



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS
FÍSICAS E MATEMÁTICAS DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

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

Carlos Augusto Vieira

FLORIANÓPOLIS - SC

Março/2024

CARLOS AUGUSTO VIEIRA

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

Relatório de Estágio Supervisionado (QMC 5515)
apresentado ao Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito para a obtenção do Título de Bacharel
em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Eduardo S. Chaves
Supervisor: Dr. Rodrigo Barcellos Hoff

FLORIANÓPOLIS - SC

Março/2024

Vieira, Carlos Augusto

Relatório De Estágio Supervisionado Desenvolvido No
Laboratório Federal De Defesa Agropecuária (LFDA) - Seção
Laboratorial Avançada (São José/SC) /Carlos Augusto
Vieira ; supervisor, Eduardo Sidinei Chaves, coorientador,
Rodrigo Barcellos Hoff, 2024.

33 p.

Relatório de Estágio - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Graduação em Química - Bacharelado, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química - Bacharelado. 2. Biotoxinas marinhas. 3.
Moluscos bivalves. I. Chaves, Eduardo Sidinei. II. Hoff,
Rodrigo Barcellos . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. IV. Título.

Carlos Augusto Vieira

Título: Relatório De Estágio Supervisionado Desenvolvido No Laboratório Federal De Defesa Agropecuária (LFDA) - Seção Laboratorial Avançada (São José/SC)

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Química

Florianópolis, 05 de dezembro de 2023.



Documento assinado digitalmente

Miguel Soriano Balparda Caro

Data: 04/03/2024 08:39:22-0300

CPF: ***.282.530-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Curso

Banca examinadora



Documento assinado digitalmente

Eduardo Sidinei Chaves

Data: 01/03/2024 07:50:06-0300

CPF: ***.185.439-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Eduardo S. Chaves, Dr.

Orientador



Documento assinado digitalmente

MONALISA AZEVEDO MOREIRA COSTA

Data: 02/03/2024 18:06:31-0300

CPF: ***.071.376-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Monalisa Moreira

Instituição Química/UFSC



Documento assinado digitalmente

Luciano Vitali

Data: 01/03/2024 16:30:14-0300

CPF: ***.529.060-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Luciano Vitali, Dr.

Instituição Química/UFSC

Florianópolis, 2024

RESUMO

Para promover a garantia de alimentos de qualidade e evitar fraudes nos processos de produção, a fiscalização e monitoramento de alimentos se prova necessária, visando a segurança da população contra problemas causados por alimentos intoxicados. Para isso o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pelo monitoramento e fiscalização de produtos destinados à alimentação de origem animal. Através dos Laboratórios Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) e das Seção Laboratorial Avançada (SLAV) o MAPA realiza diversos tipos de análises para produtos no Brasil. Este trabalho descreve as atividades vivenciadas durante o estágio supervisionado realizado na SLAV de São José/SC. Assim, foi possível vivenciar e participar de atividades de rotina em laboratório de referência nacional, onde ocorreu o acompanhamento de diversos tipos de análises de produtos de origem animal incluindo desde o processo de recepção das amostras até a verificação e expressão dos resultados. Tendo como destaque a determinação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas.

Palavras-chave: Pescados, Biotoxinas marinhas, Moluscos bivalves, MAPA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas

HPLC-MS/MS- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (do Inglês: *High-performance liquid chromatography mass spectrometry*)

IEC- Comissão Eletrotécnica Internacional (do inglês: *International Electrotechnical Commission*)

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial

ISO- Organização Internacional para Padronização (do Inglês: *International Organization for Standardization*)

LFDA- Laboratório Federal de Defesa Agropecuária MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NBR- Norma Brasileira

SLAV/SC- Seção Laboratorial Avançada de São José/SC

IQA-Identidade e Qualidade de Alimentos (IQA)

RCA- Resíduos e Contaminantes em Alimentos (RCA)

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO DO LOCAL	8
2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 MOLUSCOS BIVALVES.....	12
3.2 BIOTOXINAS MARINHAS.....	13
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE BIOTOXINAS MARINHAS.....	16
3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS LC-MS/MS.....	17
3.5 DETERMINAÇÃO DE BIOTOXINAS MARINHAS EM MOLUSCOS BIVALVES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 OBJETIVO GERAL	18
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 REAGENTES E AMOSTRAS	19
4.2 INSTRUMENTAÇÃO.....	19
4.3 PROCEDIMENTO.....	20
4.4 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO.....	22
5. RESULTADOS.....	22
5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	23
5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	25
6. CONCLUSÕES.....	28
7. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO.....	29
8. REFERÊNCIAS.....	30
9. ANEXO.....	33

1 APRESENTAÇÃO DO LOCAL

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é um órgão federal responsável pela fiscalização de alimentos que são produzidos e comercializados no território nacional e de produtos de exportação para o mercado externo. Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDAs) são laboratórios oficiais que fazem parte do MAPA, e tem como função monitorar e realizar a fiscalização de alimentos produzidos no Brasil. Conforme ilustrado pela Figura 1, há seis LFDAs distribuídos pelo 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 avançadas em Belo Horizonte, Andradás 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.

Figura 1: Complexos laboratoriais rede LFDA



Fonte: Ministério da Agricultura e Pecuária¹

Entre estes laboratórios, o LFDA-RS situado em Porto Alegre, é responsável pela região sul do Brasil, a este laboratório está vinculada a Seção Laboratorial Avançada situada em Santa Catarina no município de São José. Os LFDAs são laboratórios de referência, que realizam análises de rotina seguindo os métodos oficiais, participam de ensaios de certificação, desenvolvem e validam novos métodos analíticos.

A Sessão Laboratorial Avançada de São José (SLAV/SC), local onde o estágio foi realizado, é um dos laboratórios de referência para análise de alimentos no estado de Santa Catarina. A 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), respectivamente, identificados pelas siglas IQA/SLAV/SC e RCA/SLAV/SC. Assim, como todos os laboratórios do MAPA, os laboratórios da SLAV/SC são equipados com tecnologia avançada destinada a análise química, são acreditados pelo INMETRO, e atendem os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025, assegurando a confiabilidade, rastreabilidade e imparcialidade dos seus resultados.

Para atender a demanda de análises, a SLAV/SC conta com uma sala para recepção e cadastro de amostras, salas coletivas contendo computadores, incluindo acesso ao sistema LIMS (*Laboratory Information Management System*), salas de preparo de amostras, balanças analíticas para pesagem, depósito de segurança para reagentes, salas de análise laboratoriais e local específico para lavagem de vidrarias junto dos sistemas de purificação de água para o laboratório. Assim, as duas unidades laboratoriais pertencentes a SLAV/SC, recebem amostras de várias regiões do Brasil, entre as principais amostras analisadas estão: produtos lácteos e cárneos, ração animal e pescados.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O SLAV-SC possui a creditação pela ISO/IEC 17025, assim é um requisito que todos integrantes sejam treinados e tenham conhecimento do sistema de qualidade. Neste contexto, todos os funcionários e os estagiários passam por um treinamento teórico e prático, conforme estabelecido pelo Manual da Qualidade do LFDA-RS. Assim, uma das primeiras atividades do estágio foi conhecer a rotina laboratorial do SLAV-SC por meio da leitura dos principais Procedimentos Operacionais Padrão (POP's) e outros documentos que são relativos ao funcionamento do SLAV-SC. Neste documentos, o todos tem acesso aos procedimentos de capacitação pessoal, controle de acesso ao laboratório, formulários de controles de registros (rastreadabilidade 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. Após esse treinamento inicial, foram realizadas atividades envolvendo o acompanhamento das atividades/análise de rotina na SLAV/SC, entre estas: a verificação da calibração das balanças analíticas, determinação de pH em pescado, avaliação de *dripping test* (teste de gotejamento) em aves, avaliação de desglaciamento em pescados congelados, determinação de bases voláteis totais (BVT) em peixes e monitoramento de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves.

