

384L0004

Nº L 15/28

Jornal Oficial das Comunidades Europeias

18. 1. 84

DIRECTIVA DA COMISSÃO**de 20 de Dezembro de 1983****que altera as Directivas 71/393/CEE, 72/199/CEE e 78/633/CEE, que fixam métodos de análise comunitários para o controlo oficial de alimentos para animais**

(84/4/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva 70/373/CEE do Conselho, de 20 de Julho de 1970, relativa à introdução de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitários para o controlo oficial de alimentos para animais⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pelo Acto de Adesão da Grécia e, nomeadamente, o seu artigo 2º,

Considerando que as Directivas 71/393/CEE⁽²⁾, 72/199/CEE⁽³⁾ e 78/633/CEE⁽⁴⁾ da Comissão fixam, respectivamente, os métodos de doseamento das matérias gordas brutas, da virginiamicina e da bacitracina-zinco; que se afigura necessário substituírem estes métodos por métodos adaptados à evolução dos conhecimentos científicos e técnicos;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente de Alimentos para Animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

No anexo da Directiva 71/393/CEE o texto da Parte 4 «Doseamento das matérias gordas brutas» é substituído pelo texto que consta do anexo I da presente directiva.

Artigo 2º

No Anexo II da Directiva 72/199/CEE, o texto da Parte 5 «Doseamento de virginiamicina — por difusão em agar» é substituído pelo texto que consta no Anexo II da presente directiva.

Artigo 3º

No anexo da Directiva 78/633/CEE, o texto da Parte 1 «Doseamento da bacitracina-zinco — por difusão em agar» é substituído pelo texto que consta no Anexo III da presente directiva.

Artigo 4º

Os Estados-membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para darem cumprimento às disposições da presente directiva, o mais tardar em 1 de Junho de 1984. Deste facto informarão imediatamente a Comissão.

Artigo 5º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 20 de Dezembro de 1983.

Pela Comissão

Poul DALSAGER

Membro da Comissão

(1) JO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

(2) JO nº L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.

(3) JO nº L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.

(4) JO nº L 206 de 29. 7. 1978, p. 43.

ANEXO I

«4. DOSEAMENTO DAS MATÉRIAS GORDAS BRUTAS

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosear o teor de matérias gordas brutas dos alimentos para animais. Não diz respeito à análise das sementes e frutos oleaginosos definidos no Regulamento nº 136/66/CEE do Conselho, de 22 de Setembro de 1966.

Consoante a natureza do alimento, deve ser aplicado um dos métodos adiante descritos.

1.1. Método A

Aplicável aos alimentos simples de origem vegetal, com excepção dos que se sabe conterem matérias gordas que não são completamente susceptíveis de extracção pelo éter de petróleo sem prévia hidrólise. São excepção os glúntens, as leveduras, as proteínas de soja e de batata. Este método é igualmente aplicável aos alimentos compostos, com excepção dos que contêm leite em pó, ou cujas matérias gordas não são completamente susceptíveis de extracção pelo éter de petróleo sem hidrólise prévia.

1.2. Método B

Aplicável aos alimentos simples de origem animal, assim como aos alimentos mencionados no ponto 1.1. como excepções à aplicação do método A.

2. Princípio

2.1. Método A

A amostra é extraída pelo éter de petróleo. O solvente é destilado e o resíduo secado e pesado.

2.2. Método B

A amostra é tratada a quente pelo ácido clorídrico. A mistura é arrefecida e filtrada. Depois de ter sido lavado e secado, o resíduo é submetido a análise segundo o método A.

3. Reagentes

3.1. Éter de petróleo, intervalo de ebulição: 40 a 60 °C. O índice de bromo deve ser inferior a 1 e o resíduo de evaporação inferior a 2 mg/100 ml.

3.2. Sulfato de sódio, anidro.

3.3. Ácido clorídrico 3 N.

