REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) 2024/771 DA COMISSÃO

de 29 de fevereiro de 2024

que altera o Regulamento (CE) n.º 152/2009 que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de março de 2017, relativo aos controlos oficiais e outras atividades oficiais que visam assegurar a aplicação da legislação em matéria de géneros alimentícios e alimentos para animais e das regras sobre saúde e bem-estar animal, fitossanidade e produtos fitofarmacêuticos, que altera os Regulamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 do Parlamento Europeu e do Conselho, os Regulamentos (CE) n.º 1/2005 e (CE) n.º 1099/2009 do Conselho, e as Diretivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE do Conselho, e que revoga os Regulamentos (CE) n.º 854/2004 e (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, as Diretivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE do Conselho e a Decisão 92/438/CEE do Conselho (Regulamento sobre os controlos oficiais) ([1]), nomeadamente o artigo 34.º, n.º 6,

Considerando o seguinte:

(1) O Regulamento (CE) n.º 152/2009 da Comissão ([2]) estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais.

(2) Os métodos de amostragem e análise estabelecidos pelo Regulamento (CE) n.º 152/2009 devem ser adaptados em função da evolução dos conhecimentos científicos e tecnológicos. O presente regulamento deve introduzir várias pequenas alterações, tendo em conta a experiência adquirida com a aplicação do método de análise, ou para clarificar determinadas disposições.

(3) O método de amostragem descrito no Regulamento (CE) n.º 152/2009 não é adequado no caso da amostragem para efeitos de controlo da contaminação microbiológica e, por conseguinte, está excluído do âmbito de aplicação. No entanto, na sequência da alteração introduzida pelo Regulamento (UE) n.º 691/2013 da Comissão ([3]) este método deixou de estar explicitamente excluído do âmbito de aplicação, o que gerou alguma confusão, pelo que é adequado voltar a excluí-lo explicitamente do âmbito de aplicação.

(4) É conveniente introduzir disposições específicas para a amostragem de alimentos para animais apresentados para venda pelos operadores das empresas do setor dos alimentos para animais através de técnicas de comunicação à distância, uma vez que a venda de alimentos para animais utilizando técnicas de comunicação à distância está a aumentar. Para além das disposições relativas à incerteza da medição analítica e à recuperação analítica em caso de análise de substâncias indesejáveis, essas disposições devem também ser introduzidas para a análise do teor de aditivos para a alimentação animal, por serem igualmente pertinentes nesse caso. Tendo em conta as provas de que a aplicação do método de análise para a determinação da ureia fora do âmbito da autorização da ureia como aditivo para a alimentação animal gera resultados analíticos incorretos, o âmbito desse método deve ser especificado e devem ser acrescentadas informações sobre a avaliação do método bem como os resultados de um estudo colaborativo.

(5) Vários métodos de análise estabelecidos pelo Regulamento (CE) n.º 152/2009 devem ser suprimidos, dado que já não são válidos para a finalidade a que se destinavam. O método de análise para a determinação das bases azotadas voláteis e o método de determinação dos carbonatos devem ser suprimidos, uma vez que já não existe qualquer requisito legal de controlo do cumprimento na legislação da União relativa aos alimentos para animais. O atual método de análise para a determinação do diclazuril contém erros editoriais e, por conseguinte, não gera resultados analíticos fiáveis. Deve, portanto, ser substituído por um método ajustado que tenha demonstrado fornecer

([1]) JO L 95 de 7.4.2017, p. 1.
([2]) Regulamento (CE) n.º 152/2009 da Comissão, de 27 de janeiro de 2009, que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais (JO L 54 de 26.2.2009, p. 1).
([3]) Regulamento (UE) n.º 691/2013 da Comissão, de 19 de julho de 2013, que altera o Regulamento (CE) n.º 152/2009 no que diz respeito aos métodos de amostragem e análise (JO L 197 de 20.7.2013, p. 1).

resultados fiáveis. Os novos métodos para a análise do gossipol livre e total demonstraram que o método de análise para a sua determinação, estabelecido pelo Regulamento (CE) n.º 152/2009, não fornece resultados fiáveis, pelo que deve ser suprimido e substituído por uma referência às normas europeias (normas EN). Os métodos de análise para controlar a presença ilegal de aditivos que já não são autorizados nos alimentos para animais devem ser suprimidos, uma vez que entretanto foram desenvolvidos métodos de rastreio e de análise mais sensíveis.