Entre as atividades experimentais do estágio, a calibração de balanças analíticas foi uma das atividades realizadas rotineiramente seguindo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 (ISO, 2017). Este procedimento é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados, a checagem da precisão e da exatidão das balanças utilizadas nos laboratórios da SLAV-SC eram realizadas com pesos padrão, estabelecendo limites restritos de variação. As balanças devidamente calibradas são fundamentais para qualidade dos resultados de uma análise química. No caso específico das atividades realizadas durante o estágio, as balanças com a calibração em dia eram fundamentais para o controle de qualidade de produtos como aves e peixes congelados.

Nas aves comercializadas congeladas, se no processo de resfriamento das a água excedente não for removida antes do congelamento, esta será contabilizada

junto com o peso final da ave, aumentando o seu peso real e lesando economicamente o consumidor. Para garantir que a quantidade de água de aves congeladas não extrapola os limites da legislação (6%), é determinado o teor de água congelada na ave por meio do *Dripping Test*. Esta análise, se baseia na determinação gravimétrica da quantidade líquido perdido por degelo em aves congeladas. Basicamente, o procedimento consiste em pesar as carcaças congeladas antes e após o descongelamento completo em banho de água com temperatura e agitação controlada.² Posteriormente, o teor de água é calculado e comparado com a legislação. No caso dos pescados, a conservação dos produtos pode ser realizada por um processo de glaciamento, onde o produto é recoberto com uma fina camada de gelo. Assim, como mencionado para as aves, a quantidade de água congelada que recobre os pescados não deve ser considerada para o peso final do produto. Neste caso, um teste semelhante ao *Dripping Test*, chamado de *desglaciamento*, é realizado. Este, baseia-se na análise gravimétrica onde a fina camada de gelo que recobre o pescado é determinada. Neste processo, o pescado deve ser pesado antes e após a remoção do glaciamento, neste caso, para o descongelamento o produto é submetido a um banho em temperatura ambiente.³ Além destas análises gravimétricas, análises como determinação de pH, *determinação de bases voláteis totais (BVT)* e biotoxinas marinhas em moluscos bivalves foram realizadas.

As medições de pH em amostras de pescado eram realizadas rotineiramente, pois este é um parâmetro importante para determinar a qualidade destes produtos. Pescados com valores de pH superiores a 7,5, não são considerados apropriados para o consumo.⁴ Outro parâmetro importante para avaliar a qualidade de pescados são as *bases voláteis totais (BVT)*, que na SLAV-SC eram realizados por *acidimetria*. A determinação das BVT possibilita uma avaliação do grau de degradação do peixe, pois neste processo são produzidos compostos como amônia, dimetilamina e trimetilamina, conferindo o pescado o odor característico. O frescor dos pescados pode ser medido por meio da determinação das BVT.⁵ Esta análise envolve a extração das BVT com ácido forte, seguidas uma neutralização com hidróxido de sódio e destilação por arraste de vapor, as BVT são coletadas em meio de ácido fraco, e determinadas de titulação.⁶

Dentre as atividades realizadas durante o período de estágio, o monitoramento de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves foi uma das atividades em que estive

mais envolvido. A importância desta análise pode ser evidenciada pelo grande consumo de frutos do mar na região e os riscos à saúde humana proporcionados por esses alimentos quando fora das normas de qualidade. Ainda, esta análise abordará questões relacionadas ao preparo de amostras para análise química, e possibilitou o contato com técnicas analíticas modernas, tal como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas. Assim, a determinação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves será detalhada neste relatório.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MOLUSCOS BIVALVES

Frutos do mar são mundialmente consumidos e geralmente associados a uma alimentação saudável. O Estado de Santa Catarina é um dos grandes produtores de frutos do mar, os moluscos bivalves, por exemplo, representam um alto impacto econômico, pois o estado é líder nacional da produção deste produto.⁷

Nas regiões litorâneas do Brasil, o consumo de frutos do mar é uma prática amplamente explorada, principalmente, devido ao ecossistema aquático rico e disponibilidade destes produtos. Os moluscos bivalves, como ostras e mariscos representam uma grande parcela do consumo total de frutos do mar. Dentre as diversas formas de consumo, as ostras são normalmente consumidas in natura e, neste caso, há um risco para a saúde humana, pois os moluscos realizam sua alimentação através de filtração, podendo ocorrendo a retenção de contaminantes.⁸

Os moluscos bivalves têm o corpo contido em uma concha formada por duas partes iguais, são filtradores, alimentam-se de materiais orgânicos e inorgânicos através de filtração branquial, realizando uma seleção química e por tamanho do material absorvido⁸⁻⁹. Sendo filtradores, os bivalves são dependentes à qualidade de água do seu ambiente, toxinas e poluentes químicos presentes no ambiente ficam retidos em seus tecidos, com isso, torna-se necessário realizar um controle intensivo em termos da concentração de potenciais contaminantes também nas regiões de produção.¹⁰ Moluscos produzidos em áreas livres de poluição, manuseados de maneira adequada e provenientes de áreas onde a água tem sua qualidade monitorada são seguros para consumo humano, além de ser um alimento extremamente saudável. Os moluscos são menos calóricos que a maior parte das

carnes, são importantes fontes de ácidos graxos do tipo ômega-3 e, por isso, contribuem para a prevenção de doenças cardiovasculares¹¹.

A maior preocupação em relação aos moluscos é a possibilidade da ocorrência de biotoxinas marinhas. Estas toxinas podem ser produzidas por algas e bactérias, e quando presente neste ambiente, os moluscos podem acumular essas toxinas nocivas para os humanos.¹²

3.2 BIOTOXINAS MARINHAS

As biotoxinas marinhas são substâncias produzidas, em situações de estresse, por organismos como algas e bactérias, que podem contaminar peixes e moluscos. Essas toxinas podem contaminar os animais marinhos utilizados na alimentação humana, especificamente os moluscos bivalves, que por serem filtradores, concentram essas toxinas em seu organismo. Diversos casos são reportados anualmente nos mais diversos países, tornando necessário a formação de zonas de monitoramento para garantir a segurança dos consumidores. Em 2007 de janeiro, foram reportados mais de 150 casos de intoxicação provocados pela toxina diarreica no estado de Santa Catarina, revelando um risco de intoxicação alimentar pelos mexilhões do litoral.¹³

Quando consumidas através da ingestão de alimentos contaminados, essas toxinas apresentam riscos para a saúde humana¹⁴. Esses organismos levam a intoxicações alimentares que geram uma diversidade de sintomas de intensidade variada, desde náuseas e diarreia até em casos extremos levando a morte.¹⁵ Essas toxinas são classificadas por grupos de acordo com os sintomas que causam pela ingestão, entre elas temos: Biotoxinas paralisantes, azaspirácidos amnésicas, diarreicas e neurotóxicas¹⁴, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Grupos das biotoxinas

(Continua)

