Springer International Publishing, 2017. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>

GURMESSA, Biyensa *et al.* Manure anaerobic digestion effects and the role of pre- and post-treatments on veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes removal efficiency. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 721, p. 137532, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137532>. Acesso em: 7 out. 2020.

GUSMAROLI, Lucia; INSA, Sara; PETROVIC, Mira. Development of an online SPE-UHPLC-MS/MS method for the multiresidue analysis of the 17 compounds from the EU “Watch list”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 410, n. 17, p. 4165–4176, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1069-8>

HEUER, Holger; SCHMITT, Heike; SMALLA, Kornelia. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. **Current Opinion in Microbiology**,

[S. l.], v. 14, n. 3, p. 236–243, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.009>

HOFF, Rodrigo Barcello *et al.* Residues of antibiotics in yeasts from ethanol production: a possible contamination route for feedingstuffs. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1880223>

HOFF, Rodrigo Barcellos; PIZZOLATO, Tânia Mara. Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 109, p. 83–96, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.002>

HOLČAPEK, Michal; JIRÁSKO, Robert; LÍSA, Miroslav. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1259, p. 3–15, 2012. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.072>

HOLLENDER, Juliane *et al.* High resolution mass spectrometry-based non-target screening can support regulatory environmental monitoring and chemicals management. **Environmental Sciences Europe**, [S. l.], v. 31, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0225-x>

HUSSAIN, Athar; DUBEY, Shashi Kant. Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. **Applied Water Science**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 535–542, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13201-015-0305-z>

HYNES, S. H. *et al.* Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 284–291, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900381>

IAMANAKA, Beatriz Thie *et al.* *Aspergillus* section *Flavi* diversity and the role of *A. novoparasiticus* in aflatoxin contamination in the sugarcane production chain. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 293, n. December 2018, p. 17–23, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.024>

ISLAM, M.; TOLEDO, R.; HAMDY, M. .. Stability of virginiamycin and penicillin during alcohol fermentation. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 369–376, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00052-5). Acesso em: 27 out. 2015.

JAKIMSKA, A.; KOT-WASIK, A.; NAMIEŚNIK, J. The Current State-of-the-Art in the Determination of Pharmaceutical Residues in Environmental Matrices Using Hyphenated

Techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 277–298, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408347.2013.835244>

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JELIĆ, Aleksandra; PETROVIĆ, Mira; BARCELÓ, Damià. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. **Talanta**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 363–371, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.077>

JIANG, Ze Pu *et al.* Effect of Long-Term Vinasse Application on Physico-chemical Properties of Sugarcane Field Soils. **Sugar Tech**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 412–417, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-012-0174-9>

KATAOKA, Hiroyuki; SAITO, Keita. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 809–832, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/bio.12.28>

KIM, Chansik *et al.* A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 217, p. 629–645, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.006>

KIM, Leesun *et al.* Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 22, p. e00063, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063>

KIM, Sunghwan *et al.* PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. D1, p. D1102–D1109, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>

KOSTIAINEN, Risto; KAUPPILA, Tiina J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1216, n. 4, p. 685–699, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.095>

KURODA, Keisuke *et al.* Assessment of groundwater pollution in Tokyo using PPCPs as sewage markers. **Environmental Science and Technology**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 1455–1464,

2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es202059g>

LAIQ UR REHMAN, Mian *et al.* Anaerobic digestion. **Water Environment Research**, [S. l.], v. 91, n. 10, p. 1253–1271, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wer.1219>

LANÇAS, Fernando Mauro. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/sc.2013.005>

LEHOTAY, S. J. *et al.* Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 485–520, 2007. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-34250304405&partnerID=40&md5=f9135368aa896c497d83ef352c262608>

LEWIS, J. A.; SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development II. Recommended approach and conditions for isocratic separation. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 721, n. 1, p. 15–29, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00771-7](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00771-7). Acesso em: 5 ago. 2016.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>

LIMA GOMES, Paulo C. F. *et al.* Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 407, n. 29, p. 8787–8801, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9038-y>

MALDANER, Liane; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 1559–1568, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700024>. Acesso em: 13 jan. 2017.

