



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5515 – ESTÁGIO SUPERVISIONADO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NO
LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA – SEÇÃO
LABORATORIAL AVANÇADA (SÃO JOSÉ/SC)**

Maristela Francisca da Silva

Supervisor: Rodrigo Barcellos Hoff
Orientador: Eduardo Sidinei Chaves.

Florianópolis
Julho/2022

Maristela Francisca da Silva

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NO
LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA – SEÇÃO
LABORATORIAL AVANÇADA (SÃO JOSÉ/SC)**

Projeto de Estágio Supervisionado (QMC 5515)
apresentado ao Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina desenvolvido
no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA)
na Seção Laboratorial Avançada (SLAV) de São José.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves

Supervisor: Dr. Rodrigo Barcellos Hoff.

Florianópolis

Julho/2022

Ficha de identificação da obra

Silva, Maristela Francisca. RELATÓRIO DE ESTÁGIO
SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO
FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA – SEÇÃO
LABORATORIAL AVANÇADA (SÃO JOSÉ/SC): Otimização de
um procedimento alternativo para extração de HPAs em moluscos
bivalves usando Ultrassom / Maristela Francisca Silva ; orientador,
Eduardo Sidinei Chaves, coorientador, Rodrigo Barcellos Hoff, 2022.
41 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal
de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

1. Química. 2. Análises de alimentos. 3. Extração assistida por
ultrassom. 4. Dispersão de matriz em fase sólida. 5. Extração por
líquido pressurizado. I. Chaves, Eduardo Sidinei . II. Hoff, Rodrigo
Barcellos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Química. IV. Título.

Maristela Francisca da Silva

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NO
LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA – SEÇÃO
LABORATORIAL AVANÇADA (SÃO JOSÉ/SC)**

Este Trabalho de conclusão de estágio foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Química Tecnológica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Química.

Florianópolis, 26 de Julho de 2022.

Danielle Marranquiel Henriques

Prof. Dra. Danielle Marranquiel
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves.
Orientador
UFSC

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante os meus anos de estudo.

A minha mãe Elisabete (in memoriam) por ser meu maior exemplo de luta e perseverança, e que mesmo com pouco estudo, não mediu esforços para investir na minha educação. Aos demais familiares por todo apoio e ajuda, em especial as minhas sobrinhas Agatha e Eduarda, por compreenderem o motivo da minha ausência no dia a dia. Vocês são as minhas fortaleza! A tia ama vocês!

A minha Daiane por compartilhar dos momentos especiais e de aflição enfrentados na graduação e na vida!

Ao supervisor, Rodrigo B. Hoff, obrigada pela disponibilidade e dedicação em compartilhar seu vasto conhecimento. Aos colaboradores da SLAV por todo o carinho, acolhimento e ensinamentos. Ao Luan pela gentileza, disposição para ensinar e por me ajudar tanto do começo ao fim. A Manuela, “minha dupla”, por me completar tanto e por ser o meu lado oposto mais necessário durante o estágio! Aprendi muito com você! Obrigada também a Samantha, Maurício e Andressa por deixar o ambiente de trabalho agradável e por reafirmar com atitudes, o quanto uma boa relação interpessoal num espaço como este, importa!

Ao meu orientador, Eduardo S. Chaves, obrigada pela confiança e empenho na conclusão do relatório. A instituição UFSC e ao corpo docente, agradeço pela oportunidade de estudar em uma instituição de referência e qualidade e por fim ao Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento pela oportunidade de realizar o estágio.

RESUMO

A finalidade do estágio supervisionado obrigatório é nortear o acadêmico dos desafios positivos e negativos presentes no cotidiano profissional. Este trabalho se trata de um relato de experiência no laboratório SLAV-SC, no qual é descrito desde o primeiro momento com o treinamento pessoal até ao acompanhamento da rotina de análises realizadas no laboratório. Especificamente, para além das atividades que foram desenvolvidas, este relatório apresenta os resultados da otimização um procedimento alternativo para o preparo de amostras de moluscos bivalves, usando extração assistida por ultrassom, para a quantificação dos principais HPAs, conforme consta do escopo do método de análise oficialmente adotado pelo MAPA. Com o interesse de minimizar os efeitos de potenciais interferentes, na etapa de preparação da amostra, a eficiência de adsorventes alternativos como celulose, polvilho, carvão, cortiça e cianopropil, a influência da concentração do extrato, por meio da variação do volume de extrato evaporado em banho-maria ($40 \pm 2^{\circ}\text{C}$) sob fluxo de nitrogênio. Por fim, a identificação e a quantificação dos principais HPAs foi realizada por LC-MS/MS. Os resultados mostraram, em síntese, que a extração assistida por ultrassom proporcionou uma eficiência similar à do método oficial, apresentando custo muito mais baixo. Em relação aos adsorventes, resultados promissores foram observados com o uso de celulose e de polvilho.

Palavras-chave: Contaminantes em alimentos. Análises de alimentos. Extração assistida por ultrassom. Extração por líquido pressurizado. Dispersão de matriz em fase sólida. LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das estruturas moleculares de 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA).....	19
Figura 2 - Representação esquemática de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).....	23
Figura 3 - Representação esquemática do procedimento de extração assistida por ultrassom.....	27
Figura 4 - Representação esquemática do procedimento de extração por líquido pressurizado	29
Figura 5 - Cromatogramas para benzo[a]pireno (parte A), benzo[ghi]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno (parte B) obtidos a partir da extração com diferentes adsorventes....	33
Figura 6 - Resposta gráfica representadas pelo analito benzo[ghi]pireno conforme o volume concentrado do extrato em comparação simultânea com os principais interferentes (parte A). l.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores obtidos das medidas (n = 10) das concentrações de HPAs fortificadas no limite regulatório em amostras de pescados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa pelo método alternativo, considerando o <i>Q-Matrix™ Hydra</i>	30
--	----

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	12
2	ATIVIDADES REALIZADAS	13
3	INTRODUÇÃO.....	16
4	OBJETIVOS	18
4.1	OBJETIVO geral	18
4.1.1	Objetivos Específicos	18
5	CONTEXTUALIZAÇÃO AO TEMA	19
5.1	HPAS EM PESCADOS.....	19
5.2	ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE PESCADOS.....	20
5.3	OTIMIZAÇÃO, PREPARO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS.....	21
5.3.1	LC-MS/MS	23
6	METODOLOGIA.....	24
6.1	MATERIAL E MÉTODO	24
6.1.1	Reagentes, padrões e soluções.....	24
6.1.2	Preparo de amostra	25
6.1.3	Extração por líquido pressurizado – Procedimento conforme método estabelecido.....	25
6.2	Calibração e Extração assistida por ultrassom.....	26
6.2.1	Otimização do MSPD com materiais adsorventes alternativos.....	27
6.2.2	Efeito do volume do extrato evaporado sobre sinais analíticos e sinais interferentes	28
6.2.3	Resíduos e segurança no laboratório	30
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6.3.1	CALIBRAÇÃO E EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	30
6.3.2	Otimização do método MSPD com materiais adsorventes alternativos	31

6.3.3	Efeito do volume do extrato evaporado sobre sinais analíticos e sinais interferentes	34
6.4	CONCLUSÃO	36
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	ANEXO A	40

1 APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é um órgão federal brasileiro responsável pela regulamentação e fiscalização de produtos agropecuários. Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) são laboratórios pertencentes ao MAPA que compõem uma rede de seis unidades distribuídas no território brasileiro com o papel fundamental nas ações de controle e fiscalização de alimentos, bebidas e insumos agropecuários produzidos no Brasil e comercializados no país e no exterior. Além disso, possui ação estratégica no monitoramento sanitário de rebanhos e lavouras, participando da garantia do status sanitário do país e do controle e saneamento de doenças animais e pragas vegetais. Estes laboratórios oficiais são distribuídos por região, da seguinte forma: região Norte (Belém/PA), região Nordeste (Recife/PE), região Centro-Oeste (Goiânia/GO), região Sudeste (Pedro Leopoldo/MG e Campinas/SP), e região Sul (Porto Alegre/RS). Atuando como unidades laboratoriais vinculadas aos LFDA, existem quatro unidades de seções laboratoriais avançadas (SLAV): Campo Grande/MS, Jundiaí/SP, Belo Horizonte/MG, Uberlândia/MG e São José/SC, sendo esta última vinculada ao LFDA de Porto Alegre (LFDA/Rs) e o local de realização do estágio durante o primeiro semestre de 2022.

A Seção Laboratorial Avançada de São José (SLAV-SC) possui duas unidades laboratoriais, o Laboratório de Identidade e Qualidade de Alimentos (IQA) e o Laboratório de Resíduos e Contaminantes em Alimentos (RCA), e as atividades do estágio ocorreram simultaneamente nos dois laboratórios, internamente identificados pelas siglas IQA/SLAV/SC e RCA/SLAV/SC. Esses laboratórios possuem acreditação pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) com relação à conformidade da norma ABNT NBR ISO 17025:2017, que garante a competência dos laboratórios com qualidade a emitirem resultados com confiabilidade, rastreabilidade e imparcialidade, evidenciando e garantindo competência. Atualmente, a unidade avançada SLAV/SC possui aproximadamente 25-30 colaboradores distribuídos em diferentes cargos, como estagiários, técnicos, administradores, analistas e fiscais.