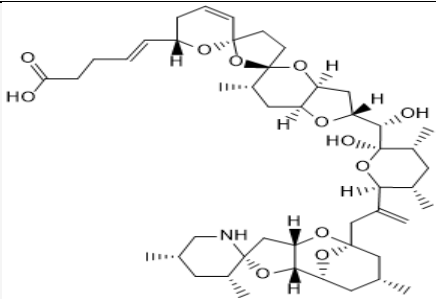
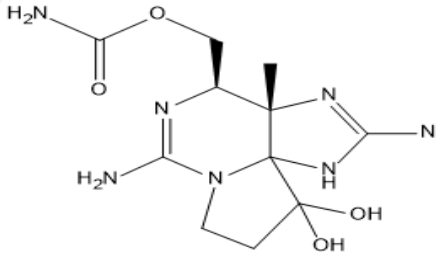
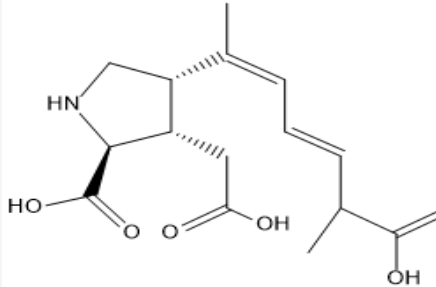
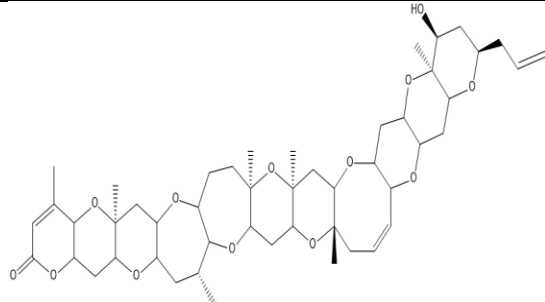
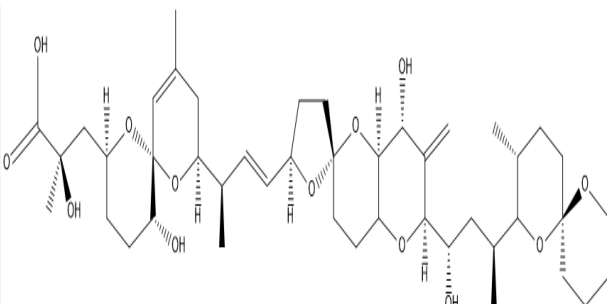
Grupo da Biotoxina	Biotoxina	Estrutura Química	Ação Tóxica	Referência
Azaspíricos	Azaspírico		Causa problemas gastrintestinais, seu nome vem devido que a toxina contém um anel azaspiro pouco comum, da qual deriva o seu nome: azaspírico-1, ou AZA1.	Román et al. 16
Paralisantes	PSP(paralytic shellfish poison)-Saxitoxina		Também conhecida como saxitoxina , Promove a paralisia da musculature torácica causando asfixia .	Schantz et al. 17
Amnésicas	Ácido domóico		Caracterizada por náuseas, vômitos e diarreia, podendo ter casos mais graves como a perda de memória.	Bates et al. 18

Tabela 1: Grupos das biotoxinas

(Conclusão)

Grupo da Biotoxina	Biotoxina	Estrutura Química	Ação Tóxica	Referência
Neurotóxicas	Brevetoxina		Formigamento na boca e nos dedos e dilatação da pupila, mas nenhum caso de fatalidade.	Baden et al. 19
Diarreicas	Ácido ocadáico		Tem efeitos menos graves, sendo apenas problemas intestinais, rara a necessidade de hospitalização dos afetados.	Yasumoto et al. 20

Fonte: Adaptado de Edison.B. 2009.¹⁵

Dependendo da classe e da concentração da biotoxina ingerida, os efeitos no organismo podem apresentar grande riscos à saúde humana, a maioria desses efeitos envolvem sintomas neurológicos ou gastrointestinais. A Saxitoxina que apresenta efeitos letais, tem como limite máximo permitido 0,8 mg/100 gramas de carne de molusco. Neste contexto, análises rápidas e precisas para o controle de qualidade dos moluscos são fundamentais para garantia da qualidade do produto e para saúde humana. ²¹

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE BIOTOXINAS MARINHAS

Para tornar o consumo de moluscos uma atividade mais segura é necessária monitorar continuamente a concentração de biotoxinas nesses alimentos. Para isso há programas de monitoramento de biotoxinas nas regiões de produção e, alguns métodos analíticos são utilizados para a determinação de biotoxinas. ²¹

Os bioensaios são comumente utilizados como referência em nível internacional, mas não possuem especificidade e sensibilidade para diferenciar as diferentes toxinas detectadas. Este método consiste em avaliar a relação da dose administrada e o tempo de morte de camundongos. ²¹.

A análise de nanoporo proteico é uma proposta mais recente devido ao avanço da nano biotecnologia, onde utilizam-se nanoestruturas biológicas como proteínas formadas de poros em membranas, que atuam como biossensores para reconhecer as moléculas presentes no meio. Ao passar moléculas através dos poros, causa uma mudança na corrente elétrica que será detectada, e através disso se identifica moléculas com alta precisão²².

Os imunoensaios enzimáticos também são utilizados para a detecção das biotoxinas. Se baseia na detecção da ligação toxina-anticorpo, através da reação do anticorpo e um substrato que gere um sinal mensurável, na qual a ligação toxina-anticorpo é detectada por uma reação de anticorpo ligado a enzima e um substrato para a enzima que gera um sinal mensurável. A desvantagem deste método é que a reatividade de um anticorpo com diversas toxinas nem sempre é satisfatória. ²³

Dentre esses métodos a cromatografia líquida se destaca, pois, pode ser combinada com variados sistemas de detecção, combinando com um espectrômetro de massas se tem as vantagens da cromatografia (eficiência de separação e alta

seletividade) com as vantagens do espectrômetro (ganho da informação estrutural e aumento da seletividade), apresentando ainda outras diversas vantagens como a rápida resposta, a confiabilidade nos dados e capacidade de analisar matrizes complexas.

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS LC-MS/MS

A cromatografia líquida é um método baseado na separação dos componentes presentes em uma mistura através de suas afinidades com as duas fases, a móvel e a fase estacionária. O solvente, também denominado por fase móvel, carrega os analitos através da coluna, e a separação desses componentes ocorre com base na velocidade de migração dos componentes na fase móvel. Quando as moléculas passam pelo detector que acusa a presença dos analitos, o sinal ali gerado é convertido e plotado como cromatogramas.²⁴⁻²⁵

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas realiza o processo de quando após a separação cromatográfica o fluxo presente na fase móvel é levado ao espectrômetro de massas, onde ocorre a ionização das moléculas presentes, vaporizando o solvente e conferindo carga elétrica as moléculas. Os compostos então passam por um analisador de massas que separará os íons baseando-se pela massa dos analitos.²⁴⁻²⁵

Como matrizes de alimentos apresentam elevada complexidade, é necessário utilizar técnicas analíticas capazes de oferecer a sensibilidade e seletividade adequada para uma determinada análise. A partir disso as técnicas cromatográficas de análise em conjunto da espectrometria de massas, se mostra como uma técnica de separação vantajosa em análises de substâncias complexas, assegurando uma maior exatidão do que quando realizando o procedimento apenas com base na retenção dos compostos.²⁵

