

Este documento constitui um instrumento de documentação e não vincula as instituições

► B

**OITAVA DIRECTIVA DA COMISSÃO**

**de 15 de Junho de 1978**

**que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais**

(78/633/CEE)

(JO L 206 de 29.7.1978, p. 43)

Alterada por:

	Jornal Oficial		
	n.º	página	data
► <u>M1</u> Directiva 81/680/CEE da Comissão de 30 de Julho de 1981	L 246	32	29.8.1981
► <u>M2</u> Directiva 84/4/CEE da Comissão de 20 de Dezembro de 1983	L 15	28	18.1.1984

▼B**OITAVA DIRECTIVA DA COMISSÃO****de 15 de Junho de 1978****que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais**

(78/633/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 das formas de recolha de amostras e dos 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 e, nomeadamente, o seu artigo 2.º,

Considerando que a referida directiva prevê que o controlo oficial dos alimentos para animais destinado a verificar se são respeitadas as condições prescritas por disposições legislativas, regulamentares ou administrativas relativas à qualidade e composição dos alimentos para animais, seja efectuado em conformidade com as formas de recolha de amostras e os métodos de análise comunitários;

Considerando que as Directivas da Comissão 71/250/CEE de 15 de Junho de 1971 <sup>(2)</sup>, 71/393/CEE de 18 de Novembro de 1971 <sup>(3)</sup>, 72/199/CEE de 27 de Abril de 1972 <sup>(4)</sup>, 73/46/CEE de 5 de Dezembro de 1972 <sup>(5)</sup>, 74/203/CEE de 25 de Março de 1974 <sup>(6)</sup>, 75/84/CEE de 20 de Dezembro de 1974 <sup>(7)</sup> e 76/372/CEE de 1 de Março de 1976 <sup>(8)</sup> fixaram já um certo número de métodos de análise comunitários; que, tendo em atenção o estado de adiantamento dos trabalhos desde então efectuados é conveniente adoptar uma oitava série de métodos;

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*

1. Os Estados-membros deverão determinar que as análises do teor de bacitracina-zinco, flavofosfolipol, ferro, cobre, manganés e zinco em alimentos para animais e destinadas ao controlo oficial destes últimos sejam efectuadas em conformidade com os métodos descritos no anexo à presente directiva.

▼M1▼B*Artigo 2.º*

Os Estados-membros põem em vigor, o mais tardar em 1 de Janeiro de 1981, as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para darem cumprimento à presente directiva. Deste facto informarão imediatamente a Comissão.

<sup>(1)</sup> JO n.º L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.<sup>(2)</sup> JO n.º L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.<sup>(3)</sup> JO n.º L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.<sup>(4)</sup> JO n.º L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.<sup>(5)</sup> JO n.º L 83 de 30. 3. 1973, p. 21.<sup>(6)</sup> JO n.º L 108 de 22. 4. 1974, p. 7.<sup>(7)</sup> JO n.º L 32 de 5. 2. 1975, p. 26.<sup>(8)</sup> JO n.º L 102 de 15. 4. 1976, p. 8.

▼B

*Artigo 3.º*

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

▼ **B**

## ANEXO

▼ **M2**

## 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)<sup>(1)</sup>.

## 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 considerando 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 <sup>(a)</sup>

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 <sup>(b)</sup>

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 <sup>(b)</sup>

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)	

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

<sup>(a)</sup> Podem ser utilizados outros métodos desde que esteja provado que produzem suspensões bacterianas análogas.

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

▼ **M2**

- 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).
- 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 de bromocresol (4.10.) como indicador. Evaporar até cerca de 4 ml num evaporador rotativo a uma temperatura não superior a 35° C. Diluir o

▼ **M2**

resíduo 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:

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

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

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

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.

**▼ M2**

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.

Expressar 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.

**▼ B**

## 2. DOSEAMENTO DO FLAVOFOSFOLIPOL POR DIFUSÃO EM AGAR

### 1. FINALIDADE E OBJECTO DE APLICAÇÃO

Esta técnica permitirá dosear o flavofosfolipol em alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior da dosagem é de 1 mg/kg (1 ppm).