3.4. Adjuvante de filtração, por exemplo, terra de diatomáceas, Hiflo-supercel.

4. Instrumentos

4.1. Extractor. Se o aparelho for munido de um sifão (aparelho Soxhlet), o débito do refluxo deve ser regulado de maneira a obter pelo menos 10 ciclos por hora. Se se tratar de um aparelho sem sifão, o débito do líquido por hora. Se se tratar de um aparelho sem sifão, o débito do líquido refluído deve ser de cerca de 10 ml por minuto.

4.2. Cones de extracção, isentos de matérias solúveis no éter de petróleo, cuja porosidade seja compatível com as exigências do ponto (4.1.).

4.3. Estufa de dessecação, quer pelo vácuo a 75 °C ± 3 °C, quer à pressão atmosférica a 100 °C ± 3 °C.

5. Modo operativo

5.1. Método A (ver observação 8.1.)

Pesar 5 g de amostra, com a aproximação de 1 mg, introduzi-los num cone de extracção (4.2.) e cobri-los com um tampão de algodão desengordorado.

Colocar o cone num extractor (4.1.) e extrair durante 6 horas pelo éter de petróleo (3.1.). Recolher o extracto num balão seco, contendo alguns fragmentos de pedra pomes (*) e tarado.

Eliminar o solvente por destilação. Secar o resíduo, colocando o balão durante uma hora e meia numa estufa de dessecação (4.3.). Deixar arrefecer num exsiccador e pesar. Secar de novo, durante 30 minutos, para ter a certeza de que o peso da matéria gorda permanece constante (a perda de peso entre duas pesagens sucessivas deve ser inferior a 1 mg).

(*) Substituir os fragmentos de pedra pomes por pérolas de vidro sempre que a matéria gorda deva ser objecto de exames quantitativos posteriores.

5.2. Método B

Pesar, com 1 mg de aproximação, 2,5 g da amostra (ver observação 8.2.), introduzi-los num copo de 400 ml ou um erlenmeyer de 300 ml e juntar 100 ml de ácido clorídrico 3 N (3.3.) e alguns fragmentos de pedra pomes. Cobrir o copo um vidro de relógio ou munir o erlenmeyer de um refrigerador de refluxo. Deixar ferver suavemente durante uma hora, à chama fraca ou sobre uma placa de aquecimento. Evitar que o produto adira às paredes do recipiente.

Arrefecer e adicionar uma quantidade de adjuvante de filtração (3.4.) suficiente para evitar qualquer perda de matéria gorda na filtração. Filtrar num filtro de papel duplo, molhado e isento de matérias gordas. Lavar o resíduo com água fria até à neutralização do filtrado. Verificar que o filtrado não contém matérias gordas. A presença destas indica que antes da hidrólise deve ser efectuada uma extracção de amostra pelo éter de petróleo segundo o método A.

Colocar o filtro contendo o resíduo num vidro de relógio e secar durante uma hora e meia na estufa a $100^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Introduzir o filtro contendo o resíduo seco num cone de extracção (4.2.) e cobrir com um tampão de algodão desengordurado. Colocar o cone num extractor (4.1.) e prosseguir como indicado em (5.1.), segundo e terceiros parágrafos.

6. Cálculo dos resultados

Exprimir o resultado da pesagem em percentagem da amostra.

7. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas, efectuadas na mesma amostra pelo mesmo analista, não deve ultrapassar:

0,2 %, em valor absoluto, para os teores de matérias gordas brutas inferiores a 5 %,

4,0 % do resultado mais elevado para os teores de 5 a 10 %,

0,4 % em valor absoluto para os superiores a 10 %.

8. Observações

- 8.1. Para os produtos de elevado teor de matérias gordas, difíceis de triturar ou não adequados à colheita de uma amostra reduzida e homogénea, proceder como se segue:

Pesar, com a aproximação de 1 mg, 20 g de amostra e misturá-los com 10 g ou mais de sulfato de sódio anidro (3.2.). Extraír pelo éter de petróleo (3.1.), como indicado em (5.1.). Completar o extracto obtido para 500 ml com éter de petróleo (3.1.) e homogeneizar. Introduzir 50 ml de solução num pequeno balão seco, contendo alguns fragmentos de pedra pomes⁽¹⁾ e tarado. Eliminar o solvente por destilação, secar e prosseguir como indicado em (5.1.), último parágrafo.