3.5 DETERMINAÇÃO DE BIOTOXINAS MARINHAS EM MOLUSCOS BIVALVES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Atualmente na SLAV/SC a determinação das biotoxinas segue o método de Molognoni²⁶, o qual baseia-se na extração sólido-líquido assistida por ultrassom e

utilizando como solvente metanol acidificado. Neste processo, os analitos de uma matriz sólida são facilmente transferidos para uma fase líquida. Para aumentar a frequência analítica, reduzir o consumo de reagentes e produção de resíduos, o método também propõe uma etapa de triagem, onde as amostras são combinadas até 10 alíquotas das amostras para realização de uma análise. Essa alternativa, torna o método atrativo para aplicação em laboratórios de análises e conexo com os conceitos da química verde.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Acompanhar as análises para o monitoramento da concentração de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o preparo de amostras de moluscos bivalves para determinação de biotoxinas marinhas em moluscos bivalves por LC-MS/MS
- Acompanhar e auxiliar na realização das análises de biotoxinas marinhas moluscos bivalves utilizando LC-MS/MS
- Compreender o processamento e tratamento dos dados analíticos das análises de biotoxinas marinhas moluscos bivalves.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E AMOSTRAS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Ácido clorídrico (HCl) e ácido acético (AA) e ácido fórmico (AF), Formiato de amônio e hidróxido de sódio (NaOH) (Sigma Aldrich, EUA) foram utilizados para o preparo das amostras e análises das biotoxinas. Metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) de grau cromatográfico (J.T. Baker, EUA) foram utilizados para as análises cromatográficas. Água ultrapura com resistividade mínima de 18,3 mΩ cm foi utilizada para o preparo de reagentes, soluções e amostras. Os padrões analíticos de biotoxinas marinhas foram fornecidos pelo Laboratório CIFGA S.A. (Lugo, Espanha). As amostras de moluscos eram recebidas congeladas de diversas regiões do litoral de Santa Catarina. Antes do início do preparo dessas amostras, eram colocadas em banho de água até atingir a temperatura adequada para o processamento.

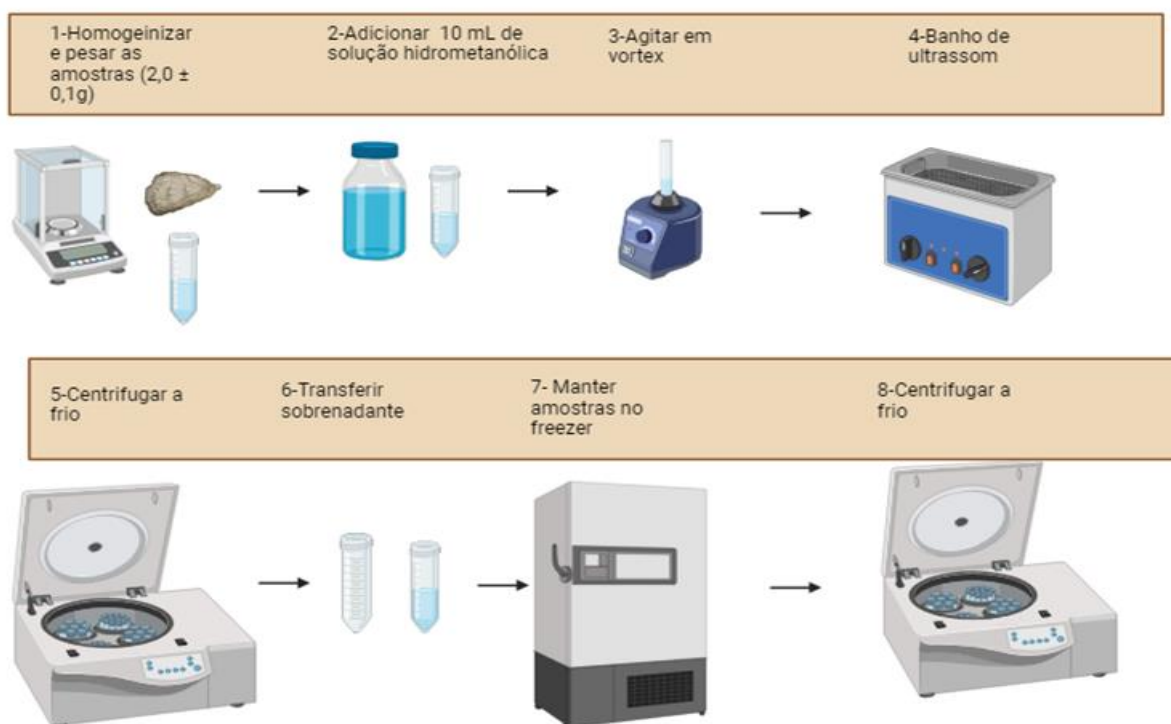
4.2 INSTRUMENTAÇÃO

A determinação de toxinas foi realizada utilizando cromatógrafo líquido modelo 1290 Infinity system from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). A separação cromatográfica foi alcançada ao utiliza uma fase estacionaria de di- isopropil-3-aminopropil silano ligado a sílica hidroxilada (Zorbax 300 Stand Boat- CN, diâmetro interno de 150 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm, 300 Å, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA). A coluna foi mantida a 35 °C, o volume de injeção foi 15 µL, e o celular o fluxo de fase foi de 500 µL min⁻¹. A fase móvel foi composta por solvente A (água com 0,1% de ácido fórmico e 2,5 mmol L⁻¹ de amônio formato) e solvente B (ACN com 0,1% de ácido fórmico e 2,5 mmol formato de amônio L⁻¹). A eluição em modo gradiente, como segue: 95% A (0-2 min), 15% A (2-4 min), 10% A (4-7 min) e 95% A (7-10 min). Um tempo de equilíbrio de 3 min (95% A) foi aplicado entre análises. A análise por espectrometria de massa (MS) foi realizada em um triplo híbrido espectrômetro de massa com armadilha iônica quadrupolo-linear Qtrap 5500 da Sciex (Foster City, CA, EUA). Para extrações de ultrassom se utiliza um banho ultrassônico (Unique USC-1800, 40 kHz, Brasil)

4.3 PROCEDIMENTO

A determinação de biotoxinas marinhas seguiu o método de Molognoni²⁶ em conjunto do método de triagem proposto por Deolindo²⁷. Os mexilhões e ostras após descongelarem, foram abertos e deles retirados a parte cárnea, nesta etapa eram necessários uma alíquota de 100 g, essa amostra foi então homogeneizada com um mixer. Da amostra homogeneizada, uma alíquota de $2,0 \pm 0,1$ g foi diretamente pesada em um tubo de propileno tipo falcon de 50 mL. Para etapa de extração, adicionava-se 10 mL de solução hidrometanólica (90% v/v metanol, 9,9% água ultrapura, 0,1% ácido acético glacial), agitado por 30s em agitador de tubos e mantidos em banho ultrassônico por 20 min. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm na temperatura de 4°C por um tempo de 10 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 5 mL, o tubo então é levado ao freezer -20°C por 60 min, e então novamente centrifuga-se por 10 min a 4000 rpm e temperatura de 4°C, como representado na Figura 2.

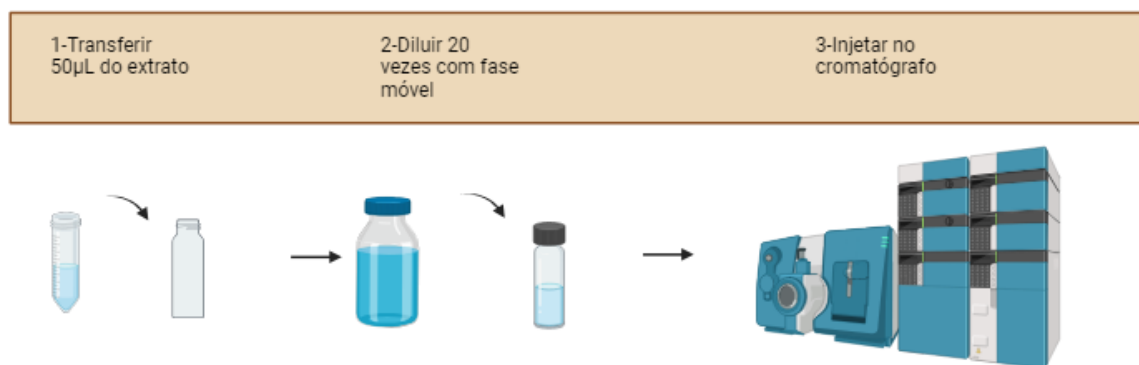
Figura 2 - Representação esquemática do procedimento de extração da biotoxinas em processo assistido por ultrassom



Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante é retirada para realização do processo de triagem, onde repetindo esse processo para outras 9 amostras, reunindo 10 mL de amostras diversas para realizar a análise da triagem. Se realiza então uma re-extração do precipitado repetindo o processo anterior, coletando 2000 μL do sobrenadante para posterior análise dos grupos AZA (Azaspirácido) por HPLC.

