



Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC  
Centro Tecnológico - CTC  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - EQA

## RELATÓRIO DE ESTÁGIO NÃO OBRIGATÓRIO - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).

Angélica Lorenzetti

Florianópolis, junho de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS  
COORDENADORIA DE ESTÁGIO/EQA

FICHA DE AVALIAÇÃO DE RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1. DADOS DO ESTAGIÁRIO

Nome: Angélica Benvenutti  
Matrícula: 10245008 Curso: Engenharia de Alimentos.....  
Departamento .....Depto. de Eng. Química e Eng. de Alimentos.....

2. DADOS DO ESTÁGIO

Período: 16/09/2013 a 31/07/2014. Duração: 46 semanas Horas: 920

Atividades Envolvidas:

Análises de pH, açú, umidade, acidez em mel e substâncias  
de pesquisa, validação de método e NMR

Supervisor de Estágio na Empresa: Kleber Paguer

3. DADOS DA EMPRESA

Empresa: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA  
Endereço: Rua José Humberto, nº 147, Bairro Rebanat  
Fone: 3261.9481 Cidade: São José Estado: SC  
Ramo de Atividade: Laboratório Federal

4. AVALIAÇÃO

Conceito (00 - 10) 9,5  
Orientador da UFSC (Nome Completo): Deborah de Oliveira  
Assinatura do Orientador da UFSC: Deborah de Oliveira  
Coordenador de Estágios: José Miguel Müller.....  
Enquadramento concedido: ( ) Curricular Obrigatório (X) Não-Obrigatório

Florianópolis, 16 de julho de 201 4

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
COORDENADORIA DE ESTÁGIO/EQA

**AValiação DO ESTÁGIO**  
(Para uso do Supervisor)

**1. IDENTIFICAÇÃO:**

Nome: Angélica Boemeth  
Nº de Matrícula: 09245004 Fase: 10  
Curso: Engenharia de Alimentos  
Coordenador de Estágios: Jose Miguel Müller  
Nome do Supervisor: Heitor Daguer  
Local do Estágio: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
Endereço: Rua João Guimichê, nº 117, Bairro Ribeirão  
Fone: 7261.9981 Cidade: São José Estado: SC

**2. AVALIAÇÃO** (Nota de 01 a 10)

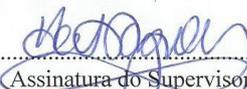
Conhecimentos Gerais: ..... 10  
Conhecimentos específicos: ..... 10  
Assiduidade: ..... 10  
Criatividade: ..... 9  
Responsabilidade: ..... 10  
Iniciativa: ..... 10  
Disciplina: ..... 10  
Sociabilidade: ..... 10

Média: ..... 9,88

Outras Observações:

A estagiária apresenta ótimo relacionamento com os colegas de trabalho e apresentou ótimo desempenho na execução das atividades atribuídas que lhe foram delegadas.

Data da Avaliação: 24/06/14

  
Assinatura do Supervisor

HEITOR DAGUER  
FISCAL FEDERAL AGROPECUÁRIO  
Carteira nº 2116  
CHEFE DO SLAV/SC/LANAGRO/RS

## Sumário

1. LISTA DE TABELAS E FIGURAS .....	5
2. INTRODUÇÃO .....	6
3. APRESENTAÇÃO DA EMPRESA .....	7
4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....	8
4.1. Preparo de amostra .....	8
4.2. Padrões de trabalho .....	8
4.3. Soluções padrão .....	8
4.4. Desenvolvimento e otimização do processo analítico .....	8
4.5. Parâmetros e critérios de aceitação de desempenho de um procedimento analítico .....	9
4.6. Procedimento de Estimção e Critérios de Aceitação da Curva de Calibração e da Linearidade .....	10
4.7. Seletividade e Efeito Matriz .....	10
4.8. Procedimento de Determinação do Efeito Matriz .....	10
4.9. Veracidade/Recuperação .....	10
4.10. Procedimento de Determinação da Veracidade/Recuperação .....	10
4.11. Precisão .....	11
4.12. Repetitividade .....	11
4.13. Limite de detecção (LD) .....	11
4.14. Limite de Quantificação (LQ) .....	11
4.15. Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ) .....	11
4.16. Incerteza de Medição Analítica (IMA) .....	11
4.17. Estudo de Robustez, Escopo e Portabilidade. ....	11
4.18. Relatório de Validação .....	12
4.19. Validação .....	13
5. CONCLUSÃO .....	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18

## 1. LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Gradiente cromatográfico de análise de RAC em músculo suíno, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Tabela 2 - Condições do espectrômetro de massas para determinações específicas RAC e CBT (PI).