Eliminar o solvente do resíduo de extracção que se encontra no cone, triturar o resíduo até ao calibre de 1 mm, colocá-lo novamente no cone (não adicionar sulfato de sódio) e prosseguir como indicado em (5.1.), segundo e terceiro parágrafos.

O teor de matérias gordas brutas em percentagem da amostra é dado pela fórmula:

$$(10a + b) \times 5$$

em que:

a = massa, em gramas, do resíduo da primeira extracção (alíquota do extracto),

b = massa, em gramas, do resíduo da segunda extracção.

- 8.2. A amostra de produtos pobres em matérias gordas pode ser elevada a 5 g.»

⁽¹⁾ Substituir os fragmentos de pedra pomes por pérolas de vidro, sempre que a matéria gorda deva ser objecto de exames qualitativos posteriores.

ANEXO II

«5. DOSEAMENTO DA VIRGINIAMICINA

— por difusão em agar —

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosar a virginiamicina nos alimentos e prémisturas. O limite inferior do doseamento é de 2 mg/kg (2 ppm) ⁽¹⁾.

2. Princípio

A amostra é submetida a uma extracção por uma solução metanólica de Tween 80. O extracto é decantado ou centrifugado e em seguida diluído. A sua actividade antibiótica é determinada pela medição da difusão da virginiamicina num meio de agar inoculado com *Micrococcus luteus*. A difusão revela-se pela formação de zonas de inibição do microrganismo. O diâmetro dessas zonas é considerado como sendo directamente proporcional ao logaritmo da concentração de antibiótico para a gama das concentrações utilizadas.

3. Microrganismo: «*Micrococcus luteus*» ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. Conservação da estirpe

Inocular o meio de cultura (4.1.) com «*Micrococcus luteus*», em tubos inclinados. Incubar durante 24 horas a 30 °C, conservar no frigorífico a cerca de 4 °C e renovar a inoculação de 15 em 15 dias.

3.2. Preparação da suspensão bacteriana ^(a)

Recolher as bactérias de um tubo de agar (3.1.) de preparação recente, com 2 a 3 ml de solução de cloreto de sódio (4.3.). Inocular com esta suspensão 250 ml do meio de cultura (4.1.) num frasco de Roux e incubar durante dezoito a vinte horas a 30 °C. Recolher as bactérias em 25 ml de solução de cloreto de sódio (4.3.) e homogeneizar.

Diluir a suspensão de 1/10, com a solução de cloreto de sódio (4.3.). A transmissão luminosa da suspensão, medida a 650 nm através de uma espessura de 1 cm por comparação com a solução de cloreto de sódio (4.3.), deve ser de cerca de 75 %. Esta suspensão pode ser conservada uma semana a cerca de 4 °C.

4. Meios de cultura e reagentes

4.1. Meio de conservação da estirpe e de base do doseamento ^(b)

Peptona de carne	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levedura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	10,0 a 20,0 g
Água	1 000 ml
pH 6,5 (após esterilização)	

4.2. Tampão fosfato, pH 6

Hidrogenofosfato de potássio, K ₂ HPO ₄	2,0 g
Diidrogenofosfato de potássio, KH ₂ PO ₄	8,0 g
Água para	1 000 ml

4.3. Solução a 0,8 % (p/v) de cloreto de sódio: dissolver em água 8 g de cloreto de sódio, diluir para 1 000 ml e esterilizar.

4.4. Metanol.

4.5. Mistura de tampão fosfato (4.2.) e de metanol (4.4.): 80/20 (v/v).

4.6. Solução metanólica a 0,5 % (p/v) de Tween 80: dissolver 5 g de Tween 80 em metanol (4.4.) e diluir para 1 000 ml com metanol.

4.7. Substância-padrão: virginiamicina de actividade conhecida.

⁽¹⁾ 1 mg de virginiamicina equivale a 1 000 unidades «UK».