▼ **B**

## 2. PRINCÍPIO

A amostra é submetida a uma extracção por metanol diluído mediante aquecimento por refluxo. O extracto é centrifugado, purificado se necessário em resinas permutantes de iões e diluído. A sua actividade antibiótica determina-se medindo a difusão do flavofosfolipol num meio de agar, semeada com *Staphylococcus aureus*. A difusão é revelada pela formação de zonas de inibição do micro-organismo, cujo diâmetro se considera como sendo directamente proporcional ao logaritmo das concentrações utilizadas.

## 3. MICRORGANISMO: STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538 P

## 3.1. Conservação da estirpe

Semear meio de cultura (4.1), em tubos inclinados, com *Staphylococcus aureus*. Incubar 24 horas a 37 °C, conservar em frigorífico a 4 °C, aproximadamente, e renovar a sementeira todos os meses.

3.2. Preparação da suspensão bacteriana <sup>(a)</sup>

Fazer a colheita de dois tubos que contemham a cultura-mãe (3.1) e renovar a sementeira todas as semanas. Incubar 24 horas a 37 °C e conservar em frigorífico a 4 °C aproximadamente.

24 horas antes da dosagem, semear com estas culturas dois a quatro tubos inclinados contendo meio de cultura (4.1).

Incubar 16 a 18 horas a 37 °C. Seguidamente, colocar em suspensão as bactérias na solução de cloreto de sódio (4.3). A transmissão da luz na suspensão, medida a 578 nm numa espessura de 1 cm por comparação com a solução de cloreto de sódio, deverá ser de cerca de 40 %.

## 4. MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

4.1. Meio de conservação da estirpe <sup>(b)</sup>

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	15,0 g
Água	1 000 ml
pH 6,5 (após esterilização)	

## 4.2. Meio de base do doseamento

4.2.1. Camada inferior <sup>(c)</sup>

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

## 4.2.2. Camada a semear

Meio de cultura (4.1), adicionado de 2 g de emulsão anti-espuma de silicone <sup>(d)</sup>.

## 4.3. Solução de cloreto de sódio a 0,4 % (p/v): dissolver em água 4 g de cloreto de sódio p.a., diluir a 1 000 ml e esterilizar.

## 4.4. Metanol puro.

## 4.5. Metanol a 50 % (v/v): diluir 500 ml de metanol (4.4) por cada 500 ml de água

## 4.6. Metanol a 80 % (v/v): diluir 800 ml de metanol (4.4) por cada 200 ml de água.

<sup>(a)</sup> Poderão ser utilizados outros métodos desde que se prove produzirem idêntica suspensão bacteriana.

<sup>(b)</sup> Poderá ser utilizado qualquer meio de cultura comercial, de composição análoga e que dê os mesmos resultados como por exemplo o Oxoid Antibiotic Medium (CM 327), adicionado de agar Oxoid n.º 3 (L 13).

<sup>(c)</sup> Poderá ser utilizado qualquer meio de cultura comercial, de composição análoga e que dê os mesmos resultados, como por exemplo o Oxoid Antibiotic Medium 2 (CM 335), adicionado de agar Oxoid n.º 3 (L 13).

<sup>(d)</sup> Por exemplo o SE 2, de Wacker Chemie GmbH, Munique.

## ▼B

- 4.7. Tri(hidroximetil)aminometano p.a.
- 4.8. Solução metanólica, a 1,5 % (p/v) de cloreto de potássio: dissolver 1,5 g de cloreto de potássio p.a. em 20 ml de água, adicionando metanol (4.4) até à obtenção de um volume de 100 ml.
- 4.9. Permutador de catiões: Dowex 50 WX8, 20-50 mesh, forma Na (cat. Serva n.º 41600) ou equivalente.
- 4.10. Permutador de aniões: Dowex 1X2, 50-100 mesh, forma Cl (cat. Serva n.º 41010) ou equivalente. Antes da utilização, manter o producto em metanol a 80 % (4.6) durante 12-14 horas.
- 4.11. Lã de vidro.
- 4.12. Papel indicador de pH (pH 6,6-8,1)
- 4.13. Ácido ascórbico.
- 4.14. Substância padrão: flavofosfolipol de actividade conhecida.

