

**DIRECTIVA 98/64/CE DA COMISSÃO**

de 3 de Setembro de 1998

**que fixa métodos de análise comunitários para a determinação dos aminoácidos, das matérias gordas em bruto e do olaquinox nos alimentos para animais e altera a Directiva 71/393/CEE**

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade 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 dos alimentos para animais <sup>(1)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pelo Acto de Adesão da Áustria, da Finlândia e da Suécia, e, nomeadamente, o seu artigo 2.º,

Considerando que a Directiva 70/373/CEE prevê que os controlos oficiais dos alimentos para animais, destinados a verificar a observância das condições estabelecidas de acordo com as disposições legislativas, regulamentares ou administrativas quanto à qualidade e composição dos alimentos para animais, sejam efectuados segundo modos de colheita de amostras e métodos de análise comunitários;

Considerando que a Directiva 79/373/CEE do Conselho, de 2 de Abril de 1979, relativa à comercialização de alimentos compostos para animais <sup>(2)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 97/47/CE da Comissão <sup>(3)</sup>, e a Directiva 93/74/CEE do Conselho, de 13 de Setembro de 1993, relativa aos alimentos para animais com objectivos nutricionais específicos <sup>(4)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 96/25/CE <sup>(5)</sup>, prevêem que os aminoácidos e as matérias gordas em bruto sejam declarados na etiqueta dos alimentos;Considerando que, além disso, a Directiva 70/524/CEE do Conselho, de 23 de Novembro de 1970, relativa aos aditivos na alimentação para animais <sup>(6)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 97/72/CE da Comissão <sup>(7)</sup>, estabelece que o teor do olaquinox deve ser indicado aquando da etiquetagem, sempre que esta substância for acrescentada aos alimentos compostos para animais;

Considerando que a segunda Directiva 71/393/CEE da Comissão, de 18 de Novembro de 1971, que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial

dos alimentos para animais <sup>(8)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 84/4/CEE <sup>(9)</sup>, fixou métodos de análise para, *inter alia*, a determinação das matérias gordas em bruto; que é conveniente alterar o método descrito;

Considerando que devem ser fixados métodos de análise comunitários para o controlo daquelas substâncias;

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

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

*Artigo 1.º*

Os Estados-membros ordenarão que as análises previstas para os controlos oficiais dos alimentos para animais, no que diz respeito ao teor de aminoácidos, de matérias gordas em bruto e de olaquinox, sejam efectuadas segundo os métodos correspondentes descritos no anexo.

*Artigo 2.º*

No anexo da Directiva 71/393/CEE da Comissão, o ponto «4. Doseamento das matérias gordas brutas» é substituído pela parte B do anexo da presente directiva.

*Artigo 3.º*

1. Os Estados-membros adoptarão e publicarão as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva o mais tardar em 31 de Dezembro de 1998. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Os Estados-membros aplicarão as referidas disposições a partir de 1 de Janeiro de 1999.

Quando os Estados-membros adoptarem tais disposições, estas devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência serão adoptadas pelos Estados-membros.

<sup>(1)</sup> JO L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.<sup>(2)</sup> JO L 86 de 6. 4. 1979, p. 30.<sup>(3)</sup> JO L 211 de 5. 8. 1997, p. 45.<sup>(4)</sup> JO L 237 de 22. 9. 1993, p. 23.<sup>(5)</sup> JO L 125 de 23. 5. 1996, p. 35.<sup>(6)</sup> JO L 270 de 14. 12. 1970, p. 1.<sup>(7)</sup> JO L 96 de 28. 3. 1998, p. 39.<sup>(8)</sup> JO L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.<sup>(9)</sup> JO L 15 de 18. 1. 1984, p. 28.

2. Os Estados-membros comunicarão à Comissão o texto das principais disposições de direito interno que adoptarem no domínio regido pela presente directiva.

*Artigo 4.º*

A presente directiva entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

*Artigo 5.º*

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 3 de Setembro de 1998.

*Pela Comissão*  
Franz FISCHLER  
*Membro da Comissão*

## ANEXO

## PARTE A

## DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMINOÁCIDOS

## 1. Objectivo e campo de aplicação

O presente método destina-se à determinação do teor de aminoácidos livres (naturais e de síntese) e aminoácidos totais (ligados e livres) em alimentos para animais, utilizando um analisador de aminoácidos. O método é aplicável ao doseamento dos seguintes aminoácidos: cistina/cisteína, metionina, lisina, treonina, alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina e valina.

O método não permite distinguir as formas D e L, nem os sais de aminoácidos. Não é aplicável ao doseamento de triptófano nem de derivados hidroxilados de aminoácidos.

## 2. Resumo do processo

2.1. *Aminoácidos livres*

Os aminoácidos livres são extraídos com ácido clorídrico diluído. As macromoléculas azotadas extraídas como subprodutos, são precipitadas com ácido sulfosalicílico e removidas por filtração. O pH do filtrado é ajustado a 2.20. Os aminoácidos são separados por cromatografia de troca iónica e determinados fotometricamente a 570 nm, após reacção com ninidrina.

2.2. *Aminoácidos totais*

O procedimento a adoptar depende dos aminoácidos a dosear. A cistina/cisteína e a metionina necessitam de oxidação a ácido cisteico e a metionina sulfona respectivamente, antes da hidrólise. A tirosina é determinada nos hidrolisados de amostras não oxidadas. Todos os restantes aminoácidos referidos em 1 podem ser determinados a partir de amostras oxidadas ou não oxidadas.