2 ATIVIDADES REALIZADAS

O estágio supervisionado foi realizado em 450 horas, com carga horária semanal de 30 horas. Neste período, diversas atividades foram realizadas, e as principais são brevemente descritas a seguir.

Os treinamentos internos dos colaboradores da SLAV/SC são obrigatórios e seguem ao Manual da Qualidade do LFDA-RS, conforme a ABNT NBR/IEC 17025:2017. Inicialmente essa preparação foi teórica, direcionada para a melhor compreensão do espaço. Dentre as especificações, de forma geral, as principais abordagens foram as análises críticas de certificados de calibração, controle de acesso ao laboratório, capacitação pessoal, imparcialidade e confidencialidade, gestão de trabalho não conforme, ações corretivas e melhorias, formulários de controles de registros (materiais de referência), rotinas analíticas, garantia de qualidade, reagentes e soluções e preparo das amostras. Logo após o período introdutório, é realizado o treinamento das ações de segurança no trabalho informando os tipos de perigos, riscos e segurança. Todas as ações realizadas no espaço laboratorial foram supervisionadas e orientadas por profissionais capacitados da equipe local.

A calibração dos instrumentos analíticos é uma etapa importante, pois garante uma maior precisão na detecção de diversas grandezas. Deste modo, a SLAV/SC sendo um laboratório acreditado e certificado pelo INMETRO, envia periodicamente os instrumentos de calibração para as empresas que têm o mesmo padrão de qualidade e rigidez na checagem e que seguem as normas da ABNT NBR/IEC 17025:2017. No retorno para o laboratório, as micropipetas e dispensadores passam por uma nova verificação interna, com técnicos capacitados para a verificação de performance, a fim de confirmar se os equipamentos calibrados estão em pleno funcionamento após a calibração externa.

Conforme indicação interna, todos os colaboradores devem participar de treinamentos práticos de checagem e verificação de utilização de micropipetas e dispensadores, semestralmente. Para isso, a checagem das micropipetas e dispensadores, pesando alíquotas de água ultrapura, de acordo com a capacidade volumétrica de cada instrumento, é realizada com auxílio de uma balança analítica. Este procedimento é repetido 10 vezes, a fim obter a resposta de repetibilidade e precisão intermediária das alíquotas pesadas para cada instrumento. Para a liberação de utilização dos equipamentos, a resposta obtida deve estar na faixa de coeficiente de variação abaixo de 3% para quaisquer volumes.

De maneira diária, é feita a verificação de todas as das balanças calibradas presentes no laboratório utilizando pesos padrão com massa de referência, respeitando os limites mínimos e máximos que cada uma delas permite. A avaliação de verificação é realizada pesando 3 vezes os pesos a fim de obter o desvio-padrão entre as aferições e a diferença entre o valor de massa de referência e o valor de massa experimental.

Os acompanhamentos nas análises de rotina são diários. E a observação tem início desde o momento da preparação da amostra, extração/purificação e a injeção e aferição das alíquotas nos equipamentos. De forma breve, algumas análises que foram acompanhadas na rotina laboratorial (bases voláteis totais, pH, *dripping test*, desglaciamento, conservantes, polifosfatos e biotoxinas marinhas) estão descritas a seguir.

Relatando as análises clássicas, a avaliação de bases voláteis totais (BVT) é determinada por acidimetria. A extração da base na amostra ocorre com uma solução de ácido perclórico. Após a alcalinização, o extrato é destilado por arraste a vapor, recebendo os componentes básicos volátil em ácido receptor. Por fim, a concentração de BVT é feita por titulação de bases absorvidas pelo ácido padronizado, HCl 0,1 mol L⁻¹. A determinação do pH por potenciometria se dá pela utilização de um aparelho adequado para análise, que possibilita quantificar a concentração dos íons de hidrogênio no extrato.

A análise de *dripping test* é uma análise gravimétrica que determina o teor de líquido perdido pelas aves congeladas no degelo em condições padronizadas. O ensaio é realizado em 6 carcaças e o resultado obtido é de acordo com a média aritmética percentual de líquido perdido nessas amostras.

O método do desglaciamento determina gravimetricamente o percentual de glaciamento em pescados congelados, pela diferença entre o peso do produto glaciado e o peso após o desglaciamento. Cada amostra é analisada em 6 replicatas.

Já em relação as análises realizadas no método de nitrito e nitrato se baseia na extração dos analitos com água quente e tampão de tetraborato de sódio. A separação dos analitos é realizada através da eletroforese capilar de zona, com detecção por arranjos de diodos (CZE-DAD).

A análise para determinar conservantes e histamina é feita pelo método de extração sólido-líquido com partição dos analitos em baixa temperatura, utilizando mistura de solventes orgânicos (acetonitrila e metanol) acidificados com ácido acético. A separação dos analitos é realizada através da cromatografia líquida em gradiente de eluição, com fase

estacionária de di-isopropil 3-cianopropil silano ligado à sílica hidroxilada e a detecção e quantificação feita pelo LC-MS/MS.

A avaliação dos polifosfatos ocorre com extração utilizando água ultrapura e o extrato é analisado por HPLC-DAD com detecção em 799 nm após reação de derivatização da pós-coluna com solução de molibdênio e zinco em meio ácido.

Para a avaliação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves, uma triagem é realizada através de extração sólido-líquido à baixa temperatura utilizando a solução metanólica 90% acidificada com ácido acético, com o intuito de extrair as toxinas marinhas dos grupos do ácido domóico, ácido okadáico, saxitonas, azaspirácidos e yessotoxinas. Para a análise do grupo do ácido okadáico, os extratos metanólicos são submetidos a uma hidrólise alcalina, para que todos os ésteres acilados do ácido okadáico e de seus análogos sejam convertidos em suas toxinas precursoras. Por fim, os extratos são filtrados e separados em cromatografia em fase reversa, utilizando cianopropil como fase estacionária e em seguida determinados por LC-ESI-MS/MS. Para a análise quantitativa, o procedimento de extração é repetido usando métodos específicos para cada um dos grupos de toxinas.

Dentre todas as atividades desenvolvidas no laboratório SLAV-SC durante o período de estágio, foi realizada a otimização de um procedimento de extração de HPAs assistido por ultrassom, avaliando o potencial de diferentes tipos adsorventes para o preparo das amostras por meio da dispersão da amostra. Ainda, a influência da concentração do extrato, avaliada por meio da evaporação de diferentes volumes, avaliada. Neste contexto, o presente relatório apresenta uma descrição mais detalhada para otimização deste procedimento alternativo de extração. Assim, uma breve introdução sobre a determinação de HPAs, os objetivos, a metodologia e os principais resultados relacionados com esta atividade são descritos a seguir.

3 INTRODUÇÃO

O vazamento de petróleo cru que atingiu mais de dois mil quilômetros do litoral das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil ocorrido entre 28 e 29 de julho de 2019 através de uma embarcação que tinha como destino à Cidade do Cabo, na África do Sul, segundo o Ministério Público Federal (MPF) foi, até o momento, o maior desastre ambiental já registrado no litoral brasileiro.

A contaminação ambiental e, conseqüentemente, humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) derivados do petróleo apresenta grandes riscos, devido ao potencial carcinogênico de vários HPAs. A presença de HPAs no ambiente costeiro representa um grande risco de entrada destes contaminantes na cadeia alimentar, até atingir o ser humano, por meio do consumo de pescados e frutos do mar contaminados (PEREIRA, 2000). Atualmente, é sabido que grupos populacionais que residem ou têm algum vínculo direto com ambientes contaminados com HPAs, tendem a um risco maior de apresentar doenças e agravos cardiovasculares, respiratórios e câncer (INCA, 2012). Dessa forma, quando da ocorrência do gigantesco acidente de 2019 nas regiões nordeste e sudeste do Brasil, diferentes órgãos que regulamentam direta ou indiretamente a saúde pública e o meio ambiente atuaram em conjunto em ações urgentes para avaliar, mitigar e investigar a extensão dos danos, o que incluir a participação ativa da SLAV-SC no desenvolvimento, validação e aplicação de um método analítico rápido, fácil e eficiente para determinar o teor de HPAs em amostras de pescado de todas as áreas afetadas pelo derramamento do óleo.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão federal responsável pela fiscalização de alimentos que são produzidos e comercializados em todo o território nacional, bem como, produtos de exportação para o mercado externo. Atualmente, os Laboratórios Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) pertencentes ao MAPA, são os responsáveis pelas análises de alimentos fiscalizados e para isso possuem à sua disposição diferentes métodos e técnicas analíticas avançadas. Entretanto, para diferentes segmentos de laboratórios de análise de alimentos, um grande desafio é se dispor e estabelecer metodologias analíticas que possibilitam a detecção e quantificação de HPAs. Além do mais, a capacidade analítica e a otimização de processos visando análises com métodos e técnicas que se enquadram em uma rotina laboratorial ainda continua sendo um grande obstáculo.