Tabela 1 - Volumes (em  $\mu\text{L}$ ) de solução de ractopamina 1 ppm e clenbuterol (padrão interno) 1 ppm, e de amostra “branca” para preparo da curva de calibração em matriz, para determinação de ractopamina em músculo suíno, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Tabela 4 - Resumo dos itens avaliados

Figura 1 - Delineamento experimental, fluxograma das etapas básicas de desenvolvimento, validação e controle na rotina de um procedimento de análise química.

## 2. INTRODUÇÃO

Nesse relatório de estágio será exposto o que se aprendeu enquanto estagiária no ministério de agricultura, pecuária e abastecimento-MAPA. Descrevendo as atividades realizadas nos últimos 12 meses, período em que houve oportunidade de se conhecer as análises, métodos e desenvolvimentos tecnológicos realizados nesse local.

O fato de ser em um local público deu a esse estágio características diferentes das de uma indústria ou laboratório particular, possibilitando-se desenvolver uma visão de como funcionam internamente órgãos públicos e suas diretrizes.

Ao iniciar um estágio espera-se agregar conhecimento para uma melhor formação acadêmica, buscando aplicar a teoria aprendida em sala de aula.

Entre os procedimentos de rotina realizados e as atividades de pesquisa desenvolveu-se habilidades laboratoriais, capacidade de raciocínio rápido para resolver problemas e relações interpessoais que serão aprofundadas no decorrer do relatório.

### **3. APRESENTAÇÃO DA EMPRESA**

A história do Ministério da Agricultura começa em 1860, durante o 2º Império. Originalmente denominada Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Comércio e Obras Públicas, a pasta é criada por decisão da Assembléia Legislativa, integrando a estrutura formal do gabinete de Dom Pedro II.

Refletindo a importância do agronegócio de carnes nos mercados nacional e internacional, a Medida Provisória 2216-37, de 31 de agosto de 2001, altera a denominação da pasta para Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), mantido até os dias atuais.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) é responsável pela gestão das políticas públicas de estímulo à agropecuária, pelo fomento do agronegócio e pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor. No Brasil, o agronegócio contempla o pequeno, o médio e o grande produtor rural e reúne atividades de fornecimento de bens e serviços à agricultura, produção agropecuária, processamento, transformação e distribuição de produtos de origem agropecuária até o consumidor final. Assim, o Ministério da Agricultura busca integrar sob sua gestão os aspectos mercadológico, tecnológico, científico, ambiental e organizacional do setor produtivo e também dos setores de abastecimento, armazenagem e transporte de safras, além da gestão da política econômica e financeira para o agronegócio. Com a integração do desenvolvimento sustentável e da competitividade, o Mapa visa à garantia da segurança alimentar da população brasileira e a produção de excedentes para exportação, fortalecendo o setor produtivo nacional e favorecendo a inserção do Brasil no mercado internacional.

Para a consecução de seus objetivos, o Mapa conta com uma estrutura fixa de cinco secretarias, 27 superintendências estaduais e suas respectivas unidades, uma rede de seis laboratórios, além de duas vinculadas, o Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet) e a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac), que abrigam cerca de 11 mil servidores espalhados por todo o Brasil.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) são empresas públicas que atuam sobre ingerência e coordenação do Mapa. Também são entes descentralizados do ministério, organizados sobre a forma de sociedades de economia mista, as Centrais de Abastecimento de Minas Gerais S.A (Ceasa/MG), a Companhia de Armazéns e Silos de Minas Gerais (Casemg) e a Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (Ceagesp). Além disso, o ministério coordena as ações e políticas de 28 Câmaras Setoriais e 8 Câmaras Temáticas relacionadas aos diversos setores produtivos do agronegócio brasileiro. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é organizado em secretarias, responsáveis pelos diferentes setores do agronegócio nacional.

O Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul(LANAGRO-RS) é um dos laboratórios oficiais do MAPA, sua função é atender a demanda por análises e desenvolver novos métodos para manter o escopo atualizado quanto a novos produtos, novos aditivos ou fraudes. O Sistema de laboratório avançado de Santa Catarina (SLAV-SC) é uma extensão do LANAGRO-RS.