A oxidação é realizada a 0 °C, com uma mistura ácido perbórmico/fenol. O excesso de reagente de oxidação é destruído com bissulfito de sódio. A amostra, oxidada ou não, é hidrolisada com ácido clorídrico 6 mol/l durante 23 horas. O pH do hidrolisado é ajustado a 2.20. Os aminoácidos são separados por cromatografia de troca iónica e determinados fotometricamente a 570 nm (440 nm no caso da prolina), após reacção com ninidrina.

## 3. Reagentes

Todos os reagentes devem ser pró-análise. Deve utilizar-se água bidestilada ou de qualidade equivalente (condutividade inferior a 10 µS).

- 3.1. Peróxido de hidrogénio, 30 % (m/m).
- 3.2. Ácido fórmico, 98-100 % (m/m).
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Bissulfito de sódio.
- 3.5. Hidróxido de sódio.
- 3.6. Ácido 5-sulfosalicílico di-hidratado.
- 3.7. Ácido clorídrico ( $r_{20}^{20}$  1.18 g/ml).
- 3.8. Citrato trissódico di-hidratado.
- 3.9. 2,2'-Etanoditiol (ditioglicol).
- 3.10. Cloreto de sódio.
- 3.11. Ninidrina.
- 3.12. Éter de petróleo (P.E. 40-60 °C).
- 3.13. Norleucina ou outro composto adequado, para ser usado como padrão interno.
- 3.14. Azoto gasoso (teor de oxigénio inferior a 10 ppm).

- 3.15. 1-Octanol.
- 3.16. Aminoácidos.
- 3.16.1. Substâncias-padrão referidas em 1. Os produtos devem ser puros e não conter água de cristalização. Secar sob vácuo, com  $P_2O_5$  ou  $H_2SO_4$ , durante uma semana, antes de usar.
- 3.16.2. Ácido cisteico.
- 3.16.3. Metionina sulfona.
- 3.17. Solução de hidróxido de sódio 7,5 mol/l.  
Dissolver 300 g de NaOH (3.5) em água, completando a 1 litro.
- 3.18. Solução de hidróxido de sódio 1 mol/l.  
Dissolver 40 g de NaOH (3.5) em água, e completar a 1 litro.
- 3.19. Solução de ácido fórmico/fenol.  
Misturar 889 g de ácido fórmico (3.2) com 111 g de água e adicionar 4,73 g de fenol (3.3).
- 3.20. Mistura de hidrólise (HCl 6 mol/l contendo 1 g de fenol/l).  
Adicionar 1 g de fenol (3.3) a 492 ml de HCl (3.7) e completar com água a 1 litro.
- 3.21. Mistura de extracção (HCl 0,1 mol/l contendo 2 % de ditioglicol).  
Misturar 8,2 ml de HCl (3.7) com cerca de 900 ml de água, adicionar 20 ml de tiodiglicol (3.9) e completar com água até 1 litro (não misturar directamente os reagentes 3.7 e 3.9).
- 3.22. Ácido 5-sulfosalicílico, 6 % (m/v).  
Dissolver 60 g de ácido 5-sulfosalicílico (3.6) em água, completando a 1 litro.
- 3.23. Mistura oxidante (ácido perfórmico/fenol).  
Misturar, num pequeno matraz, 0,5 ml de peróxido de hidrogénio (3.1) com 4,5 ml de solução de ácido fórmico/fenol (3.19). Tapar e manter a 20-30 °C durante 1 hora, de modo a obter ácido perfórmico. Arrefecer num banho de gelo (15 minutos) e adicionar à amostra.  
*Cuidado:* evitar o contacto com a pele e utilizar vestuário de protecção.
- 3.24. Tampão citrato (0,2 mol/l; pH = 2.20).  
Dissolver 19,61 g de citrato de sódio (3.8), 5 ml de ditioglicol (3.9), 1 g de fenol (3.3) e 16,5 ml HCl (3.7) em cerca de 800 ml de água. Ajustar o pH a 2.20. Completar com água a 1 litro.
- 3.25. Tampões de eluição, preparados em função do aparelho utilizado (4.9).
- 3.26. Reagente de ninidrina, preparado em função do aparelho utilizado (4.9).
- 3.27. Soluções-padrão de aminoácidos. Estas soluções devem ser armazenadas a uma temperatura inferior a 5 °C.
- 3.27.1. Solução-mãe padrão de aminoácidos (3.16.1),  $c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$  de cada aminoácido em ácido clorídrico (disponível no comércio).
- 3.27.2. Solução-mãe padrão de ácido cisteico e metionina sulfona,  $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$ .  
Dissolver, num balão aferido de 1 l, 0,2115 g de ácido cisteico (3.16.2) e 0,2265 g de metionina sulfona (3.16.3) em tampão citrato (3.24), completando o volume com o mesmo tampão. Armazenar a uma temperatura inferior a 5 °C, por um período não superior a 12 meses. NOTA: Esta solução não é necessária no caso de a solução-mãe padrão (3.27.1) conter ácido cisteico e metionina sulfona.
- 3.27.3. Solução-mãe de padrão interno, por exemplo norleucina ( $c = 20 \mu\text{mol/ml}$ ).  
Dissolver num balão aferido de 250 ml 0,6560 g de norleucina (3.13) em tampão citrato (3.24), completando o volume com o mesmo tampão. Armazenar a uma temperatura inferior a 5 °C, por um período não superior a 6 meses.
- 3.27.4. Solução de calibração de aminoácidos-padrão para uso com os hidrolisados ( $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$  de ácido cisteico e metionina sulfona;  $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$  dos restantes aminoácidos).

