



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC 5515 – ESTÁGIO SUPERVISIONADO

TRABALHO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

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

DAIANE HACKENHAAR

Florianópolis - SC

2022

DAIANE HACKENHAAR

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

Relatório de Estágio Supervisionado (QMC 5515) apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) desenvolvido no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) – Seção Laboratorial Avançada (SLAV) em São José como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Sidnei Chaves

Supervisor: Rodrigo Barcellos Hoff

Florianópolis - SC

2022

Ficha de identificação da obra

Hackenhaar, Daiane.

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NO
LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA – SEÇÃO
LABORATORIAL AVANÇADA (SÃO JOSÉ/SC) / Daiane Hackenhaar;**
orientador, Eduardo Sidnei Chaves, coorientador, Rodrigo Barcellos Hoff, 2022.

38 p.

Trabalho de Estágio Supervisionado (graduação) -

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,

Graduação em Química Tecnológica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química tecnológica. 2. Pesticidas. 3. Validação analítica. 4. Robustez.

I. Chaves, Eduardo Sidnei. II. Hoff, Rodrigo Barcellos. III. Universidade Federal de Santa Catarina.

Graduação em Química Tecnológica. IV. Título.

Daiane Hackenhaar

**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, 16 de novembro de 2022.

Prof. Dra. Danielle Marranquiel
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Eduardo Sidinei Chaves
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

*Este trabalho é dedicado à minha família, amigos
e todos que me apoiaram durante esse processo.*

RESUMO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pelo monitoramento e fiscalização de produtos destinados à alimentação de origem animal. O controle e a coleta de dados referente ao uso de pesticidas são importantes para a manutenção e estabilidade da saúde dos consumidores de alimentos de origem animal. Para isso, o MAPA através dos Laboratórios Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) e das Seção Laboratorial Avançada (SLAV) realizam diversos tipos de análises para inúmeros controles de produtos no Brasil. Nesse contexto, este trabalho relata as atividades vivenciadas durante a realização do estágio supervisionado obrigatório do curso de graduação em Química Tecnológica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em um laboratório avançado pertencente ao LFDA/RS situado em São José, Santa Catarina. Assim, foi possível vivenciar e participar de atividades de rotina em laboratório de referência nacional acreditado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e com conformidade à 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. Durante a vivência, a principal atividade foi o acompanhamento e realização de diferentes tipos de análises de produtos de origem animal, bem como a validação de um método analítico para determinação de pesticidas e medicamentos veterinários em rações destinadas à alimentação animal. Em conclusão, foi possível experimentar na prática os conhecimentos adquiridos durante a vida acadêmica.

Palavras-chave: Estágio supervisionado. Pesticidas. Validação analítica. Robustez. LC-MS/MS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz de fatores e combinação de níveis e suas respectivas respostas para o teste de Youden.....	19
Tabela 2. Montagem do experimento fatorial.....	22
Tabela 3. Analitos escolhidos para avaliação da robustez.....	24
Tabela 4. Fatores e variáveis selecionadas para avaliação da robustez.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de pareto para abamectina.....	26
Figura 2. Gráfico de pareto para clortetraciclina.....	27
Figura 3. Gráfico de pareto para decoquinato.....	27
Figura 4. Gráfico de pareto para nicarbazina.....	28
Figura 5. Gráfico de pareto para etopabato.....	28
Figura 6. Gráfico de pareto para fipronil.....	29
Figura 7. Gráfico de pareto para fenbendazol.....	29
Figura 8. Gráfico de pareto para florfenicol.....	30
Figura 9. Gráfico de pareto para nitrofurantoína.....	30
Figura 10. Gráfico de pareto para sarafloxacino.....	31
Figura 11. Gráfico de pareto para sulfametoxazol.....	31
Figura 12. Gráfico de pareto para tiamulina.....	32
Figura 13. Gráfico de pareto para tilosina.....	32

SUMÁRIO

1.JUSTIFICATIVA.....	pag 10
2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	pag 11
3. ATIVIDADES REALIZADAS.....	pag 12
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	pag 17
5. OBJETIVOS.....	pag 20
5.1 Objetvo geral.....	pag 20
5.2 Objetivos específicos.....	pag 20
6. METODOLOGIA.....	pag 21
6.1 Reagentes, padrões e soluções.....	pag 21
6.2 Extração por líquido pressurizado (EDGE).....	pag 22
6.3 Resíduos e segurança no laboratório.....	pag 23
7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO	pag24
8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	pag 34
9. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL	pag 35
REFERÊNCIA.....	pag 36
ANEXO.....	pag 38

1. JUSTIFICATIVA

É crescente no mundo o uso de pesticidas, principalmente no Brasil, para o controle de pragas e doenças nas lavouras. Por esse motivo, órgãos nacionais e internacionais monitoram e estabelecem critérios de avaliação para o controle da qualidade dos alimentos, regulamentando os limites máximos de resíduos (LMRs) que podem causar efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente. Para realizar a quantificação de pesticidas, são utilizados alguns métodos analíticos que se institui-se de técnicas com elevada sensibilidade e reproduzibilidade analítica, como a cromatografia líquida ou a gás, podendo empregar diferentes tipos de detector, como o detector de massa, fluorescência, e também, arranjo de diodo.

O desenvolvimento de um novo método analítico e a demonstração de sua capacidade de comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade é cada vez mais reconhecida e exigida. O desenvolvimento de validação de um método envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório, gerando informações confiáveis e interpretáveis sobre o propósito de análise. A esse processo, denomina-se validação analítica. A validação analítica consiste em demonstrar que a metodologia analítica é adequada ao que se propõe, produzindo valores consistentes quando comparados a um valor de referência. Para um método ser considerado validado, este deve atender uma série de parâmetros estabelecidos, como por exemplo a robustez, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Desta forma, o presente relatório de estágio supervisionado realizado na Seção Laboratorial Avançada localizado em São José (SLAV/SC), pertencente ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – (LFDA/RS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA tem como objetivo geral relatar a vivência e experiências obtidas durante o estágio obrigatório supervisionado. Também, mencionar a participação em um estudo de validação analítica de um método desenvolvido pelo próprio laboratório na avaliação de robustez do método. Por fim, além da parte experimental, também foi possível aprender e vivenciar a parte rotineira, treinamentos, capacitações e gestão de qualidade de um laboratório. Com isso, foi possível adquirir uma rica experiência nas demais áreas de atuação de um químico tecnológico.

2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é um órgão do Poder Executivo do Brasil e é de sua competência formular e implementar políticas atreladas ao agronegócio. A mesma exerce suas atividades nos estados brasileiros através das Superintendências Federais de Agricultura (SFAs). Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) são laboratórios oficiais do MAPA e nestes, são desenvolvidas funções de análises oficiais, a fim de atuar como referência nacional em assuntos laboratoriais, realizar auditoria em laboratórios credenciados, realizar ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação em métodos analíticos, atuar como centro regional de difusão de tecnologia e expertise, realizar estudos e manter banco de material de referência.

Os LDFAs compõem uma rede de seis unidades espalhadas pelas regiões do Brasil: na região Norte, em Belém/PA; na região Nordeste, em Recife/PE; na região Centro-oeste, em Goiânia/GO; na região Sudeste, em Pedro Leopoldo/MG, com unidades de sessões laboratoriais avançadas (SLAV) em Belo Horizonte, Andradas e Varginha; e em Campinas/SP, com unidade avançada em Jundiaí; na região Sul, em Porto Alegre/RS, com unidade avançada em São José/SC, sendo este último a unidade que o presente trabalho foi realizado.

A Seção Laboratorial Avançada de São José (SLAV-SC) conta com duas unidades laboratoriais, o Laboratório de Identidade e Qualidade de Alimentos (IQA) e o Laboratório de Resíduos e Contaminantes em Alimentos (RCA), identificados internamente pelas siglas IQA/SLAV/SC e RCA/SLAV/SC. Ambos os laboratórios são equipados com instrumentação de ponta em química analítica, dispendo de acreditação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), baseada na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017; assegurando a confiabilidade dos resultados, rastreabilidade e imparcialidade.

O espaço físico do prédio conta com uma área de recepção e cadastro de amostras, salas coletivas para cada colaborador realizar trabalhos administrativos, incluindo acesso ao sistema LIMS (*Laboratory Information Management System*), salas únicas de preparo de amostras, balanças analíticas para pesagem de amostras, depósito de segurança para reagentes com armário corta fogo, salas de análise laboratoriais e local específico para lavagem de vidrarias, onde também consta os sistemas de purificação de água (MilliQ) para abastecimento de água para o laboratório.

3. ATIVIDADES REALIZADAS

O estágio curricular obrigatório da disciplina QMC 5515 – Estágio Supervisionado, para a conclusão do curso de bacharel em química tecnológica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), possui uma carga horária total de 450 horas. Para a conclusão total da carga horária, o estágio supervisionado percorreu diversas semanas entre os meses de Junho a Novembro com uma carga semanal de 30 horas e 6 horas diárias. A seguir, serão descritas brevemente as atividades realizadas durante esse período.

Convencionalmente, ao ingressar no local do estágio (SLAV-SC), os colaboradores passam por um treinamento teórico e prático, seguindo o Manual da Qualidade do LFDA-RS, conforme a ABNT NBR/IEC 17025:2017. Inicialmente, foi solicitado a realização da leitura e o treinamento teórico de Procedimentos Operacionais Padrão (POP's) destinados ao uso durante a rotina laboratorial e outros documentos representativos essenciais de funcionamento da própria SLAV-SC, como a certificação de confidencialidade de informações sigilosas e garantias de qualidades de procedimentos analíticos. As principais abordagens desses documentos são relativas a compreensão de capacitação pessoal, controle de acesso ao laboratório, formulários de controles de registros (rastreabilidade de procedimentos e materiais), gestão de trabalho de conformidade e não conformidade, rotinas de análise analíticas, medidas de segurança físicas e químicas do local do trabalho e, não menos importante, análises críticas de certificados de calibração de instrumentos calibrados.