Dessa forma, o intuito deste trabalho foi otimizar o procedimento do preparo da amostra para adaptar ao método já proposto por no laboratório para análise de HPAs em pescados (Mello *et al.*, 2022). O método atualmente em rotina se baseia em uma extração composta por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) seguida de extração por líquido pressurizado (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*). Após, o extrato é concentrado por evaporação, redissolvido em acetonitrila e a quantificação é realizada por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. O aperfeiçoamento do preparo de amostra otimização tem como foco identificar fases sólidas alternativos para a etapa de MSPD que possam dispor de uma melhor relação custo-benefício em comparação à fase sólida atualmente utilizada (*Q-Matrix*), que possui um preço elevado e um acesso restrito de compra por se tratar de produto importado e sob patente. As opções de fase sólida escolhidas foram a celulose, cortiça, carvão, polvilho e cianopropil. Outra otimização foi a avaliação do preparo das amostras substituindo a extração por PLE por extração assistida por ultrassom. A adição do processo de ultrassom ao método desenvolvido teve como princípio fornecer uma maior capacidade de extração dos HPAs.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar um procedimento de preparo de amostras de moluscos bivalves (ostras e mexilhões) para a extração e determinação de HPAs, a partir do método oficial em rotina, baseado em MSPD e PLE), avaliando e otimizando novas fases sólidas, extração assistida por ultrassom e concentração do extrato em diferentes volumes, com a meta de obter resolução do sinal melhor sinal analítico para os HPAs e minimizar o efeito de potenciais interferentes. e menor carga de compostos interferentes da matriz.

4.1.1 Objetivos Específicos

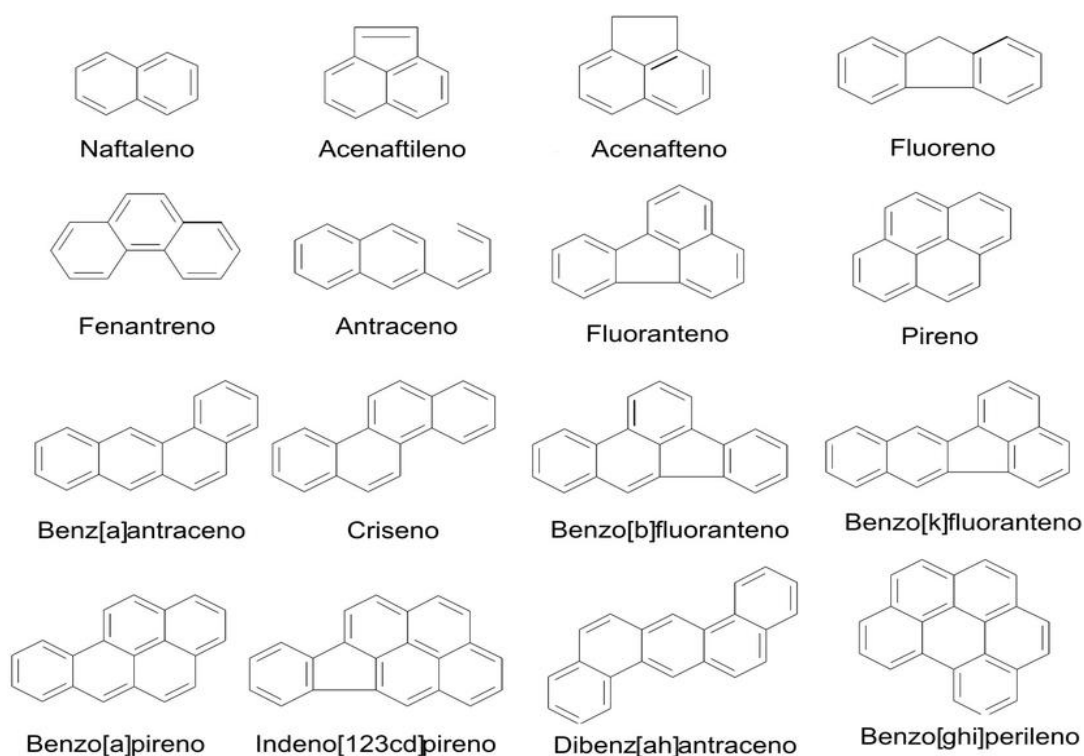
- Avaliar a extração de HPAs utilizando ultrassom e comparando os resultados obtidos com o método oficial que utiliza PLE.
- Otimizar a etapa de MSPD avaliando diferentes fases extratoras sólidas alternativas: celulose, cortiça, carvão, polvilho e cianopropil.
- Otimizar o volume de extrato para avaliar o impacto desta etapa na intensidade dos interferentes.

5 CONTEXTUALIZAÇÃO AO TEMA

5.1 HPAS EM PESCADOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos amplamente encontrados na natureza. Podem ser originados de fontes naturais, como a biossíntese de alguns hidrocarbonetos por organismos marinhos ou terrestres, trocas atmosféricas e exsudações naturais de petróleo no oceano. Entretanto, a principal fonte é através de processos incompletos de combustão, geralmente através da ação do homem. Outras fontes importantes que tem como origem a atividade humana são os efluentes domésticos e industriais, as drenagens pluviais urbanas, e a exploração do petróleo (ARAÚJO, 2010). Os HPAs são uma família de moléculas constituídas unicamente de carbono e hidrogênio, arranjados em dois ou mais anéis benzênicos condensados, cada anel contendo 5 ou 6 átomos de carbono e podem representar ramificações constituídas de cadeias hidrocarbônicas alifáticas (MAZEAS, 2004). Na Figura 1, estão representadas as estruturas moleculares de 16 HPAs prioritários em estudos ambientais .

Figura 1 - Representação das estruturas moleculares de 16 HPAs prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA)



Fonte: EPA (1987)

Os HPAs são compostos pouco biodegradáveis e são altamente lipofílicos, tendendo a ser depositados nos sedimentos e consequentemente bioacumulados nos tecidos dos organismos aquáticos à eles expostos (LIMA, 2001). A concentração relativa dos HPAs no meio aquático é geralmente alta nos sedimentos, intermediária nas biotas e baixas na coluna d'água (LIMA, 2001). Pescados que vivem em ambientes contaminados por HPAs absorvem esses compostos através da pele e brânquias ou pela ingestão de sedimentos ou alimentos contaminados (RUDDOCK, 2012). Dentre os pescados, os moluscos bivalves, possuem grande potencial para a bioacumulação de HPAs em seus tecidos. As características hidrofóbicas dos compostos e a elevada capacidade de filtração da água dos moluscos bivalves fazem destes organismos um potencial provedor de contaminação por HPAs de consumidores deste pescado (ARAÚJO, 2010). Além disso, os moluscos bivalves são maus metabolizadores destes contaminantes. Por esses motivos, a determinação de HPAs em moluscos bivalves é amplamente usada como marcador da contaminação ambiental por HPAs.

O monitoramento de HPAs, assim como em qualquer análise química a qualidade dos resultados é muito importante, e por este motivo a realização das análises em laboratórios acreditados garantem a confiabilidade necessária, conforme preconizado pela NBR ISO-IEC 17025:2017 e a legislação de pescados no Brasil.

5.2 ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE PESCADOS

A ABNT NBR ISO IEC/ISO 17025:2017 estabelece que um laboratório atende os requisitos necessários quando possui seus ensaios acreditados. Portanto, parâmetros como o sistema de gestão de qualidade e competência técnica permitem a acreditação de laboratórios de calibração (RBC- Rede Brasileira de Calibração) e ensaio (RBLE - Rede Brasileira de Laboratórios de ensaio). Desta forma, para assegurar o controle nas etapas de um processo analítico, deve-se manter e melhorar, continuamente, o sistema de gestão da qualidade, garantindo o compromisso com os princípios de ética e imparcialidade, em um ambiente de trabalho livre de pressões externas.

A fim de sempre obter resultados confiáveis, são realizadas análises e inspeções oficiais físico-químicos e microbiológicos em alimentos de origem animal, sendo que estes

ensaios devem atender aos requisitos do sistema de gestão de qualidade conforme a ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2017 (MAPA-LANAGRO, 2014). A inspeção e fiscalização em estabelecimentos de pescado e derivados deve abranger requisitos da inspeção tradicional e de autocontroles, sendo realizada em caráter periódico em atendimento ao artigo 11 do Decreto nº 9.013, de 2017 (Barbosa, 2021). O artigo trata como um autocontrole a verificação do cumprimento dos parâmetros analíticos legais das matérias-primas, da água e dos produtos beneficiados (análises laboratoriais oficiais), com coleta de amostras para as análises fiscais e avaliação dos resultados, visando a verificação da conformidade dos produtos (identidade e qualidade) e o combate à fraude. Assim como o acompanhamento da resolução das não-conformidades, incluindo a apuração de investigação de denúncias de consumidores, e verificação dos controles de rastreabilidade dos animais, das matérias-primas, dos insumos, dos ingredientes e dos produtos ao longo da cadeia produtiva, a partir de seu recebimento nos estabelecimentos até sua expedição (MAPA, 2021).