^(a) Podem ser utilizados outros métodos desde que esteja provado que produzem suspensões bacterianas análogas.

^(b) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que dê os mesmos resultados.

5. Soluções-padrão

Dissolver uma quantidade pesada com exactidão da substância-padrão (4.7.) em metanol (4.4.) e diluir com metanol (4.4.) para obter uma solução-mãe a 1 000 µg de virginiamicina/ml. Conservada em frasco rolhado a 4 °C, esta solução é estável durante cinco dias.

Preparar a partir desta solução por diluições sucessivas, com a mistura (4.5.), as soluções seguintes:

S ₈	1	µg/ml
S ₄	0,5	µg/ml
S ₂	0,25	µg/ml
S ₁	0,125	µg/ml

6. Preparação do extracto e das soluções

6.1. *Extracção*

6.1.1. Produtos cujo teor de virginiamicina não seja superior a 100 mg/kg

Pesar 50,0 g de amostra. Adicionar 200 ml de solução (4.6.), agitar durante 30 minutos, em seguida deixar depositar ou centrifugar. Recolher 20 ml do sobrenadante e evaporar até 5 ml, num evaporador rotativo, a uma temperatura não superior a 40 °C. Diluir o resíduo com a mistura (4.5.) para obter uma concentração teórica de virginiamicina de 1 µg/ml (= U₈).

6.1.2. Produtos cujo teor de virginiamicina seja superior a 100 mg/kg

Pesar uma quantidade de amostra não superior a 10,0 g e contendo de 1 a 50 mg de virginiamicina. Juntar 100 ml de solução (4.6.), agitar durante 30 minutos, em seguida deixar depositar ou centrifugar. Diluir o sobrenadante com a mistura (4.5.) para obter uma concentração de virginiamicina de 1 µg/ml (= U₈).

6.2. *Soluções do extracto*

Preparar a partir da solução U₈ por diluições sucessivas (1 + 1), com a mistura (4.5.), as soluções U₄ (concentração teórica: 0,5 µg/ml), U₂ (concentração teórica: 0,25 µg/ml) e U₁ (concentração teórica: 0,125 µg/ml).

7. Modalidades de doseamento

7.1. *Inoculação do meio de cultura*

Inocular a cerca de 50 °C o meio de base de doseamento (4.1.) com a suspensão bacteriana (3.2.). Por meio de ensaios preliminares em placas com o meio (4.1.), determinar a quantidade de suspensão bacteriana que permite obter, para as diferentes concentrações de virginiamicina, zonas de inibição tão extensas quanto possível, que ainda sejam límpidas.

7.2. *Preparação das placas*

A difusão em agar efectua-se em placas com as quatro concentrações da solução-padrão (S₈, S₄, S₂, S₁) e as quatro concentrações do extracto (U₈, U₄, U₂, U₁). Cada placa tem de receber as quatro concentrações do padrão e do extracto. Para este efeito, escolher a dimensão das placas de tal forma que se possam cavar no meio de agar pelo menos oito cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro cujos centros distem pelo menos 30 mm uns dos outros. Podem utilizar-se como placas, placas de Peetri tendo sobreposto um anel de alumínio ou de matéria plástica de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir nas placas uma quantidade do meio (4.1.), inoculado como indicado em (7.1.), que permita obter uma camada de cerca de 2 mm de espessura (60 ml para uma caixa de 200 mm de diâmetro). Deixar solidificar, fazer as cavidades e depositar nelas os volumes exactamente medidos das soluções-padrão e do extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidade, conforme o diâmetro). Fazer pelo menos quatro repetições de cada concentração, de forma que cada determinação seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

7.3. *Incubação*

Incubar as placas durante dezasseis a dezoito horas, a 30 °C ± 2 °C.