(6) Para além dos métodos de análise descritos nos anexos do presente regulamento, deve ser feita referência às normas EN para utilização nos controlos oficiais.

(7) Uma vez que o Regulamento de Execução (UE) 2021/2047 da Comissão ([4]) autorizou o amprólio como novo aditivo para a alimentação animal, um método de análise para a sua determinação deve ser aditado ao anexo IV do Regulamento (CE) n.º 152/2009.

(8) Dado que as alterações ao Regulamento (CE) n.º 152/2009 são substanciais e dizem respeito a várias disposições nos seus anexos, é conveniente, por razões de clareza, substituir esses anexos na íntegra.

(9) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Vegetais, Animais e Alimentos para Consumo Humano e Animal,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

Alterações do Regulamento (CE) n.º 152/2009

O Regulamento (CE) n.º 152/2009 é alterado do seguinte modo:

1) No artigo 1.º, o primeiro parágrafo passa a ter a seguinte redação:

«A amostragem para efeitos de controlo oficial de alimentos para animais, em especial no que se refere à determinação de constituintes, incluindo material que contenha ou consista em ou que seja produzido a partir de organismos geneticamente modificados (OGM), de aditivos para a alimentação animal, como definidos pelo Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho (*), ou de substâncias indesejáveis, na aceção da Diretiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho (**), é efetuada em conformidade com os métodos indicados no anexo I, com exceção da amostragem para efeitos de controlo da contaminação microbiológica.

(*) Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2003, relativo aos aditivos destinados à alimentação animal (JO L 268 de 18.10.2003, p. 29).
(**) Diretiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de maio de 2002, relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais (JO L 140 de 30.5.2002, p. 10).».

2) O anexo I é substituído pelo texto constante do anexo I do presente regulamento.

3) O anexo II é substituído pelo texto constante do anexo II do presente regulamento.

4) O anexo III é substituído pelo texto constante do anexo III do presente regulamento.

5) O anexo IV é substituído pelo texto constante do anexo IV do presente regulamento.

6) O anexo V é substituído pelo texto constante do anexo V do presente regulamento.

7) O anexo VII é substituído pelo texto constante do anexo VI do presente regulamento.

8) O anexo VIII é suprimido.

([4]) Regulamento de Execução (UE) 2021/2047 da Comissão, de 23 de novembro de 2021, relativo à autorização de cloridrato de amprólio (COXAM) como aditivo em alimentos para frangos de engorda e frangas criadas para postura (detentor da autorização: HuvePharma NV) (JO L 418 de 24.11.2021, p. 13).

Artigo 2.º

Entrada em vigor

O presente regulamento entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e diretamente aplicável em todos os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 29 de fevereiro de 2024.

Pela Comissão
A Presidente
Ursula VON DER LEYEN

ANEXO I

«*ANEXO I*

MÉTODOS DE AMOSTRAGEM

1. OBJETO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

As amostras destinadas aos controlos oficiais de alimentos para animais são colhidas de acordo com os métodos seguidamente indicados. As amostras assim obtidas serão consideradas representativas das porções amostradas.

O objetivo das amostras representativas é obter uma pequena fração de um lote, correspondendo a determinação de quaisquer características particulares dessa fração ao valor médio das características do lote. O lote é amostrado colhendo repetidamente amostras elementares em várias posições únicas do lote. Essas amostras elementares são combinadas misturando-as de forma a obter uma amostra global a partir da qual são preparadas amostras finais representativas por divisão representativa.