5.3 OTIMIZAÇÃO, PREPARO E EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS

A etapa de preparo da amostra é necessária na realização de qualquer análise. Esse preparo pode ser muito simples ou laborioso. Sendo assim, diversas técnicas são realizadas com a finalidade de determinar compostos orgânicos presentes em amostras laboratoriais. Para o procedimento de extração de HPAs em peçados, são usadas as técnicas de extração assistida por ultrassom, dispersão de matriz em fase sólida e extração por líquido pressurizado.

As ondas de ultrassom são um tipo de onda que possuem a mesma vibração que as ondas sonoras, mas com frequência muito mais elevada. A extração assistida por ultrassom está relacionada aos efeitos provocados pelo fenômeno de cavitação, que é o crescimento e colapso de pequenas bolhas que se formam no meio líquido, com energia suficiente para favorecer a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, transferindo os analitos para solvente de extração. A eficiência na extração é também favorecida pelo desempenho do solvente utilizado (KORN *et al*, 2003). Em comparação com métodos convencionais, o ultrassom apresenta várias vantagens, como menor tempo de processo, maior penetração e baixo consumo do solvente, maior rendimento, boa reprodutibilidade, possibilidade de utilização de solventes alternativos mais econômicos e mais seguros para o ambiente e para a saúde (MAZZA, 2017).

A dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) é uma técnica de preparo da amostra que se baseia no “espalhamento” da amostra sobre uma fase sólida. Esta fase sólida pode ser totalmente inerte, sendo usada somente para romper a estrutura da amostra, ou pode possuir interação físico-química com a matriz. Isso dependerá dos objetivos da técnica. Depois da mistura de amostra e fase sólida, o sólido resultante é transferido para uma seringa e compactado, sendo posteriormente eluído com solventes. O método é vantajoso por ser rápido, fácil, de baixo custo, eficaz, robusto e seguro (PRESTES, 2011).

O princípio da técnica é a quebra da amostra utilizando um suporte sólido através da maceração, para aumentar a superfície de contato. Com a mistura homogeneizada, a mesma é empacotada em um cartucho e um solvente (ou vários, ou misturas de solventes) é permeado através do cartucho e recolhido no final para posterior análise (BARKER *et al.*, 1989).

No método de HPAs em vigor na SLAV-SC, a etapa de MSPD é realizada em um tubo de propileno de 50 mL, ao qual a fase sólida é adicionada e a mistura amostra e fase sólida se dá por agitação mecânica. Posteriormente, a amostra é extraída por PLE usando acetonitrila. O seu uso como solvente de extração proporciona uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra (PRESTES, 2011). De acordo com BARKER (2007), a escolha do solvente de extração e suporte sólido podem ser otimizados, visto que a etapa de dispersão é determinante para eficiência da extração.

A extração por líquido pressurizado foi desenvolvida para compostos orgânicos em amostras sólidas e semissólidas. Basicamente, a amostra é submetida à elevação de temperatura e de pressão. Nestas condições, solventes aquosos podem se comportar como solventes orgânicos, solubilizando melhor analitos que, em condições normais de temperatura e pressão, só seriam extraídos por solventes mais apolares. Existem diversos sistemas comerciais de PLE. Na SLAV-SC, é utilizado o sistema EDGE (CEM). Este sistema combina os processos de *solvent accelerated extraction* (SAE) e *matrix solid phase dispersion* (MSPD) em um único instrumento (SIQUEIRA, 2018).

A mistura de amostra e fase sólida obtida na etapa de MSPD é pesada no tubo de extração (Q-cup), o qual é submetido à câmara de extração do sistema EDGE. O solvente adequado para extração é bombeado entre a célula de extração e a câmara de pressão e, em seguida, aquecido. O solvente é adicionado simultaneamente pela parte superior e inferior da célula, causando uma dispersão (turbilhonamento) e aumentando a capacidade de extração. Por fim, a amostra é filtrada e injetada ou submetida às etapas posteriores de preparo. No caso

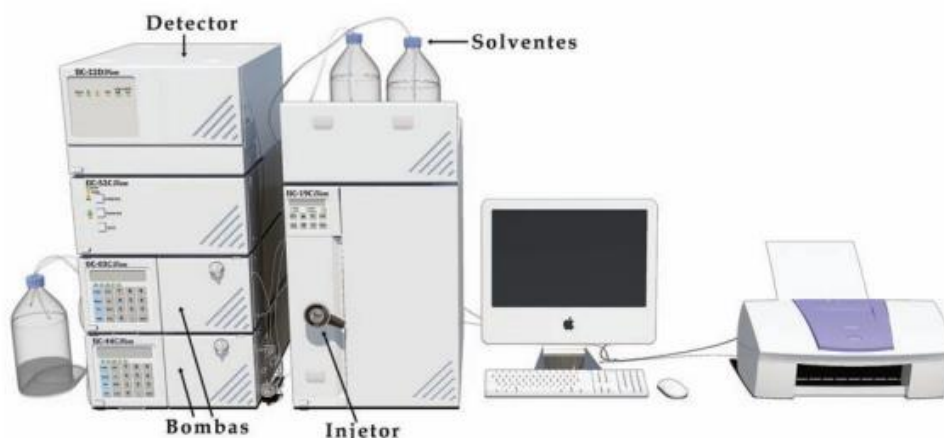
dos HPAs, o extrato é concentrado por evaporação em banho-maria à 40 °C com o auxílio de nitrogênio.

As etapas do preparo de amostras antes da análise instrumental são primordiais para estabelecer resultados confiáveis em um método cromatográfico sensível e seletivo para análise de traços em matrizes complexas, como HPAs. Desta forma, realizando uma boa dispersão, extração e a concentração do extrato, é possível retirar uma alíquota do sobrenadante para injetar no LC- MS/MS.

5.3.1 LC-MS/MS

A cromatografia líquida é baseada na separação de componentes de uma mistura entre duas fases distintas, a móvel e a estacionária. Devido à dispersão e interação desses componentes ao longo das duas fases, parte fica retida na fase estacionária, resultando na migração das moléculas em diferentes tempos de retenção. Ao passar pelo detector cromatográfico, o sinal é convertido e plotado graficamente (tempo *versus* sinal) na forma de cromatogramas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um avanço das técnicas cromatográficas de separação e utiliza fases estacionárias com partículas menores que 2 µm. Os usos destas partículas juntamente com os altos fluxos de fase móvel (FM) aumentam a resolução e a capacidade de detecção, além de diminuir o tempo das análises (MALDANER,2009). A Figura 2 ilustra um equipamento de alta eficiência líquida.

Figura 2 - Representação esquemática de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).



Fonte: LANÇAS (2009).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é basicamente formada por duas partes: após a separação cromatográfica o fluxo de FM chega ao espectrômetro de massas, é introduzido através do sistema de ionização das moléculas, que promove a vaporização do solvente e confere carga elétrica à essas moléculas. Após serem ionizadas, os compostos podem ainda ser fragmentados. Por fim, os compostos chegam ao analisador de massas, que promoverá a separação dos íons de acordo com a respectiva massa do analito (CHIARADIA, 2008).

A variação na energia de fragmentação do quadrupolo, utilizado neste trabalho, possibilita a “quebra” da molécula gerando novos fragmentos, e estes são característicos, pois permitem a identificação dos analitos submetido à essas condições.

6 METODOLOGIA

6.1 MATERIAL E MÉTODO

6.1.1 Reagentes, padrões e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau cromatográfico. Acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e n-hexano foram fornecidos por JT Baker Chemical Co. (Phillipsburg, EUA). Água ultrapura (tipo I) (resistividade mínima 18,2 MΩ cm) foi obtida de um sistema de purificação *Millipore Milli-Q®* (Molsheim, França). Cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) foram grau analítico e foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) e Scharlau (Barcelona, Espanha), respectivamente.

O adsorvente de polímero *Q-Matrix™ Hydra* foi adquirido da CEM Corporation (Charlotte, EUA). Amostras de polvilho, pó de cortiça e carvão ativado estavam disponíveis no laboratório. A celulose microcristalina foi adquirida da JRS PHARMA (Rosenberg, Alemanha). A fase sólida cianopropil foi obtida da Phenomenex.

Todos os padrões analíticos eram de pureza igual ou superior a 95%. Foi utilizado um mix de HPAs adquirida da Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA). Esta solução (CRM 47940) continha 10 mg L⁻¹ em ACN de cada um dos seguintes HPAs: benzo[a]antraceno (B[a]A); benzo[a]pireno (B[a]P); benzo[b]fluoranteno (B[b]F); benzo[ghi]perileno (B[ghi]P); benzo[k]fluoranteno (B[k]F); criseno (Chry); dibenzo[a,h]antraceno (DB[a,h] A); e indeno[1,2,3-

cd]pireno (I[cd] P). Os padrões internos eram HPAs marcados isotopicamente: chrysene-d12, fluoranteno-d10; e pireno-d10. Todos os padrões internos foram adquiridos da Toronto Research Chemicals (Ontário, Canadá).

A solução padrão de trabalho de HPAs foi preparada pela diluição da solução padrão estoque com ACN para obter $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a solução de fortificação de HPAs 100 ng mL^{-1} , foi diluído $100 \mu\text{L}$ do mix de padrões ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) com acetonitrila avolumando até 10 mL no balão volumétrico.