MARTI, Elisabet; VARIATZA, Eleni; BALCAZAR, Jose Luis. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 36–41, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>

MARTÍNEZ-PIERNAS, A. B. *et al.* Determination of organic microcontaminants in agricultural soils irrigated with reclaimed wastewater: Target and suspect approaches. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1030, p. 115–124, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.049>

MASSÉ, D. I. *et al.* Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 205–211, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00046-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00046-8)

MATTHIESSEN, Line *et al.* Increased momentum in antimicrobial resistance research. **The Lancet**, [S. l.], v. 388, n. 10047, p. 865, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31425-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31425-8)

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 75, n. 13, p. 3019–3030, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac020361s>

MCNAIR, Harold M.; MILLER, James M. Introduction. *In*: **BASIC GAS CHROMATOGRAPHY**. 2. ed. Hoboken, USA: Wiley, 2009. p. 1–13. *E-book*.

MILHOME, M. A. L. *et al.* Influence the use of pesticides in the quality of surface and groundwater located in irrigated areas. **Int. J. Environ. Res**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 255–262, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.25016>

MORAES, Bruna S. *et al.* Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy , environmental , and economic perspectives : Profit or expense ? **Applied Energy**, [S. l.], v. 113, p. 825–835, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.018>

MORAES, Bruna S.; ZAIAT, Marcelo; BONOMI, Antonio. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 44, p. 888–903, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>

MORENO-GONZÁLEZ, David *et al.* Validation of a new method based on salting-out assisted liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS for the determination of betalactam antibiotics in infant dairy products. **Talanta**, [S. l.], v. 167, n. February, p. 493–498, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.045>

MORENO-GONZÁLEZ, David; GARCÍA-CAMPAÑA, Ana M. Salting-out assisted liquid–liquid extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 221, p. 1763–1769, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.107>. Acesso em: 23 nov. 2017.

MUTHAIYAN, Arunachalam; LIMAYEM, Alya; RICKE, Steven C. Antimicrobial

strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 351–370, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.06.005>. Acesso em: 13 mar. 2015.

NASCIMENTO, Diana. **Do vinho para o etanol**. [s. l.], 2015. Disponível em: <https://www.jallesmachado.com/pt/novidades/10410>. Acesso em: 5 jul. 2020.

NOGUEIRA, Lah *et al.* **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. [S. l.: s. n.]. *E-book*. Disponível em: http://www.cgee.org.br/publicacoes/conferencia_bioetanol.php

OBERACHER, Herbert *et al.* A European proposal for quality control and quality assurance of tandem mass spectral libraries. **Environmental Sciences Europe**, [S. l.], v. 32, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00314-9>

OLIVA-NETO, Pedro de; YOKOYA, Fumio. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 10–14, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100003>. Acesso em: 27 out. 2015.

OLIVEIRA, Bruna Gonçalves De *et al.* Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, [S. l.], v. 200–201, p. 77–84, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.02.005>

OLIVEIRA, Bruna Gonçalves De *et al.* Greenhouse gas emissions from sugarcane vinasse transportation by open channel: A case study in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 94, p. 102–107, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.02.025>

OLIVEIRA, Marcos de. **Alternative vinasse**. [s. l.], 2011. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/en/2011/08/01/alternative-vinasse-2/>. Acesso em: 9 abr. 2020.

OSTRY, Vladimir; MALIR, Frantisek; RUPRICH, Jiri. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. **Toxins**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 1574–1586, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins5091574>

PAN, Hong Wei *et al.* Levels and distributions of organochlorine pesticides in the soil–groundwater system of vegetable planting area in Tianjin City, Northern China. **Environmental Geochemistry and Health**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 417–429, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10653-016-9899-9>

PENA, Angelina *et al.* Determination of tetracycline and its major degradation products by chemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 405, n. 1–2, p. 51–56, 2000.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00668-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00668-6)

PETRIE, Bruce; BARDEN, Ruth; KASPRZYK-HORDERN, Barbara. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, [S. l.], v. 72, p. 3–27, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>. Acesso em: 28 ago. 2014.

PETROVIC, Mira. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 1, p. e25–e33, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2013.11.004>

PHENOMENEX. **Fact: Strata-X outperforms Oasis HLB**. [s. l.], 2010. Disponível em: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/e62d67d8-eef5-42f0-b829-4e188661ab57.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2021.