## 5. MATERIAL

- 5.1. Tubo de vidro para cromatografia, com 9 mm de diâmetro interno e 150-200 mm de comprimento. torneira na parte mais afilada da extremidade inferior e rosca normalizada (para acoplamento do funil 5.2) na extremidade superior.
- 5.2. Funil com reservatório de 250 ml. torneira e rosca normalizada.
- 5.3. Frasco cónico de 250 ml, com rosca normalizada.
- 5.4. Refrigerador por refluxo, com rosca normalizada.

## 6. SOLUÇÕES PADRÃO

Dissolver uma quantidade rigorosamente pesada de substância-padrão (4.14) em metanol a 50 % (4.5) e diluir, para obter uma solução-mãe de flavofosfolipol a 100 µg/ml. Conservada em frasco fechada a 4 °C, esta solução manter-se-á estável durante dois meses.

Preparar, a partir desta solução e por diluições sucessivas com metanol a 50 % (4.5), as seguintes soluções:

S <sub>8</sub>	0,2 µg/ml
S <sub>4</sub>	0,1 µg/ml
S <sub>2</sub>	0,05 µg/ml
S <sub>1</sub>	0,025µg/ml

## 7. PREPARAÇÃO DO EXTRACTO

## 7.1. Extração

7.1.1. *Concentrados, pré-misturas e alimentos minerais*

Pesar de amostra 2 a 5 g e adicionar cerca de 150 mg de ácido ascórbico (4.13). Misturar com 150 mg de metanol a 50 % (4.5) num fiasco (5.3) e corrigir o pH para 8,1-8,2 mediante cerca de 400 mg de tri(hidroximetil)aminometano (4.7). Controlar o pH por meio de papel indicador (4.12). Deixar macerar 15 minutos, corrigir novamente o pH a 8,1-8,2 com tri(hidroximetil)aminometano (4.7) e ferver em seguida durante 10 minutos sob refrigeração por refluxo (5.4), mexendo sempre. Deixar arrefecer e em seguida centrifugar e decantar o extracto.

7.1.2. *Outros alimentos*

Pesar 5 a 30 g de amostra contendo pelo menos 30 µg de flavofosfolipol. Misturar com 150 ml de metanol a 50 % (4.5) num frasco (5.3) e corrigir o pH para 8,1-8,2, com cerca de 400 mg de tri(hidroximetil)aminometano (4.7), e seguidamente ferver durante 10 minutos sob refrigeração por refluxo (5.4), mexendo sempre. Deixar arrefecer e em seguida centrifugar e decantar o extracto.

7.2. **Purificação (esta operação pode ser dispensada para concentrados, pré-misturas e alimentos minerais).**

Misturar 110 ml de extracto em 11 g de permutador de catiões (4.9) e ferver durante um minuto sob refrigeração por refluxo (5.4), mexendo sempre. Separar o permutador de catiões por centrifugação ou filtração. Misturar 100 ml de extracto com 150 ml de metanol (4.4) e deixar repousar a solução 12 a 15 horas a 4 °C. Eliminar a substância floculenta por filtração a frio.

## ▼B

Fechar a extremidade inferior de um tubo (5.1) com tampão de lã de vidro (4.11), deitar no tubo 5 ml de permutador de aniões (4.10) e lavar a coluna com 100 ml de metanol a 80 % (4.6). Transvasar em seguida para a coluna, com o funil (5.2), um volume de 100 ml, pelo menos, de filtrado, que teoricamente contenha 16 µg de flavofosfolipol (200 ml por cada 30 g de alimento a 1 ppm). Se necessário diluir o filtrado antes de o transvasar para a coluna, com metanol a 80 % (4.6) para obter uma concentração teórica de flavofosfolipol de 16 µg por 100 ml. Regular o caudal de saída do líquido para cerca de 2 ml por minuto. Eliminar a totalidade do filtrado. Lavar em seguida a coluna com 50 ml de metanol a 80 % (4.6) e eliminar o filtrado.