Para preparar a solução de trabalho de padrão interno, cada padrão marcado com isótopo foi pesado separadamente ($0,010 \pm 0,001 \text{ g}$) e dissolvido em acetona para obter soluções estoque individuais de 1000 mg L^{-1} . Em seguida, uma alíquota de cada solução foi diluída com ACN para obter $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Todas as soluções foram estocadas a $-30 \pm 10^\circ\text{C}$.

6.1.2 Preparo de amostra

Amostras de molusco bivalves (mexilhão e ostras) foram coletadas e disponibilizadas através do Programa Nacional de Moluscos Bivalves Seguros (MoluBis) no mês de maio de 2022. A fim de obter uma amostra controlada sem a presença dos analitos de interesse (HPAs), um pescado tipo Tilápia, previamente avaliado foi utilizado como amostra branca. A Tilápia foi criada em cativeiro na água doce. A preparação das amostras foi realizada de acordo com cada tipo de matriz. Para as amostras de moluscos bivalves, as conchas foram removidas juntamente com o bisso de cada molusco, utilizando espátula e tesoura. Para as amostras de peixes, foram utilizadas apenas partes do tecido muscular, retirando escamas, pele e espinhas. Ao final as amostras foram homogeneizadas separadamente usando um processador de alimentos. Em seguida foram estocadas em um recipiente de alumínio com tampa de papel laminado, armazenadas a -30°C até o momento da análise.

6.1.3 Extração por líquido pressurizado – Procedimento conforme método estabelecido

Foi pesado $2,0 \pm 0,1 \text{ g}$ das amostras e fortificada com solução de padrão interno CrS-d12 ($100 \mu\text{L}$). Foram fortificadas as amostras de recuperação com $100 \mu\text{L}$ de solução de fortificação de HPAs (100 ng mL^{-1}) e $100 \mu\text{L}$ com a solução do padrão interno de CrS-d12 (800 ng mL^{-1}) e em seguida foram agitados em vórtex por 5-10 s. Em seguida, o Q Matrix foi adicionado a cada tubo ($2,0 \pm 0,5 \text{ g}$). O conteúdo do tubo foi misturado vigorosamente usando

um vórtex até que a dispersão da amostra na matriz sólida fosse observada. A mistura foi então cuidadosamente transferida para uma cápsula de extração (Q-cup). A limpeza do extrato foi realizada por extração com líquido pressurizado. O extrato obtido foi centrifugado à 4200 rpm por 10 min à 4°C, o sobrenadante foi transferido para um tubo tipo falcon. Então, o extrato foi evaporado até a secura em banho-maria ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) e sob um fluxo suave de nitrogênio. O resíduo seco foi solubilizado em com 500 μL de ACN, obtendo-se um fator de concentração de quatro vezes. Esta solução contendo os analitos foi transferida para um tubo tipo Eppendorf (2 mL) e foi centrifugado a 13300 rpm por 10 min a 4°C. Para análise, uma alíquota do sobrenadante foi transferida para um *vial* de HPLC com *insert* para 200 μL e posteriormente analisado por LC-MS/MS.

6.2 CALIBRAÇÃO E EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Inicialmente, para obtenção de resultados referentes à recuperação dos analitos de HPAs, uma curva de calibração com 6 níveis de concentrações conhecidas foi preparada em duas etapas (extração e concentração dos analitos). Para isso, inicialmente na primeira etapa de extração dos analitos, foi pesado 2,0 g de amostra de peixe (tilápia), com os seguintes níveis de concentração, contendo 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do mix de HPAs. Além disso, todas as amostras foram fortificadas com 800 ng mL^{-1} da solução de padrão interno CrS-d12, exceto as amostras do branco. Após as fortificações de HPAs e de padrão interno, foram adicionadas a essa mistura a mesma quantidade de amostra pesada de *Q-matriz Hydra@* e homogeneizado em vórtex por aproximadamente 20 segundos.

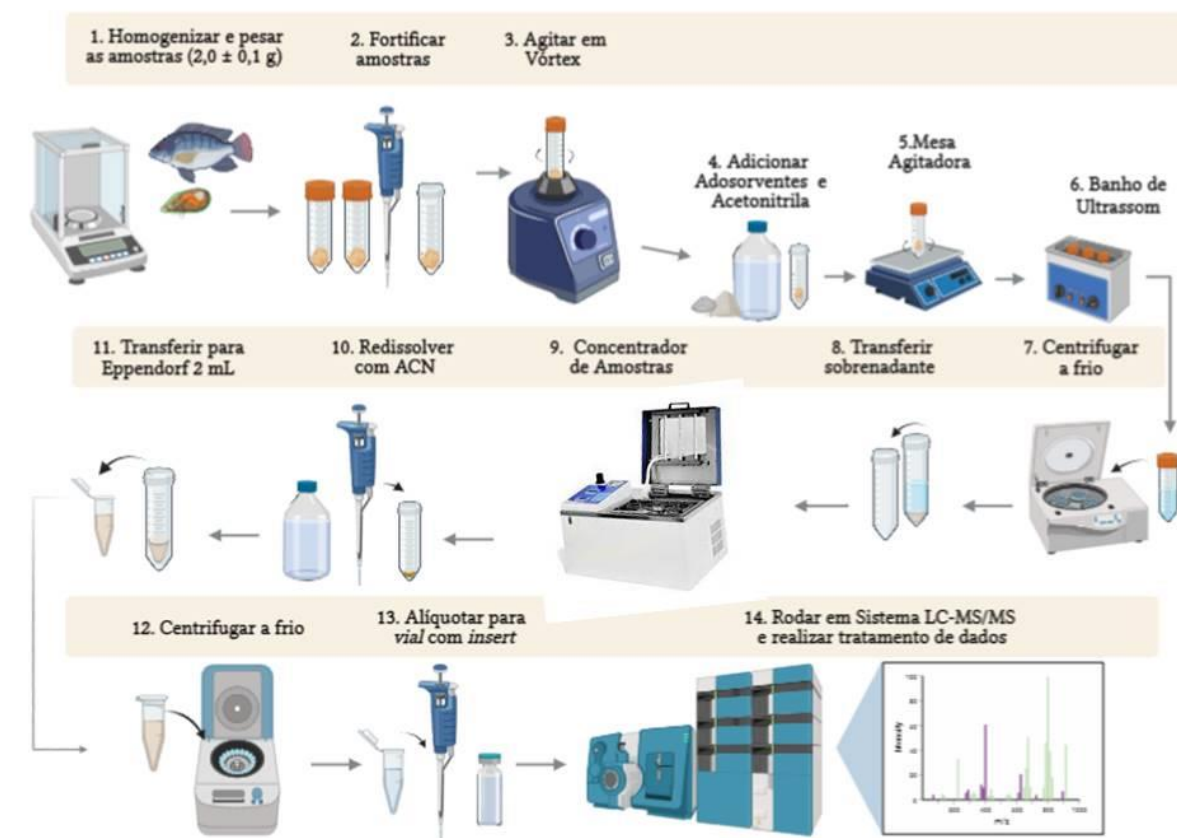
Na primeira etapa de extração dos analitos, com as amostras já totalmente dispersas na fase sólida, foram adicionados 20 mL de acetonitrila, e agitados em vórtex por 20 segundos. Depois, foram colocados em uma mesa agitadora por 20 minutos e posteriormente em banho de ultrassom por 30 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas em uma centrífuga a 4.200 rpm a 4 °C por 10 minutos e transferido todo o sobrenadante para um outro tubo limpo de 50 mL.

Na segunda etapa de concentração dos analitos, os extratos das amostras foram evaporados, redissolvidos em acetonitrila e os demais procedimentos para análises por LC-MS/MS foram realizadas conforme descrito no item 6.1.4.

6.2.1 Otimização do MSPD com materiais adsorventes alternativos

Na avaliação para obtenção de resultados referentes aos materiais adsorventes alternativos, foram pesadas em triplicata amostras de 2,0 g de moluscos bivalves (mexilhão e ostras), para cada material adsorvente, em tubos de polipropileno de 50 mL. Para cada triplicata de avaliação, dois tubos eram amostras de controles brancos e o outro tubo com amostra controle fortificada no nível de garantia ($5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Em seguida, após as fortificações para cada respectivo tubo, foram adicionados 2,0 g do material alternativo de dispersão (celulose, polvilho, cortiça, carvão e cianopropil), mexendo até formar uma mistura homogênea. Após a etapa de homogeneização das amostras o mesmo procedimento de extração e concentração descrito na seção 5.1.4 foi realizado e injetado no LC-MS/MS. Este procedimento de extração e os procedimentos mencionados anteriormente estão ilustrados na Figura 3.