POLSON, Cara *et al.* Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [S. l.], v. 785, n. 2, p. 263–275, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00914-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00914-5)

POPOVA, Inna E.; MORRA, Matthew J.; PARIKH, Sanjai J. Pressurized liquid extraction of six tetracyclines from agricultural soils. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 35–40, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1530547>

RASHID, A. *et al.* Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1217, n. 17, p. 2933–2939, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.060>

REAL QUÍMICA. **Controle das bactérias**. [s. l.], 2021. Disponível em: <http://www.quimicareal.com.br/qrhp/produtos/abrir/1>. Acesso em: 21 fev. 2021.

RIBAS, Maria Magdalena Ferreira *et al.* Microbial succession within an Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor (ASBBR) treating cane vinasse at 55°C. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 52, n. August, p. 1027–1036, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000400028>

RICHARDSON, Susan D.; KIMURA, Susana Y. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 473–505, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05269>

RÍOS LEAL, Elvira; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Refugio; GALINDO, Tomás. Separation of phenolic compounds from sugarcane bagasse pith and their determination by hplc. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 369–382, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02773819408003103>

RODRIGUEZ-MOZAZ, Sara *et al.* Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, [S. l.], v. 69, p. 234–242, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>

ROSSI, David T.; ZHANG, Nanyan. Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. [S. l.], v. 885, p. 97–113, 2000.

SÁ, Lívian R. Vasconcelos de; CAMMAROTA, Magali C.; FERREIRA-LEITÃO, Viridiana S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, [S. l.], v. 388, p. 539–547, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140138>

SADEGHINEZHAD, Emad *et al.* Sustainability and environmental impact of ethanol as a biofuel. **REVIEWS IN CHEMICAL ENGINEERING**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 51–72, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/revce-2013-0024>

SANTOS, H. G. dos *et al.* **O novo mapa de solos do Brasil: legenda atualizada**. [S. l.], 2011. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/920267>. Acesso em: 7 maio. 2020.

SANZ, J. L. *et al.* The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, 175 FIFTH AVE, NEW YORK, NY 10010, v. 46, n. 5–6, p. 587–592, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002530050865>

SCHEEL, Guilherme Luiz; TEIXEIRA TARLEY, César Ricardo. Simultaneous microextraction of carbendazim, fipronil and picoxystrobin in naturally and artificial occurring water bodies by water-induced supramolecular solvent and determination by HPLC-DAD. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 297, p. 111897, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111897>

SCHYMANSKI, Emma L. *et al.* Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. **Environmental Science and Technology**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 2097–2098, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es5002105>

SEIFRTOVÁ, Marcela *et al.* An overview of analytical methodologies for the

determination of antibiotics in environmental waters. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 649, n. 2, p. 158–179, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.031>

SEKAR, Ramaiyan; WU, Hui-Fen. Quantitative Method for Analysis of Monensin in Soil, Water, and Urine by Direct Combination of Single-Drop Microextraction with Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 78, n. 18, p. 6306–6313, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac060123n>

SHARMA, Bhavisha *et al.* Agricultural utilization of biosolids: A review on potential effects on soil and plant grown. **Waste Management**, [S. l.], v. 64, p. 117–132, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.03.002>

SHARMA, Bhavisha *et al.* Recycling of Organic Wastes in Agriculture: An Environmental Perspective. **International Journal of Environmental Research**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 409–429, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s41742-019-00175-y>

SILVA, Carla Grazieli Azevedo da; COLLINS, Carol H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000400020>. Acesso em: 21 ago. 2017.

SILVA, Josué J. *et al.* Aflatoxins in sugarcane production chain: what could be the source? **Current Opinion in Food Science**, [S. l.], v. 29, p. 94–98, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.010>

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, J. W. Detection. *In: Introduction to modern liquid chromatography*. 3. ed. Hoboken, USA: [s. n.], 2010 a. p. 147–198. *E-book*.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. Introduction. *In: Introduction to modern liquid chromatography*. 3. ed. Hoboken, USA: Wiley, 2010 b. p. 1–18. *E-book*.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. Basic concepts and the control of separation. *In: Introduction to modern liquid chromatography*. 3 ed ed. Hoboken: Wiley, 2010 c. p. 20–86. *E-book*.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. Normal-phase chromatography. *In: Introduction to modern liquid chromatography*. 3. ed. Hoboken, USA: [s. n.], 2010 d. p. 361–402. *E-book*.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. Reversed-phase

chromatography for neutral samples. *In: Introduction to modern liquid chromatography*. 3. ed. Hoboken, USA: [s. n.], 2010 e. p. 253–302. *E-book*.