## **4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

O SLAV-SC atende a demanda dos fiscais federais por análises para controle de produtos de empresas que tenham o Selo de Inspeção Federal (SIF), essas análises são consideradas como rotina dentro do laboratório, pois são realizadas periodicamente. Todos os colaboradores do laboratório podem ser capacitados para realizar essas análises, eu fui capacitada para realizar as análises de pH, atividade água, acidez e umidade em mel e umidade de produtos de origem animal.

A capacitação consiste na realização da atividade com o acompanhamento da técnica por seis vezes em dias diferentes, para que o novo analista tenha total domínio da técnica, preparo de soluções necessárias, utilização de equipamentos, cálculos e análise de resultados.

Para executar as análises de rotina federal passei por treinamento para cada uma delas. Após o treinamento realizava quando solicitado, intercalando com as atividades de pesquisa e desenvolvimento.

Na parte de pesquisa trabalhei com validação de método, seguindo guias do MAPA, nos seguintes passos:

### **4.1. Preparo de amostra**

Para cada método é necessário preparar a amostra, extraindo dela o composto de interesse, nessa etapa cuidados com contaminações são definitivos para o sucesso do método.

### **4.2. Padrões de trabalho**

Os materiais/padrões de trabalho devem ter sido calibrados com um Material de Referência Certificado (MRC). Além de serem armazenados em condições controladas.