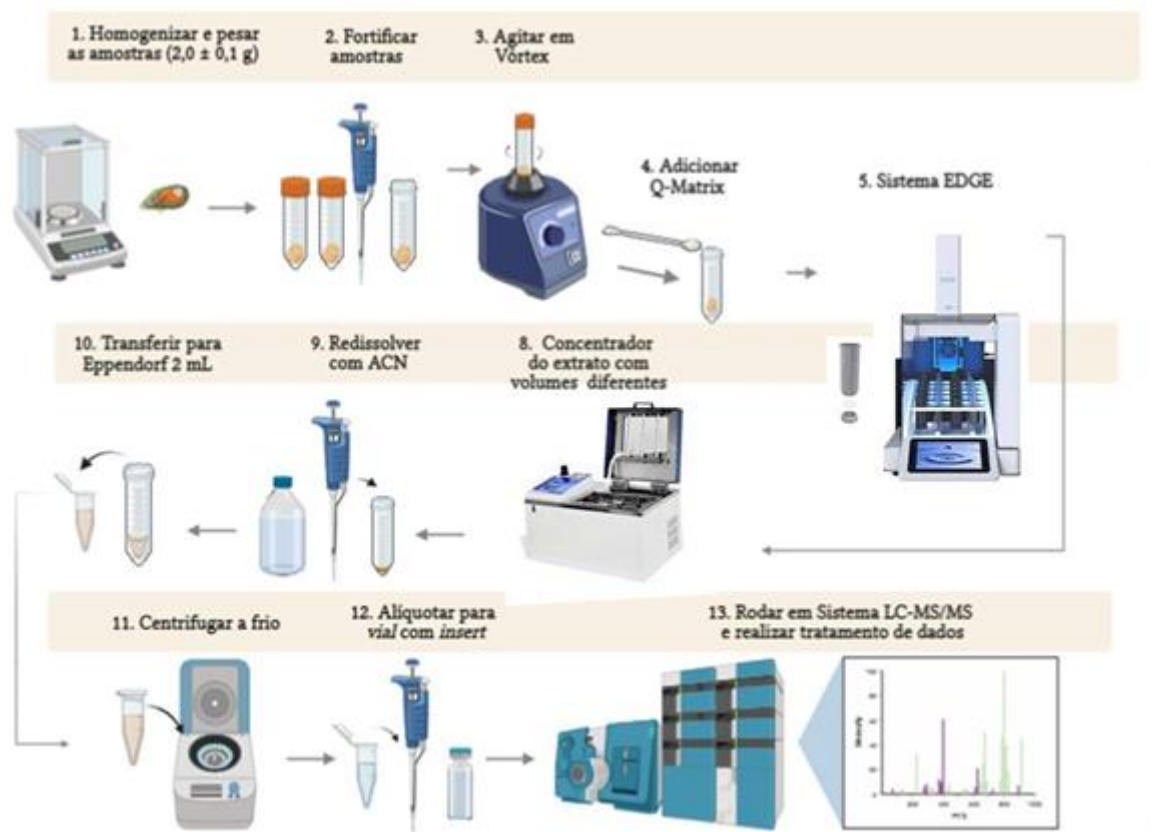
Figura 3 - Representação esquemática do procedimento de extração assistida por ultrassom



6.2.2 Efeito do volume do extrato evaporado sobre sinais analíticos e sinais interferentes

Foi preparado 6 replicatas com 2,0 g dos moluscos bivalves em tubos de polipropileno de 50 mL para cada material adsorvente. Foram fortificados os tubos adicionando 50 µL da solução de padrão interno CrS-d12 (800 ng mL⁻¹), 100 µL e a solução de fortificação de HPAs (100 ng mL⁻¹). A essa mistura foi adicionado aproximadamente 2 g do *Q-matriz Hydra@* e para homogeneizar a mistura utilizou-se uma espátula. A extração ocorreu no equipamento EDGE. Depois da extração, os cinco tubos foram levados para a secagem no banho-maria a 40 ± 2° C com auxílio do nitrogênio. Nesta etapa, diferentes alíquotas do extrato bruto 3,0 - 5,0 - 7,5 - 15,0 - 20,0 e 35,0 mL foram pipetados para serem evaporados. Na sequência, cada extrato seco foi redissolvido com 500 µL de acetonitrila, o sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga do tipo *Eppendorf* de 2,0 mL e centrifugado a 13300 rpm por 10 min a 4°C. Uma alíquota foi transferida para *vial* e analisados por LC-MS/MS. Este procedimento está ilustrado na figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática do procedimento de extração por líquido pressurizado



Parâmetros instrumentais

A análise instrumental foi realizada por cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massa de armadilha de íons linear híbrido triplo quadrupolo modelo 5500 QTrap com uma fonte APCI operando em modo positivo. As análises foram realizadas usando o modo de monitoramento de reação selecionado (SRM), com pelo menos dois íons de fragmento monitorados para cada HPA, sendo um de quantificação e outro para confirmação. A otimização das condições experimentais MS/MS foi realizada em estudos anteriores (Mello et al., (2022)). Os parâmetros APCI otimizados foram os seguintes: 600 °C (temperatura da fonte); 3 V (corrente do nebulizador); 20 psi (gás de cortina); 60 psi (fluxo de gás nebulizador) (GS1). Para análise, o volume de injeção foi ajustado para 7,5 μ L, a separação cromatográfica foi obtida usando uma coluna Zorbax Eclipse HPA Rapid Resolution HT (2,1 $\times$ 100 mm, 1,8 μ m, 95 Å) (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, EUA), a temperatura do forno da coluna foi mantida em 25°C. Todos os dados foram adquiridos e processados com os softwares Analyst® 1.7 HotFix 3 e MultiQuant™ 3.0 (Sciex, Framingham, EUA). Para quantificação, utilizou-se calibração com padrão interno.

6.2.3 Resíduos e segurança no laboratório

Devido às características altamente adsorventes do *Q-Matrix*, durante a limpeza dos tubos *Q-Cups* é necessário que todos os resíduos sejam descartados em resíduo sólido de laboratório antes de ser direcionados à lavagem de vidrarias, evitando assim o entupimento nas tubulações das pias e a contaminação laboratorial. O descarte do extrato no fim da análise deve ser colocado em recipientes específicos para a acetonitrila.

As amostras de alimentos usados na SLAV/SC devem ser consideradas de risco biológico, portanto o uso de luvas é obrigatório para evitar a contaminação, o contato com a pele ou mucosas. As substâncias químicas usadas na otimização do método de extração via ultrassom são nocivas para o operador. Sendo assim, para evitar os riscos durante o processo analítico, o uso de equipamentos de segurança e uniforme apropriado são necessários. Ao manusear solventes orgânicos, deve-se usar um sistema de exaustão adequado.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 CALIBRAÇÃO E EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

O desempenho do método alternativo de extração assistida por ultrassom foi considerado satisfatório. Todos os analitos (exceto benzo[a]antraceno e criseno), demonstraram estar de acordo com a decisão da Comissão Europeia 2002/657/EC em termos de seletividade, linearidade ($R^2 > 0,95$), precisão ($CV < 21\%$) e exatidão em termos de recuperação (75–115%) (EU, 2002). Os resultados obtidos para cada analito estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores obtidos das medidas ($n = 10$) das concentrações de HPAs fortificadas no limite regulatório em amostras de pescados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa pelo método alternativo, considerando o *Q-Matrix*TM *Hydra*.

Analitos	Concentração teórica (mg/Kg)	Concentração média experimental (mg/Kg)	Desvio-padrão	CV (%)	Recuperação (%)
Benzo[b]fluoranteno	5	5,07	0,25	5	101

Benzo[k]fluoranteno	5	5,74	0,57	10	115
Benzo[a]pireno	5	5,57	0,32	6	111
Dibenzo[a,h]antraceno	5	5,52	0,38	7	110
Benzo[ghi]perileno	5	5,79	0,59	10	115
Indeno[1,2,3-cd]pireno	5	5,70	0,44	8	114

Fonte: Autor (2022).

A capacidade de um procedimento alternativo alcançar níveis próximos em parâmetros de validação analítica de um método de referência como a repetibilidade e precisão intermediária, confirma a eficiência da metodologia de extração assistida por ultrassom na avaliação e quantificação de HPAs utilizando LC-MS/MS. Além disso, estes resultados demonstram de forma clara, o potencial da extração assistida por ultrassom em suprir com sucesso uma possível necessidade de alteração na rotina de trabalho laboratorial, servindo como uma metodologia de extração alternativa ao método de referência em que utiliza uma extração por líquido pressurizado, inicialmente proposto por Mello *et al.* (2022).

No caso do criseno e do benzo[a]antraceno, cabe ressaltar que estes dois analitos já estavam apresentando problemas de recuperação no método oficial e que procedimentos de investigação das causas desse fenômeno estão sendo atualmente realizadas pela equipe do laboratório. Ou seja, os resultados insatisfatórios obtidos nos experimentos realizados no estágio para estes dois analitos são similares àqueles observados com o método oficial.