Eluir o flavofosfolipol pela solução metanólica de cloreto de potássio (4.8), mantendo o caudal de saída a cerca de 2 ml por minuto. Recolher 50 ml de líquido eluído para uma proveta graduada, adicionar 30 ml de água e homogeneizar. O teor de flavofosfolipol desta solução deverá ser de 0,2 µg/ml (=  $U_8$ ).

### 7.3. Soluções do extracto

Se necessário (em particular nos casos em que for dispensada a purificação), diluir o extracto obtido em 7.1.1 com metanol a 50 % (4.5) para obter uma concentração teórica de flavofosfolipol de 0,2 µg/ml (=  $U_8$ ).

Preparar, a partir da solução  $U_8$  por diluições sucessivas (1 + 1) com metanol a 50 % (4.5), as soluções  $U_4$  (concentração teórica: 0,1 µg/ml),  $U_2$  (concentração teórica: 0,005 µg/ml) e  $U_1$  (concentração teórica: 0,025 µg/ml).

## 8. REGRAS DE DOSEAMENTO

### 8.1. Inoculação do meio de cultura

Semar com a suspensão bacteriana (3.2) o meio de base do doseamento (4.2.2), a cerca de 50 °C. Determinar, por ensaios preliminares com o meio (4.2.2) em placas, a quantidade de suspensão bacteriana necessária à obtenção, para as diferentes concentrações em flavofosfolipol, de zonas de inibição tão amplas quanto possível que sejam ainda bem definidas (aproximadamente 30 ml por litro).

### 8.2. Preparação das placas

A difusão em agar é feita em placas contendo 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 terá obrigatoriamente de receber as quatro concentrações-padrão e de extracto. Para o efeito, escolher placas cujas dimensões permitam a abertura no meio de agar, de pelo menos oito cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro e cujos centros não distem menos de 30 mm entre si. Podem ser utilizadas placas de vidro, debruadas com aro de alumínio ou substância plástica, de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir nas placas uma doze de meio (4.2.1) que permita obter uma camada de aproximadamente 1,5 mm de espessura (45 ml, para uma placa de 200 mm de diâmetro). Deixar solidificar e adicionar o meio (4.2.2), semeado como indicado em 8.1, em quantidade suficiente para a obtenção de uma camada de 1 mm de espessura (30 ml para uma placa de 200 mm de diâmetro). Deixar solidificar, abrir as cavidades e nelas depositar os volumes, rigorosamente medidos, das soluções-padrão e do extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidade, conforme o diâmetro).

Fazer pelo menos quatro repetições do ensaio para cada concentração, de forma a que cada determinação englobe a avaliação de 32 zonas de inibição.

### 8.3. Incubação

Incubar as placas durante 16 a 18 horas, a 28-30 °C.

## 9. AVALIAÇÃO

Medir o diâmetro das zonas de inibição até à aproximação de 0,1 mm. Para cada concentração, registar os valores médios em papel semi-logarítmico colocando o logaritmo no alinhamento dos diâmetros das zonas de inibição. Traçar as resultantes mais representativas da solução-padrão e do extracto procedendo, por exemplo, da seguinte maneira:

Determinar o ponto mais representativo do nível mais baixo observado na solução-padrão (SL), através da fórmula seguinte:

▼B

$$(a) \text{ SL} = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Determinar o ponto mais representativo do nível mais elevado observado na solução-padrão (SH) por meio da fórmula seguinte:

$$(b) \text{ SH} = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Determinar da mesma forma os pontos mais representativos do extracto, tanto para o seu nível mais baixo (UL) como para o seu nível mais elevado (UH), substituindo  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_4$  y  $S_8$ , nas fórmulas supramencionadas, 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 resultante mais representativa da solução-padrão. Procedendo da mesma forma para UL e UH, obtém-se a resultante mais representativa do extracto.