A finalidade de introdução ao laboratório e ao treinamento teórico desses procedimentos essenciais, é a exclusividade de acesso individual ao laboratório e a permissão de todas as futuras ações realizadas no espaço laboratorial. Entretanto, todas as atividades desenvolvidas foram supervisionadas e orientadas por profissionais capacitados da equipe local. Inicialmente, os treinamentos práticos, geralmente, começam pelo acompanhamento da realização de análises analíticas de rotina por um analista capacitado, e depois seguem com a realização do procedimento experimental sob supervisão do mesmo analista proficiente para a realização da análise específica. Como estagiária da SLAV-SC, para a execução de qualquer experimento, a aprovação de algum analista capacitado é imprescindível.

O primeiro contato ao entrar no laboratório foi com a calibração de balanças analíticas. A verificação da calibração de instrumentos analíticos está diretamente relacionada à entrega de resultados exatos e precisos. Diariamente, é realizada a verificação de todas as balanças analíticas e semi-analíticas calibradas presentes no laboratório. A verificação é realizada

conforme a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 (ISO, 2017), onde são utilizados pesos padrão com massa de referência, respeitando os limites mínimos e máximos que para cada um dos pesos padrão. De forma sucinta, a verificação de rotina para conformidade das balanças analíticas é realizada a partir da obtenção sequencial de pesagens (pelo menos três pesagens) de um peso padrão com um valor denominado conhecido. O valor médio obtido entre as medidas das avaliações experimentais não deve ultrapassar os erros estabelecidos em conformidade ao valor de referência do peso padrão utilizado (os erros são dependentes do valor de massa de referência utilizado e da sensibilidade da balança verificada).

Em seguida, após o treinamento de pesagem e de verificação de rotina das balanças analíticas, foram realizados treinamentos para o uso de pipetas volumétricas, micropipetas de uso manual, micropipeta eletrônica (tipo *Eppendorf Research pro*), e multidispensador eletrônico (tipo *HandyStep*). Assim como todos os instrumentos de medição do laboratório, as micropipetas e pipetas volumétricas, dispensadores manuais e eletrônicos e buretas automáticas, recebem uma calibração anual. A calibração dos equipamentos de medição é realizada por empresas credenciadas pelo INMETRO, e no retorno de todos os equipamentos calibrados para o laboratório, é realizada uma nova verificação interna. Essa verificação interna é desempenhada por técnicos capacitados que garantem que tais instrumentos estejam devidamente calibrados após a calibração externa e suas funcionalidades de medição estejam em sua plena conformidade, durante e depois do transporte à sede da SLAV/SC após a calibração dos equipamentos. Para a realização dessa verificação de calibração, inúmeras alíquotas de água (mínimo dez alíquotas) para uma única determinação de volume são efetuada por cada instrumento, em uma balança analítica calibrada. Levando em conta que a massa da água (à pressão de 1 atm) em temperatura ambiente ($\sim 21\text{ }^{\circ}\text{C}$) é aproximadamente 0,99802, é possível com auxílio de uma balança analítica calibrada, determinar a quantidade exata em volumes de uma alíquota efetuada utilizando um instrumento de dispensação de líquidos. Os valores das médias de massa obtidos após a pesagem da água, para cada volume experimental dispensado, é realizada a comparação com o valor nominal teórico de referência. Assim como no procedimento de verificação de balanças analíticas, o valor médio obtido entre as medidas das avaliações experimentais não deve ultrapassar os erros estabelecidos em conformidade ao valor de referência do peso padrão utilizado (os erros são dependentes do volume de referência utilizado, da sensibilidade da balança verificada e da sensibilidade de cada micropipeta, sendo ela manual ou eletrônica).

Diariamente, é feito o acompanhamento de análises de rotina. Para essas análises, cada amostra recebida, assim como cada reagente e padrão que consta no laboratório, são identificadas e armazenadas em condições específicas para cada material, em termos de tempo e temperatura ideal de armazenamento. A realização do acompanhamento e de vivência prática experienciada das diversas análises que são realizadas rotineiramente na SLAV/SC foram: Análise para determinação de bases voláteis totais (BVT) e determinação de pH em pescado, avaliação de *dripping test* (teste de gotejamento) em aves, avaliação de desglaciamento em produtos cárneos e pescado, determinação de conservantes em produtos cárneos e lácteos, e histamina em pescado, e não menos importante, a avaliação como forma de monitoramento de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves.

A determinação de bases voláteis totais (BVT), realizada em pescados, é feita por acidimetria. Todas as análises são feitas em duplicatas, pesando-se 10 g de amostra, que passaram previamente pelo processo de preparo de amostra e homogeneização. As bases voláteis são extraídas da amostra utilizando uma solução de HClO_4 , subsequente de uma neutralização com NaOH . Em seguida, o extrato é submetido a destilação por arraste de vapor, recebendo os componentes básicos voláteis em ácido receptor, passando então por uma titulação potenciométrica com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ neutralizando as bases voláteis. Através de um pHmetro, é possível determinar o pH por potenciometria, que possibilita obter uma resposta de volume por titulação, que é convertida em mg de nitrogênio de BVT por 100 g de amostra.

A análise de pH é realizada em simultaneamente com a análise de BVT gerando um laudo mais completo com informações sobre uma possível adulteração. Quando o pH do pescado estiver muito básico, a não conformidade do pescado é certificada, pois uma não adequação de estocagem da matéria-prima em condições inapropriadas para a sua estabilidade bem como, um longo período de tempo nessas condições de armazenamento pode ocasionar a degradação dos aminoácidos presentes na proteína animal, provocando à formação de bases voláteis como a trimetilamina e a amônia.

O *dripping test* é um procedimento para a execução de ensaio de determinação gravimétrica do teor líquido perdido por degelo em aves congeladas. A carne de aves *in natura* é muito propícia à contaminação microbiológica e por isso é importante um resfriamento adequado. A etapa de resfriamento ocorre por imersão em tanques de água gelada e nesse processo ocorre a hidratação das proteínas, incorporação da água ao tecido muscular. Se a água excedente não for removida antes da etapa de congelamento, esta água excedente poderá congelar junto ao produto aumentando o seu peso líquido e prejudicando economicamente o consumidor. Para esse método são utilizadas 6 carcaças ainda congeladas, fazendo-se a imersão

simultânea em um banho de água com temperatura e agitação controlada, permanecendo nesse banho por um tempo pré-determinado conforme seu peso inicial. Após o tempo de imersão, as amostras de frango são removidas do banho, enxugadas e avaliadas em uma balança semi-analítica o peso final das carcaças. O resultado final do ensaio é a média aritmética do percentual de líquido perdido das 6 carcaças.

O ensaio de desglaciamento, realizado em 6 replicatas, é a determinação do percentual de glaciamento por gravimetria em pescado congelado glaciado. Esta avaliação, é realizada determinando o peso do produto glaciado, do produto desglaciado e obtendo o percentual de glaciamento em pescado. Essa análise tem por objetivo inibir fraudes econômicas na venda desses produtos, pois o gelo utilizado na conservação do peixe deve ser descontado do peso líquido cobrado do consumidor.

A determinação de conservantes realizadas em produtos cárneos, lácteos e histaminas em pescado, é executado através de um método único e de multideterminação que utiliza cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) como técnica de separação e detecção de moléculas de interesse. Inicialmente, as amostras são submetidas a uma extração-sólido em baixa temperatura onde ocorre a partição dos analitos de interesse, utilizando solventes orgânicos acidificados com ácido acético. A separação dos analitos é desempenhada por cromatografia líquida (LC) em gradiente de eluição, composta por uma fase estacionária de di-isopropil-3-cianopropil selano ligado à sílica hidroxilada e sua respectiva detecção e quantificação é determinada por espectrometria de massa em tandem (MS/MS).

A análise de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves, inicialmente, é realizada através de uma triagem utilizando extração sólido-líquido à baixa temperatura com solução metanólica 90% acidificada com ácido acético, para a extração das toxinas marinhas dos grupos do ácido domoico, ácido okadaico, saxitoxinas, azaspirácidos e yessotoxinas. Em sequência é realizado um segundo protocolo para a determinação das toxinas referentes ao ácido okadáico, onde os extratos metanólicos são submetidos à hidrólise alcalina para que todos ésteres acilados sejam convertidos às toxinas precursoras. Ao final, esses extratos são filtrados e separados em cromatografia líquida, utilizando cianopropil como fase estacionária e determinados por 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 acompanhadas durante o período de estágio supervisionado realizado na SLAV-SC, também foi possível acompanhar o processo para a validação de um método analítico aplicado à detecção de pesticidas e medicamentos veterinários por LC-

MS/MS. O processo de validação é utilizado nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia, para que este atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. Dentre os diversos tipos de parâmetros de aplicação e avaliação em uma validação analítica, principalmente àquelas obrigatoriamente exigida por guias nacionais e internacionais reconhecidos (EURACHEM, ISO, INEMTRO, MAPA), um dos parâmetros realizados durante os testes de validação é a avaliação da robustez, que a maioria das vezes é obtida através do método de Youden por meio de um delineamento que envolve pelo menos 7 parâmetros analíticos combinados em oito experimentos. Assim, uma breve introdução sobre o método de Youden, os objetivos, a metodologia e os principais resultados relacionados com esta atividade estão descritos a seguir.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ao longo do tempo, com as inúmeras mudanças, tem-se percebido a necessidade de atender às novas demandas do homem. Para isso, a incorporação de novas descobertas tecnológicas e organizacionais vem contribuindo para a efetivação dessas mudanças.