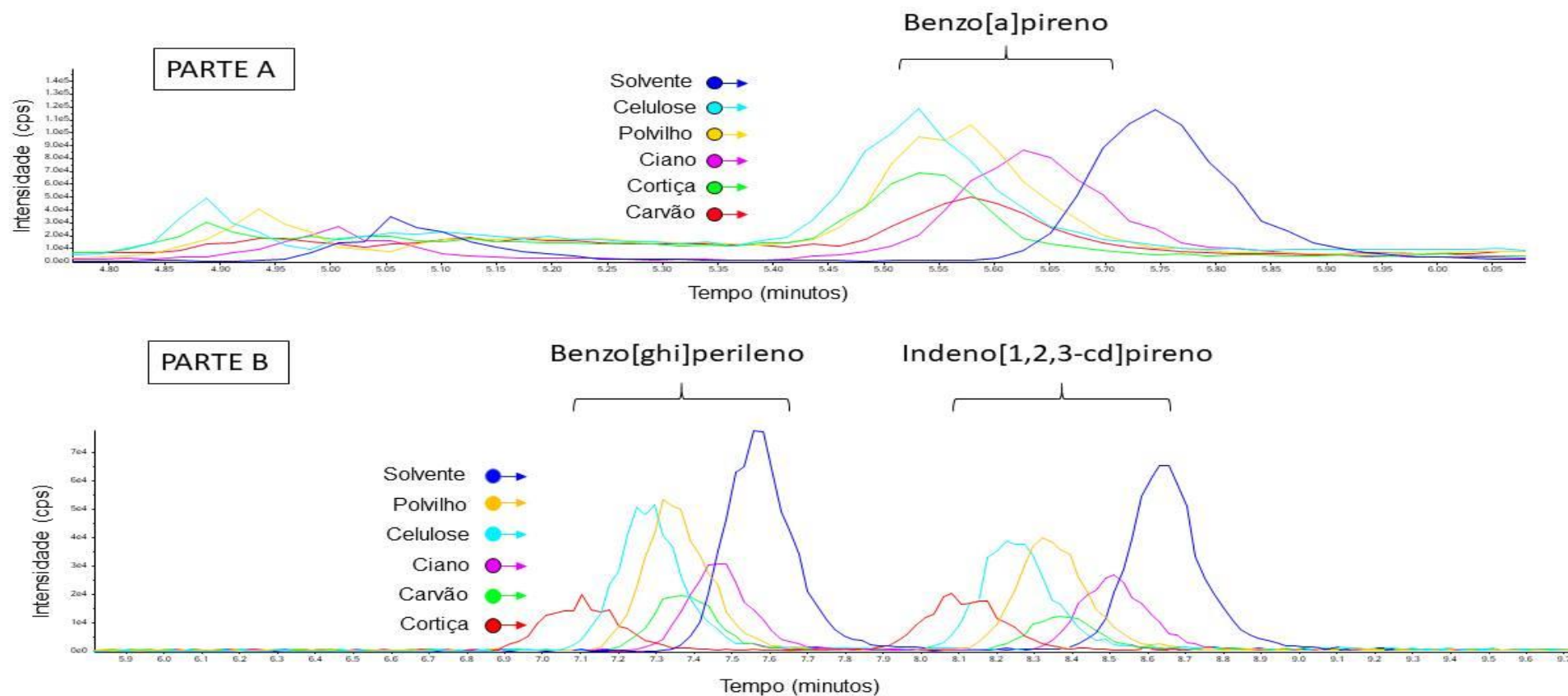
6.3.2 Otimização do método MSPD com materiais adsorventes alternativos

A análise de HPAs em alimentos quando se utiliza LC-MS/MS, os efeitos proporcionados pelas matrizes complexas são um dos pontos mais críticos. Os resultados obtidos neste trabalho derivado das otimizações ao utilizar diferentes tipos de adsorventes alternativos em comparação ao método de referência (MELLO *et al.*, (2022) apresentaram excelentes resultados para um aumento na capacidade de extração dos HPAs e na diminuição de interferentes presentes constantemente nos extratos de pescados. Além disso, representam uma diminuição do custo do ensaio. Estes adsorventes alternativos tem menor custo e possuem uma maior facilidade de compra, quando comparado às principais fases sólidas constituídas por partículas de sílica derivadas de polímeros lipofílicos, como C18, C8, fenil, ciano ou amina (BARKER, 2007).

As observações da Figura 5 demonstram que o método de dispersão de fase sólida é uma etapa importante para a análise com extratos complexos e pode servir como uma excelente abordagem para minimizar os efeitos da matriz em métodos bioanalíticos. As respostas obtidas pela utilização da celulose, cortiça, polvilho, carvão e cianopropil demonstram a capacidade de produzir resultados similares aos que encontramos nas análises de rotina.

Em um contexto geral para todos os analitos (exceto benzo[a]antraceno e criseno), os adsorventes sólidos alternativos **celulose** e **polvilho** foram os que apresentaram os melhores resultados na diminuição de interferentes na cromatografia e no aumento da capacidade de intensidade de sinal analítico, possivelmente por possuir menor fração de vazios e porosidade relacionados, com as suas respectivas granulometria (valores desconhecidos) . A Figura 5 demonstra a avaliação conforme os diferentes tipos de adsorventes utilizados. Conforme antecipado, o benzo[a]antraceno e criseno possuem elevadas interferências de matriz e essas interferências impedem que a quantificação exata e precisa destes compostos seja impossibilitada de forma confiável.

Figura 5 - Cromatogramas para benzo[a]pireno (parte A), benzo[ghi]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno (parte B) obtidos a partir da extração com diferentes adsorventes.



Fonte: AUTOR (2022).

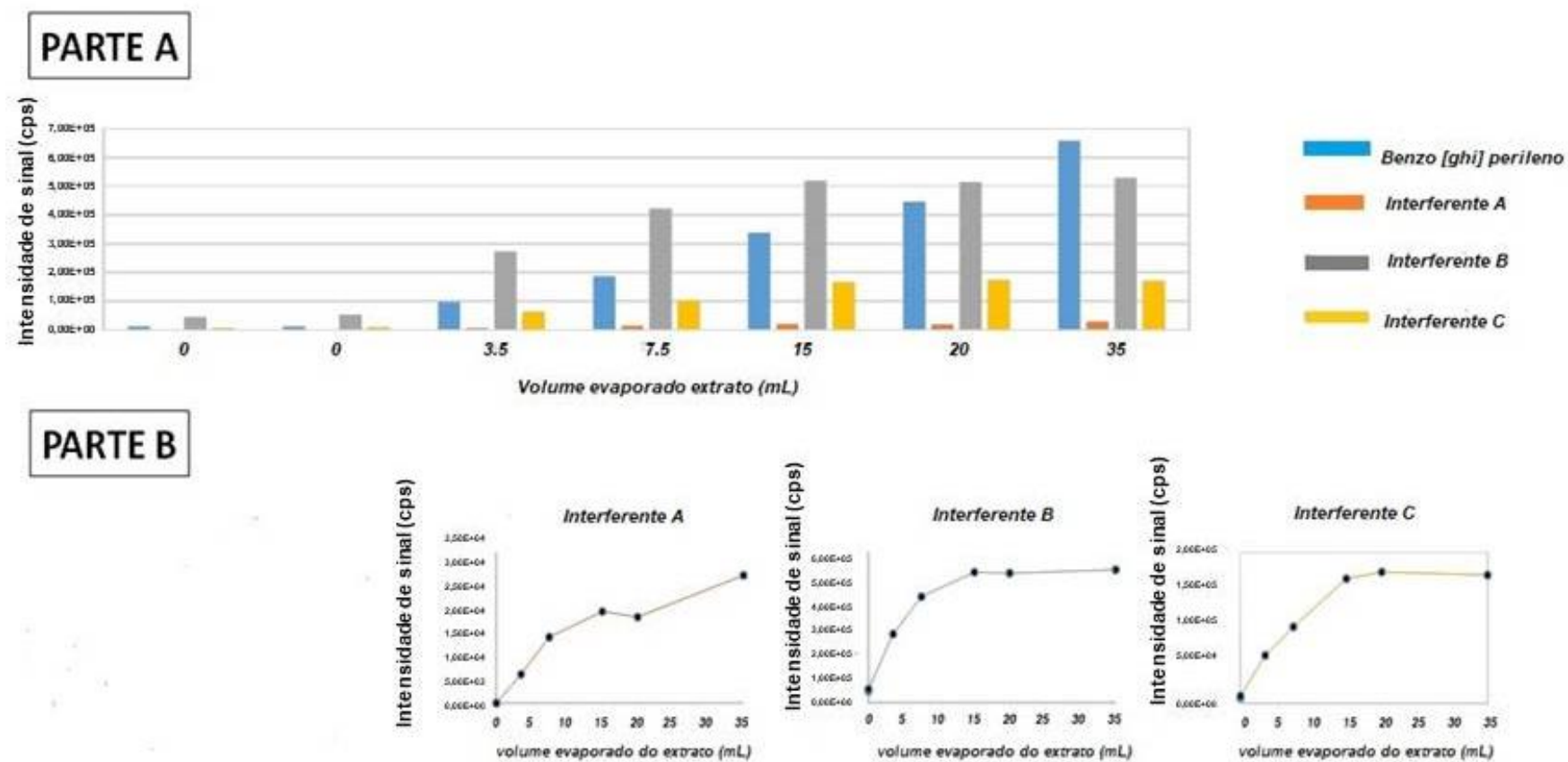
6.3.3 Efeito do volume do extrato evaporado sobre sinais analíticos e sinais interferentes

Devido à complexidade das amostras de alimentos e pelo fato de que muitos analitos de interesse podem estar presentes em níveis de traços, o preparo das amostras é uma etapa crucial para a obtenção de um extrato final adequado a ser analisado por uma técnica instrumental como LC-MS/MS. Dessa forma, a otimização de um método se torna ideal, principalmente quando sua capacidade de realizar a extração e a purificação simultaneamente dos analitos de interesse é eficiente e bem resolvida na cromatografia (HOFF, 2015).