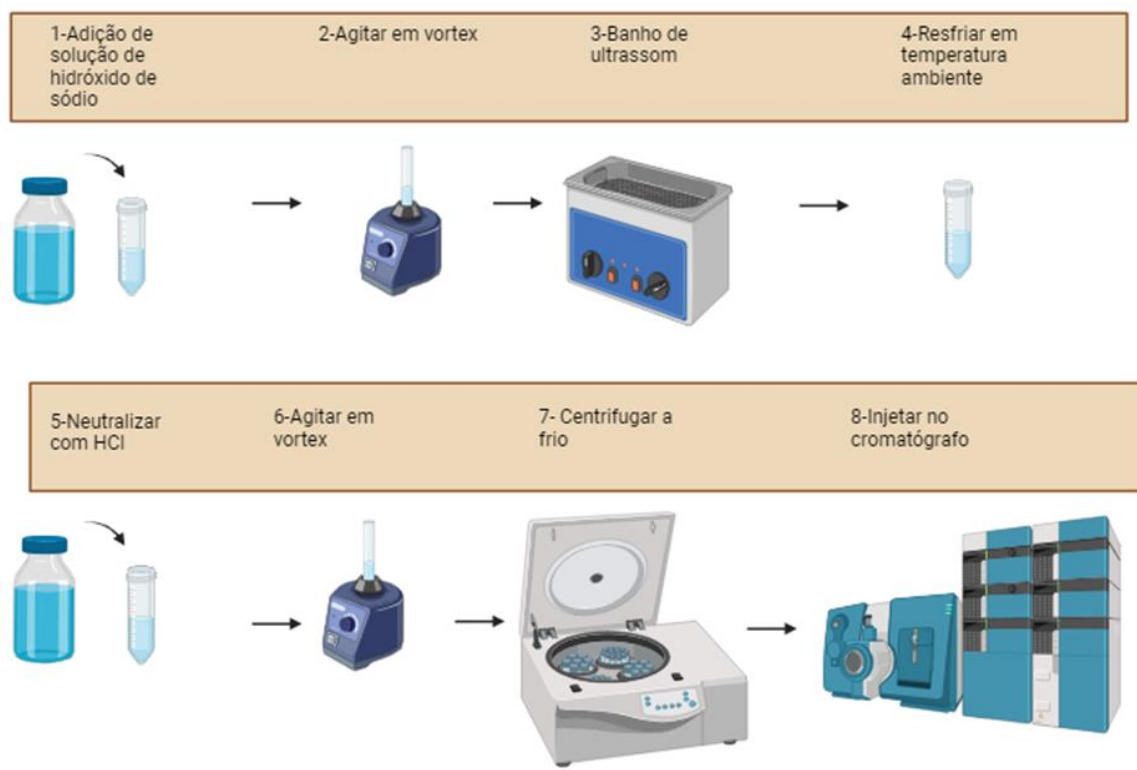
Para realizar a análise do ácido domóico, transfere-se 50 μL do extrato previamente adquirido para um vial, e diluí-se 20 vezes, por meio da adição de 950 μL de fase móvel. A solução resultante é analisada por HPLC (Figura 3).

Figura 3 - Representação da etapa de diluição para análise do ácido domóico.



Para a análise do ácido ocadaico se realiza uma hidrólise, conforme descrita a seguir. Adiciona-se 250 μL de solução de hidróxido de sódio ($2,5 \text{ mol L}^{-1}$) e o tubo foi agitado em agitador de tubos por 30 s e aquecido em banho de ultrassom a aproximadamente 76°C por 40 min. Após esta etapa a amostra é resfriada até a temperatura ambiente, para então a solução ser neutralizada com 250 μL de solução de HCl $2,5 \text{ mol L}^{-1}$, agitada por 30 s e centrifugado novamente para então ser analisada por HPLC. O procedimento está ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Representação da etapa de hidrólise para posterior determinação do ácido ocadaico.



4.4 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO

Durante todo o procedimento foi utilizado equipamentos de proteção individual EPI, como guarda-pó, luvas, calça e sapatos fechados. Os reagentes foram manuseados em capelas com exaustores. Todos os resíduos foram devidamente separados e descartados em seus recipientes apropriados fornecidos pelo laboratório. Todos os descartes foram tratados pelo sistema de gerenciamento de resíduos do SLAV.

5 RESULTADOS

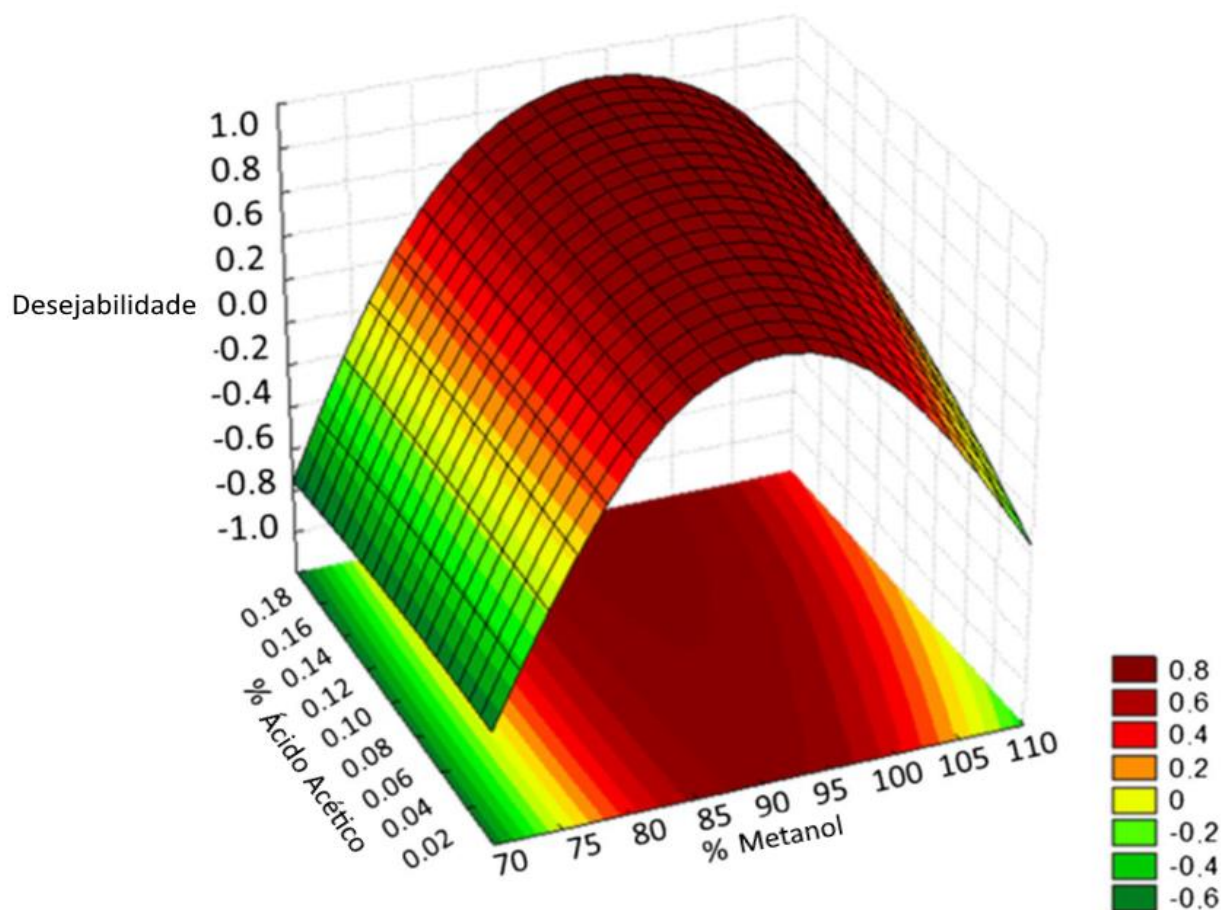
Devido as normas de sigilo aplicadas nos laboratórios da SLAV, os resultados obtidos durante o processo de estágio não puderam ser utilizados nesse relatório, mas foi fornecido um trabalho que serviu de base para o procedimento atualmente utilizado nas análises.²⁶ Desta forma, alguns parâmetros importantes da otimização do método analítico que é atualmente utilizado no laboratório da SLAV serão apresentadas como parte dos resultados deste relatório.