8. Avaliação

Medir o diâmetro das zonas de inibição com a aproximação de 0,1 mm. Para cada concentração, registar as medidas médias em papel semi-logarítmico, marcando o logaritmo das concentrações em correlação com o diâmetro das zonas de inibição. Traçar as rectas mais ajustadas para a solução-padrão e para o extracto, procedendo, por exemplo, como se segue:

Determinar o ponto mais apropriado do nível mais baixo da solução-padrão (SL) aplicando a fórmula:

$$(a) SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Determinar o ponto mais apropriado do nível mais elevado da solução-padrão (SH), aplicando a fórmula:

$$(b) SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Determinar da mesma maneira os pontos mais apropriados do extracto para o nível mais baixo (UL) e o nível mais elevado (UH) substituindo, nas fórmulas acima mencionadas, S_1, S_2, S_4 e S_8 por U_1, U_2, U_4, U_8 .

Inscriver os valores SL e SH no mesmo gráfico. Unindo os dois pontos obtém-se a recta mais ajustada para a solução-padrão. Procedendo da mesma maneira para UL e UH, obtém-se a recta mais ajustada para o extracto.

Na ausência de qualquer interferência, as rectas devem ser paralelas. Na prática, consideram-se paralelas quando (SH-SL) e (UH-UL) não diferem mais de 10 % da sua média.

Se as linhas não forem paralelas, pode eliminar-se quer U_1 e S_1 , quer U_8 e S_8 . Os valores SL, SH, UL e UH que permitem obter as rectas mais ajustadas são então calculados por meio das seguintes fórmulas:

$$(a') SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{ou} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b') SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{ou} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

e de fórmulas análogas para UL e UH. A utilização desta alternativa, impõe que sejam respeitados os mesmos critérios de paralelismo.

A obtenção de um resultado proveniente de três níveis deve ser mencionado no boletim de análise.

Sendo as rectas consideradas paralelas, calcular o logaritmo da actividade relativa (log. A) por meio de uma das fórmulas seguintes, segundo o número de níveis (4 ou 3) utilizados para a avaliação do paralelismo.

Para 4 níveis:

$$(c) \log. A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Para 3 níveis:

$$(d) \log. A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

ou

$$(d') \log. A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Actividade do extracto do extracto da amostra = actividade do padrão correspondente \times A:

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Se a actividade relativa se encontrar fora da gama dos valores compreendidos entre 0,5 e 2,0, repetir a determinação procedendo a ajustamentos das concentrações do extracto ou, eventualmente, das soluções-padrão. Quando esta actividade não puder ser introduzida na gama dos valores adequados, o resultado deve ser considerado como aproximado e esta indicação deve ser anotada no boletim de análise.

Quando as rectas forem consideradas não paralelas, repetir a determinação. Se o paralelismo nunca for conseguido, a determinação deve ser considerada não satisfatória.

Exprimir o resultado em miligramas de virginiamicina por quilograma de alimento.

9. **Reprodutibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas na mesma amostra pelo mesmo analista não deve ultrapassar:

2 mg/kg, em valor absoluto, para os teores de virginamicina inferiores a 10 mg/kg,

20 % do resultado mais elevado para os teores de 10 a 25 mg/kg,

5 mg/kg, em valor absoluto, para os teores de 25 a 50 mg/kg,

10 % do resultado mais elevado para os teores superiores a 50 mg/kg.»

ANEXO III

«1. DOSEAMENTO DA BACITRACINA-ZINCO

— por difusão em agar —

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosear a bacitracina-zinco nos alimentos e nas pré-misturas. O limite inferior do doseamento é de 5 mg/kg (5 ppm) ⁽¹⁾.

2. Princípio

A amostra é extraída a pH 2 por uma mistura de etanol, água e ácido clorídrico e uma solução de sulfureto de sódio. O sulfureto de sódio permite precipitar os sais de cobre solúveis que podem interferir na determinação: O extracto, levado a pH 6,5 é concentrado (se necessário) e diluído. A sua actividade antibiótica é determinada por medição da difusão da bacitracina-zinco num meio de agar inoculado com "*Micrococcus luteus (flavus)*". A difusão revela-se pela formação de zonas de inibição do microrganismo. O diâmetro dessas zonas é considerado como sendo directamente proporcional ao logaritmo da concentração de antibiótico para a gama das concentrações utilizadas.