Dissolver, num matraz de 100 ml, 2,2 g de cloreto de sódio (3.10) em 30 ml de tampão citrato (3.24). Adicionar 4,00 ml de solução-mãe padrão de aminoácidos (3.27.1), 4,00 ml de solução-mãe padrão de solução-mãe padrão de aminoácidos (3.27.1), 4,00 ml de solução-mãe padrão de ácido cisteico e de metionina sulfona (3.27.2) e 0,50 ml de solução-mãe padrão de padrão interno (3.27.3), se for caso disso. Ajustar o pH a 2,20 com solução de hidróxido de sódio (3.18).

Transferir quantitativamente para um balão aferido de 50 ml, completar o volume com tampão citrato (3.24) e misturar.

Armazenar a uma temperatura inferior a 5 °C, por um período não superior a 3 meses.

Ver igualmente o ponto 9.1 das observações.

- 3.27.5. Solução de calibração de aminoácidos-padrão para uso com os hidrolisados obtidos de acordo com 5.3.3.1, bem como com os extractos referidos em 5.2. A solução de calibração é preparada em conformidade com 3.27.4, suprimindo o cloreto de sódio.

Armazenar a uma temperatura inferior a 5 °C, por um período não superior a 3 meses.

#### 4. Aparelhos e utensílios

- 4.1. Material corrente de laboratório, e nomeadamente: Balão de fundo redondo de 100 ml ou 250 ml equipado com um condensador de refluxo.
- 4.2. Frasco de vidro de borosilicato de 100 ml munido de tampa de rosca com revestimento de borracha ou teflon (por exemplo, Duran, Schott), para uso em estufa.
- 4.3. Estufa munida de um sistema de ventilação e de um sistema de regulação de temperatura com exactidão superior a  $\pm 2$  °C.
- 4.4. Medidor de pH (com leitura às milésimas).
- 4.5. Filtro de membrana (porosidade 0,2  $\mu\text{m}$ ).
- 4.6. Centrifuga.
- 4.7. Evaporador rotativo de vácuo.
- 4.8. Agitador mecânico ou magnético.
- 4.9. Analisador de aminoácidos ou aparelho para HPLC munido de uma coluna de troca iónica, derivatização pós-coluna com ninidrina e detector fotométrico.

O enchimento da coluna é de resinas de poliestireno sulfonado que permitem separar os aminoácidos entre si, bem como de outros produtos com reacção positiva à ninidrina. A estabilidade do fluxo das bombas que controlam o caudal do tampão de eluição e do reagente de ninidrina deve ser de cerca de  $\pm 0,5$  %, quer durante o ensaio de calibração quer durante a execução da análise.

Em alguns analisadores de aminoácidos é possível utilizar produtos de hidrólise que contenham uma concentração de sódio superior a 0,8 mol/l, bem como o ácido fórmico residual do processo de oxidação. Noutros analisadores, a separação de determinados aminoácidos não é satisfatória caso os produtos de hidrólise contenham um excesso de ácido fórmico e/ou uma concentração elevada de ião sódio. Nestes casos, o volume de ácido é reduzido, por evaporação, a cerca de 5 ml, após a hidrólise e antes do ajuste de pH. A evaporação deve ser realizada sob vácuo, a uma temperatura não superior a 40 °C.

#### 5. Modo operatório

##### 5.1. Preparação da amostra

A amostra é moída a uma granulometria inferior a 0,5 mm. (As amostras com elevado teor de humidade devem ser secas em estufa, a uma temperatura não superior a 50 °C, ou liofilizadas, antes da moagem). As amostras com elevado teor de gordura devem ser desengorduradas com éter de petróleo (3.12) antes da moagem.

##### 5.2. Determinação de aminoácidos livres em alimentos para animais e pré-misturas

Com aproximação a 0,2 mg, pesar num matraz uma quantidade adequada (1-5 g) de amostra preparada de acordo com 5.1 e adicionar 100,0 ml de mistura de extracção (3.21). Agitar durante 60 minutos em agitador mecânico ou magnético (4.8). Deixar sedimentar e pipetar 10,0 ml de solução sobrenadante para um matraz de 100 ml.

Adicionar, sob agitação, 5,0 ml de solução de ácido sulfosalicílico (3.22), mantendo a agitação durante 5 minutos. Filtrar ou centrifugar o sobrenadante, de modo a remover qualquer precipitado. Colocar 10,0 ml da solução num matraz de 100 ml e ajustar o pH a 2.20 com solução de hidróxido de sódio (3.18). Transferir para um balão aferido de volume adequado e completar até à marca com tampão citrato (3.24).

Caso se utilize um padrão interno, adicionar 1,00 ml (3.27.3) por cada 100 ml de solução final, antes de completar à marca com tampão (3.24).

Efectuar a análise cromatográfica de acordo com 5.4.

Se os extractos não forem sujeitos a cromatografia no mesmo dia, devem ser armazenados a uma temperatura inferior a 5 °C.

### 5.3. *Determinação dos aminoácidos totais*

#### 5.3.1. Oxidação

Pesar, com aproximação a 0,2 mg, 1 g de amostra preparada (5.1):

- num balão de fundo redondo de 100 ml (4.1), no caso de hidrólise em sistema aberto (5.3.2.3),
- num balão de fundo redondo de 250 ml (4.1), caso seja necessário um teor de sódio reduzido (5.3.3.1),
- num frasco de 100 ml munido de tampa de rosca (4.2), no caso de hidrólise em sistema fechado (5.3.2.4).

A toma de amostra para ensaio deve ter um teor aproximado de azoto de 10 mg e um teor de humidade não superior a 100 mg.

