



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013  
Chave de Correção da Prova Prática

Cargo:  
E-29 - Médico Veterinário - Análise de resíduos em alimentos

QUESTÃO 1:

Tetraciclina são antibióticos usados na medicina veterinária para o controle de doenças, porém o uso inadequado dessas substâncias pode resultar na presença de resíduos em tecidos animais destinados ao consumo humano. Devido à preocupação com a qualidade dos alimentos, a ANVISA, em 2003, estabeleceu o Limite Máximo de Resíduo (LMR) de 100 ng/g para as tetraciclina. O método a seguir foi desenvolvido e validado para análise dessas substâncias utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, utilizando ionização *electrospray* (CL-EM/EM).

Preparo da amostra

Foram preparadas soluções estoque dos padrões de tetraciclina com concentração final de 1,0 mg/mL (cada solução) e soluções de trabalho a partir das soluções estoque:

1,0 g de amostra (músculo de frango) homogeneizada foi transferida para tubo de centrífuga, fortificada com solução de trabalho e adicionado padrão interno. Após mistura e repouso por 30 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 4,0 mL de solução tampão. Após mistura vigorosa e centrifugação, o sobrenadante foi separado. Essa etapa foi realizada duas vezes e os sobrenadantes combinados. Foram adicionados 4mL de n-pentano, misturado vigorosamente, centrifugado e a fase aquosa foi separada, a qual foi transferida para um cartucho de extração em fase sólida (EFS) com sorbente C18 (previamente condicionado) e realizado o procedimento. Para a eluição dos analitos, foi utilizada uma solução mistura de acetato de etila e metanol. Após a extração, o solvente foi removido sob fluxo de nitrogênio utilizando um banho a 40°C. O resíduo foi ressuspensionado em 100 µL de fase móvel e 10 µL dessa solução final foram injetados no equipamento CL-EM/EM o qual estava com uma coluna cromatográfica C18 (100 x 2,0 mm e 5 µm de diâmetro interno).

As condições utilizadas no sistema foram:

Espectrômetro de massas: agulha 5000 V, *shield* 600 V, *housing* 50°C, voltagem do capilar 50 V e voltagem do detector 1500 V. Nitrogênio ultra-puro foi utilizado como gás nebulizador e gás secante a 19 psi e 360°C. Argônio ultra-puro foi utilizado como gás de colisão a 2,0 mTorr. Foi operado em modo de monitoramento seletivo de reação.

Cromatógrafo: Foi utilizado modo gradiente de eluição onde o solvente A foi água ultra-pura (Milli-Q) e B acetonitrila (ambos com 0,1 % de ácido fórmico) e fluxo de 0,3 mL/min.

Dentre os resultados obtidos, tem-se a média da recuperação (%) descrita na tabela a seguir:

Nível (ng/g)	TC	CTC	DC	OTC
50	95,47	94,81	99,51	93,53
100	101,36	89,38	92,92	90,48
150	106,27	99,23	102,99	95,05

Onde:

TC = tetraciclina

CTC = clorotetraciclina

DC = doxiciclina

OTC = oxitetraciclina



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013**  
**Chave de Correção da Prova Prática**

**Pergunta-se:**

**Item A) A fortificação da amostra poderia ter sido realizada utilizando as soluções estoque? Justifique.**

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Não. As soluções estoques estão muito concentradas. Para a fortificação das amostras nos níveis que devem ser utilizados na validação (próximos ao valor de LMR), teria que adicionar os volumes muito pequenos e que não podem ser medidos com as pipetas usuais disponíveis em laboratórios de análise de resíduos (pipetas automáticas). Para a fortificação no nível do LMR (100 ng/g), seria necessário retirar uma alíquota de 0,10 µL da solução estoque, o que não é possível.	10

**Item B) Qual a finalidade do solvente n-pentano utilizado durante o preparo da amostra?**

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
N-pentano é um hidrocarboneto utilizado para retirar a gordura da amostra, a qual é prejudicial ao procedimento de extração em fase sólida.	10

**Item C) Qual a finalidade do gás secante?**

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
O gás secante é utilizado para remover a fase móvel após a saída do cromatógrafo, promovendo a mudança de um sistema de alta pressão (gerado pelo cromatógrafo líquido) para a pressão atmosférica (pressão requerida pelo sistema de ionização eletrospray).	10

**Item D) Era realmente necessário utilizar o gás de colisão?**

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Sim, pois se a validação foi realizada com o espectrômetro no modo monitoramento seletivo de reação, deve-se selecionar íons característicos dos analitos (no 1º quadrupolo), fragmentá-los (no 2º quadrupolo) e analisar os íons fragmentos característicos selecionados (no 3º quadrupolo).	10



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013**  
**Chave de Correção da Prova Prática**

Item E) Foi adequada a escolha dos níveis para o critério de validação, recuperação? Justifique sua resposta.

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Sim. Para o estudo de recuperação a Decisão da União Europeia 2002/657/EC solicita a realização nos níveis 0,5 x LMR, 1 x LMR e 1,5 x LMR, que no caso em questão, são 40, 100 e 150 ng/g.	10

Item F) Os resultados obtidos para a recuperação estão aceitáveis? Justifique sua resposta.