O desempenho da otimização dos sinais analíticos de interesse versus sinais interferentes confirmou a metodologia previamente relatada por Mello *et al.*, (2022) deflagrando como o melhor desempenho de processo de concentração para todos os analitos avaliados a evaporação de todo o sobrenadante do extrato obtido (35 mL), conforme demonstrado na figura 3.

A representação gráfica na Figura 5 representada pelo analito benzo[ghi]pireno foi característico para todos os outros analitos. As respostas demonstraram que na medida em que quanto maior o volume do extrato concentrado maior é o sinal analítico do analito de interesse (HPAs). Em contrapartida, na medida em que extrato foi submetido a maiores volumes de concentração, os analitos interferentes assumem uma resposta de saturação formando um platô (parte A). Essa resposta é valiosa na medida em que a avaliação demonstra que pequenos volumes de extrato concentrado não influenciam de forma expressiva os analitos interferentes presentes na avaliação de HPAs em pescados. Entretanto, esta resposta classifica que a maiores volumes de extrato concentrado favorece de forma linear o aumento de sinal analítico do analito de interesse (parte B).

Figura 6 - Resposta gráfica representadas pelo analito benzo[ghi]pireno conforme o volume concentrado do extrato em comparação simultânea com os principais interferentes (parte A).



Fonte: AUTOR (2022).

6.4 CONCLUSÃO

A extração de HPAs nas amostras de moluscos bivalves é realizada por uma combinação de MSPD e PLE, utilizando o sistema EDGE. No entanto, foi avaliado que utilizando extração assistida por ultrassom, podem ser obtidos resultados similares e coerentes com o método oficial aplicado em rotina para análises de fiscalização federal na SLAV/SC (Mello et al., 2022). A avaliação dos materiais alternativos adsorventes foi importante para estabelecer qual deles proporciona a melhor dispersão em fase sólida e a maior diminuição na presença de interferentes presentes no extrato. A celulose e o polvilho foram as fases sólidas alternativas que atenderam melhor aos propósitos. Na tentativa de controlar os sinais interferentes presentes no extrato, foi avaliado o impacto do volume de extrato a ser concentrado e foi constatado que não ocorrem mudanças nos sinais interferentes com a variação do volume, mas ocorre perda de sinal dos analitos com volumes menores. Neste caso, o mais recomendável é manter a evaporação de todo o extrato obtido no EDGE.

Em resumo, foi possível obter um processo alternativo de extração (ultrassom) mais prático, barato e eficiente que o sistema EDGE, podendo se tornar uma alternativa ao laboratório. Da mesma forma, a celulose e o polvilho são possibilidades de fases sólidas mais acessíveis que poderão ser incluídas em estudo completo de validação para futuro uso na rotina.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho se propôs, como objetivo principal, relatar a vivência da rotina de um laboratório acreditado e que segue a ABNT NBR ISO/IEC 17025-2017. Sendo assim, foi muito satisfatório e enriquecedor estagiar neste órgão competente, que realiza análises oficiais para posterior monitoramento e fiscalização de alimentos.

Neste espaço foi possível obter de maneira mais concreta, a relação entre os conhecimentos adquiridos no decorrer do Curso de Química com as práticas laboratoriais obtidas. Numa perspectiva de preparação para mercado de trabalho, o estágio supervisionado obrigatório foi fundamental neste processo para o crescimento profissional. Para além da capacitação e qualificação recebida na SLAV- SC, foi importante também desenvolver a relação interpessoal com os colaboradores, que permitiu expandir as ideias e a troca de conhecimentos.

Sendo assim, o estágio proporcionou o contato com a química para além do ambiente acadêmico, demonstrando quão necessária ela é para o desenvolvimento da sociedade e para o futuro profissional.

REFERÊNCIAS

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MAPA. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br>> . Acesso em: 08/06/2022a.
- VERRUCK, Silvani; PRUDENCIO, Elane Schwinden. Ultrassom na indústria de alimentos: Aplicações no processamento e conservação. **Ponta Grossa: Editora Atena**, 2018.
- MAZZA, KEL. Extração assistida por ultrassom e microencapsulação por spray drying de compostos fenólicos do bagaço de uva. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Tese/dissertação (ALICE)**, 2017.
- ARRACHÉ, Elisa Rosa Seus. Micotoxinas em Insumo e Produto Cervejeiro: Desenvolvimento de Método Analítico e Aplicação de Adsorventes Alternativos. 2019.
- GUIMARÃES, Artemizia Pessoa. Determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) em alimentos obtidos por técnicas diferentes. 2014.
- BARBOSA, B. C. F.; ROSSI, G. A. M.; SOUZA, B. M. S. Atualizações do regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (riispoa): o que mudou na inspeção higiênico-sanitária no Brasil?. **Ars Veterinaria**, v. 37, n. 2, p. 87-98, 2021.
- MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química nova** , v. 32, p. 214-222, 2009.
- WILCKEN, Bridget et al. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. **Jornal de Medicina da Nova Inglaterra**, v. 348, n. 23, p. 2304-2312, 2003.
- HOFF, Rodrigo Barcellos; PIZZOLATO, Tânia Mara. Combinando etapas de extração e purificação na preparação de amostras para matrizes ambientais: Uma revisão das aplicações de dispersão em fase sólida de matriz (MSPD) e extração de líquido pressurizado (PLE). **Tendência do TrAC em química analítica**, v. 109, p. 83-96, 2018.
- DE MELO, Ana Paula Zapelini et al. Determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em frutos do mar por PLE-LC-APCI-MS/MS e avaliação preliminar de risco do derramamento de óleo no Nordeste do Brasil. **Métodos Analíticos de Alimentos** , p. 1-17, 2022.
- MARTINES, Marco Antonio Utrera; DAVOLOS, Marian Rosaly; JAFELICCI JÚNIOR, Miguel. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, p. 251-256, 2000.

ARAÚJO, Liliane Pequeno de et al. Avaliação de exposição de pescados a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na Baía de Guanabara Rio de Janeiro-Brasil. 2010.

CARMINITTI, LILIAN. **Estabelecimento do potencial de plantas no monitoramento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes na atmosfera urbana de São Paulo, SP. 73 p.** 2008. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente)-Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente, São Paulo.

SILVA, Patrícia Maria Freire da. **Estudo dos principais fatores que influenciam na solubilização dos hpas em águas.** 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

DICKEL, E. L. Sistema brasileiro de inspeção de produtos de origem animal-SISBI/POA-Nova oportunidade para inspeção e qualidade de produtos de origem animal. **Ci. Tecnol. Prod. Orig. Anim.**, p. 48-52, 2008.

GONÇALVES, Alex Augusto. ciência, tecnologia, inovação e legislação. **São Paulo: Atheneu**, 2011.

SANTOS, Antonio Sérgio Oliveira dos et al. Estudo comparativo entre extração Soxhlet e ultrassom para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos do estuário do rio Sergipe por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. 2011.

RODRIGUES, Nathalia Pamela et al. Proposta de implementação de um sistema de gestão de qualidade para acreditação pela abnt nbr iso/iec 17025: 2017 para o laboratório de qualidade da bioengenharia do hcu-ufu. 2019.

DÓRIA, Irene de Menezes. A atuação da Associação Brasileira de Normas Técnicas-ABNT. **Revista Biblioteconomia de Brasília**, v. 4, n. 1, p. 101-5, 1976.

LANÇAS, Fernando M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

ANEXO A**DECLARAÇÃO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO**

O MAPA, inscrito no CNPJ n. 00.396895/0045-46, localizado na Rua João Grumiche, número 117, bairro Kobrasol, na cidade de São José/SC, declara que a aluna Maristela Francisca da Silva, CPF [REDACTED], número de matrícula da UFSC 18250157, realizou estágio OBRIGATÓRIO referente a disciplina Estágio Supervisionado (QMC 5515) no Laboratório SLAV-SC entre o período de 07/03/2022 a 24/06/2022, totalizando 450 horas.

A Instituição de Ensino UFSC em que o (a) aluno (a) estuda possui vínculo com esta empresa ou órgão e o (a) aluno (a) tem seu projeto de estágio de conclusão de curso supervisionado pelo auditor fiscal federal agropecuário Rodrigo Barcellos Hoff, CRF/SC 7005, CPF [REDACTED].

Atenciosamente,

Documento assinado digitalmente
 Rodrigo Barcellos Hoff
Data: 15/07/2022 11:27:20-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Rodrigo Barcellos Hoff

LFDA/SLAV-SC

São José, 24 de junho de 2022.