Colocar o balão ou o frasco num banho de gelo, arrefecer a 0 °C, adicionar 5 ml de mistura oxidante (3.23) e misturar com uma vareta de vidro de ponta recurva. Tapar o balão ou o frasco contendo a vareta com película impermeável ao ar, e colocar o conjunto constituído pelo recipiente tapado e o banho de gelo no frigorífico, a 0 °C, durante 16 horas. Após este período, retirar do frigorífico e destruir o excesso de oxidante por adição de 0,84 g de bissulfito de sódio (3.4).

Continuar de acordo com 5.3.2.1.

#### 5.3.2. Hidrólise

##### 5.3.2.1. Hidrólise de amostras oxidadas:

Adicionar 25 ml de mistura de hidrólise (3.20) à amostra oxidada de acordo com 5.3.1, removendo quaisquer resíduos de amostra das paredes do recipiente e da vareta. Proceder em conformidade com 5.3.2.3 ou 5.3.2.4, em função do tipo de hidrólise.

##### 5.3.2.2. Hidrólise de amostras não oxidadas:

Pesar num balão de fundo redondo de 100 ml ou 250 ml (4.1) ou num frasco munido de tampa de rosca (4.2), com aproximação a 0,2 mg, 0,1 a 1 g de amostra preparada (5.1). A quantidade pesada de amostra deve possuir um teor de cerca de 10 mg de azoto. Adicionar cuidadosamente 25 ml da mistura de hidrólise (3.20) e misturar. Proceder de acordo com 5.3.2.3 ou 5.3.2.4.

##### 5.3.2.3. Hidrólise em sistema aberto:

Juntar 3 pérolas de vidro como reguladores de ebulição à mistura preparada de acordo com 5.3.2.1 ou 5.3.2.2 e manter em ebulição contínua, sob refluxo, durante 23 horas. Após a hidrólise, lavar o refrigerante, com 5 ml de tampão citrato (3.24), pelo topo. Desmontar o conjunto e arrefecer o balão num banho de gelo. Proceder de acordo com 5.3.3.

##### 5.3.2.4. Hidrólise em sistema fechado:

Colocar o frasco que contém a mistura preparada de acordo com 5.3.2.1 ou 5.3.2.2, numa estufa (4.3) a 110 °C. Durante a primeira hora, colocar a tampa de rosca no topo do frasco *sem contudo o vedar*, de modo a evitar um aumento da pressão devido aos gases libertados e o conseqüente risco de explosão. Em seguida, vedar o frasco com a tampa de rosca e manter em estufa (4.3) durante 23 horas. Após a hidrólise, remover o frasco da estufa, abri-lo cuidadosamente e colocá-lo num banho de gelo, até arrefecer.

Com o auxílio de tampão de citratos (3.24), transferir quantitativamente o conteúdo do frasco para um matraz ou um balão de fundo redondo de 250 ml, em função do procedimento de ajuste do pH a utilizar.

Proceder de acordo com 5.3.3.

#### 5.3.3. Ajuste do pH

Para o ajuste do pH, proceder de acordo com 5.3.3.1 ou 5.3.3.2, em função da tolerância do analisador de aminoácidos ao sódio (4.9).

##### 5.3.3.1. Sistemas cromatográficos que necessitem de um teor reduzido de sódio:

É aconselhável utilizar uma solução-mãe de padrão interno (3.27.3), no caso de analisadores de aminoácidos que necessitem de um teor reduzido de sódio (uma vez que o volume de ácido deve ser reduzido).

Adicionar 2,00 ml de solução-mãe de padrão interno (3.27.3) ao hidrolisado, antes ou após a evaporação.

Adicionar 2 gotas de 1-octanol (3.15) ao hidrolisado obtido de acordo com 5.3.2.3 ou 5.3.2.4.

Em evaporador rotativo (4.7), reduzir o volume a 5-10 ml, sob vácuo, a 40 °C. Se, acidentalmente, o volume for reduzido a menos de 5 ml, o produto deve ser rejeitado e a análise recomeçada.

Ajustar o pH a 2.20 com solução de hidróxido de sódio (3.18), e proceder de acordo com 5.3.4.

#### 5.3.3.2. Restantes analisadores de aminoácidos:

Neutralizar parcialmente o hidrolisado obtido de acordo com 5.3.2.3 ou 5.3.2.4 mediante a adição cuidadosa, sob agitação, de 17 ml de solução de hidróxido de sódio (3.17), mantendo a temperatura inferior a 40 °C.

Ajustar o pH a 2.20, à temperatura ambiente, com as soluções de hidróxido de sódio (3.17) e (3.18). Proceder de acordo com 5.3.4.

#### 5.3.4. Solução de amostra para cromatografia

Com o auxílio de tampão citrato (3.24), transferir quantitativamente o produto de hidrólise com o pH ajustado (5.3.3.1 ou 5.3.3.2) para um balão aferido de 200 ml, completando até à marca com o mesmo tampão.

No caso de não se ter adicionado ainda um padrão interno, juntar 2,00 ml da solução-mãe de padrão interno (3.27.3) e completar até à marca com tampão citrato (3.24). Misturar.

Efectuar a análise cromatográfica de acordo com 5.4.

Se os hidrolisados das amostras não forem analisadas no mesmo dia, devem ser conservadas a uma temperatura inferior a 5 °C.

#### 5.4. Cromatografia

Antes de iniciar a análise cromatográfica, deixar estabilizar o extracto (5.2) ou o produto de hidrólise (5.3.4) à temperatura ambiente. Agitar a mistura e filtrar uma quantidade adequada por filtro de membrana (4.5). A solução límpida resultante é sujeita a cromatografia de troca iónica no analisador de aminoácidos (4.9).