3. Microrganismo: «*Micrococcus luteus (flavus)*» ATCC 10240

3.1. Conservação da estirpe

Inocular com "*Micrococcus luteus (flavus)*" o meio de cultura (4.1.) em tubos inclinados. Incubar durante vinte e quatro horas a 30 °C, conservar no frigorífico a cerca de 4 °C e renovar a inoculação de quinze em quinze dias

3.2. Preparação da suspensão bacteriana ⁽²⁾

Recolher as bactérias de um tubo de agar (3.1.), de preparação recente, com 2 a 3 ml de solução de cloreto de sódio (4.3.). Inocular, com esta suspensão, 250 ml do meio de cultura (4.1.) num frasco de Roux e incubar durante dezoito a vinte horas a 30 °C. Recolher as bactérias em 25 ml de solução de cloreto de sódio (4.3.) e homogeneizar.

Diluir a suspensão de 1/10 com a solução de cloreto de sódio (4.3.). A transmissão luminosa da suspensão, medida a 650 nm através de uma espessura de 1 cm, por comparação com a solução de cloreto de sódio (4.3.), deve ser de cerca de 75 %. Esta suspensão pode ser conservada uma semana a cerca de 4 °C.

4. Meios de cultura e reagentes

4.1. Meio de conservação da estirpe ^(b)

Peptona de carne	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levedura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	10,0 a 20,0 g
Água	1 000 ml
pH 6,5 — 6,6 (após esterilização)	

4.2. Meio de base do doseamento ^(b)

Triptona	10,0 g
Extracto de levedura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	10,0 a 20,0 g
Tween 80	1 ml
Água	1 000 ml
pH 6,5 (após esterilização)	

4.3. Solução a 0,8 % (p/v) de cloreto de sódico: dissolver em água 8 g de cloreto de sódio, diluir para 1 000 ml e esterilizar.

4.4. Mistura de metanol/água/ácido clorídrico (4.6): 80/17,5/2,5 (v/v/v).

⁽¹⁾ 1 mg de bacitracina-zinco (qualidade para alimentos de animais) equivale a 42 unidades internacionais (UI).

⁽²⁾ Podem ser utilizados outros métodos desde que esteja provado que produzem suspensões bacterianas análogas.

^(b) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que dê os mesmos resultados.

- 4.5. *Tampão fosfato, pH 6,5*
- | | |
|----------------------------------|----------|
| Fosfato bipotássico K_2HPO_4 | 22,15 g |
| Fosfato monopotássico KH_2PO_4 | 27,85 g |
| Água para | 1 000 ml |
- 4.6. Ácido clorídrico, d: 1,18-1,19
- 4.7. Ácido clorídrico, 0,1 M
- 4.8. Solução 1 M de hidróxido sódico
- 4.9. Solução de sulfureto de sódio cerca de 0,5 M.
- 4.10. Solução a 0,04 % (p/v) de púrpura de bromocresol: dissolver 0,1 g de púrpura de bromocresol em 18,5 ml de solução 0,01 M de hidróxido de sódio. Completar para 250 ml com água e homogeneizar.
- 4.11. Substância-padrão: bacitracina-zinco de actividade conhecida (em UI).

5. Soluções-padrão

Pesar uma quantidade de substância-padrão (4.11) correspondente a 1050 UI (segundo o título indicado). Adicionar 5 ml de ácido clorídrico 0,1 M (4.7.) e deixar repousar durante quinze minutos. Adicionar 30 ml de água, ajustar o pH a 4,5 com tampão fosfato (4.5.) (cerca de 4 ml), completar para 50 ml com água e homogeneizar (1 ml = 21 UI).