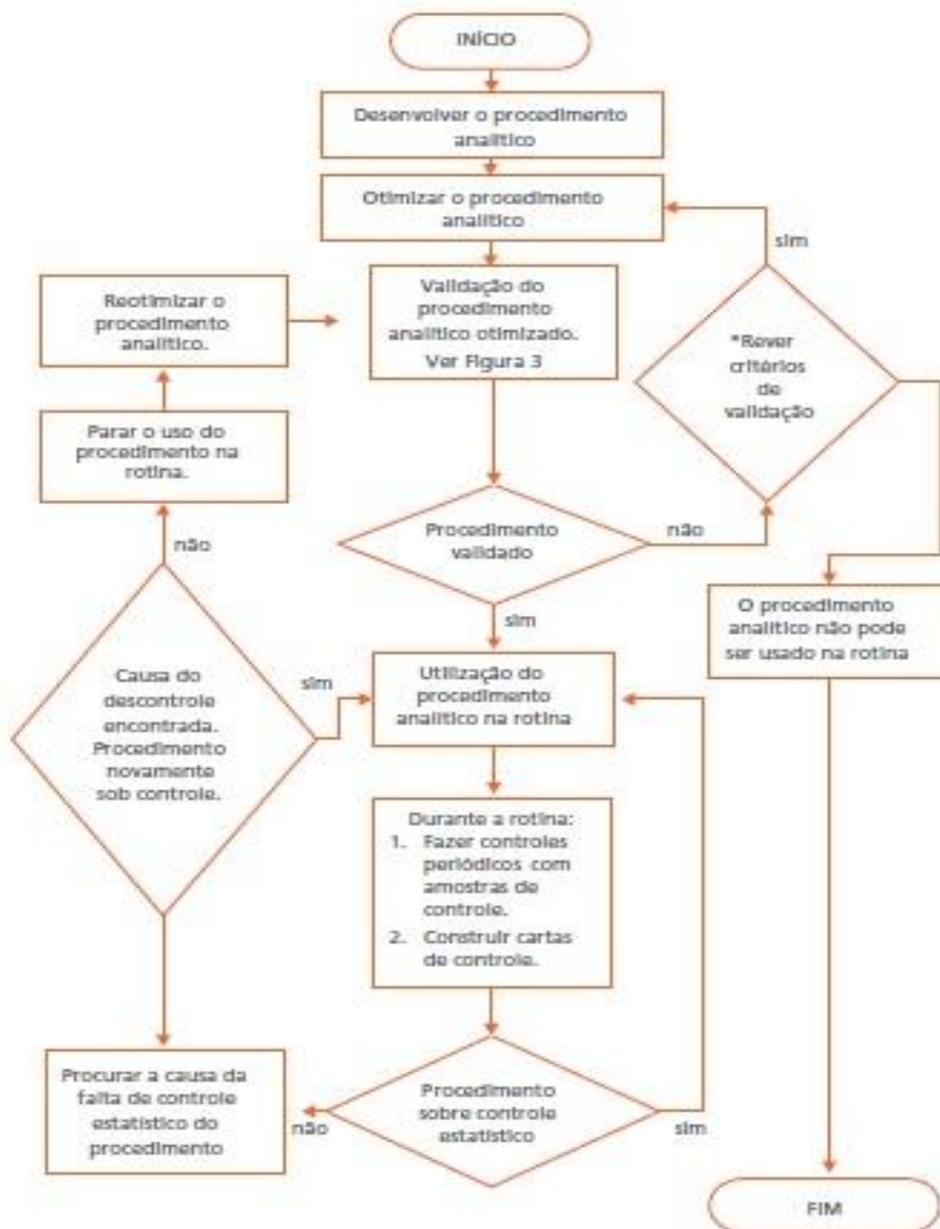
### **4.3. Soluções padrão**

O cuidado com a precisão no preparo dessas soluções é definitivo, pois através delas serão determinados outros parâmetros.

### **4.4. Desenvolvimento e otimização do processo analítico**

Na otimização do procedimento analítico é feito um estudo dos diversos fatores experimentais que podem afetar o resultado analítico, procurando-se estabelecer as condições experimentais que produzam um resultado com qualidade adequada ao propósito do uso do resultado analítico.

Figural: Delineamento experimental, fluxograma das etapas básicas de desenvolvimento, validação e controle na rotina de um procedimento de análise química.



#### 4.5. Parâmetros e critérios de aceitação de desempenho de um procedimento analítico

Níveis de interesse analítico: Para as substâncias permitidas (toleradas), devem ser levados em consideração os Limites Máximos Permitidos (LMR ou TMC). Esses valores estão disponíveis em laudos.

Quando não houver LMR ou TMC definidos para os analitos permitidos, deve ser tomado como referência o valor estabelecido nas normativas publicadas pela área competente do Mapa.

Para os analitos banidos ou proibidos, os laboratórios devem utilizar como referência – o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR).

#### **4.6. Procedimento de Estimação e Critérios de Aceitação da Curva de Calibração e da Linearidade**

Três são os tipos possíveis de curva de calibração que podem ser elaboradas:

1. CCAS – Curva de Calibração do Analito em Solução: construída a partir dos padrões de calibração do analito puro em solvente. Este tipo de curva de calibração somente poderá ser utilizado se comprovada a inexistência do efeito de matriz.
2. CCMBF – Curva de Calibração da Matriz Branca Fortificada: construída a partir da matriz branca fortificada com os padrões de calibração do analito puro.
3. CCEMBF – Curva de Calibração do Extrato da Matriz Branca Fortificado: construída a partir do extrato da matriz branca fortificado com os padrões de calibração do analito puro.

O número total de respostas instrumentais ( $N_y$ ) deve ser igual ou superior a 30 ( $N_y \geq 30$ ) e todas as ( $N_y$ ) leituras instrumentais devem ser feitas aleatoriamente.

Dessa forma, as curvas analíticas devem ser obtidas a partir de, no mínimo, cinco níveis ( $I \geq 5$ ) de concentração, preparados em pelo menos três réplica.

#### **4.7. Seletividade e Efeito Matriz**

É a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, isóbaros e componentes que possam gerar interferência poliatômica, entre outras). A verificação da seletividade do procedimento analítico deve ser realizada a partir da comparação entre os sinais (resposta instrumental) advindos do processamento da matriz, do extrato/digerido da matriz fortificada e do analito puro em solvente.

#### **4.8. Procedimento de Determinação do Efeito Matriz**

Preparar uma curva de calibração CCAS com no mínimo cinco níveis  $I$  de concentração ( $I \geq 5$ ), usando soluções padrão de calibração, não matrizadas, de analito puro em solvente puro. Um mínimo  $J$  de seis réplicas ( $J \geq 6$ ) por nível de fortificação de:

1. Analito em solvente puro (amostra não matrizada);
2. Analito em matriz branca ou em extrato/digerido de matriz branca (amostra matrizada).

Após isso proceder a análise dos resultados.