A injeção pode ser manual ou automática. A quantidade de solução utilizada na análise dos padrões e das amostras deve ser constante, com uma aproximação de  $\pm 0,5\%$ , excepto no caso de se utilizar um padrão interno; a razão entre as concentrações de sódio e de aminoácidos na solução-padrão e na amostra deve ser tão próxima quanto possível.

A frequência dos ensaios de calibração depende da estabilidade do reagente de ninidrina e do sistema analítico em geral. O padrão ou a amostra são diluídos com tampão citrato (3.24), de modo a que a área dos picos de aminoácidos produzidos pelo padrão seja de 30-200 % da área dos correspondentes picos dos aminoácidos da amostra.

A cromatografia dos aminoácidos varia ligeiramente em função do tipo de analisador e da resina utilizada. O sistema escolhido deve permitir a separação dos aminoácidos entre si, bem como dos restantes produtos com reacção positiva à ninidrina. Além disso, o sistema deverá dar uma resposta linear à alteração das quantidades de aminoácidos injectadas, na gama das concentrações utilizadas.

Durante a cromatografia, a solução equimolar de aminoácidos deve conter, pelo menos, 30 % da quantidade máxima de cada aminoácido que pode ser determinada com exactidão no analisador de aminoácidos (4.9).

No caso dos picos correspondentes à treonina e a serina estarem parcialmente sobrepostos, a razão entre a altura do vale e a altura do menor dos dois picos sobrepostos no cromatograma não deve exceder 2:10. Caso se pretenda determinar apenas a cistina/cisteína, a metionina, a treonina e a lisina, a má resolução de dois picos adjacentes afecta a quantificação. No que respeita aos restantes aminoácidos, a separação deve ser superior a 1:10.

O sistema deve assegurar a separação da lisina das substâncias afins, e da ornitina.

#### 6. Cálculo dos resultados

Procede-se à determinação da área do pico correspondente a cada aminoácido presente na amostra e no padrão, sendo o respectivo teor, expresso em g por kg de amostra, calculado pela fórmula:

$$\frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1000} = \text{g de aminoácido por kg de amostra}$$

Caso tenha sido utilizado um padrão interno, multiplicar pelo factor  $\frac{D}{C}$ .

- A = área do pico do hidrolisado ou do extracto  
 B = área do pico da solução-padrão de calibração  
 C = área do pico do padrão interno, no hidrolisado ou no extracto  
 D = área do pico do padrão interno, na solução-padrão de calibração  
 M = massa molecular  
 c = concentração da solução-padrão, expressa em  $\mu\text{mol/ml}$   
 m = massa da amostra, corrigida em caso de secagem ou desengorduramento, expressa em g  
 V = volume do hidrolisado (5.3.4) ou volume de diluição total do extracto (6.1), expressos em ml

A cistina e a cisteína são determinadas na forma de ácido cisteico, no hidrolisado da amostra oxidada, sendo expressas em cistina ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ ,  $M = 240,30$ ), considerando  $M = 120,15$  ( $0,5 \times 240,30$ ).

A metionina é determinada na forma da respectiva metionina sulfona, no hidrolisado da amostra oxidada, sendo expressa em metionina, considerando  $M = 149,21$ .

A metionina livre adicionada é determinada na forma de metionina, após extracção, utilizando o mesmo valor de massa molecular.

- 6.1. O volume total de diluição dos extractos (V), para a determinação dos aminoácidos livres (5.2), é calculado do seguinte modo:

$$F = 100 \text{ ml} \times \frac{(10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V_{\text{ml}}}{10 \text{ ml}}$$

em que v representa o volume do extracto final.

## 7. Avaliação do método

O método foi ensaiado num estudo internacional de comparação interlaboratorial realizado em 1990 com base em quatro tipos de alimentos para animais (alimento misto para suínos, alimento composto para frangos, concentrado proteico e pré-mistura). Após eliminação dos valores isolados, obtiveram-se para a média os valores que se apresentam no quadro seguinte:

Médias, expressas em g/kg

Material de referência	Aminoácido			
	Treonina	Cistina/Cisteína	Metionina	Lisina
Alimento misto para suínos	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Alimento composto para frangos	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Concentrado proteico	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Pré-mistura	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = número de laboratórios participantes.

### 7.1. Repetibilidade

Apresentam-se de seguida os valores relativos à repetibilidade, expressos em termos de desvio-padrão intralaboratorial, obtidos na intercomparação mencionada, para os aminoácidos em estudo:



Desvio-padrão intralaboratorial ( $S_i$ ), expresso em g/kg

Material de referência	Aminoácido			
	Treonina	Cistina/Cisteína	Metionina	Lisina
Alimento misto para suínos	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Alimento composto para frangos	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Concentrado proteico	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Pré-mistura	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = número de laboratórios participantes.

Coefficiente de variação, expresso em percentagem, do desvio-padrão intralaboratorial ( $S_i$ )

Material de referência	Aminoácido			
	Treonina	Cistina/Cisteína	Metionina	Lisina
Alimento misto para suínos	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Alimento composto para frangos	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Concentrado proteico	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Pré-mistura	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = número de laboratórios participantes.

## 7.2. Reprodutibilidade

Apresentam-se no quadro seguinte os valores do desvio-padrão interlaboratorial obtidos na intercomparação mencionada;

Desvio-padrão interlaboratorial ( $S_i$ ), expresso em g/kg

Material de referência	Aminoácido			
	Treonina	Cistina/Cisteína	Metionina	Lisina
Alimento misto para suínos	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Alimento composto para frangos	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Concentrado proteico	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Pré-mistura	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = número de laboratórios participantes.