Uma das atividades mais antigas, a agricultura, por séculos constitui o meio de vida de muitas famílias e com isso, estas passaram a ser incentivadas a ter uma produção mais voltada para um meio comercial, visando o aumento da produtividade agrícola para atender as essas novas demandas. Para isso, o uso de agrotóxicos na agricultura tem se tornado uma prática constante e crescente com o passar dos anos, efetivando o aumento da produtividade agrícola.
1,2

A atual intensificação do uso das terras para fins agrícolas tem despertado uma preocupação global.³ Diversos estudos têm apontado a ocorrência de resíduos de pesticidas em produtos alimentícios e no meio ambiente, em especial na água, tornando-se necessária a intensificação de estudos e pesquisas que promovam um monitoramento ambiental eficiente. Para isso, é imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos exatos e precisos que permitam identificar um grande número de compostos e que assim, contribuam para a avaliação de riscos ambientais, essenciais para a elaboração de estratégias que visem a redução destes riscos.⁴

O desenvolvimento de um método analítico, assim como a adaptação ou a implementação de um método já conhecido, passa por um processo de avaliação que preze sua eficiência na rotina de laboratório. Para isso, novos métodos ou métodos modificados precisam ser avaliados quanto a parâmetros que garantam a confiabilidade dos resultados. Esse processo costuma ser denominado de validação.⁵ Órgãos reguladores do Brasil, empresas e artigos científicos exigem cada vez mais a validação de metodologias analíticas e para isso, os mesmos têm estabelecido documentos oficiais com diretrizes a serem adotadas no processo de validação.⁶

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE no 899, de 29/05/2003⁷ e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.⁸ Segundo a ANVISA,⁷ “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a

confiabilidade dos resultados”. Nesse processo, é possível identificar duas etapas de validação de método, segundo Perez:

A validação no laboratório, que consiste em etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo ou para verificar um método existente. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as etapas de validação, sem verificar a reprodutibilidade. A *validação completa* envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação.

Os parâmetros de validação para uma metodologia analítica são a seletividade/especificidade, linearidade/ faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.⁹ Dentre esses parâmetros, a robustez tem despertado interesse. A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta quando sujeito a pequenas variações. Um método é considerado robusto quando este permanece praticamente insensível quando aplicada pequenas variações que possam ocorrer na utilização do método.¹⁰ Para uma avaliação que gere resultados confiáveis ao método e seu uso em laboratórios, é necessário que um número considerável de variáveis sejam analisados.¹¹ Essa análise geralmente ocorre recorrendo-se ao teste de *Youden*, pois além de avaliar a robustez do método, esse teste também aponta a influência de cada variável avaliada no resultado final.

O procedimento de Youden e Steiner consiste em uma avaliação de até 7 parâmetros variáveis com a análise de 8 amostras. O método é um planejamento fatorial fracionário e não permite a detecção de interações entre os diversos fatores. Por convenção, letras maiúsculas são representações do valor nominal e letras minúsculas, a variação para cada fator e oito amostras são projetadas seguindo o exemplo mostrado na Tabela 1¹².

Tabela 1. Matriz de fatores e combinação de níveis e suas respectivas respostas para o teste de Youden

Valores das variáveis	Análises							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	f	F	F	f	f	F
G, g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Com base nos resultados da análise de amostras, cada efeito variável pode ser determinado calculando a média das quatro análises contendo a variável em seu maior valor (letra maiúscula) e aqueles que o apresentam em seu menor valor (letra minúscula). Assim, o efeito da mudança do Fator "A" para "a" é medida através da diferença utilizando a equação 1:

$$\frac{P}{p} = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad \text{Equação 1}$$

em que P/p se referem ao efeito de cada um dos sete parâmetros.¹⁵

Para saber se o efeito é significativo, é necessário comparar o valor do efeito com o valor de efeito considerado crítico (*Ecrítico*), que será considerado o desvio padrão da precisão intermediária multiplicado por 3 (nível de 99% de confiança); caso o valor do efeito for maior que *Ecrítico*, o efeito é significativo. Se o efeito for significativo, nessa faixa de variação do fator em questão o método não é robusto e é necessário controlar a variação adequadamente para esse fator. Em alguns casos, é necessário determinar qual é a variação máxima no fator que não seja significativo e deve ser efetuada experimentalmente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Determinar a robustez através do Método de Youden para a validação de um método analítico aplicado à detecção de pesticidas e medicamentos veterinários, analisando sete parâmetros analíticos combinados em oito experimentos, a fim de estabelecer o efeito de cada parâmetro nos resultados finais das análises.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar a robustez do método introduzindo pequenas variações nos valores nominais dos parâmetros.
- Avaliar as áreas dos picos cromatográficos, a resolução dos picos e o fator de retenção dos compostos.
- Analisar a influência de cada uma das variações nos resultados finais.

6. METODOLOGIA

6.1 Reagentes, padrões e soluções

Para a realização do experimento, todos os reagentes utilizados foram de grau cromatográfico. Acetonitrila (ACN) foi fornecida por JT Baker Chemical Co. (Phillipsburg, EUA). Cloreto de sódio (NaCl) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). O ácido acético (AA) e o ácido fórmico (FA) foram fornecidos pela Tedia Co. (Fairfield, EUA). o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St Louis, EUA). Água ultrapura (tipo I) (resistividade mínima 18,2 MΩ cm) foi obtida de um sistema de purificação Millipore Milli-Q® (Molsheim, França).

Todos os padrões analíticos eram da mais alta pureza disponível ($\geq 95\%$ de pureza) e foram fornecidos pela Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha) ou Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A solução extratora de acetonitrila:água foi preparada 50:50 v/v e 60:40 v/v.

Para a validação analítica e a aplicabilidade do método, foi utilizada amostra de ração (amostra branca), obtida em um moinho local e submetida a análises para confirmar a ausência de interferentes.

Amostras de ração ($2,0 \pm 0,1$ g) foram pesadas em tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL e então, adicionou-se a solução de EDTA e o mix de fortificação de padrões internos, contendo os pesticidas a serem analisados (concentrações conhecidas pelos analistas que prepararam as amostras). Em seguida as amostras foram agitadas em vórtex (5 segundos).

Preparadas e fortificadas as amostras, seguiu-se o experimento conforme tabela abaixo, elaborada através do método de *Youden*. Foram escolhidos 7 fatores que poderão ocorrer normalmente na rotina ou que sejam de interesse do laboratório, foram eles: concentração de acetonitrila na solução de extração, adição de NaCl nos tubos coletores do extrato (efeito salting-out), temperatura da coluna, tempo de freezer, fornecedor da terra diatomácea, fornecedor da acetonitrila e aditivo da solução extratora. Escolhidos os parâmetros que serão variados, montou-se o planejamento do experimento conforme a tabela 2.

Tabela 2. Montagem do experimento fatorial

Parâmetro	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentração de acetonitrila na solução de extração	A	A	A	A	a	a	a	a
Adição de NaCl nos tubos coletores do extrato (efeito salting-out)	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura da coluna	C	c	C	c	C	c	C	c
Tempo de freezer	D	D	d	d	d	d	D	D
Fornecedor da terra diatomácea	E	e	E	e	e	E	e	E
Fornecedor da acetonitrila	F	f	f	F	F	f	f	F
Aditivo da solução extratora	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

6.2 Extração por líquido pressurizado (EDGE)

Ao tubo coletor contendo a amostra já fortificada, adicionou-se aproximadamente 2,5g da terra diatomácea. O conteúdo do tubo foi misturado vigorosamente usando o 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) específicos do equipamento EDGE (CEM Corporation, Matthews, EUA) contendo em seu interior três tipos filtros de filtragem líquida (Q-Disc), onde dois discos de filtros são constituídos de celulose de com diâmetro de porosidade 40 μm (C9) e um de fibra de vidro com 0,3 μm (G1) colocadas na sequência C9 + G1 + C9, para a subsequente extração.

A extração ocorreu no equipamento EDGE com a solução onde variou-se a concentração de acetonitrila e o aditivo da solução extratora. O extrato obtido foi centrifugado à 4200 rpm por 10 min à 4°C (modelo 40R, Thermo Scientific, Alemanha), os extratos resultantes como sobrenadante foram recolhidos; a eles adicionou-se o NaCl e transferidos para tubos de centrífuga de 15 mL e mantidos em freezer (-20 °C) por 30 e 60 minutos. 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.

As análises de LC-MS/MS foram realizadas usando os cromatógrafos 1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) e ExionLC (AB Sciex LLC, Framingham, EUA) acoplados aos espectrômetros de massa híbrido triplo quadrupolo-linear ion trap QTRAP 5500 (AB Sciex LLC, Framingham, EUA), com fonte de ionização *elektrospray* usada nas polaridades positiva e negativa (ESI) e modo de monitoramento de reação selecionado (SRM) e a temperatura da coluna ajustada para m 35°C e m 40°C. Os softwares Analyst 1.6.2 e MultQuant (Sciex, Foster City, CA) foram utilizados para aquisição e processamento dos dados.

6.3 Resíduos e segurança no laboratório

Em todas as etapas, desde a pesagem e manuseamento de soluções e amostras, o uso de luvas e EPI's é obrigatório, evitando o risco de contaminantes e resíduos e riscos de acidentes em laboratórios. Durante a limpeza dos tubos Q-Cups foi necessário que todos os resíduos sólidos sejam descartados em um recipiente específico 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 foi colocado em recipientes específicos devidamente etiquetados. Ao manusear solventes orgânicos, utilizou-se um sistema de exaustão adequado.