#### **4.9. Veracidade/Recuperação**

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A determinação da veracidade deve ser feita com material de referência certificado – MRC. Caso não haja MRC disponível, a determinação da recuperação deve ser feita por intermédio de matriz branca fortificada. Na falta de uma matriz branca pode-se usar uma amostra de ensaio com baixa concentração do analito.

A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como limpeza (*clean-up*), diluições ou pré-concentração, derivatizações, secagens.

#### **4.10. Procedimento de Determinação da Veracidade/Recuperação**

Analisar seis réplicas de Material de Referência Certificado (MRC) ou de matriz branca, antes e após fortificação com os padrões de calibração, em no mínimo três níveis de concentração (alta, média e baixa).

#### **4.11. Precisão**

É a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Pode ser expressa por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade.

#### **4.12. Repetitividade**

É a precisão intracorrida, ou seja, é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição.

#### **4.13. Limite de detecção (LD)**

É o menor valor em que é possível detectar o analito naquela análise, garantindo sua presença.

#### **4.14. Limite de Quantificação (LQ)**

O limite de quantificação é a menor concentração ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza aceitável ou Incerteza Máxima Aceitável ( $I_{max}$ ).

#### **4.15. Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ )**

São parâmetros que medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de concentração no qual se toma alguma decisão, o chamado nível de interesse. São função do limite máximo requerido (LMR).

$CC\alpha$  e  $CC\beta$  devem ser inferiores ao Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR), no caso de substâncias banidas. Para as substâncias com LMR definidos,  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  são sempre maiores que o LMR, devendo ser o mais próximo possível dele.

#### **4.16. Incerteza de Medição Analítica (IMA)**

Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. É a principal característica metrológica do resultado de uma medição para se estabelecer e se verificar o atendimento ao critério de adequação ao uso pretendido.

As fontes que mais contribuem para a incerteza combinada do resultado analítico são:

1. As incertezas de amostragem, subamostragem e de preparo de amostras de análise;
2. A incerteza de reprodutibilidade ou de precisão intermediária (ou reprodutibilidade intralaboratorial), *urepro* ou *uprecint*;
3. A incerteza relacionada com a estimação da recuperação, caso o resultado seja corrigido por ela, ou com a faixa permitida de variação da recuperação, se o resultado não for corrigido pela recuperação.
4. A incerteza de previsão da curva de calibração do instrumento de medição analítica.

#### **4.17. Estudo de Robustez, Escopo e Portabilidade.**

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão sensível o resultado analítico é a variações nas condições experimentais do procedimento, os chamados fatores ou tratamento ou grandezas de influência.

A portabilidade é a característica de um procedimento analítico que permite sua transferência para outro local, sem perda de suas características metrológicas e de desempenho analítico.

As etapas do estudo de robustez são:

1. Identificar os possíveis fatores que possam influenciar os resultados.
2. Variar levemente cada fator em pelo menos dois níveis (tratamentos). Essas variações devem ser da mesma ordem daquelas que podem ocorrer durante o uso do procedimento analítico na rotina.
3. Realizar um teste de robustez utilizando a abordagem clássica, variando um fator de cada vez, ou utilizando a abordagem do planejamento fatorial completo ou fracionário. Essa última abordagem é preferível, uma vez que exige menor número de experimentos, é mais rápida, eficiente e econômica.
4. Identificados na etapa anterior os fatores que têm efeitos mais significativos sobre o resultado da medição analítica, um novo estudo mais detalhado é realizado apenas com esses fatores mais significantes. O objetivo é estabelecer a faixa de variação aceitável desses fatores, de forma que não comprometa a veracidade e a precisão do resultado analítico.
5. Os fatores que afetam significativamente o resultado analítico e as faixas permitidas de suas variações devem ser explicitamente identificados no procedimento de análise, ressaltando-se os cuidados especiais com esses fatores.