Coefficiente de variação, expresso em percentagem, do desvio-padrão interlaboratorial (S)

Material de referência	Aminoácido			
	Treonina	Cistina/Cisteína	Metionina	Lisina
Alimento misto para suínos	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Alimento composto para frangos	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Concentrado proteico	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Pré-mistura	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = número de laboratórios participantes.

#### 8. Utilização de materiais de referência

Deve verificar-se a aplicação correcta do método mediante a realização de ensaios em duplicado com materiais de referência quando disponíveis. Recomenda-se a calibração com soluções de calibração de aminoácidos certificadas.

#### 9. Observações

- 9.1. Em virtude das diferenças entre os analisadores de aminoácidos, deve tomar-se como orientação a concentração final das soluções de calibração dos aminoácidos-padrão (3.27.4 e 3.27.5) e do hidrolisado (5.3.4).

Determina-se a zona de resposta linear do aparelho para todos os aminoácidos.

Dilui-se a solução-padrão com tampão citrato de modo que os picos surjam no meio dessa zona.

- 9.2. Quando se utilizar um aparelho para HPLC para análise dos hidrolisados, as condições experimentais devem ser optimizadas de acordo com as recomendações do fabricante.
- 9.3. A aplicação do método a alimentos para animais com mais de 1 % de cloretos (concentrados, minerais, suplementos) pode originar uma subestimação da metionina, sendo por isso necessário um tratamento especial.

## PARTE B

### DOSEAMENTO DAS MATÉRIAS GORDAS BRUTAS

#### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método tem por objectivo o doseamento do teor das 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.

A utilização dos processos a seguir descritos depende da natureza e composição do alimento e da razão pela qual a análise é realizada.

##### 1.1. Processo A — Matérias gordas brutas extraíveis directamente

Este método é aplicável a materiais simples de origem vegetal, com excepção daqueles a que é aplicável o processo B.

##### 1.2. Processo B — Matérias gordas brutas totais

Este método é aplicável a materiais simples de origem animal e a todos os alimentos compostos para animais. Deve ser utilizado para todos os materiais dos quais as matérias gordas não podem ser completamente extraídas sem hidrólise prévia, como, por exemplo, glúten, leveduras, proteínas de batata e produtos submetidos a processos como a extrusão, descamação e aquecimento.

### 1.3. *Interpretação dos resultados*

Sempre que pelo processo B for obtido um resultado de valor mais elevado do que o obtido pelo processo A, o resultado obtido com o processo B será considerado como o verdadeiro valor.

## 2. **Princípio**

### 2.1. *Processo A*

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

### 2.2. *Processo B*

A amostra é tratada a quente pelo ácido clorídrico. A mistura é arrefecida e filtrada. Depois de ter sido lavado e seco, o resíduo é submetido a análise segundo o processo 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 após evaporação inferior a 2 mg/100 ml.

3.2. Sulfato de sódio, anidro.

3.3. Ácido clorídrico 3 M.

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

## 4. **Aparelhos**

4.1. Extractor. Se o dispositivo for munido de um sifão (aparelho Soxhlet), o débito do refluxo deve ser regulado de maneira a obter cerca de 10 ciclos 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. Filtros de extracção em forma de dedal, isentos de matérias solúveis no éter de petróleo, com uma porosidade compatível com as exigências do ponto 4.1.

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

## 5. **Modo operatório**

### 5.1. *Processo A (ver ponto 8.1)*

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

Colocar o filtro de extracção num extractor (4.1) e extrair durante 6 horas pelo éter de petróleo (3.1). Recolher o extracto de éter de petróleo num balão seco, contendo fragmentos de pedra pomes<sup>(1)</sup> e pesado.

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).

### 5.2. *Processo B*

Pesar, com 1 mg de aproximação, 2,5 g da amostra (ver ponto 8.2), introduzi-los num copo de 400 ml ou num balão volumétrico de 300 ml e juntar 100 ml de ácido clorídrico 3 M (3.3) e alguns fragmentos de pedra pomes. Cobrir o copo com um vidro de relógio ou munir o balão volumétrico de um condensador 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 com papel de filtro duplo, humidificado e isento de matérias gordas. Lavar o resíduo com água fria até à neutralização do filtrado. Verificar que o filtro não contém matérias gordas. A presença destas indica que antes da hidrólise deve ser efectuada uma extracção da amostra pelo éter de petróleo segundo o processo A.

Colocar o papel de filtro duplo contendo o resíduo num vidro de relógio e secar durante uma hora e meia na estufa a 100 °C ± 3 °C.

Introduzir o papel de filtro duplo contendo o resíduo seco num filtro de extracção (4.2) e cobrir com um tampão de algodão desengordurado. Colocar o filtro de extracção num extractor (4.1) e prosseguir como indicado nos segundo e terceiro parágrafos do ponto 5.1.

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

**6. Expressão dos resultados**

Expressar o peso do resíduo em percentagem da amostra.

**7. Repetibilidade**

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 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 teores superiores a 10 %.

**8. Observações**

- 8.1. Para produtos de elevado teor de matérias gordas, difíceis de triturar ou inadequados para a 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). Extrair pelo éter de petróleo (3.1), como indicado em 5.1. Completar o extracto obtido com éter de petróleo (3.1) até perfazer 500 ml e misturar. Introduzir 50 ml de solução num pequeno balão seco, contendo alguns fragmentos de pedra pomes<sup>(1)</sup> e pesado. Eliminar o solvente por destilação, secar e prosseguir como indicado no último parágrafo do ponto 5.1.