Preparar a partir desta solução, por diluições sucessivas com tampão fosfato pH 6,5 (4.5.), as soluções seguintes:

S_8	0,42	UI/ml
S_4	0,21	UI/ml
S_2	0,105	UI/ml
S_1	0,0525	UI/ml

6. Preparação do extracto

6.1. *Extracção*

6.1.1. Pré-misturas e alimentos minerais

Pesar 2,0 a 5,0 g de amostra, adicionar 29,0 ml da mistura (4.4.) e 1,0 ml de solução de sulfureto de sódio (4.9.); agitar um pouco. Verificar que o pH é de cerca de 2. Agitar durante 10 minutos, adicionar 30 ml de tampão fosfato (4.5.), agitar durante 15 minutos e centrifugar. Recolher uma alíquota do sobrenadante e ajustar o pH a 6,5 com uma solução 1 M de hidróxido de sódio (4.8.) utilizando um aparelho medidor de pH ou a solução de púrpura de bromocresol (4.10.) como indicador. Diluir com tampão fosfato (4.5.) para obter uma concentração teórica de bacitracina-zinco de 0,42 UI/ml (= U_8).

6.1.2. Concentrados proteínas

Pesar 10,0 g de amostra, adicionar 49,0 ml da mistura (4.4.) e 1,0 ml da solução de sulfureto de sódio (4.9.); agitar um pouco. Verificar que o pH é de cerca de 2. Agitar durante 10 minutos, adicionar 50 ml de tampão fosfato (4.5.); agitar durante 15 minutos e centrifugar. Recolher uma alíquota do sobrenadante e ajustar o pH a 6,5 com uma solução 1 M de hidróxido de sódio (4.8.) utilizando um aparelho medidor de pH ou a solução de púrpura de bromocresol (4.10.) como indicador.

Evaporar aproximadamente metade do volume num evaporador rotativo a uma temperatura não superior a 35° C. Diluir com tampão fosfato (4.5.) para obter uma concentração teórica de bacitracina-zinco de 0,42 UI/ml (= U_8).

6.1.3. Outros alimentos

Pesar 10,0 g de amostra (20,0 g para uma concentração teórica de bacitracina-zinco de 5 mg/kg). Adicionar 24,0 ml da mistura (4.4.) e 1,0 ml da solução de sulfureto de sódio (4.9.); homogeneizar durante 10 minutos. Adicionar 25 ml de tampão fosfato (4.5.), agitar durante quinze minutos e centrifugar. Recolher 20 ml do sobrenadante e ajustar o pH a 6,5 com uma solução 1 M de hidróxido de sódio (4.8.) utilizando um aparelho medidor de pH ou a solução de púrpura bromocresol (4.10.) como indicador. Evaporar até cerca de 4 ml num evaporador rotativo a uma temperatura não superior a 35° C. Diluir o residuo com tampão fosfato (4.5.) para obter uma concentração teórica de bacitracina-zinco de 0,42 UI/ml (= U_8).

6.2. *Soluções do extracto*

Preparar a partir da solução U_8 , por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão fosfato (4.5.), as soluções U_4 (concentração teórica: 0,21 UI/ml e U_2 (concentração teórica: 0,105 UI/ml e U_1 (concentração teórica: 0,0525 UI/ml).

7. Modalidades de doseamento

7.1. Inoculação do meio de cultura

Inocular a cerca de 50 °C o meio de base de doseamento (4.2.) com a suspensão bacteriana (3.2.). Por meio de ensaios preliminares em placas com o meio (4.2.), determinar a quantidade de suspensão bacteriana, que permite obter, para as diferentes concentrações de bacitracina-zinco, zonas de inibição tão extensas quanto possível, que ainda sejam límpidas.