SPIRITO, Catherine M. *et al.* Redundancy in anaerobic digestion microbiomes during disturbances by the antibiotic monensin. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 84, n. 9, p. 1–18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02692-17>

SULEIMAN, Afnan Khalil Ahmad *et al.* Recycling organic residues in agriculture impacts soil-borne microbial community structure, function and N₂O emissions. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 631–632, p. 1089–1099, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.116>

SUPELCO. **Solid Phase Extraction Products**. [s. l.], [s. d.]. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t402150.pdf. Acesso em: 14 jan. 2021.

SVAHN, Ola; BJÖRKLUND, Erland. Thermal stability assessment of antibiotics in moderate temperature and subcritical water using a pressurized dynamic flow-through system. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 872–880, 2015.

THAVEESRI, J.; BOUCNEAU, G.; VERSTRAETE, W. Effect of monensin on UASB-reactor performance. **Environmental Technology**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 491–496, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593339409385454>

TURNIPSEED, S. B. *et al.* LC/MS confirmation of ionophores in animal feeds. **Journal of AOAC International**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 640–647, 2001. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035347343&partnerID=40&md5=18205ca391bb850d5889b8a9e1be17e7>

VALENTE, Inês Maria; GONÇALVES, Luís Moreira; RODRIGUES, José António. Another glimpse over the salting-out assisted liquid–liquid extraction in acetonitrile/water mixtures. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1308, p. 58–62, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.014>

VALSECCHI, Sara *et al.* On-line sample extraction and purification for the LC-MS determination of emerging contaminants in environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 8, p. 27–37, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2015.08.001>

VAREL, V. H. *et al.* Effect of anaerobic digestion temperature on odour, coliforms and chlortetracycline in swine manure or monensin in cattle manure. **Journal of Applied**

Microbiology, [S. l.], v. 112, n. 4, p. 705–715, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05250.x>

VESSECCHI, Ricardo *et al.* **Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa**. [S. l.]: scielo, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011001000025

WALTER, Audrey L. *et al.* Virginiamycin Thermal Degradation Kinetics in a Model Matrix Simulating Distillation Conditions within a Commercial Fuel Ethanol Production Facility. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 120, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.12.003>

WATERS CORPORATION. **Hlb Product and Generic Method Information**. [s. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/oasis10-11.pdf>. Acesso em: 3 maio. 2018.

WILKIE, Ann C.; RIEDESEL, Kelly J.; OWENS, John M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 63–102, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00017-9). Acesso em: 4 maio. 2015.

WISHART, David S. *et al.* HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, n. D1, p. D608–D617, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>

XIAO, Leilei *et al.* **Effect of Antibiotics on the Microbial Efficiency of Anaerobic Digestion of Wastewater: A Review**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.611613>

XU, Mingfei *et al.* Simultaneous determination of florfenicol with its metabolite based on modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample pretreatment and evaluation of their degradation behavior in agricultural soils. **Journal of Separation Science**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 211–217, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.201400919>

ZHANG, Jun *et al.* Salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile: A new high throughput sample preparation technique for good laboratory practice bioanalysis using liquid chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 419–425, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bmc.1135>

ZHANG, Quanguo; HU, Jianjun; LEE, Duu-Jong. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 98, p. 108–119, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.029>. Acesso em: 24 jan. 2017.

ZHANG, Wei. Fluorocarbon stationary phases for liquid chromatography applications. **Journal of Fluorine Chemistry**, [S. l.], v. 129, n. 10, p. 910–919, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2008.07.001>

ZHANG, Zhaohan *et al.* Enhancing anaerobic digestion and methane production of tetracycline wastewater in EGSB reactor with GAC/NZVI mediator. **Water Research**, [S. l.], v. 136, p. 54–63, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.025>

ZHOU, Li-Jun *et al.* Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1244, p. 123–138, 2012. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.076>

ZHU, Zhou *et al.* Development of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Method for Simultaneous Determination of 15 Aminoglycoside Residues in Porcine Tissues. **Food Analytical Methods**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 2587–2599, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0446-1>