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

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

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

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 ensaio de produtos pobres em matérias gordas pode ser elevada a 5 g.
- 8.3. Os alimentos para animais de companhia com um elevado teor de água podem ter que ser misturados com sulfato de sódio anidro antes da hidrólise e extracção como através do processo B.
- 8.4. No ponto 5.2, pode ser mais eficaz utilizar água quente em vez de fria para lavar o resíduo após filtração.
- 8.5. Para alguns alimentos para animais, o tempo de secagem de 1 hora e 30 minutos pode ter que ser aumentado. A secagem excessiva deve ser evitada pois pode levar a resultados baixos. Pode também ser utilizado um forno de microndas.
- 8.6. A pré-extracção pelo processo A antes da hidrólise e a re-extracção pelo processo B são recomendadas quando o teor de matéria gorda bruta for superior a 15 %. Em certa medida, isto depende da natureza do alimento e da matéria gorda do alimento.

**PARTE C****DOSEAMENTO DO OLAQUINDOX**

N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dióxido de 2-(N-2'-(hidroxietil)carbamoil)-3-metilquinoxalina

**1. Objectivo e domínio de aplicação**

O presente método permite dosear o olaquindox nos alimentos para animais. O limite inferior de doseamento é de 5 mg/kg.

**2. Princípio**

A amostra é submetida a uma extracção por uma mistura de água e de metanol. O teor de olaquindox é determinado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de fase inversa, com detector de UV.

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

### 3. Reagentes

- 3.1. Metanol.
- 3.2. Metanol para HPLC.
- 3.3. Água para HPLC.
- 3.4. Fase móvel para HPLC.  
Mistura de água (3.3) e de metanol (3.2), 900 + 100 (V + V).
- 3.5. Substância-padrão: olaquinox puro. [N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dióxido de 2-(N-2'-(hidroxietil)carbamoil)-3-metilquinoxalina], E851.
  - 3.5.1. Solução-padrão mãe de olaquinox, 250 µg/ml:  
Pesar com uma aproximação de 0,1 mg, 50 mg de olaquinox (3.5) num balão aferido de 200 ml e acrescentar aproximadamente 190 ml de água. Colocar o balão num banho de ultra-sons (4.1) durante 20 minutos. Depois do tratamento ultra-sónico, levar a solução à temperatura ambiente, encher com água até ao traço e misturar. Envolver o balão com uma folha de alumínio e colocá-lo no frigorífico. Esta solução deve ser renovada mensalmente.
  - 3.5.2. Solução-padrão intermédia de olaquinox, 25 µg/ml:  
Transferir 10,0 ml de solução-padrão mãe (3.5.1) para um balão aferido de 100 ml, encher com a fase móvel até ao traço e misturar. Envolver o balão com uma folha de alumínio e colocá-lo no frigorífico. Esta solução deve ser renovada diariamente.
  - 3.5.3. Solução-padrão de trabalho:  
Transferir para balões aferidos de 50 ml: 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 ml da solução-padrão intermédia (3.5.2). Encher com a fase móvel (3.4) até ao traço e misturar. Envolver o balão com uma folha de alumínio. Estas soluções correspondem, respectivamente, a 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 µg de olaquinox por ml. Estas soluções devem ser renovadas diariamente.

### 4. Aparelhagem

- 4.1. Banho de ultra-sons.
- 4.2. Agitador mecânico
- 4.3. Equipamento HPLC com detector de UV de comprimento de onda variável ou um detector por díodos.
  - 4.3.1. Coluna de cromatografia de 250 mm × 4 mm, C18, partículas de 10 µm, ou equivalente.
- 4.4. Filtro de membrana de 0,45 µm.

### 5. Procedimento

*Nota:* o olaquinox é sensível à luz. Efectuar todas as operações sob luz difusa ou utilizar material de vidro ambarizado.

#### 5.1. Generalidades

- 5.1.1. Analisar um branco (alimento de referência) para verificar a ausência de olaquinox ou de substâncias interferentes.
- 5.1.2. Efectuar um teste de recuperação, analisando um branco (alimento de referência) a que se tenha adicionado uma certa quantidade de olaquinox, semelhante à que está presente na amostra. Para obter uma concentração de 50 mg/kg, transferir 10,0 ml da solução-padrão mãe (3.5.1) para um Erlenmayer de 250 ml e concentrar a solução por evaporação até cerca de 0,5 ml. Acrescentar 50 g do branco (alimento de referência), misturar cuidadosamente e esperar 10 minutos misturando do novo várias vezes antes de proceder à extracção (5.2).

*Nota:* No caso do presente método, o branco (alimento de referência), deve ser de um tipo semelhante ao da amostra, não devendo ser nele detectada a presença de olaquinox.

#### 5.2. Extracção

Pesar, com uma aproximação de 0,01 g, cerca de 50 g da amostra. Transferir para um Erlenmayer de 1 000 ml, acrescentar 100 ml de metanol (3.1) e colocar o balão durante 5 minutos num banho de ultrasons (4.1). Acrescentar 410 ml de água e deixar no banho de ultrasons durante mais 15 minutos. Retirar o Erlenmayer do banho de ultrasons, agitá-lo durante 30 minutos no agitador (4.2) e filtrar através de um filtro dobrado. Transferir 10,0 ml do filtrado para um balão aferido de 20 ml, encher até ao traço com água e misturar. Filtrar uma alíquota através de um filtro de membrana (4.4.) (ver ponto 9). Proceder ao doseamento por HPLC (5.3).