Caso não tenha havido interferências, estas resultantes deverão ser paralelas. Na prática, considerar-se-ão como estando paralelas se (SH-SL) e (UH-UL) não se afastarem em mais de 10 % da sua mediana.

Se as resultantes não forem paralelas, poder-se-á eliminar quer  $U_1$  e  $S_1$  quer  $U_8$  e  $S_8$ . Os valores SL, SH, UL e UH, que são os que permitem obter as resultantes mais fiéis, serão então calculados mediante as seguintes fórmulas:

$$(a') \text{ SL} = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \text{ ou } \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \text{ ou } \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

e fórmulas análogas para UL e UH. Nesta alternativa deve igualmente verificar-se o paralelismo das resultantes, como acima se indica. Deve ser mencionada no boletim de análise a obtenção de um resultado proveniente de três níveis.

*Sempre que as resultantes forem consideradas como estando paralelas, calcular o logaritmo da actividade relativa (log. A) por intermédio das fórmulas seguintes.*

*Para 4 níveis*

$$(c) \text{ log. A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

*Para 3 níveis*

$$(d) \text{ log. A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

$$(d') \text{ log. A} = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Actividade real = actividade teórica × actividade relativa

*Sempre que as resultantes não forem consideradas como estando paralelas, repetir a determinação. Se esta ainda não permitir atingir o paralelismo, calcular o logaritmo da actividade relativa (log. A) por meio da fórmula (c). O resultado obtido deverá, no entanto, ser considerado como meramente aproximativo, disso devendo ser feita menção no boletim de análise.*

## 10. REPRODUTIBILIDADE

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas com a mesma amostra e pelo mesmo analista não deverão ultrapassar:

0,5 mg/kg, em valor absoluto, para teores de flavofosfolipol entre 1 e 2 mg/kg,

25 % do resultado mais elevado para teores entre 2 mg/kg e até 10 mg/kg,

20 % do resultado mais elevado para teores entre 10 mg/kg e até 25 mg/kg,

**▼B**

5 mg/kg, em valor absoluto, para teores entre 25 mg/kg e até 50 mg/kg,  
10 % do resultado mais elevado para teores superiores a 50 mg/kg.

### 3. DOSEAMENTO DOS OLIGO-ELEMENTOS FERRO, COBRE, MANGANÉS E ZINCO

#### 1. FINALIDADE E OBJECTO DE APLICAÇÃO

Esta técnica permite dosar os oligo-elementos ferro, cobre, manganés e zinco em alimentos para animais. São os seguintes os valores de determinação mínimos:

ferro (Fe)	20 mg/kg,
cobre(Cu)	10 mg/kg
manganés(Mn)	20 mg/kg
zinco(Zn)	20 mg/kg

#### 2. PRINCÍPIO

A amostra é colocada em solução no ácido clorídrico, após a eventual destruição de substâncias orgânicas. Os elementos ferro, cobre, manganés e zinco são determinados, após a diluição apropriada, por espectrometria de absorção atómica.

#### 3. REAGENTES

##### Observações prévias

A água utilizada na preparação dos reagentes e das soluções necessárias ao processo de análise deverá estar isenta dos cátions a determinar, devendo obter-se mediante dupla destilação num aparelho de borosilicato ou de quartzo, ou por dupla troca em resina permutadora de iões.

Os reagentes devem ser, pelo menos, da qualidade «para análise» (p.a.). A ausência do elemento a determinar deve ser verificada por um ensaio em branco. Os reagentes podem, se necessário, ser submetidos a uma maior purificação.

As soluções-padrão adiante descritas poderão ser substituídas por soluções-padrão comerciais, desde que venham garantidas e sejam testadas antes da sua utilização.