5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

O preparo de amostras assistido por ultrassom aplicado para determinação de biotoxinas marinhas na SLAV foi devidamente otimizado, conforme demonstrado no artigo publicado pelos pesquisadores do SLAV.²⁶ A utilização do ultrassom, possibilitou a redução no tempo de preparo das amostras sem prejuízos a sensibilidade do método análise. Segundo os autores, com uso do ultrassom o tempo de necessário para realização da extração do ácido domóico e iessotoxina (YTX) foi de 10 e 20 min, respectivamente. Esse tempo é significativamente menor que o tempo necessário para extração dos analitos por meio do método tradicional (40 min), utilizando extração com vórtex sem uso de ultrassom. Para um laboratório como o da SLAV, que recebe uma grande quantidade de amostras para análises, a redução do tempo de extração representa um importante aumento na frequência analítica. Além da extração assistida por ultrassom, o tipo de solvente utilizado tem grande influência sobre a eficiência do processo e, por isso, deve ser adequadamente otimizado.

Atualmente o solvente utilizado para extração de biotoxinas na SLAV é composto por uma solução hidrometálica contendo 90% v/v de metanol, acidificada com 0,1% de ácido acético. A utilização deste solvente, também foi definida após otimização da melhor composição. O processo de otimização também é descrito no trabalho de Deolindo et al.²⁷, onde o solvente para extração das biotoxinas foi otimizado utilizando metodologia de superfície de resposta de planejamento composto central. Nesta otimização, a influência da composição adequada do solvente sobre a eficiência de extração dos analitos foi avaliada. A porcentagem de ácido acético e metanol no solvente extrator foi realizada considerando as respostas para extração do ácido domóico, ácido ocadaico e para iessotoxina. A superfície de respostas obtida, considera a função desejabilidade, uma função que combina as respostas dos 3 analitos e facilita a definição da condição de ótima de compromisso a ser utilizada. Na Figura 5 está representada a superfície de respostas obtida por Deolindo et al.²⁷ para otimização da composição do solvente extrator

Figura 5: Superfície de resposta para otimização da composição do solvente para extração de ácido demoico, ácido ocadaído e iessotoxina em processo assistido por ultrassom



Fonte: Adaptado de Deolindo et al.²⁷

Como pode ser observado na superfície de resposta, a função desejabilidade apresenta uma região de máximo, indicando as condições onde há maior efetividade na extração dos analitos. Para a porcentagem de metanol, claramente a concentração de 90% de metanol ofereceu a melhor condição, concentrações menores ou superiores a esta, resultam em uma menor eficiência de extração. Observa-se também que a variação da concentração de ácido acético na mistura não tem influência expressiva sobre a desejabilidade e, conseqüentemente, na extração dos analitos. Desta forma, os autores optaram por considerar a condição experimental utilizada no ponto central do planejamento, que corresponde a solução contendo 90% v/v de metanol e 0,1% v/v de ácido acético, como condição de compromisso para extração dos analitos. Esta mesma condição de extração tem sido utilizada com sucesso para a extração de biotoxinas em análises de rotina do SLAV.

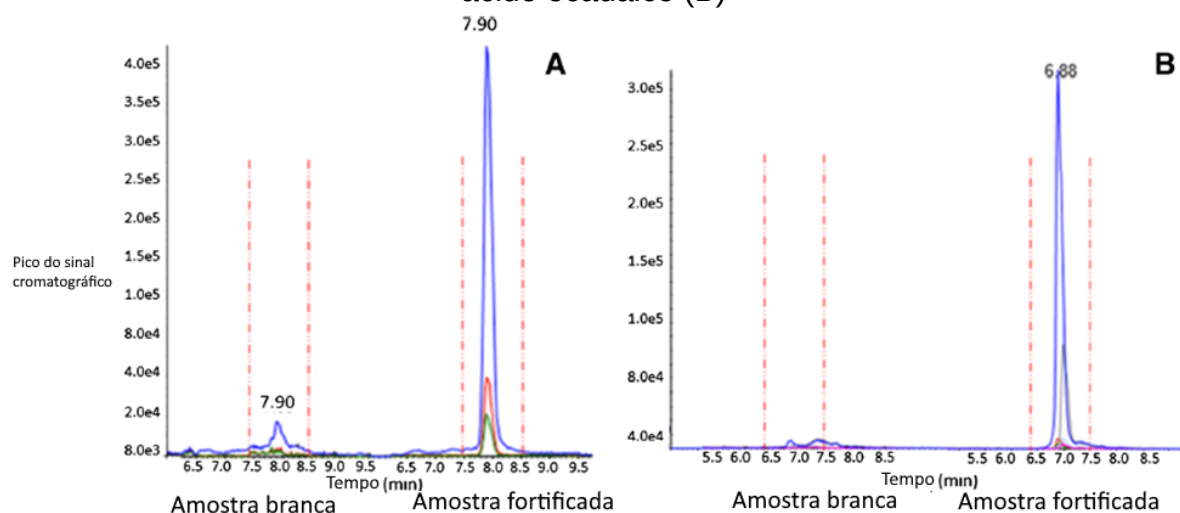
5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A maior limitação na determinação de biotoxinas é a possibilidade de um falso negativo, erro esse que pode atrasar identificação de regiões contaminadas, sendo assim um grande risco para a saúde dos consumidores. Para garantir uma detecção efetiva utilizando o método de triagem adotado pelo SLAV considera os limites de detecção estabelecidos no trabalho de Deolindo et al. ²⁷, sendo estes: 1.92 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para azaspirácido-1 (AZA-1), azaspirácido-2 (AZA-2), azaspirácido-3 (AZA-3), e gimnodimina (GYM); 0,96 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ácido ocadaico(AO), Dinofisistoxina-1 (DTX-1), Dinofisistoxina-2 (DTX-2), e Pectenotoxinas (PTX); e 2,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ácido domóico(DA). Embora a literatura reporte limites inferiores para determinação destes analitos, os limites estabelecidos atendem as necessidades para monitoramento de biotoxinas em moluscos bivalves.