7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO

A definição do termo robustez e o procedimento a ser empregado não são harmonizados entre os guias de validação de métodos e nem sempre é mandatória a sua avaliação. Segundo o Guia do MAPA, "o estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão sensível o resultado analítico é às variações nas condições experimentais do procedimento analítico."¹⁶ A robustez é a susceptibilidade de um método de ensaio às alterações das condições experimentais, as quais podem ser expressas como tipos de amostras, analitos, condições de armazenamento, condições ambientais ou de preparo de amostra em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações específicas.

O Guia de Validação do MAPA recomenda que o teste de robustez seja realizado utilizando a abordagem clássica, variando um fator de cada vez, ou utilizando a abordagem do planejamento fatorial completo ou fracionário. Contudo, o Guia não propõe quais parâmetros podem ou devem ser avaliados nos testes de robustez de métodos analíticos e nenhuma menção é dada referente a testes estatísticos para avaliar os resultados. Já outros guias recomendam o Teste de Youden para determinar a robustez do método.

No estudo de validação em que participamos, a avaliação da robustez foi realizada para 13 fármacos (um representante para cada classe de antimicrobiano ou antiparasitário e três representantes para a classe farmacológica dos coccidiostáticos, conforme Tabela 3) e foi escolhido o teste de Youden, visto que neste experimento é possível examinar, simultaneamente, os efeitos de alterações em sete diferentes fatores do método. Na Tabela 4 são mostrados os fatores e as variáveis selecionadas para cada ativo, os quais foram variados levemente em dois níveis (tratamentos) e os resultados (significância dos efeitos) após tratamento estatístico. Foram elencados fatores que poderiam causar alterações no resultado.

Tabela 3. Analitos escolhidos para avaliação da robustez.

Analito	Classe química	Classe farmacológica
Abamectina	Avermectinas	Antiparasitários
Clortetraciclina	Tetraciclinas	Antimicrobianos
Decoquinato	NA	Coccidiostáticos
Etopabato	NA	Coccidiostáticos

Fenbendazol	Benzimidazóis	Antiparasitários
Fipronil	Fenilpirazóis	Pesticidas
Florfenicol	Anfenicóis	Antimicrobianos
Nicarbazina	NA	Coccidiostáticos
Nitrofurantoína	Nitrofuranos	Antimicrobianos
Sarafloxacino	Fluorquinolonas	Antimicrobianos
Sulfametoxazol	Sulfonamidas	Antimicrobianos
Tiamulina	Pleuromutilinas	Antimicrobianos
Tilosina	Macrolídeos	Antimicrobianos

Tabela 4. Fatores e variáveis selecionadas para avaliação da robustez.

Fator	Parâmetro	Nominal	Variação
A/a	Concentração de acetonitrila na solução de extração	60%	50%
B/b	Adição de NaCl nos tubos coletores do extrato (efeito <i>salting-out</i>)	não	sim
C/c	Temperatura da coluna	40°C	35°C
D/d	Tempo de freezer	30 min	60 min
E/e	Fornecedor da terra diatomácea	Marca 1	Marca 2
F/f	Fornecedor de metanol	Marca 1	Marca 2
G/g	Aditivo de solução extratora	ácido acético	ácido fórmico

A significância dos efeitos foi interpretada graficamente, sendo que foi estabelecido um limite de 25% de desvio da resposta normal (condições centrais) para mais ou para menos como critério de robustez. A análise dos resultados foi realizada mediante a construção do gráfico de

Pareto (Figuras 1 a 13), no qual os efeitos padronizados são calculados mediante o quociente do efeito de cada fator e o erro associado. O resultado obtido para os diferentes fármacos avaliados revela a importância deste parâmetro de validação, pois apesar do método ser devidamente desenvolvido e validado, nem sempre ele pode ser considerado robusto.

Nos resultados abaixo, percebe-se que algumas modificações no método têm grande impacto na resposta. Os perfis são bastante parecidos em todos os analitos avaliados, exceto para clortetraciclina. O exemplo da abamectina representa o cenário de todos os demais analitos estudados usando a abordagem de Youden, ao passo que a clortetraciclina apresenta respostas bem distintas.

As linhas em vermelho representam os limites de aceitação dos desvios causados pelas modificações em relação ao coeficiente de variação médio (CV) determinado para o ensaio em condições normais, obtidos no estudo de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial, que é de 25%. Quando um efeito causar um desvio maior do $\pm 25\%$, considera-se que o ensaio não é robusto para aquela alteração.

Entretanto, efeitos positivos – que causam ganho de sinal – podem ser vantajosos se estudados e otimizados em futuros experimentos de validação.

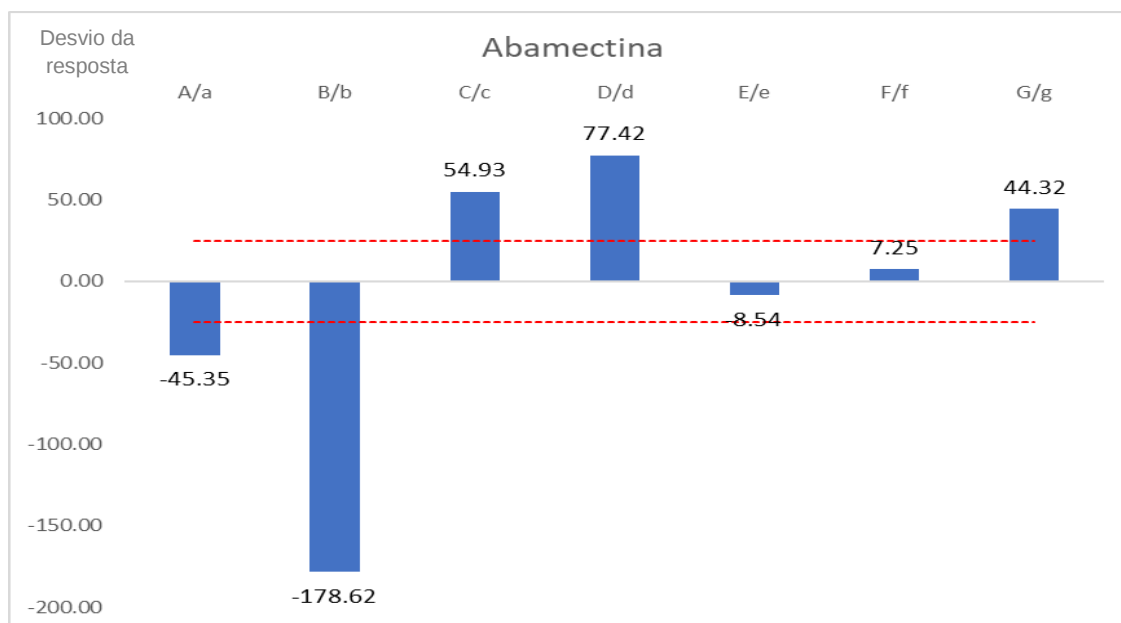


Figura 1. Gráfico de pareto para abamectina.

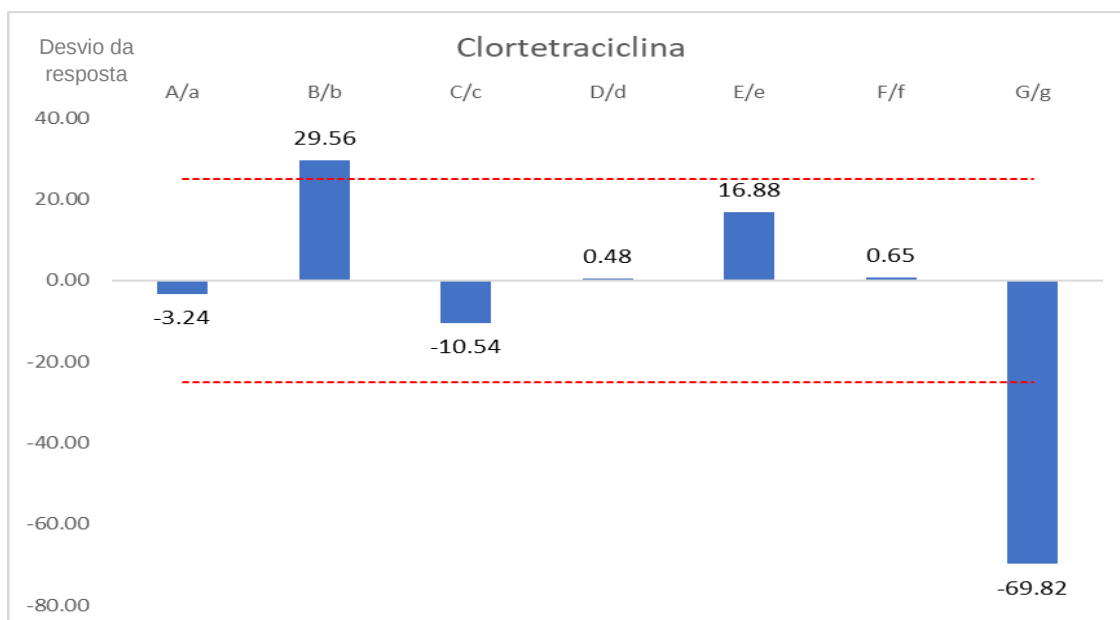


Figura 2. Gráfico de pareto para clortetraciclina.