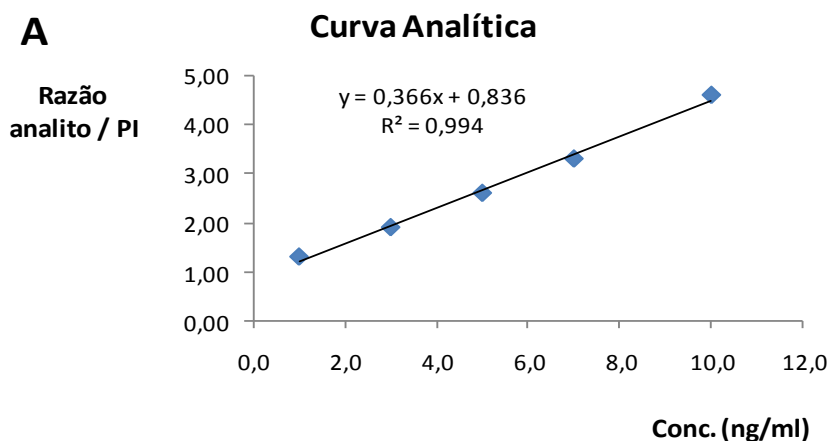
Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Sim. De acordo com a Decisão da União Europeia 2002/657/EC, o critério de aceitação para a Recuperação é de 80 – 110%.	10

**QUESTÃO 2:**

Um agente dopante hipotético "X" é o principal alvo analítico para quantificação quando presente na análise das urinas dos atletas. Tal análise é realizada através da CL-EM-EM, com uma coluna C18 de 1,8 $\mu$ m X 2,1 mm X 50 mm. Para determinar, quantitativamente, a concentração de "X" na urina do atleta, o primeiro passo é a construção de uma curva analítica de "X", com utilização de padrão interno deuterado ("X-D<sub>3</sub>"). A amostra foi preparada em triplicata. A área do analito "X" na amostra e a área do PI ("X-D<sub>3</sub>") encontram-se na tabela abaixo.

Replicatas	Analito (área)	Padrão interno (área)
Replicata 1	16764	12693
Replicata 2	16015	11948
Replicata 3	16128	12277

As curvas analíticas obtidas são apresentadas a seguir:

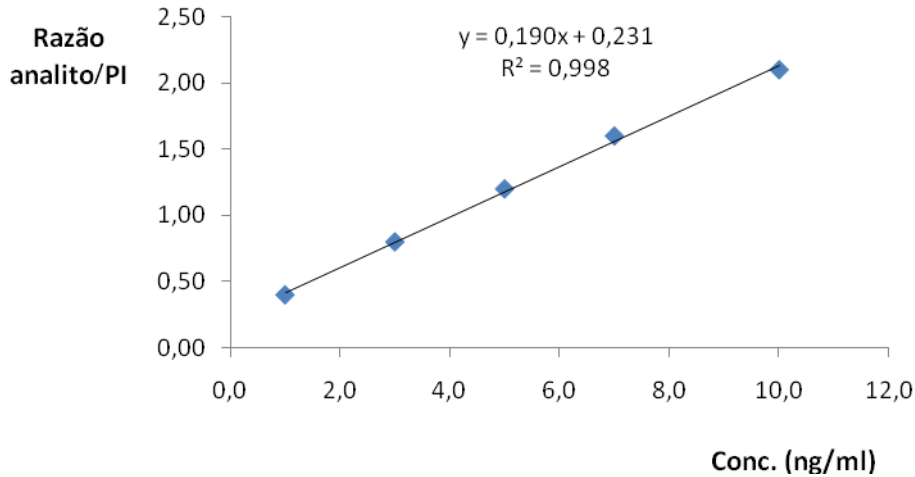




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013  
Chave de Correção da Prova Prática

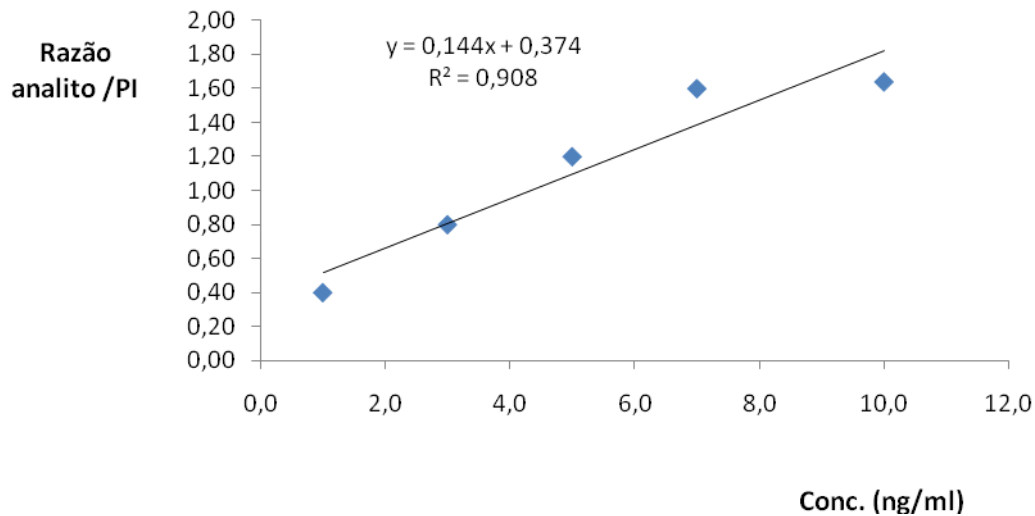
**B**

**Curva Analítica**



**C**

**Curva Analítica**



De acordo com o exposto, responda:

Item A) Qual dos três gráficos apresentados é o mais adequado para proceder com a quantificação? Explique sua resposta. Qual a concentração em ng/mL do analito "X" na urina?

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Gráfico B. Os valores de razão área analito sobre área do padrão interno estão no centro do gráfico. 5,75 ng/mL.	8



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013**  
**Chave de Correção da Prova Prática**

**Item B) É possível utilizar qualquer um dos três gráficos para proceder com a quantificação? Explique detalhadamente sua resposta.**

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Não. Faixa linear de trabalho. Valores da razão analito sobre padrão interno no centro do gráfico.	8

**Item C) Um analista trabalha com uma fase móvel contendo uma mistura de tampão fosfato de sódio monobásico monohidratado e metanol. Quais são os cuidados necessários no preparo de 1 L de fase móvel contendo uma mistura de tampão fosfato de sódio monobásico monohidratado  $0,10\text{mol.L}^{-1}$  e metanol na proporção (60:40)? Descreva detalhadamente a preparação desta fase.**

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Descrição da preparação: - utilizar metanol grau HPLC; - utilizar água Tipo I com valor de condutividade inferior a 20 ohms; - utilizar frasco de borossilicato (geralmente 1L) com tampa específica para armazenar a FM; - pesar em balança analítica, a massa de 8,28 g de fosfato de sódio (deve ter pureza mínima de 90%); - transferir quantitativamente para um Bécher e adicionar água Tipo I; - transferir o conteúdo para uma proveta com volume total de 1000 mL; - lavar o Bécher várias vezes com água Tipo I e seguir transferindo a solução para um cilindro até a lavagem total do Bécher, sempre com volume total inferior a 600 mL; - completar o volume de 600 mL com água Tipo I; - filtrar a solução em equipamento de filtração contendo: kitassato, copo de filtração e garra. Usar filtro para solução aquosa, de nylon ou teflon (0,22 ou 0,45 $\mu\text{m}$ ). - filtrar separadamente o metanol grau HPLC, com o mesmo procedimento utilizando filtro para solventes orgânicos, celulose ou teflon (0,22 ou 0,45 $\mu\text{m}$ ). - ou filtrar a mistura Tampão:MeOH com o mesmo procedimento utilizando filtro para solução aquosa, de teflon (0,22 ou 0,45 $\mu\text{m}$ ). - transferir o conteúdo para um cilindro com volume total de 500mL, até completar o volume de 400mL; - transferir os 400mL de MeOH para o cilindro de 1000mL contendo a solução tampão e homogeneizar em cilindro fechado; - abrir o cilindro para aliviar a pressão; - observa-se leve aquecimento da solução em função da mistura exotérmica; - transferir a solução para frasco de fase móvel de 1L; - levar a mistura de fase móvel para o ultrassom por cerca de 15 minutos, com a tampa aberta. Respeitar o nível de água do ultrassom e a temperatura de trabalho. Levar o frasco de fase móvel para o reservatório de fase móvel, no sistema CLAE e conectar adequadamente; - levar a mistura de fase móvel para o reservatório de fase móvel acoplado a degaseificador "on line" no sistema CLAE (com linha de Hélio) e conectar adequadamente.	8



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013**  
**Chave de Correção da Prova Prática**

**Item D) Quais são os cuidados necessários com o equipamento cromatográfico quando se utiliza fase móvel contendo a mistura de tampão fosfato 10mM e metanol na proporção (40:60)?**

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Passar água do tipo I, no sistema todo após a utilização da FM.	8

**Item E) Como deve ser realizada a preparação de uma fase móvel metanol / água (30:70)? Quais os materiais de laboratório seriam utilizados? Justifique sua resposta.**

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
<ul style="list-style-type: none"><li>- 2 provetas graduadas de 1000 mL.</li><li>- Kitassato.</li><li>- copo de filtração.</li><li>- garra. X pontos</li><li>- bomba de vácuo.</li><li>- membrana filtrante.</li><li>- cilindro de 1000mL.</li></ul> <p>Filtrar a água (700 mL) e o metanol (300 mL), com filtros de 0,22 ou 0,45 um, transferir o metanol para o cilindro contendo água, aliviar a pressão do cilindro, um leve aquecimento será observado (mistura exotérmica). Transferir a mistura para um frasco de vidro borossilicato de 1 L, levar ao ultrassom por cerca de 15 min e conectá-lo ao sistema CLAE.</p>	8