O procedimento de triagem, durante o processo de otimização proposto por Deolindo et al. ²⁷ foi validado por meio de diversas análises para garantir a identificação de possíveis resultados falso positivos ou falso negativos. Segundo os autores, para identificação de possíveis falsos resultados o método apresentou uma eficiência de 100% os todos analitos. Neste procedimento de triagem atualmente adotado pelo laboratório da SLAV, são analisadas em conjunto um total de 10 amostras, caso o resultado seja negativo, todas as amostras do lote são aprovadas, porem em caso de resultado positivo, todas as amostras do lote são analisadas individualmente. Esse processo, na prática, garante um aumento na frequência analítica e reduz os custos com reagentes e minimiza a produção de resíduos.

O procedimento utilizado é confiável e possui boa seletividade, os testes de seletividade demonstrados por Deolindo et al. ²⁷ indicam que há uma boa separação dos analitos e não há interferências nos picos cromatográficos (Figura 6).

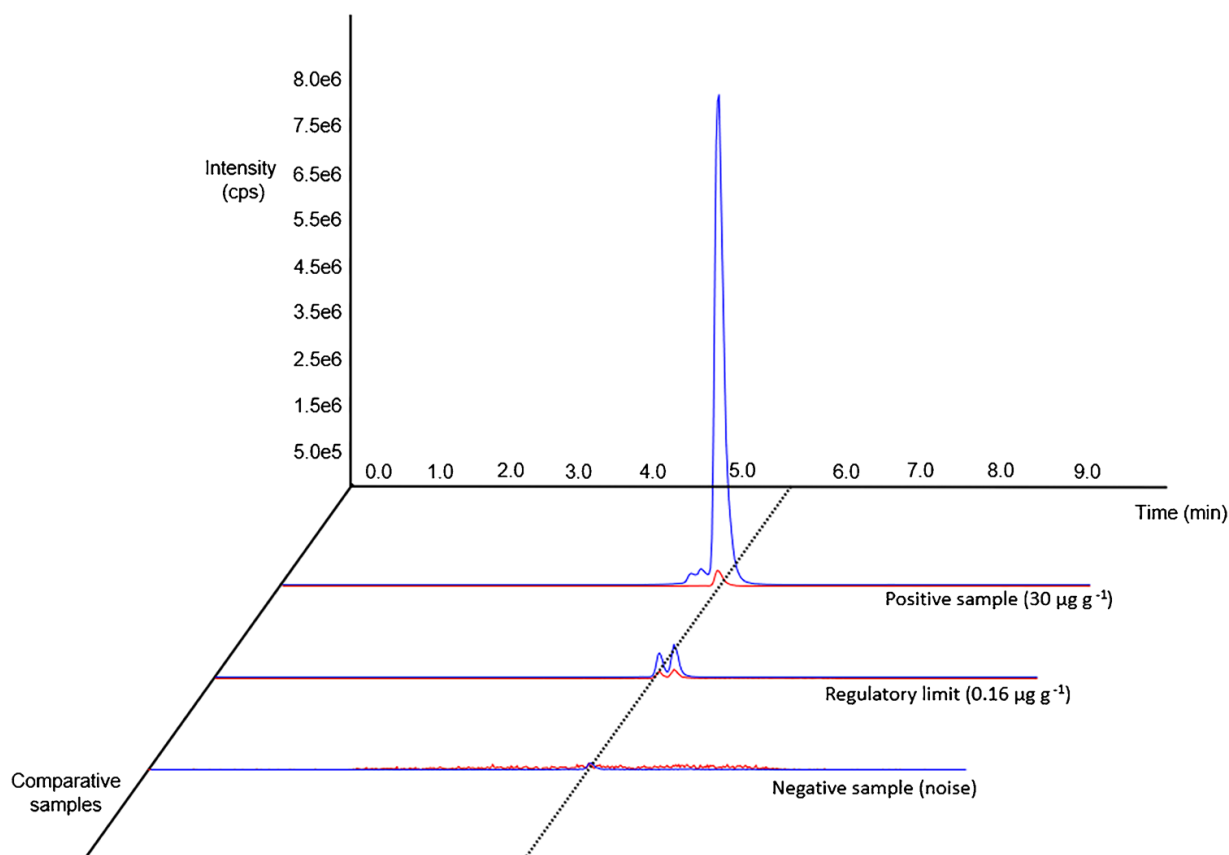
Figura 6: Teste de seletividade em método de triagem para análise de AZA-2 (A) e ácido ocadaico (B)



Fonte: Deolindo et al.²⁷

Na SLAV, este método de triagem utilizando a extração assistida por ultrassom é aplicado para análise de diversas amostras semanalmente. Segundo os autores do artigo que é usado como referência para o método aplicado na SLAV ²⁶, durante o período de 2020-2022, detectou-se em áreas de cultivo de ostras, elevadas concentrações de ácido ocadaico. Destas amostras, aproximadamente 25% das apresentaram concentração acima do limite para essa biotoxina, em concentrações de até $30 \mu\text{g g}^{-1}$. Esses resultados positivos podem ser facilmente identificáveis pelo método proposto, conforme ilustrado nos cromatogramas da Figura 7.

Figura 7: Cromatograma de uma amostra de rotina positiva para ácido ocadaico ($30 \mu\text{g.g}^{-1}$), uma amostra próxima do limite regulatório ($0.16 \mu\text{g.g}^{-1}$) e um branco da amostra.



Fonte: Deolindo et al.²⁷

Desta forma, a utilização do banho de ultrassom no processo de extração de biotoxinas adotado pela SLAV claramente oferece uma vantagem para a preparação de amostras, pois reduz significativamente o tempo requerido para a extração. Na rotina do laboratório, a implementação deste método combinando o processo de extração assistido por ultrassom e a etapa de triagem para análises das amostras, proporcionou um aumento da eficiência de todo processo analítico. Como consequência, reduzindo em aproximadamente 80% o tempo total de análise.

6. CONCLUSÕES

Como o consumo de frutos do mar é comum por diversas regiões, sua contaminação com biotoxinas resulta em severas consequências para os consumidores, sendo necessário um controle efetivo e rápido para garantia da segurança dos consumidores.

A utilização do método de triagem em conjunto do banho de ultrassom proporcionou um preparo de amostra mais rápido sem redução da eficiência e da qualidade. Essa combinação da triagem com a extração em banho ultrassônico, um equipamento simples e de baixo custo, melhorou a eficiência do processo, aumentou a frequência analítica e reduz o consumo de reagentes e geração de resíduos, estando assim, conexo com os conceitos da química verde.

Apesar da utilização de novas técnicas auxiliarem o procedimento de análise de biotoxinas, ainda há necessidade de mais aperfeiçoamento para melhorar a segurança alimentar. Unificar os processos de análise de contaminantes a um monitoramento unificado das regiões de produção é essencial para reduzir os casos de infecção, reduzindo os impactos das biotoxinas para a saúde humana.

7. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO

Este trabalho teve como proposta, relatar a vivência da rotina de um laboratório acreditado. Sendo assim, foi enriquecedor e gratificante estagiar neste órgão importante, que realiza análises oficiais no quesito de monitoramento e fiscalização de alimentos.

Por muitas vezes diversos fundamentos e conhecimentos adquiridos no decorrer do curso não são claramente compreendidos quanto sua aplicação, porém, durante o estágio, foi possível correlacionar os conhecimentos adquiridos do Curso de Química com a rotina de um laboratório de análises. Colocando em perspectiva a preparação para mercado de trabalho, o estágio supervisionado obrigatório é uma experiência fundamental neste processo para o crescimento profissional. Além das qualificações obtidas na SLAV-SC, foi importante a experiência da relação com os colaboradores, que permite uma troca de conhecimentos e vivências.