#### **4.18. Relatório de Validação**

Após a validação, um documento deve ser redigido no qual os desempenhos alcançados pelo procedimento validado são relatados. Esse documento deve conter o maior número possível de informações de forma a permitir uma forte evidência para demonstrar a qualidade do procedimento validado e sua adequação ao uso pretendido. Algumas das informações que devem constar deste relatório final de validação são:

1. Identificação do Laboratório, local, período de realização dos experimentos de validação, data de sua conclusão, incluindo a confecção do relatório final;
2. Nomes e assinaturas do gerente da qualidade, gerente técnico, aprovação do documento, relação dos técnicos que participaram da validação.
3. A identificação do(s) analito(s) validados e a sua forma de apresentação nas matrizes validadas – e.g., sólida/naturalmente contaminada/solúvel em/suspensão em/digerível em/inclusão em/resíduo de/contaminação de/metabólico de/subproduto de/degradação de etc. – e, quando apropriado, incluir a especificação, por exemplo: arsênico total, metilmercúrio, Cr(III), FeO.
4. Declaração do uso pretendido, estabelecendo requisitos de tendência e incertezas máximas aceitáveis. Por exemplo: “A análise de triagem de micotoxinas com teor entre 0,1 a 50 ng/g em sementes alimentícias com faixa de recuperação permitida entre 60% e 120% e incerteza expandida relativa máxima de 25%”.
5. Especificar a faixa de concentração validada de cada analito (e.g., “0–500 ng/g”) para cada matriz do conjunto de matrizes validadas e explicitamente especificadas.
6. Um protocolo descrevendo equipamentos, materiais, reagentes, calibração dos instrumentos de medição analítica qualificados para o procedimento analítico validado.
7. Recomendações de segurança necessárias para equipamentos e pessoas.
8. Procedimento analítico final e definitivo, no qual, além de todas as etapas detalhadamente descritas, devem estar relatadas todas as recomendações de cuidados especiais em relação ao controle e às faixas aceitáveis dos fatores que têm efeito significativo no resultado analítico, conforme detectado no estudo de robustez. Por exemplo: *i* - Extração temperatura à  $(60 \pm$

5)°C por (50 ± 5) min sob agitação vigorosa; *ii* - Fluxo de gás carreador de (80 ± 10) mL/minuto etc.

9. Os registros, as análises estatísticas e o status do critério de aceitação para cada parâmetro de desempenho estudado.

10. Uma declaração relativa ao atendimento ou não do uso pretendido.

#### 4.19. Validação

Participou-se do desenvolvimento do projeto de validação de métodos para determinação de ractopamina em alimentos para suínos, carne suína e produtos derivados, segue um pequeno resumo de como se deu o processo de validação:

Preparo de soluções

Foram preparadas soluções estoque de clenbuterol e ractopamina em metanol na concentração de 1000mg/L, para a fase móvel, preparou-se uma solução de acetato de amônio 100 mmol/L. Para a extração foi utilizado MgSO<sub>4</sub> (1,2 g), C18 (0,4 g) e PSA (0,4 g) em acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido acético.

Para definir as condições cromatográficas as análises foram conduzidas em sistema HPLC (Waters 2795), operado pelo software MassLynx. Foi utilizada Coluna C18, Venusil XBP (Agela), 3 µm 100Å 100 x 2,1 mm e coluna de guarda C18 (Phenomenex, Torrance, EUA), 5 µm, 4,0 mm x 3,0 mm. O volume de injeção adotado foi de 20 µL. a temperatura da coluna foi ajustada em 40°C e o fluxo estabelecido em 0,3 mL/min. Os fluxos e tempos estão descritos na tabela 1:

Tabela 2. Gradiente cromatográfico da análise de RAC em músculo suíno, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Tempo (min)	% Solv. A	% Solv. B
0	95	5
3	10	90
6	10	90
7	95	5
12	95	5

Legenda: Solv. A, solução aquosa de acetato de amônio 5 mmol/L, acidificado com 0,1% de ácido fórmico; Solv. B, solução de acetonitrila, com acetato de amônio 5 mmol/L, contendo ácido fórmico 0,1%. Fonte: o próprio autor.

Para a determinação das condições do equipamento, após variar algumas condições e baseando-se na literatura chegou-se as seguintes condições como as mais indicadas:

Tabela 3. Condições do espectrômetro de massas para determinação específicas RAC e CBT (PI).

Analítico	Íon precursor [M+H] <sup>+</sup>	Íon quantitativo (m/z)	Tempo de Transição (s)	Cone (V)	Energia (V)
<b>RAC</b>	302,2	164,2	0,2	25	16
		121,3			16
<b>CBT</b>	286,1	204,3	0,2	23	15
		268,4			15

#### Preparo de amostra

Músculo suíno foi fracionado em tubos tipo falcon com alíquotas de  $5,0 \pm 0,1$  g, mantido congelado até o momento da análise. Após descongelamento das amostras, adicionou-se 50  $\mu$ L de padrão interno de clenbuterol-D9 (1 mg/L). Em seguida, foram adicionados 10 mL da solução de ácido acético 0,1% em acetonitrila; que foram adicionados em quatro etapas, de alíquotas de 2,5 mL de solução, com homogeneização da amostra, utilizando bastão de vidro.

