



INSTITUTO FEDERAL
SANTA CATARINA

Instituto Federal de Santa Catarina
Câmpus Florianópolis
Curso Integrado Técnico em Química
Disciplina de Análise Instrumental II
Estagiário: Heitor Daguer
Supervisor: Prof. Marcel Piovezan

ROTEIRO EXPERIMENTAL – Análise de sorbato em produtos cárneos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

O objetivo deste roteiro é dar continuidade aos experimentos executados pelos alunos na semana anterior, apresentando a técnica cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para análise de sorbato em produtos cárneos. Para isso, serão utilizadas as amostras de hambúrguer preparadas anteriormente pelos alunos e amostras comerciais de produtos cárneos (adquiridas pelo professor), com o objetivo de que os alunos aprofundem seus conhecimentos sobre análise instrumental.

Ao final desse experimento, os alunos deverão ser capazes de preparar amostras de produtos cárneos para análise de sorbato; preparar curvas de calibração; demonstrar a garantia da qualidade dos resultados analíticos obtidos no experimento; identificar a importância da utilização de padronização interna em análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; compreender a cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas como uma possibilidade de análise instrumental para análise de sorbato em produtos cárneos.

1. Material

- Balões volumétricos de 10 mL;
- Coluna SB-CN (Zorbax-Agilent), 5 μm , 300 Å, 150 x 4,6 mm, ou similar;
- Dispensador automático de 50 mL;
- Micropipetadores e ponteiras para volumes de 2-20; 10-100; 100-1000 e 1000-5000 μL ;
- Microtubos de polipropileno, com capacidade para 1,5 mL;
- Proveta de 250 e 500 mL;
- Tubos de polipropileno, com capacidade para 15 e 50 mL (tipo Falcon);
- Vials para HPLC de borossilicato com capacidade de 1,5 mL.

2. Equipamentos

- Agitador de tubos tipo vórtex;
- Agitador orbital;
- Balança analítica;
- Banho de ultrassom;
- Centrífuga refrigerada para tubos de 50 mL;
- Centrífuga refrigerada para microtubos;
- Homogeneizador do tipo *Ultra Turrax*;
- Sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS/MS).

3. Soluções

- Acetonitrila (ACN) grau HPLC;
- Metanol (MeOH) grau HPLC;
- Solução de extração ACN: MeOH: água (45:45:10) acidificado com 0,1% ácido acético;
- Fase móvel A (solução de ácido fórmico 0,1%);

- Fase móvel B (solução de ACN acidificada com 0,1% de ácido fórmico);
- Fase móvel de diluição (fase móvel A: fase móvel B 90:10);
- Soluções-estoque de 1000 mg L⁻¹ e 10.000 mg L⁻¹;
- Solução de fortificação do padrão interno (3,5-DNB, 10 mg L⁻¹);
- Solução de fortificação (sorbato).

4. Procedimentos experimentais

Grupo 1 – Preparo das amostras de hambúrguer

- Homogeneizar e processar as amostras em processador e pesar 2,0 ± 0,1 g de amostra em tubo tipo "falcon" de 50 mL;
- Fortificar as amostras com 200 µL do mix de padrão interno.
- Adicionar 10 mL de solução de extração aos tubos com amostra.
- Homogeneizar o conteúdo de cada tubo por volta de cinco segundos no *Ultra Turrax*.
- Agitar em mesa agitadora orbital durante 20 minutos.
- Centrifugar por dez minutos à rotação de 4000 rpm, à temperatura de 4°C.
- Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade e levar ao freezer (à temperatura de cerca de -18°C) por no mínimo uma hora.
- Centrifugar novamente por dez minutos à rotação de 4000 rpm, à temperatura de 4°C.
- Transferir 50 µL do sobrenadante do extrato para vials e completar com 950 µL de fase móvel de diluição (90A:10B). Homogeneizar e injetar no sistema LC-ESI-MS/MS.

Grupo 2 – Preparo das amostras de produtos comerciais

- Homogeneizar e processar as amostras em processador e pesar 2,0 ± 0,1 g de amostra em tubo tipo "falcon" de 50 mL;
- Fortificar as amostras com 200 µL do mix de padrão interno.
- Adicionar 10 mL de solução de extração aos tubos com amostra.
- Homogeneizar o conteúdo de cada tubo por volta de cinco segundos no *Ultra Turrax*.
- Agitar em mesa agitadora orbital durante 20 minutos.
- Centrifugar por dez minutos à rotação de 4000 rpm, à temperatura de 4°C.
- Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade e levar ao freezer (à temperatura de cerca de -18°C) por no mínimo uma hora.
- Centrifugar novamente por dez minutos à rotação de 4000 rpm, à temperatura de 4°C.
- Transferir 50 µL do sobrenadante do extrato para vials e completar com 950 µL de fase móvel de diluição (90A:10B). Homogeneizar e injetar no sistema LC-ESI-MS/MS.