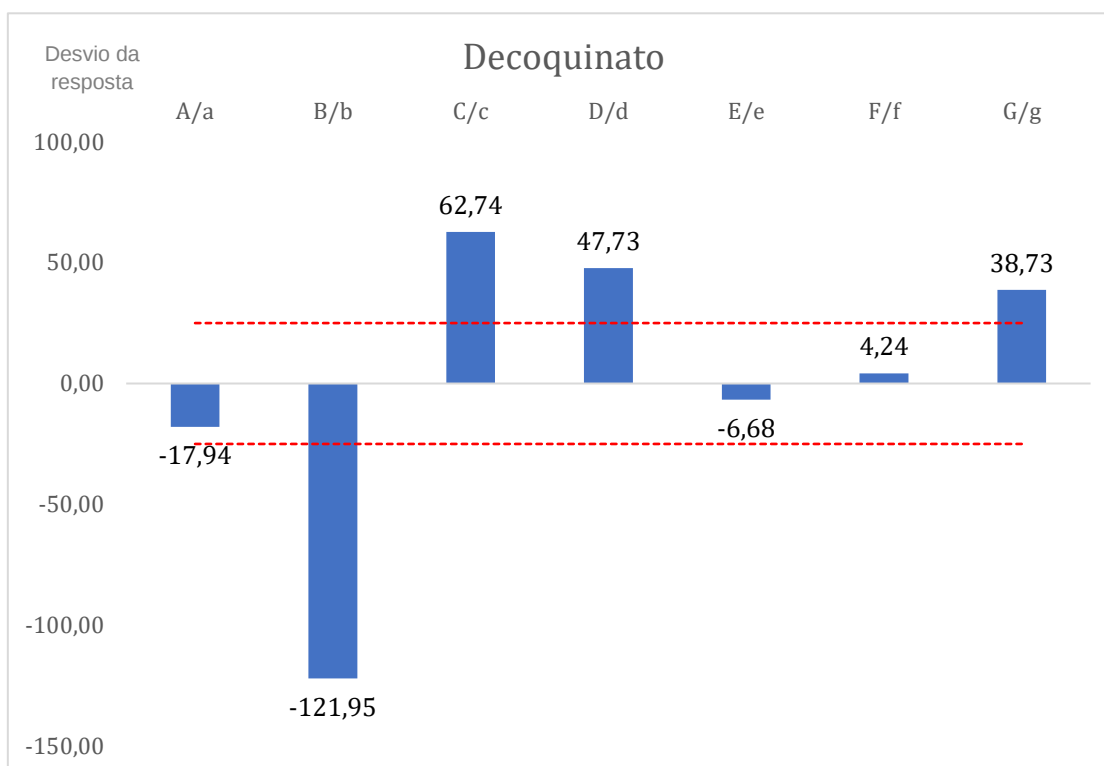


Figura 3. Gráfico de pareto para decoquinato.

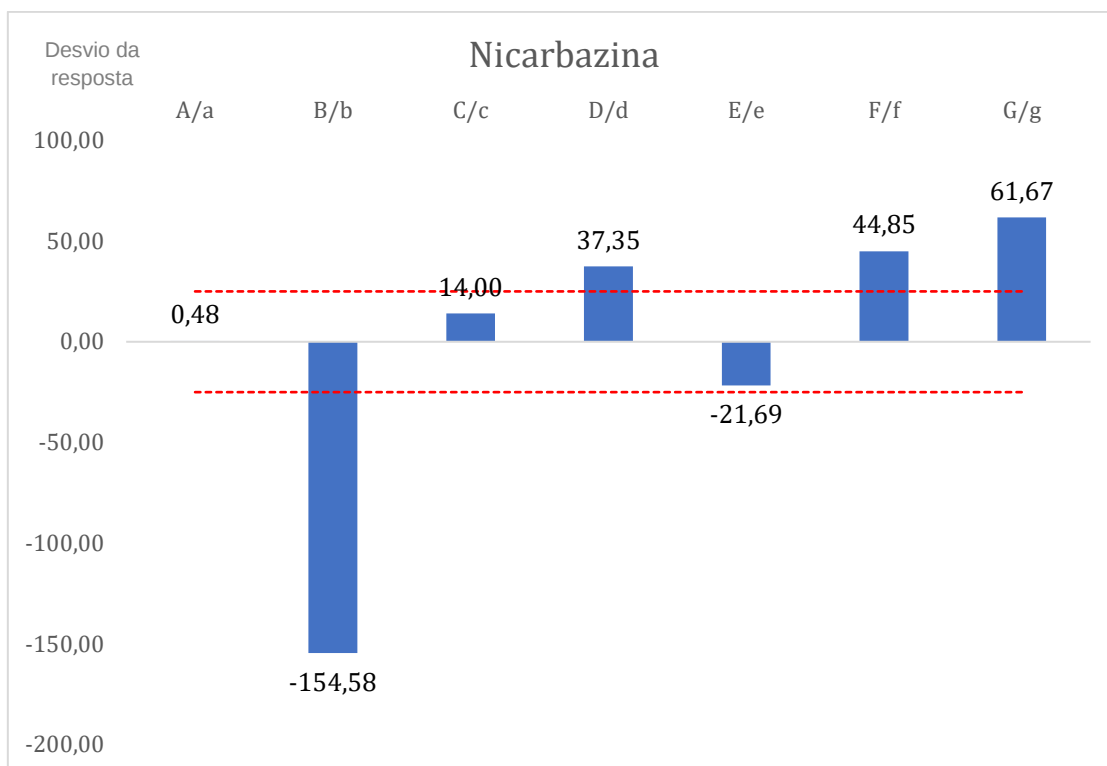


Figura 4. Gráfico de pareto para nicarbazina.

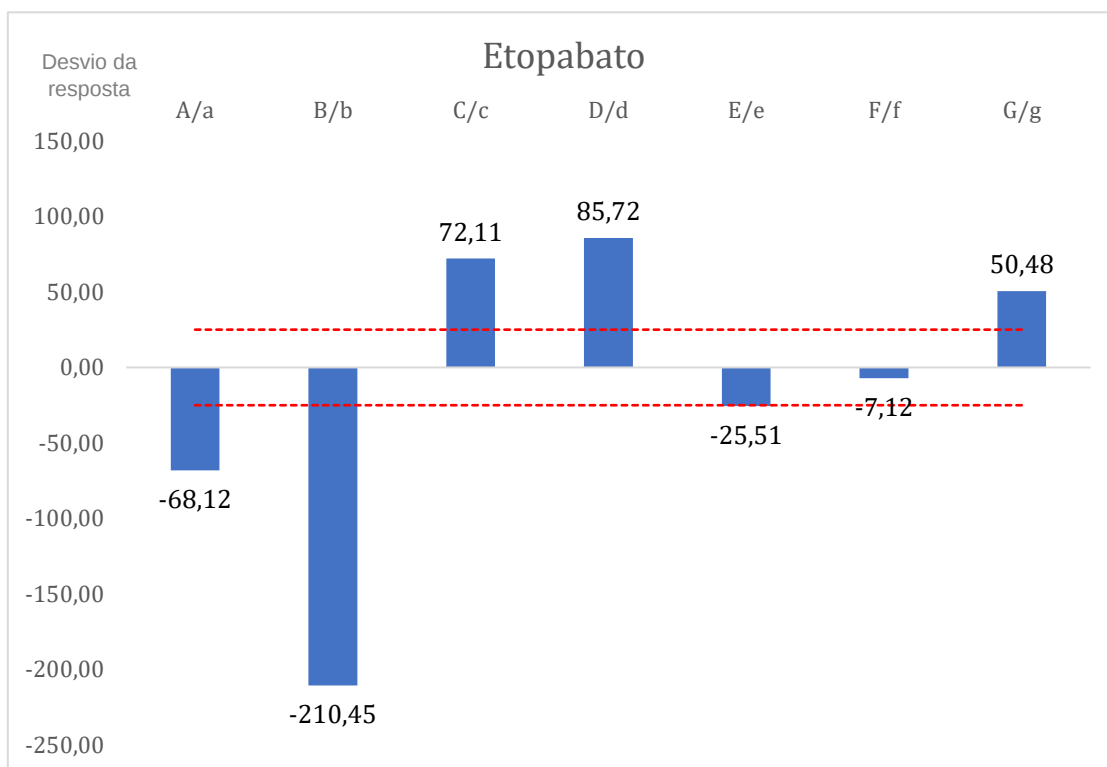


Figura 5. Gráfico de pareto para etopabato.

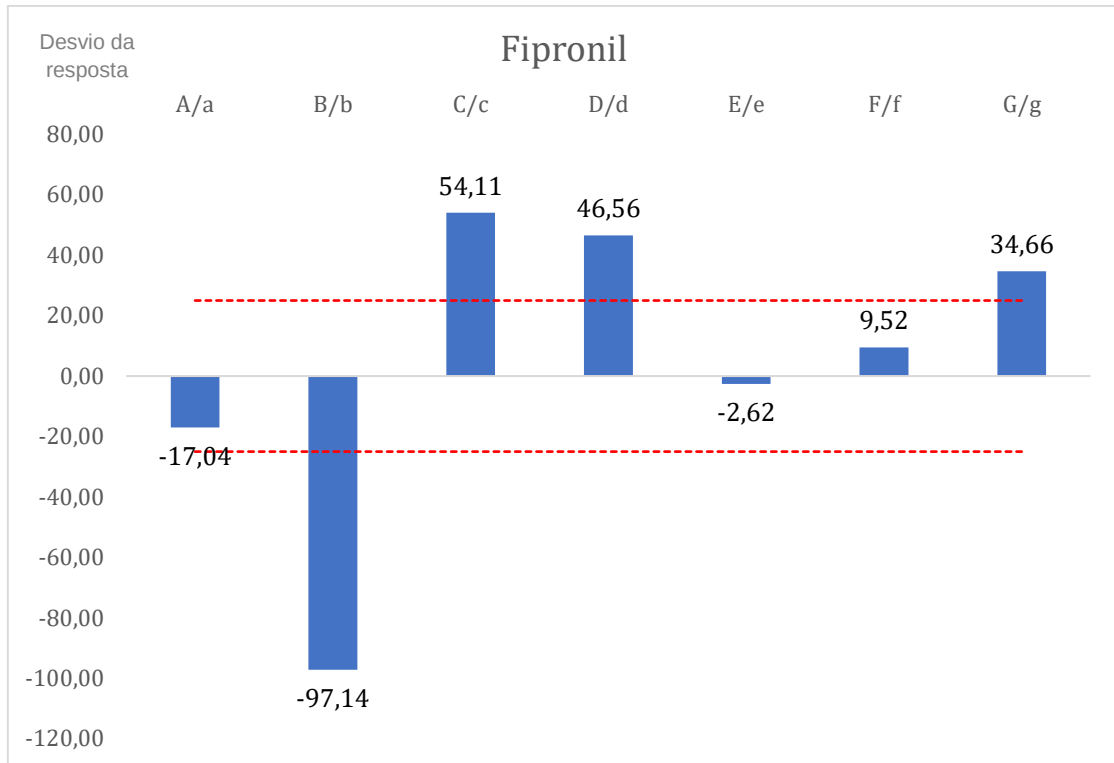


Figura 6. Gráfico de pareto para fipronil.