7.2. Preparação das placas

A difusão agar efectua-se em placas com as quatro concentrações da solução-padrão (S_8, S_4, S_2, S_1) e as quatro concentrações do extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada placa deve receber necessariamente as quatro concentrações do padrão e do extracto. Para este efeito, escolher a dimensão das placas, de forma que se possam cavar no meio com agar pelo menos oito cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro, cujos centros distem pelo menos 30 mm uns dos outros. Podem utilizarse como placas, placas de Peetri tendo sobreposto um anel de alumínio ou de matéria plástica de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir nas placas uma quantidade do meio (4.2.), inoculado como indicado em (7.1.) que permita obter uma camada de cerca de 2 mm de espessura (60 ml para uma placa de 200 mm de diâmetro). Deixar solidificar, fazer as cavidades e depositar nelas as soluções-padrão extracto em volumes exactamente medidas (0,10 a 0,15 ml por cavidade, conforme o diâmetro). Fazer pelo menos quatro repetições de cada concentração de maneira que cada determinação seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

7.3. Incubação

Incubar as placas durante dezasseis a dezoito horas a 30 °C ± 2 °C.

8. Avaliação

Medir o diâmetro das zonas de inibição com a aproximação de 0,1 mm. Para cada concentração, registar as medidas médias em papel semilogarítmico, marcando o logaritmo das concentrações em correlação com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas mais ajustadas para a solução-padrão e para o extracto, procedendo, por exemplo, como se segue:

Determinar o ponto mais apropriado do nível mais baixo da solução-padrão (SL), aplicando a fórmula:

$$(a) \text{ SL} = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Determinar o ponto mais adequado do nível mais elevado da solução-padrão (SH), aplicando a fórmula:

$$(b) \text{ SH} = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Determinar do mesmo modo os pontos mais adequados do extracto para o nível mais baixo (UL) e o nível mais elevado (UH), substituindo, nas fórmulas acima mencionadas, S_1, S_2, S_4 y S_8 por U_1, U_2, U_4 y U_8 .

Inscrever os valores SL e SH no mesmo gráfico. Unindo os dois pontos, obtém-se a recta mais ajustada para a solução-padrão. Procedendo do mesmo modo para UL e UH obtém-se a recta mais ajustada para o extracto.

Na ausência de qualquer interferência, as rectas deveriam ser paralelas. Na prática, consideram-se paralelas quanto $(SH - SL)$ e $(UH - UL)$ não diferem mais de 10 % da sua média.

Se as rectas não forem paralelas, pode eliminar-se, quer U_1 e S_1 , quer U_8 e S_8 . Os valores SL, SH, UL y UH, que permitem obter as rectas mais adequadas são então calculadas por meio das seguintes fórmulas:

$$(a') \text{ SL} = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{ou} \quad \frac{5s_2 - 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5s_4 - 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{ou} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

e de fórmulas análogas para UL e UH.

A utilização desta alternativa impõe que sejam respeitados os mesmos critérios de paralelismo. A obtenção de um resultado proveniente de três níveis deve ser mencionado no boletim de análise.

Quando as rectas são consideradas paralelas, calcular o logaritmo da actividade relativa (log. A) por meio de uma das fórmulas seguintes, segundo o número de níveis (4 ou 3) utilizados para a avaliação do paralelismo.

Para 4 níveis:

$$(c) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Para 3 níveis:

$$(d) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

ou

$$(d') \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Actividade do extracto da amostra = actividade do padrão correspondente \times A:

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Se a actividade relativa se encontrar fora da gama dos valores compreendidos entre 0,5 e 2,0, repetir a determinação procedendo a ajustamentos das concentrações do extracto ou, eventualmente, das soluções-padrão. Quando esta actividade não puder ser introduzida na gama dos valores adequados, o resultado deve ser considerado como aproximado e esta indicação deve ser anotada no boletim de análise.

Quando as rectas forem consideradas não paralelas, repetir a determinação. Se o paralelismo nunca for conseguido, a determinação deve ser considerada não satisfatória.

Exprimir o resultado em miligramas de bacitracina-zinco por quilograma de alimento.

9. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra, pelo mesmo analista, não deve ultrapassar:

2 mg/kg, em valor absoluto, para os teores de bacitracina-zinco inferiores a 10 mg/kg,

20 % do resultado mais elevado para os teores de 10 a 25 mg/kg,

5 mg/kg, em valor absoluto, para os teores de 25 a 50 mg/kg.

10 % do resultado mais elevado, para os teores superiores a 50 mg/kg.»