Grupo 3 – Preparo de curva de calibração em matriz

As curvas de calibração são preparadas em matriz, pesando-se 2,0 ± 0,1 g de amostra “branca” para cada ponto. As concentrações de cada ponto da curva são apresentadas na tabela 1. Preparar as curvas de calibração através da fortificação de matriz branca (Tabela 1). Prosseguir com a extração da seguinte forma:

- Homogeneizar o conteúdo de cada tubo por volta de cinco segundos no *Ultra Turrax*.
- Agitar em mesa agitadora orbital durante 20 minutos.
- Centrifugar por dez minutos à rotação de 4000 rpm, à temperatura de 4°C.
- Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade e levar ao freezer (à temperatura de cerca de -18°C) por no mínimo uma hora.
- Centrifugar novamente por dez minutos à rotação de 4000 rpm, à temperatura de 4°C.
- Transferir 50 µL do sobrenadante do extrato para vials e completar com 950 µL de fase móvel de diluição (90A:10B). Homogeneizar e injetar no sistema LC-ESI-MS/MS.

Tabela 1. Volumes de soluções-padrão e concentrações para a elaboração da curva de calibração em matriz.

Ponto	Concentração (mg kg ⁻¹)	Vol. solução- padrão de sorbato (µL)	Vol. solução padrão interno (µL)	Vol. fase móvel de diluição (mL)
Branco	-	-	-	10,00
C0	-	-	200	9,80
C1	2,5	50	200	9,70
C2	5,0	100	200	9,60
C3	10,0	200	200	9,40
C4	15,0	300	200	9,20
C5	20,0	400	200	9,00

A concentração do padrão interno ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5-DNB) é de 10 mg kg⁻¹.

Grupo 4 – Amostras-controle

As amostras controle devem ser preparadas utilizando duas amostras brancas que serão fortificadas de acordo com o ponto C3 da tabela 1 (acima) e seguir o procedimento de extração de acordo com as instruções fornecidas para o grupo 3. Fortificar também as amostras de hambúrguer, seguindo o mesmo procedimento.

5. Análise instrumental

As amostras são analisadas em sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) sob as condições especificadas nas tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2. Condições instrumentais para determinação de ácido sórbico em produtos cárneos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Sistema LC-MS/MS	Bomba 1290 Infinity (Agilent) acoplada ao espectrômetro 5500 QTRAP (Sciex)
Coluna	Coluna SB-CN, Zorbax (Agilent), 5 µm, 300Å, 150 x 4,6 mm, ou similar
Temperatura da coluna	40°C
Fluxo	0,5 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL

Tabela 3. Gradiente de eluição para determinação de ácido sórbico em produtos cárneos por LC-MS/MS.

Tempo (minutos)	% Fase móvel A	% Fase móvel B
1	90	10
2	80	20
4	70	30
5	50	50
7	10	90
9	50	50
10	90	90
+ 4 min para equilíbrio da coluna		

Tabela 4. Parâmetros do analisador de massas para determinação de ácido sórbico em produtos cárneos por LC-MS/MS.

Analitos	^a Íon precursor (ESI)	^a Transição de quantificação (Q)	^a Transição de confirmação (C)	DP (V)	CXP (V)
		(CE, em V)	(CE, em V)	Q/C	Q/C
Ácido sórbico (SOR) e seus sais	112,9 (+)	67,0 (19)	65,0 (25)	56/56	8/8
Ácido 3,5-dinitrobenzoico (3-5-DNB)	210,9 (-)	166,9 (-14)	-	-45	-15
Parâmetros da fonte			Valor (MRM ⁺)	Valor (MRM ⁻)	
Temperatura da fonte (TEM)			650°C	650°C	
Gás de colisão (CAD)			High	High	
Voltagem aplicada no capilar (IS)			5.500 V	-5.500 V	
Gás de nebulização (GS1)			55 psi	55 psi	
Gás de secagem (GS2)			55 psi	55 psi	
Curtain gas (CUR)			20 psi	20 psi	

^aÍons em m/z. ^bEstado de ionização positivo utilizando cinco cargas. CE = *collision energy*; CXP = *exit cell potential*; DP = *declustering potential*; EP = *entrance potential*; ESI = ionização por electrospray; Q/C = íon de quantificação/íon de identificação.

6. Cálculos e expressão dos resultados

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

$$y = ax + b$$

Onde: y = a razão das áreas do analito pelo padrão interno em unidades de área (u.a.); x = razão da concentração do analito (mg kg⁻¹) pela concentração do padrão interno (mg kg⁻¹); a = inclinação; b = coeficiente linear.

7. Avaliação

Para a avaliação, cada grupo deverá confeccionar seu relatório, apresentando cálculos, referencial teórico e discutindo as seguintes questões:

Como foi feito o procedimento de extração das amostras de produtos cárneos?

Os resultados obtidos estão em conformidade com a legislação?

Qual é a importância de se fortificar as amostras com padrão interno logo no início da extração?

Como podemos garantir a qualidade dos resultados nessa análise?

Como podemos identificar e quantificar os analitos por esse método analítico?

Referência

Molognoni, L., Daguer, H., de Sá Plôencio, L. A., & Lindner, J. D. D. (2018). A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta*, 178, 1053-1066.