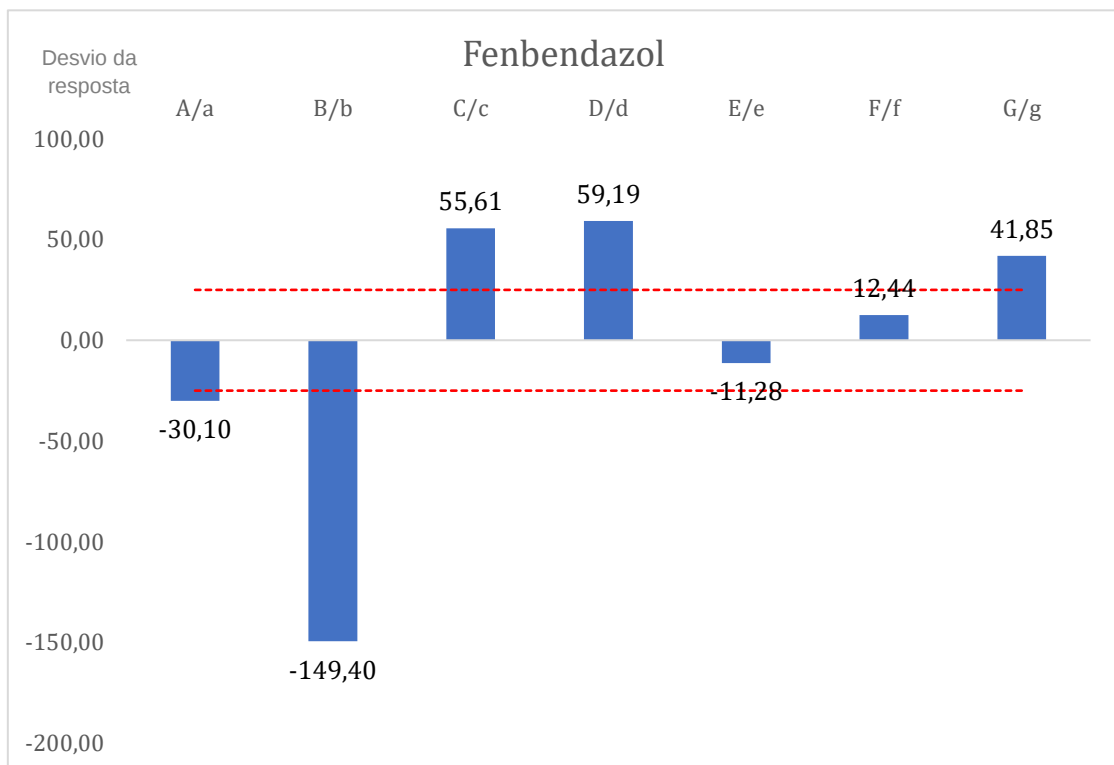


Figura 7. Gráfico de pareto para fenbendazol.

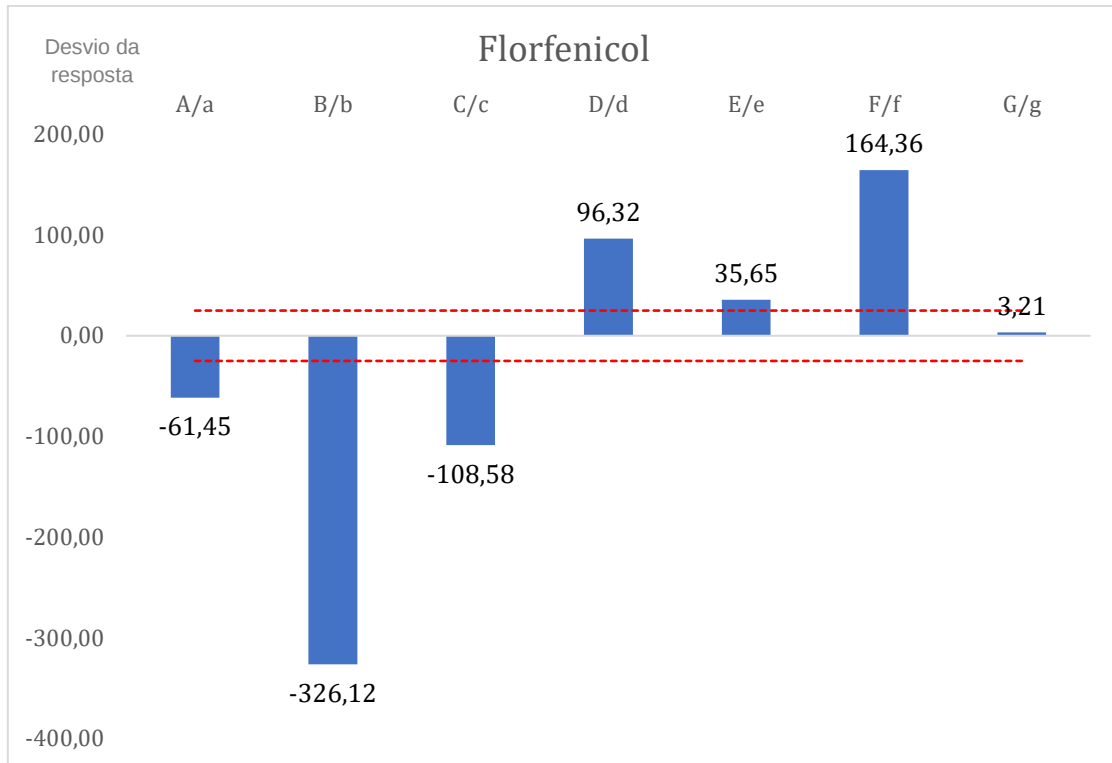


Figura 8. Gráfico de pareto para florfenicol.

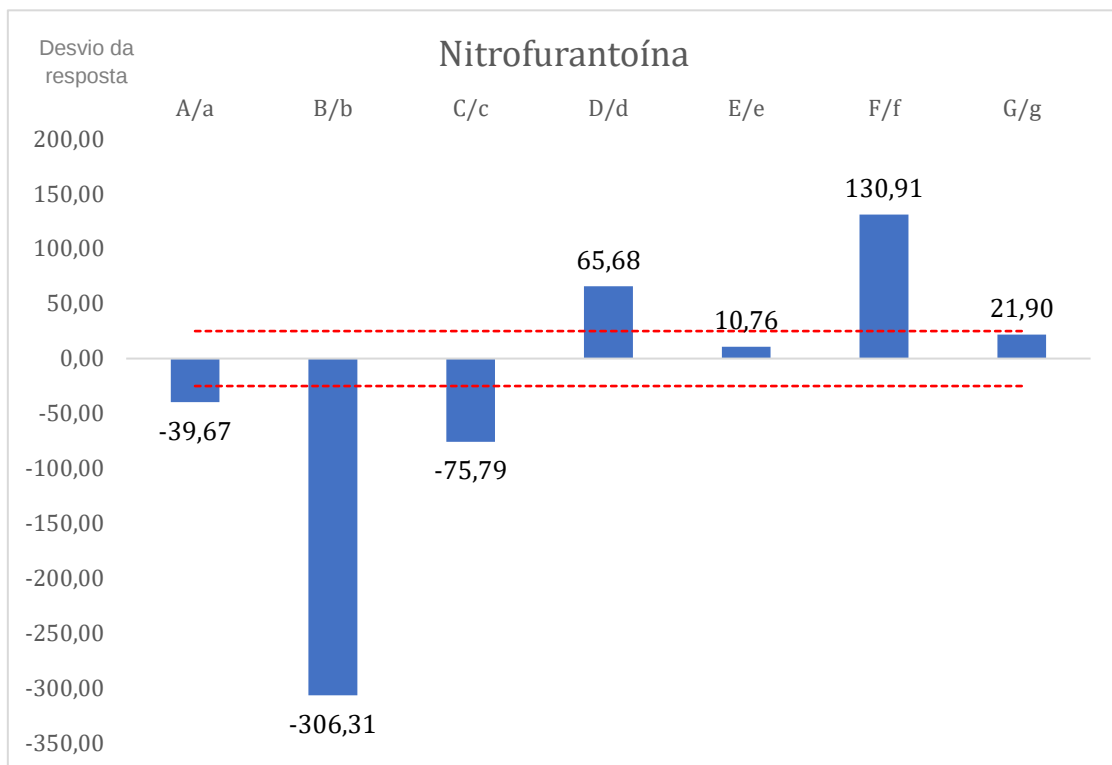


Figura 9. Gráfico de pareto para nitrofurantoína.