- 3.1. Ácido clorídrico p.a.d: 1,19.
- 3.2. Ácido clorídrico p.a., 6 N.
- 3.3. Ácido clorídrico p.a., 0,5 N.
- 3.4. Ácido fluorídrico a 38-40 % (v/v), com um teor de ferro inferior a 1 mg/1 e residuo de evaporação inferior a 10 mg (expressos em sulfatos)/1.
- 3.5. Ácido sulfúrico p.a., d: 1,84.
- 3.6. Água oxigenada p.a., a aproximadamente 100 vol. de oxigénio (30 % em peso).
- 3.7. Solução-padrão de ferro (1 000 µg Fe/ml): dissolver 1 g de arame de ferro p.a. em 200 ml de ácido clorídrico 6 N (3.2), adicionar 16 ml de água oxigenada (3.6) e completar o volume com água até atingir 1 litro.
- 3.7.1. Solução-padrão de trabalho (100 µg Fe/ml): diluir a solução-padrão (3.7) em água, na proporção 1 + 9.
- 3.8. Solução-padrão de cobre (100 µg Cu/ml): dissolver 1 g de cobre em pó p.a. em 25 ml de ácido clorídrico 6 N (3.2), adicionar 5 ml de água oxigenada (3.6) e completar a solução com água até obter o volume de 1 litro.
- 3.8.1. Solução-padrão de trabalho (10 µg Cu/ml): diluir a solução-padrão (3.8) em água na proporção de 1 + 9; diluir em seguida esta solução em água, na proporção de 1 + 9.
- 3.9. Solução-padrão de manganés (1 000 µg Mn/ml): dissolver 1 g de manganés em pó p.a. em 25 ml de ácido clorídrico 6 N (3.2) e adicionar água até à obtenção de 1 litro.
- 3.9.1. Solução-padrão de trabalho (10 µg Mn/ml): diluir a solução-padrão (3.9) em água na proporção de 1 + 9; diluir seguidamente em água a solução obtida, na proporção de 1 + 9.

## ▼B

- 3.10. Solução-padrão de zinco (1 000 µg Zn/ml): dissolver 1 g de zinco, em barra ou placa p.a., em 25 ml de ácido clorídrico 6 N (3.2) e adicionar água até obter o volume 1 litro.
- 3.10.1. Solução-padrão de trabalho (10 µg Zn/ml): diluir a solução-padrão (3.10) em água na proporção de 1 + 9; diluir em seguida esta solução em água, na proporção de 1 + 9.
- 3.11. Solução de cloreto de lantâneo: dissolver 12 g de óxido de lantâneo em 150 ml de água, adicionar 100 ml de ácido clorídrico 6 N (3.2) e completar a solução com água até obter 1 litro.

## 4. MATERIAL

- 4.1. Mufla de temperatura regulável e controlável.
- 4.2. Copos em borossilicato, resistentes. Recomenda-se a utilização de material que sirva exclusivamente para dosagens de olig-elementos.
- 4.3. Cápsulas de platino, ou eventualmente quartzo.
- 4.4. Espectrofotómetro de absorção atómica, de características de sensibilidade e precisão de medida compatíveis com as exigências desta técnica.

## 5. MÉTODO

5.1. **Amostra contendo compostos orgânicos.**5.1.1. *Incineração e preparação da solução a analisar* (\*)

- i) Colocar de 5 a 10 g de amostra, pesadas até à aproximação de 0,2 mg, numa cápsula de quartzo ou platina (4.3) [ver nota b)], secar em estufa a 150 °C e introduzir a cápsula na mufla (4.1) a frio. Fechar a mufla [ver nota c)] e elevar progressivamente a sua temperatura por forma a que atinja aproximadamente 450 °C a 475 °C em 90 minutos. Manter esta temperatura durante 4 a 16 horas (durante a noite, por exemplo) para eliminar a substância carbonosa, abrir em seguida a mufla e deixar arrefecer [ver nota d)].

Humedecer as cinzas com água a transvasá-las em seguida para um copo 250 ml. Lavar a cápsula com 5 ml de ácido clorídrico (3.1) e transvasar, lentamente e com precaução, a solução de lavagem para o copo (poderá produzir-se uma reacção violenta pela formação de CO<sub>2</sub>). Em seguida adicionar gota a gota o ácido clorídrico (3.1), mexendo o conteúdo do copo até que cesse a efervescência. Evaporar a seco, mexendo regularmente com uma vareta.