Ao final, o estágio forneceu um contato com a química diferente do praticado no ambiente acadêmico, mostrando sua necessidade para a sociedade e sua importância profissional proporcionou o contato com a química para além do ambiente acadêmico, demonstrando quão necessária ela é para o desenvolvimento da sociedade e de grande valor para o currículo.

8. REFERENCIAS

1. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E AGROPECUÁRIA-UNIDADES.2022.Disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfd/quem-somos/unidades>. Acesso em: 16 Out. 2023.
2. FRIES, G. Avaliação da perda de água em carcaças de frango por *dripping test* em um frigorífico do vale do taquari. 2017. Artigo apresentado na disciplina de Estágio Supervisionado, na linha de formação específica em Técnico em Química, da Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do título de Técnico em Química. Lajeado, 2017.
3. ARGENTA, Fernando F. Tecnologia de pescado: características e processamento da matéria-prima. 2012. 61 f. Monografia (Especialização em produção, tecnologia e higiene de alimentos de origem animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
4. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. Brasília. MAPA. 2017.
5. OGAWA, M.; MAIA, E. I.; Ciência e tecnologia do pescado. Manual de pesca. São Paulo. Editora Varela. v. 1, p. 430, 1999.
6. JORNAL OFICIAL DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Determinação da concentração de azoto básico volátil total (ABVT) no peixe e em 28 produtos a base de peixe: método de referência (Anexo II). nº 97/85, 1995.
7. RUPP, G. S. Introdução à Biologia de Ostras. In: FERREIRA, J. F. et al. Cultivo de ostras. Laboratório de Cultivo de Moluscos Bivalves Marinhos, 1999. p. 15 – 24.)
8. PEREIRA, M. A.; NUNES, M. M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis - Brazil. Brazilian Journal Microbiology, vol.37, no.2, 2006. p.159-163.
9. FURLAN, E.F. Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. 2004; 106 f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de /agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, SP).
10. TURECK, C. R.; OLIVEIRA, T.N. Sustentabilidade ambiental e maricultura. Revista Saúde e Meio Ambiente, Joinville, v.4, n.2, p 22- 26, 2003
11. EMPRESA PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA - EPAGRI. Síntese informativa da maricultura 2017. Disponível em:

https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_epagri/Cedap/Estatistica-Sintese/Sintese-informativa-da-maricultura-2017.pdf Florianópolis, 2009. Acesso em 11/10/23.

12. VALE, P. Biotoxinas marinhas-Marine biotoxins. *Revista Portuguesa de Medicina Veterinária*, v. 99, n. 549, p. 03-18, 2004
13. PROENÇA, L.A.O. & SCHRAMM, MATHIAS & TAMANAHA, MÁRCIO & PEREIRA ALVES, THIAGO. (2007). Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. *Harmful Algal News*. 33. 19-20.
14. HESS, P.; Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and qualification of marine biotoxins in end-product and officioal control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, p. 1683-1694, 2010.
15. BARBIERI, E. O perigo das biotoxinas marinhas. São Paulo: Instituto de Pesca, 2009
16. ROMÁN, Y., ALFONSO, A., LOUZAO, M.C., DE LA ROSA, L., LEIRA, F., VIEITES, J.M., VIEYTES, M.R., OFUJI, K., SATAKE, M., YASUMOTO, T. E BOTANA, L.M. (2002). Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets. *Cell. Signalling*, 14, 703-716
17. SCHANTZ, E.J. (1984). Historical perspective on paralytic shellfish poison. In: *Seafood Toxins* American Chemical Society, Washington, DC, pp. 99-111.
18. BATES, S.S., BIRD, C.J., DE FREITAS, A.S.W., FOXALL, R., GILGAN, M., HANIC, L.A., JOHNSON, G.R., MCCULLOCH, A.W., ODENSE, P., POCKLINGTON, R., QUILLIAM, M.A., SIM, P.G., SMITH, J.C., SUBBA RAO, D.V., TODD, E.C.D., WALTER, J.A. E WRIGHT, 28 J.L.C. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46, 1203-1215
19. BADEN, D.G., FLEMING, L.E. E BEAN, J.A. (1995a). Marine toxins. In: *Handbook of clinical neurology*, Vol. 21 – Intoxications of the nervous system, Part III. Editor: F.A. Wolf. Elsevier Science (B.V.), pp. 141-174.
20. YASUMOTO, T., OSHIMA, Y. E YAMAGUCHI, M. (1978) Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 44 (11), 1249-1255.

21. OLIVEIRA, G. M. de et al. Presença de dinoflagelados bentônicos potencialmente tóxicos: identificação do perigo em áreas destinadas à maricultura na Baía de Sepetiba, RJ. 2009.
22. AGUIAR, J. P. et al. Stochastic biosensing by a single proteic nanopore in the development of analytical tools. *Química Nova*, v. 38, p. 817-827, 2015.
23. PÉREZ RODRÍGUEZ, LAURA MARÍA. Desarrollo de métodos bioquímicos para la detección de ficotoxinas.
24. DE GIROLAMO A, LIPPOLIS V, PASCALE M. Overview of Recent Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Methods for Natural Toxins Detection in Food Products. *Toxins (Basel)*. 2022 May 4;14(5):328. doi: 10.3390/toxins14050328. PMID: 35622576; PMCID: PMC9143482.
25. TOLENTINO JÚNIOR, D. S. .; SANTOS, S. N.; MARQUES, A. B. de S.; FARIAS, K. P.; SOUZA, A. B.; LIMA, G. N.; RODRIGUES, J. L. Review on liquid chromatography coupled with mass spectrometry applied to food toxicological analysis. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. e47910515419, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i5.15419.
26. MOLOGNONI, L.; DOS SANTOS, J. N.; KLEEMANN, C.; COSTA, A. C. O.; HOFF, R. B.; DAGUER, H.; Cost-Effective and High-Reliability Analytical Approach for Multitoxin Screening in Bivalve Mollusks by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* v. 67, p. 2691–2699, 2019.
27. DEOLINDO CTP, KLEEMANN CR, BOSCH-OREA C, MOLOGNONI L, DAGUER H, HOFF RB, COSTA ACO. Sample pooling and incurred samples improve analytical throughput and quality control of lipophilic phycotoxins screening in bivalve mollusks. *Anal Bioanal Chem.* 2023 Aug;415(20):5023-5034. doi: 10.1007/s00216-023-04788-3. Epub 2023 Jun 22. PMID: 37349647.

ANEXO 1

DECLARAÇÃO DE CARGA HORÁRIA DE ESTÁGIO

Declaramos que o estudante **Carlos Augusto Vieira** portador do RG nº. 5.310.307, regularmente matriculado no Curso de Química na UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas (CFM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) realizou **450** horas de Estágio **OBRIGATÓRIO** referente a disciplina **Estágio Supervisionado (QMC 5515)** na **Seção Laboratorial Avançada (SLAV/SC)**, no período de 22/05/2023 a 06/09/2023, supervisionado pelo auditor fiscal federal agropecuário Rodrigo Barcellos Hoff, CRF/SC 7005, referente ao semestre 2023.2.

LFDA/SLAV-SC

São José, 16 de novembro de 2023



Documento assinado digitalmente
RODRIGO BARCELLOS HOFF
Data: 16/11/2023 13:44:58-0300
CPF: ***.882.730-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Rodrigo Barcellos Hoff