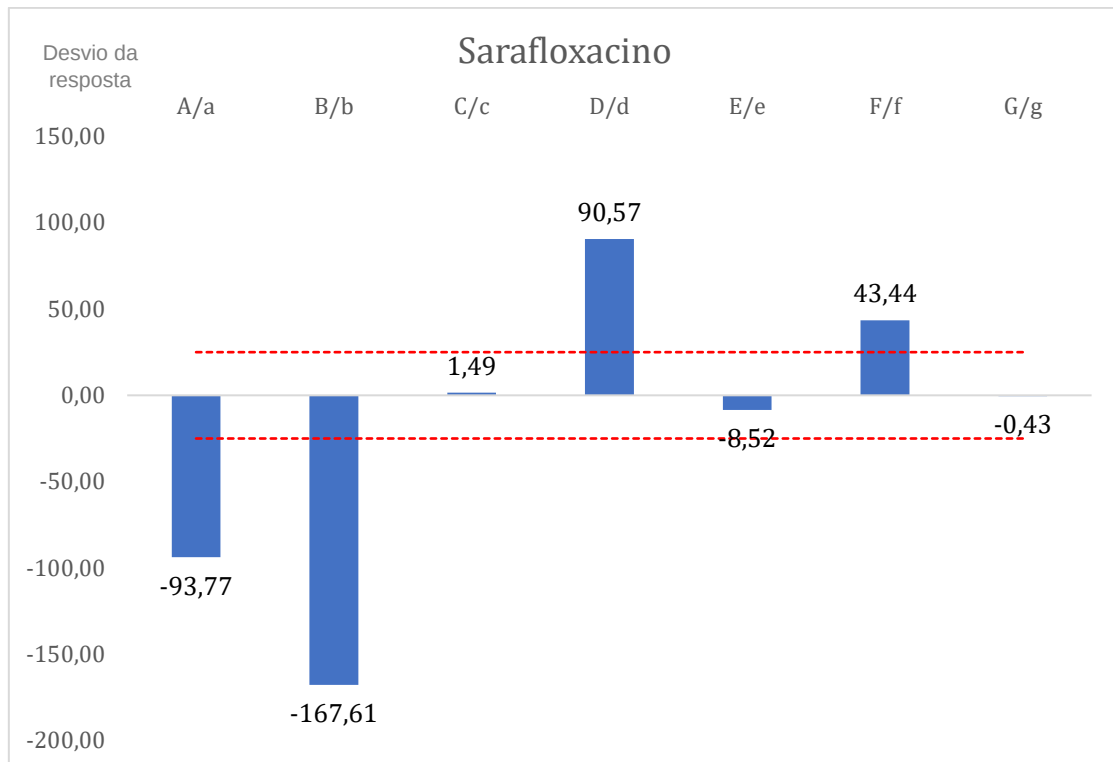


Figura 10. Gráfico de pareto para sarafloxacino.

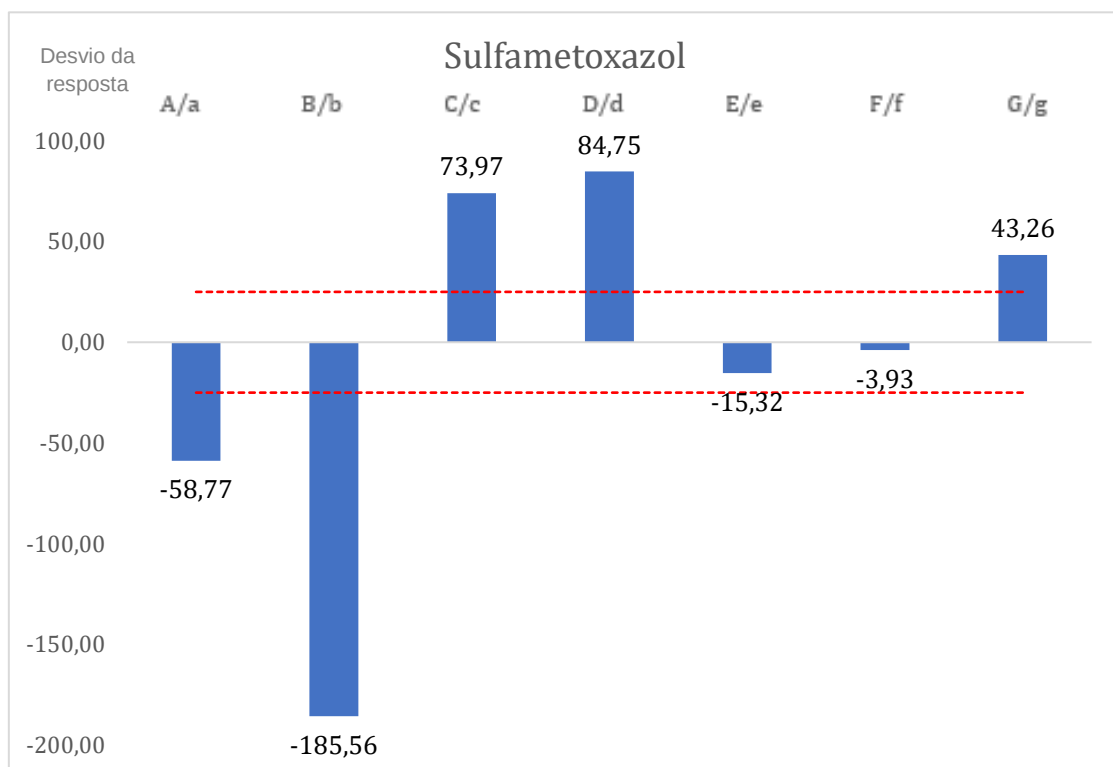


Figura 11. Gráfico de pareto para sulfametoxazol.

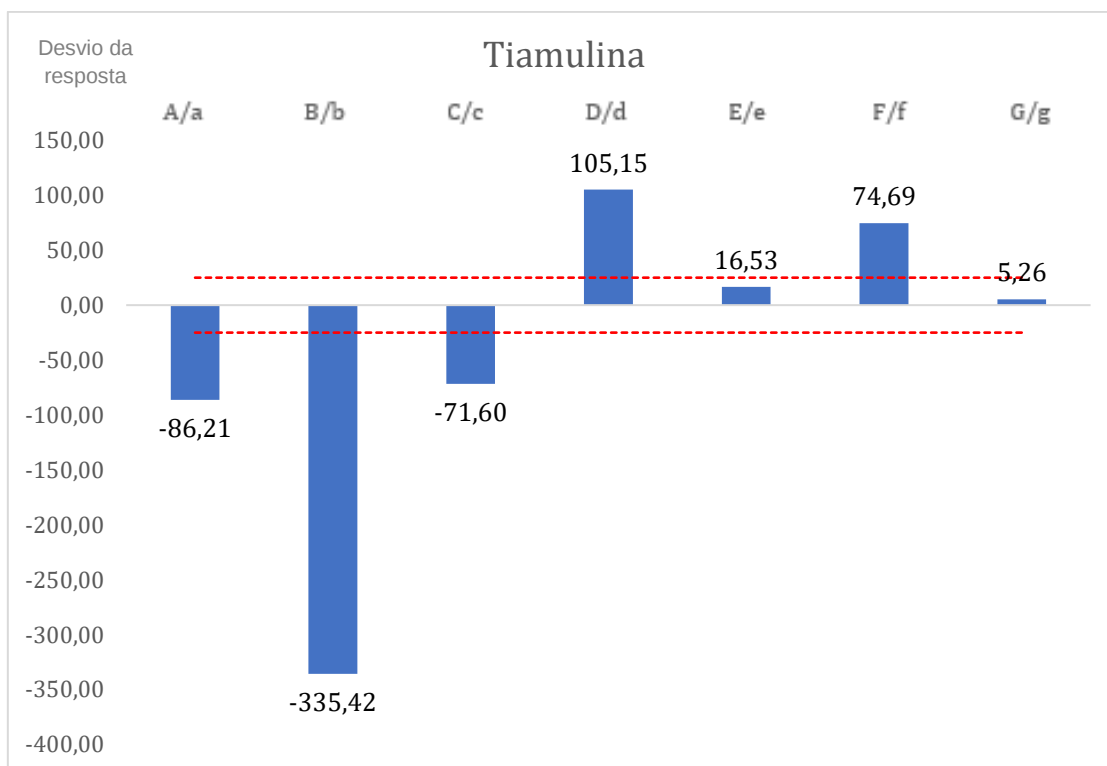


Figura 12. Gráfico de pareto para tiamulina.