Juntar ao resíduo 15 ml de ácido clorídrico 6 N (3.2) e, em seguida, aproximadamente 120 ml de água. Misturar com a vareta, deixá-la no copo, cobrindo-o com um vidro de relógio. Levar lentamente a ebulição e ferver em lume brando até que a dissolução das cinzas deixe de ser visível. Filtrar com papel filtro, sem cinzas, e recolher o filtrado para um balão de aferição de 250 ml. Lavar o copo e o filtro em 5 ml de ácido clorídrico 6 N (3.2) quente e duas vezes em água a ferver. Completar o volume com água (a concentração em HCl é aproximadamente de 0,5 N).

- ii) Se o resíduo que ficou no filtro for de cor negra (carbonosa) levá-lo de novo ao forno e incinerá-lo a 450-475 °C. Esta incineração, que requer apenas algumas horas (3 a 5 horas, aproximadamente), consider-se-á terminada quando as cinzas se apresentarem de cor branca ou quase branca. Dissolver o resíduo em aproximadamente 2 ml de ácido clorídrico (3.1), evaporá-lo a seco e adicionar 5 ml de ácido clorídrico 6 N (3.2). Aquecer, filtrar a solução para o balão de aferição e completar o volume com água (a concentração em HCl é de aproximadamente 0,5 N).

(\*) As forragens verdes (frescas ou desidratadas) são susceptíveis de conter grandes quantidades de sílica vegetal que pode reter oligo-elementos que devem ser eliminados. As amostras destes alimentos devem ser submetidas ao seguinte tratamento: efectuar a operação 5.1.1 i) até ao estágio da filtração. Lavar duas vezes em água a ferver o papel filtro que contém o resíduo insolúvel e colocá-lo numa capsula de platina (4.3). Incinerar na mufla (4.1) a uma temperatura inferior a 550 °C até desaparecer completamente toda a substância carbonosa. Deixar arrefecer, juntar algumas gotas de água, deitar em seguida 10 a 15 ml de ácido fluorídrico (3.4) e evaporar a seco, a aproximadamente 150 °C. Se o resíduo ainda contiver sílica, dissolvê-la em alguns ml de ácido fluorídrico (3.4) e evaporar a seco. Juntar 5 gotas de ácido sulfúrico (3.5) e aquecer até ao desaparecimento do fumo branco. Juntar 5 ml de ácido clorídrico 6 N (3.2) e aproximadamente 30 ml de água, aquecer, filtrar a solução num balão de aferição de 250 ml e completar o volume com água (a concentração em HCl é aproximadamente de 0,5 N). Prosseguir a operação a partir do ponto 5.1.3.

▼ **B**

Nota:

- a) Convém chamar a atenção para o risco, durante o doseamento dos oligo-elementos, de contaminação designadamente pelo zinco, cobre e ferro. É por essa razão que os instrumentos utilizados na preparação das amostras devem estar isentos destes metais.

Para reduzir o risco de contaminação, é conveniente trabalhar numa atmosfera isenta de peiras, com material rigorosamente limpo e vidros cuidadosamente lavados. O doseamento do zinco é especialmente propício à contaminação, em especial por matérias provenientes dos vidros, reagentes, poeira, etc.

- b) Calcular o peso da amostra a incinerar em função do teor estimado de oligo-elementos a dosear no alimento e da sensibilidade do espectrofotómetro utilizado. Para certos alimentos pobres em oligo-elementos, poderá ser necessário colher uma amostra de 10 a 20 g e limitar o volume da solução final a 100 ml.

- c) Incinerar num forno fechado, sem injeção de ar nem de oxigénio.

- d) A temperatura indicada pelo pirómetro não deverá ultrapassar os 475 °C.