As amostras foram submetidas à homogeneização, em mesa agitadora, durante 20 minutos, em velocidade mediana, de modo que o solvente entrasse em contato com os dois lados do tubo, durante a movimentação do equipamento.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas, a 4000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O conteúdo líquido foi vertido para outro tubo tipo *falcon*, contendo 1,2 g de sulfato de magnésio anidro, 0,4 g de C18 e 0,4 g de PSA (QuEChERS). O conteúdo foi agitado, manualmente, de forma vigorosa, por cerca de 30 segundos; Após agitação, as amostras foram submetidas a centrifugação, a 4000 rpm, por 10 minutos, a 4°C.

O conteúdo líquido, foi vertido para outro tubo tipo *falcon* e submetido a evaporação, com fluxo de nitrogênio, a 50°C, até total evaporação do solvente.

Após concentração, as amostras evaporadas foram ressuspensas com 1000  $\mu$ L da mistura de fase móvel (A:B; 95:5), com posterior agitação.

Todo o conteúdo líquido da amostra foi vertido para microtubos sendo submetido a centrifugação, a 12 000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Do conteúdo, recolheu-se alíquota de 200  $\mu$ L do sobrenadante, submetido a análise no sistema de LC-MS/MS.

#### Preparo de amostras tissue standart

Essas amostras têm como função verificar se os padrões adicionados estão chegando ao final do processo, se não está havendo perdas ou contaminações durante a fase de extração. São feitas adicionando o padrão de ractopamina apenas no final do processo.

#### Preparo da curva de calibração

A curva de calibração foi preparada em matriz branca fortificada. Os padrões foram adicionados conforme descrito na Tabela 2.

A faixa de trabalho foi estabelecida de acordo com o nível de validação adotado (NVA) de 10 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e compreendeu as concentrações de 0 a 20 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Tabela 4. Volumes (em  $\mu\text{L}$ ) de solução de ractopamina 1 ppm e clenbuterol (padrão interno) 1 ppm, e de amostra “branca” para preparo da curva de calibração em matriz, para determinação de ractopamina em músculo suíno, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Ponto	Volume Ractopamina 1 ppm ( $\mu\text{L}$ )	Volume Clenbuterol (PI) 1 ppm ( $\mu\text{L}$ )
C0	0,0	50,0
C2,5	12,5	50,0
C5	25,0	50,0
C10	50,0	50,0
C15	75,0	50,0
C20	100,0	50,0

#### Cálculos

A concentração do analito na amostra é calculada de acordo com a seguinte equação, obtida a partir do cálculo da regressão linear da curva de calibração:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = concentração de ractopamina em ppb;

x = razão de áreas ractopamina/clembuterol-D9;

a = inclinação da reta;

b = coeficiente linear.

Os resultados são expressos em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

#### Validação do método

Para que o método fosse validado seguiu-se instruções do MAPA, realizou-se os testes F e t de Student para verificar se existia efeito matriz nas curvas analisadas, obtendo resultados negativos.

Para verificar a linearidade plotou-se um gráfico onde o eixo x representa a concentração ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) predita e no eixo y os valores das médias obtidas, em três dias de análises, das razões das áreas RAC/CBT.

Para avaliação da seletividade, foram observadas as transições da molécula de ractopamina, para que houvesse certificação de que na amostra não há nenhum interferente na matriz. Não foram identificados picos que pudessem contribuir com erro nos procedimentos de identificação e quantificação dos analitos, em pontos específicos da molécula.

Para avaliar a veracidade/recuperação do método comparou-se a média do que foi recuperado com o que foi fortificado, sendo que todos os resultados obtidos permaneceram dentro do intervalo de 70-110%, conforme Manual da Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011). Os resultados obtidos para avaliação da veracidade variaram 90 – 101% e o método foi considerado adequado.

O Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ) e a Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ) são importantes parâmetros de estimativa do nível de confiança dos resultados obtidos na rotina de análises,

sendo utilizados na prevenção da emissão de resultados falso-negativos e falso-positivos. Seguindo os parâmetros propostos foram obtidos bons resultados. Sobre o Limite de Detecção (LD) que corresponde à menor concentração que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, o método foi considerado satisfatório, pois atingiu 1,5 µg/kg, indicando que o método tem boa sensibilidade para limite regulatório (10 µg/kg). Quanto ao Limite de Quantificação (LQ), que corresponde à menor concentração do analito que pode ser quantificada em um nível aceitável de precisão e exatidão, foi possível atingir valores de 2,5 µg/kg, considerando o método proposto satisfatório.

Abaixo uma tabela com o resumo dos itens avaliados:

Tabela 4: resumo dos itens avaliados

LMR/LMDR	RAC	LMR 10 µg/Kg		
Nível de validação adotado (NVA)	RAC	10 µg/Kg		
Parâmetro	Critério	Resultado	Parecer	Unidade
Otimização do equipamento	-	-	Conforme	-
Seletividade/Especificidade	-	-	Conforme	-
Linearidade	$R^2 \geq 0,95$ Resíduos	>0,99	Conforme	-
Veracidade	-30 a +10%	0,5 LMR: - 10	Conforme	%
		1,0 LMR: -2		
		1,5 LMR: +1		
Repetitividade (CV)	30%	Intra-dia 12,8	Conforme	%
		Inter-dia 9,9		
Reprodutibilidade	20%	16,2	Conforme	%
Recuperação	-	99	Conforme	%
Limite de Detecção	-	1,5	Conforme	µg/Kg
Limite de Quantificação	-	2,5	Conforme	µg/Kg
Limite de Decisão (CC $\alpha$ )	-	11,9	Conforme	µg/Kg
Capacidade de detecção	-	13,8	Conforme	µg/Kg

O processo de validação de um método é longo e com várias variáveis, já que visa garantir a qualidade daquele método.

## 5. CONCLUSÃO

Durante esse período de estágio pode-se adquirir bom conhecimento em análise de alimentos, aprendeu-se a escolher métodos de análise conforme o tipo de alimento e o que se deseja descobrir e avaliar resultados analíticos.

Tomou-se conhecimento também de como se realiza uma validação de método, todos os procedimentos realizados, variáveis estabelecidas, cuidados que devem ser tomados para garantir que no final se tenha um método confiável e reproduzível. Um processo longo, mas que permite que novas análises sejam estabelecidas, possibilitando o controle de mais compostos.

Por se tratar de fiscalizações federais foi interessante presenciar denúncias de fraudes alimentares sendo confirmadas por análises dentro do laboratório, Além de conhecer os métodos utilizados pelos fraudadores e entender como cada composto adicionado influencia na fraude.

O aprendizado sobre diversos equipamentos de laboratório também agregou bastante. Foi possível entender e realizar análises em cromatógrafos, espectrômetros de massa, espectrômetro de infravermelho próximo entre outros. Entender como esses sistemas trabalham propiciou um aprofundamento do conhecimento adquirido em sala de aula, vendo na prática como acontece.

Outro fator importante foi a relação interpessoal. Durante esse período foi possível desenvolver a comunicação com diversos setores hierárquicos, além do convívio com profissionais de diversas áreas e com níveis de formação distintos, mostrando que cada um agrega algo fundamental para o funcionamento do laboratório.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, F. M. (RS). Rede Metrológica do Rio Grande do Sul (Org.). **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais: Guia Prático**. Porto Alegre: Própria, 136 p. 2009.

ANASTASSIADES, M. et al. **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, v. 86, 412-431 p., 2003.

BRASIL – MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília: Mapa/ACS, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº17, DE 29 DE MAIO DE 2013**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília, DF, 14 p. 2013.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (Concórdia, SC). **Tabela de composição química e valores energéticos de alimentos para suínos e aves**. 3.ed. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1991. 97p..

RODRIGUES, S. A. **Otimização e validação de métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola**. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2010.

RODRIGUES, S. A. et al. **Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola**. Quim. Nova, v. 34, 780-786 p, 2011.

Site Ministério da agricultura pecuária e abastecimento (MAPA) <http://www.agricultura.gov.br/ministerio>) visitado em 7 de julho de 2014.