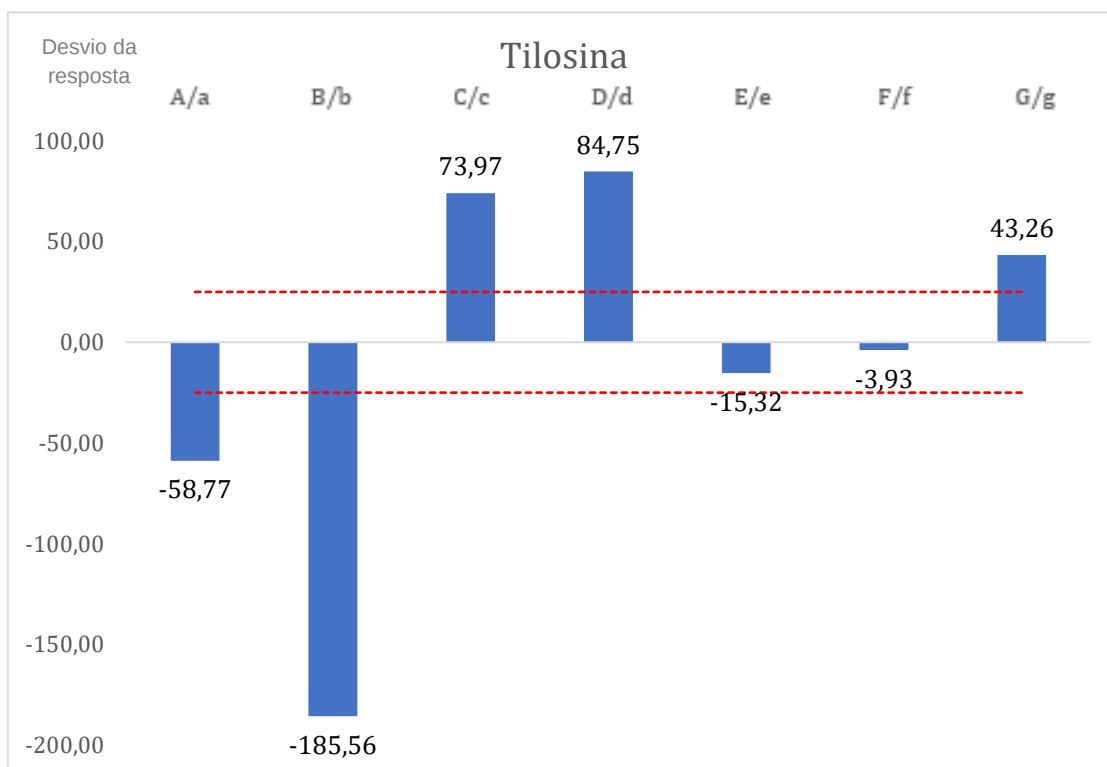
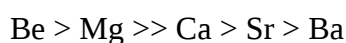


Figura 13. Gráfico de pareto para o analito tilosina.

O teste de robustez de Youden demonstrou que o método foi robusto diante: fornecedor da terra diatomácea e fornecedor de metanol. Para os parâmetros: concentração de acetonitrila na solução de extração e aditivo de solução extratora, as respostas foram bastante variáveis. Para alguns analitos, essas variações não se demonstraram significativas, já para outros, houve uma variação significativa, extrapolando o limite de desvio. Por outro lado, tornou-se possível observar que o método não é robusto diante a variação nos parâmetros de: adição de NaCl nos tubos coletores do extrato (efeito *salting-out*), temperatura da coluna e tempo de freezer, pequenas variações nesses parâmetros foram suficientes para alterar consideravelmente o efeito de cada fator, portanto, torna-se evidente que estas variáveis devem ser rigorosamente controladas de modo a manter a validação dos parâmetros analíticos avaliados.

A adição de NaCl nos extratos resultantes como sobrenadante após a extração, causa o efeito *salting out*. Este permite a redução da miscibilidade de compostos orgânicos em água devido ao aumento da força iônica do meio aquoso, aumentando a diferença da polaridade. Sais como o sulfato de magnésio e cloreto de sódio são eficazes na separação de acetonitrila da água.¹³

Esses sais são usados na prática de extração de cafeína, após várias etapas adiciona-se o MgSO_4 comumente chamado como sal secante. A solubilidade dos sais diminui ao descer pelo grupo 2 da tabela periódica.



BeSO_4 e MgSO_4 são solúveis, mas CaSO_4 é pouco solúvel, enquanto que os outros praticamente insolúveis.

As solubilidades muito maiores de BeSO_4 e MgSO_4 são decorrentes das elevadas entalpias de solvatação dos íons Be^{2+} e Mg^{2+} . A energia de hidratação também diminui à medida de os íons se tornam maiores.

Entretanto, esses ganhos de sinal podem ser vantajosos e mais estudos podem ser realizados em futuros experimentos de validação.

Por conter substâncias ionizáveis em meio as soluções, variações na temperatura da coluna também acabam afetando a robustez do método, gerando grandes variações quando aumentada o diminuída a temperatura da mesma.¹⁴

8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A determinação da robustez para a validação de um método analítico seguindo o método de *Youden* se mostrou satisfatório, uma vez que se adquiriu os resultados desejados. Os resultados mostram que os parâmetros que exigem mais atenção são a dição de NaCl nos tubos coletores do extrato (efeito salting-out), a temperatura da coluna e o tempo de freezer, já que estes foram os responsáveis por propiciar diferenças significativas em maior número de compostos. O estudo apontou que apesar do método ser devidamente desenvolvido e validado, nem sempre ele pode ser considerado robusto, o que ressalta a importância deste parâmetro de validação.

Os efeitos positivos obtidos nos estudos gráficos podem ser vantajosos se estudados e otimizados em futuros experimentos de validação, exemplo disso é a adição de NaCl nos tubos coletores dos extratos, que ao analisar as áreas dos picos adquiridos no LC-MS/MS, despertou o interesse dos analistas para futuros testes na validação do método.

Por fim, o estágio proporcionou o primeiro contato com a química fora do ambiente acadêmico, proporcionando uma experiência de grande valor para a conclusão do curso de Química Tecnológica, pois além de ter a oportunidade de pôr em prática os conhecimentos adquiridos durante a formação acadêmica, foi possível vivenciar a rotina de um laboratório que segue normas internacionais de gestão de qualidade, como a ABNT NBR ISO/IEC 17025, fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados.

9. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL

Durante o processo de realização do estágio obrigatório supervisionado foi possível aplicar em sua grandeza o conhecimento teórico e prático obtido durante o Curso de Graduação em Química Tecnológica, exercendo uma oportunidade única de crescimento e complementação à formação acadêmica e profissional. Nesse processo, percebeu-se a importância de aplicar corretamente as metodologias desenvolvidas e o rigor técnico das análises, com o intuito de garantir a identidade, qualidade e segurança dos alimentos para os consumidores, bem como, a confiabilidade dos resultados emitidos nas análises da Seção Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV-SC).

10. REFERÊNCIAS

- 1 MAGALHÃES, Maria Auxiliadora de Sá. Exposição a agrotóxicos na atividade agrícola: um estudo de percepção de risco à saúde dos trabalhadores rurais no Distrito de Pau Ferro – Salgueiro/PE. 2010. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010
- 2 M.Alamgir Zaman Chowdhury. A.N.M. Fakhruddin; Md. Nazrul Isla; Mohammed Moniruzzamana; Siew Hua Gan; Md. Khorshed Alam. Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Control* 34 (2013) 457e465.
- 3 Ribeiro, A. C. A. et al. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do Rio São Lourenço-MT: validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Quím. Nova* 36 (2). 2013
- 4 Caldas, E. D.; De Souza, M. V.; Jardim, A. N. O.; *Food Addit. Contam., Part A* **2011**,28,79.
- 5 Brito, N. M.; Junior, O. P. A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L.; Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.
- 6 Perez; M. A. F., “Validação de métodos analíticos: Como Fazer? Por que ela é importante? *Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens ITAL*, vol. 22, nº3, 2010.
- 7 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.
- 8 Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- 9 EMANUELLI T., SCANDIUZZI M. Validação de processos na indústria farmacêutica. In: Congresso de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos. 2000; Rio Grande do Sul: Universidade do Rio Grande do Sul. Anais. . p.57. 2000.
- 10 Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 – Revisão de 05 agosto 2016.
- 11 ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Qualidade em Química Analítica: Uma Assistência a Acreditação. [s.l: s.n.]. v. 1
- 12 YOUNG, W. J.; STEINER, E. H. Statistical manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry. Washington: AOAC, 88 p., 1975.
- 13 PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em

alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, 32, 2009, p.1620-1634.

14 SOUZA, Graziene Lopes de. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise da fração acetato de etila do extrato da casca do caule de *Anacardium occidentale* Linn por cromatografia líquida de alta eficiência . 2015. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

15 Silva B.; Gonzaga L.V.; Fett R.; Costa A.C.O. Robustez do método para determinação de compostos fenólicos em mel de melato de Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) por HPLC/DAD. -Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, 2018.

16 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica : fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2011. 72 p.

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA EXECUTIVA
DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACAO
COORDENACAO GERAL DE GESTAO DE PESSOAS
COORDENACAO DE PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO FUNCIONAL
DIVISAO DE PLANEJAMENTO DA FORCA DE TRABALHO
SERVICO DE ESTAGIO DE ESTUDANTES

DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins de comprovação, que **DAIANE HACHENHAAR**, portadora da Cédula de Identidade RG nº [REDAZIDA] SSP/SC e do CPF nº [REDAZIDA], estava regularmente cadastrada no Centro de Integração Empresa Escola - CIEE, no curso de Química na UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC, o que possibilitou sua inclusão em vaga de estágio obrigatório de nível superior nesta Repartição Pública Federal, permanecendo de 26 de julho de 2022 até 22 de novembro de 2022, totalizando **492 (quatrocentos e noventa e duas) horas**.

O Convênio MAPA/CIEE disponibilizou ao estudante uma carga horário de 30 (trinta) horas semanais, de segunda a sexta-feira, sem o pagamento de bolsa e sem transporte, com base na Orientação Normativa 213/2019.

O estudante cumpriu seu estágio regularmente neste Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA.

Por ser verdade, firmo o presente.

KAILANE RAMOS DOS SANTOS
 Chefe de Serviço



Documento assinado eletronicamente por **KAILANE RAMOS DOS SANTOS, Chefe de Serviço**, em 23/11/2022, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site: https://sei.agro.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 25137922 e o código CRC 3CAA03E5.

Referência: Processo nº 21000.015652/2020-71

SEI nº 11120312