### 5.1.2. Determinação espectrofotométrica.

#### 5.1.2.1. Preparação das soluções de aferição

Preparar por cada oligo-elemento a dosear um grama de cada solução de aferição, a partir das soluções-padrão de trabalho 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 e 3.10.1, de modo a que cada solução de aferição fique com uma concentração em HCl de aproximadamente 0,5 N e, no caso do ferro, do manganés e do zinco, uma concentração em cloreto de lantânio correspondente a 0,1 % de lantânio (p/v). As concentrações de oligo-elementos escolhidas deverão situar-se na zona de sensibilidade do espectrofotómetro utilizado. Os quadros adiante apresentados indicam, a título de exemplo, alguns tipos de composição da solução de aferição; poderá ser necessário, conforme o tipo e a sensibilidade do espectrofotómetro utilizado, optar por outras concentrações.

#### Ferro

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de solução de trabalho-padrão (3.7.1)							
(1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
+ ml HCl 6 N (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de solução de cloreto de lantânio (3.11); completar o volume com água até obter 100 ml.

#### Cobre

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solução de trabalho-padrão (3.8.1)							
(1 ml = 10 µg CU)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml HCl 6 N (3.2)	8	8	8	8	8	10	8

Completar o volume com água até obter 100 ml.

▼**B****Manganés**

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solução de trabalho-padrão (3.9.1)							
(1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml HCl 6 N (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de solução de cloreto de lantâneo (3.11); completar o volume com água até obter 100 ml.

**Zinco**

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml de solução de trabalho-padrão (3.10.1)							
(1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
+ ml HCl 6 N (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de solução de cloreto de lantâneo (3.11), completar o volume com água até obter 100 ml.

## 5.1.2.2. Preparação da solução a analisar

Para o doseamento do cobre, a solução preparada como indicado em 5.1.1 poderá, regra geral, ser utilizada directamente. Se for necessário incluir a concentração de cobre no leque das concentrações das soluções de aferição, poderá intriduzir-se por pipeta uma parte alíquota num balão de aferição de 100 ml e completado o volume obtido com ácido clorídrico 0,5 N (3.3) (ver também o ponto 8, «Observações»).

## 5.1.2.3. Ensaio em branco

Efectuar sem a amostra um ensaio em branco que inclua todas as etapas constantes do método. A solução de aferição «O» não deve ser utilizada como «branco».

## 5.1.2.4. Medição da absorção atómica

Medir a absorção das soluções de aferição e da solução a analisar utilizando uma chama oxidante ar-acetileno com os seguintes comprimentos de onda:

Fe	248,3 nm
Cu	324,8 nm
Mn	279,5 nm
Zn	213,8 nm.

Repetir quatro vezes cada medição.

## 5.2. Compostos minerais

Na ausência de matérias orgânicas é inútil a incineração prévia. Seguir o método a partir do segundo parágrafo do ponto 5.5.1 i). Pode ser dispensada a evaporação em presença de ácido fluorídrico.

## 6. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Calcular a concentração de oligo-elementos na solução a analisar, por meio de uma curva de aferição, e exprimir o resultado em mg de oligo-elemento por dada kg de amostra (ppm).

## 7. REPRODUTIBILIDADE

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com uma mesma amostra pelo mesmo analista não deverá ultrapassar:

- 5 mg/kg, em valor absoluto, para os teores de oligo-elemento visado inferiores a 50 mg/kg,
- 10 % do mais alto valor obtido nos teores entre 50 e 100 mg/kg,

**▼B**

- 10 mg/kg, em valor absoluto, para os teores entre 100 e 200 mg/kg,
- 5 % do mais alto valor obtido em teores superiores a 200 mg/kg.

## 8. OBSERVAÇÕES

A presença de grandes quantidades de fosfatos poderá influir no doseamento do ferro, manganés e zinco. Esta interferência deve ser corrigida pela adição de uma solução de cloreto de lantâneo (3.11). Se, no entanto a amostra tiver um quociente de ponderação de  $\frac{\text{Ca} + \text{Mg}}{\text{P}} > 2$ , poderá ser dispensada a adição da solução de cloreto de lantâneo (3.11) à solução a analisar e às soluções de aferição.