### 5.3. Doseamento por HPLC

#### 5.3.1. Parâmetros:

As condições seguintes são propostas a título indicativo, podendo ser aplicadas outras desde que forneçam resultados equivalentes.

Coluna analítica (4.3.1)

Fase móvel (3.4): mistura de água (3.3.) e de metanol (3.2), 900 + 100 (V + V)

Fluxo: 1,5 a 2 ml/minuto

Comprimento de onda de detecção: 380 nm

Volume da injeção: 20 µl-100 µl

Verificar a estabilidade do sistema cromatográfico, injectando várias vezes a solução-padrão de trabalho (3.5.3) contendo 2,5 µg/ml até se obterem alturas de pico e tempos de retenção constantes.

#### 5.3.2. Curva de calibração

Injectar cada solução de trabalho (3.5.3) várias vezes e determinar as alturas (superfícies) de pico médias para cada concentração. Estabelecer uma curva de calibração, utilizando as alturas (superfícies) de pico médias das soluções de trabalho como ordenadas e as concentrações correspondentes em µg/ml como abcissas.

#### 5.3.3. Solução da amostra

Injectar o extracto da amostra (5.2) várias vezes, utilizando o mesmo volume que o usado no caso das soluções de trabalho, e determinar a altura (superfície) média dos picos do olaquinox.

## 6. Cálculo dos resultados

A partir da altura (superfície) média dos picos do olaquinox da solução da amostra, determinar a concentração da solução da amostra em µg/ml por referência à curva de calibração (5.3.2).

O teor de olaquinox, expresso em mg/kg da amostra, é dado pela fórmula seguinte:

$$T = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

em que:

c = concentração de olaquinox no extracto da amostra (5.2) em µg/ml

m = massa da toma para análise em g.

## 7. Validação dos resultados

### 7.1. Identidade

A identidade do analito pode ser confirmada por co-cromatografia ou pela utilização de um detector por díodos que permita comparar os espectros do extracto da amostra (5.2) e da solução de trabalho (3.5.3) contendo 5,0 µg/ml.

#### 7.1.1. Co-cromatografia

Adiciona-se uma quantidade apropriada da solução de trabalho (3.5.3) a um extracto da amostra (5.2). A quantidade de olaquinox acrescentada deve ser semelhante à quantidade de olaquinox encontrada no extracto da amostra.

Apenas deve aumentar a altura do pico de olaquinox, de acordo com a quantidade acrescentada e a dissolução do extracto. A largura do pico a meio da sua altura não deve diferir mais de 10 % da largura inicial do pico de olaquinox do extracto da amostra não suplementada.

#### 7.1.2. Detecção por díodos

Avaliar os resultados de acordo com os seguintes critérios:

- O comprimento de onda de absorção máxima dos espectros da amostra e do padrão, registado no vértice do pico do cromatograma, deve estar contido dentro de uma margem determinada pelo poder de resolução do sistema de detecção. No caso da detecção por díodos, é geralmente de  $\pm 2$  nm;

- b) Entre 220 e 400 nm, os espectros da amostra e do padrão, registados no vértice do pico do cromatograma, não devem ser diferentes, para as partes do espectro situadas entre 10 e 100 % da observância relativa. Este critério é preenchido quando estão presentes os mesmos máximos e quando, em nenhum ponto observado, o desvio entre os espectros é superior a 15 % da densidade óptica do espectro no vértice do pico;
- c) Entre 220 e 400 nm da curva ascendente, do vértice e da curva descendente do pico, os espectros produzidos pelo extracto da amostra não devem ser diferentes uns dos outros para as partes do espectro situadas entre 10 e 100 % da absorvância relativa. Este critério é preenchido quando estão presentes os mesmos máximos e quando, em todos os pontos observados, o desvio entre os espectros não é superior a 15 % da absorvância do espectro no vértice do pico.

Se nenhum destes critérios for preenchido, a presença do analito não terá sido confirmada.

#### 7.2. Repetibilidade

A diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve exceder 15 % do resultado superior para teores de olaquinox entre 10 e 200 mg/kg.

#### 7.3. Recuperação

Para uma amostra de branco suplementada, a recuperação deve ser pelo menos de 90 %.

### 8. Resultados de um estudo interlaboratórios

Foi organizado um estudo interlaboratórios comunitário, no decurso do qual foram analisados, em 13 laboratórios, quatro amostras de alimento para leitões, incluindo um branco (alimento de referência). Os resultados desse estudo são apresentados em seguida:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
L	13	10	11	11
N	40	40	44	44
média (mg/kg)	—	14,6	48,0	95,4
$S_r$ (mg/kg)	—	0,82	2,05	6,36
$S_R$ (mg/kg)	—	1,62	4,28	8,42
$CV_r$ (%)	—	5,6	4,3	6,7
$CV_R$ (%)	—	11,1	8,9	8,8
conteúdo nominal (mg/kg)	—	15	50	100
Recuperação %	—	97,3	96,0	95,4

L : número de laboratórios

n : número de valores individuais

$S_r$  : desvio-padrão da repetibilidade

$S_R$  : desvio-padrão da reprodutibilidade

$CV_r$  : coeficiente de variação do desvio-padrão da repetibilidade

$CV_R$  : coeficiente de variação do desvio-padrão da reprodutibilidade.

### 9. Observação

Embora não tenha sido validado em alimentos para animais com teores de olaquinox superiores a 100 mg/kg, o método pode ser utilizado satisfatoriamente, mediante uma redução da toma de ensaio e/ou diluição do extracto da amostra (5.2), de forma a obter uma concentração no intervalo da curva de calibração (5.3.2).