Se uma inspeção visual ou outra informação pertinente revelar uma diferença de qualidade entre as porções amostradas do alimento para animais e o resto do alimento para animais do mesmo lote, essas porções devem ser separadas do resto do alimento para animais e ser tratadas como um sublote separado. Se não for possível dividir o alimento para animais em sublotes separados, o produto em causa é amostrado como lote único. Nesses casos, esse facto será mencionado no relatório de amostragem.

Sempre que um alimento para animais amostrado em conformidade com as disposições do presente regulamento não satisfaça os requisitos da UE e faça parte de um lote de alimentos para animais da mesma categoria ou descrição, presume-se que todos os alimentos para animais desse lote se encontram afetados da mesma forma, a menos que, na sequência de uma avaliação rigorosa, não sejam detetados indícios de que o resto do lote não cumpre os requisitos da UE.

A amostragem pode igualmente incluir alimentos para animais apresentados para venda pelos operadores das empresas do setor dos alimentos para animais através de técnicas de comunicação à distância nos termos do artigo 11.º, n.º 3, do Regulamento (CE) n.º 767/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho ([1]). A amostragem de alimentos para animais apresentados para venda através de técnicas de comunicação à distância deve, em princípio, estar sujeita ao disposto nos pontos estabelecidos no presente anexo. Os aspetos específicos da amostragem de alimentos para animais apresentados para venda à distância encontram-se descritos no ponto 11.

2. DEFINIÇÕES

— Lote: quantidade identificada de alimentos para animais que se presume ter características uniformes, nomeadamente a origem, a variedade, o tipo de acondicionamento, o embalador, o expedidor ou a rotulagem; no caso de um processo de produção, uma quantidade do produto fabricada por uma unidade de produção de uma única unidade fabril que utilize parâmetros de produção uniformes ou por várias dessas unidades, quando produzida em ordem sequencial e armazenada em conjunto.

— Porção amostrada: lote ou uma parte identificada do lote ou sublote.

— Amostra selada: amostra selada de modo a impedir qualquer acesso à amostra sem quebrar ou remover o selo.

— Amostra elementar: quantidade colhida num ponto da porção amostrada.

— Amostra global: conjunto de amostras elementares colhidas da mesma porção amostrada.

— Amostra reduzida: parte da amostra global, obtida a partir desta através de um processo de redução representativa.

— Amostra final: parte da amostra global (misturada), da amostra reduzida ou da amostra global homogeneizada, em função do tipo de controlo (ver ponto 9.4).

— Amostra laboratorial: amostra destinada ao laboratório (como recebida pelo laboratório), que pode ser uma amostra final, reduzida ou global.

— Amostra de um alimento para venda à distância: amostra de um lote de alimentos para animais apresentados para venda através de técnicas de comunicação à distância.

([1]) Regulamento (CE) n.º 767/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 13 de julho de 2009, relativo à colocação no mercado e à utilização de alimentos para animais, que altera o Regulamento (CE) n.º 1831/2003 e revoga as Diretivas 79/373/CEE do Conselho, 80/511/CEE da Comissão, 82/471/CEE do Conselho, 83/228/CEE do Conselho, 93/74/CEE do Conselho, 93/113/CE do Conselho e 96/25/CE do Conselho e a Decisão 2004/217/CE da Comissão (JO L 229 de 1.9.2009, p. 1).

3. DISPOSIÇÕES GERAIS

— As amostras são colhidas por pessoas autorizadas para o efeito pela autoridade competente.

— Para uma amostra de um alimento para venda à distância, a autoridade competente deve solicitar uma quantidade do alimento para animais ao operador da empresa do setor de alimentos para animais, através de técnicas de comunicação à distância.

— A amostra tem de ser selada de modo a impedir qualquer acesso à amostra sem quebrar ou remover o selo.

A marca do selo tem de ser claramente identificável e visível.

— Identificação da amostra: a amostra tem de estar marcada de modo indelével e identificada de forma a garantir uma relação inequívoca com o relatório de amostragem.

— De cada amostra global ou reduzida são obtidas as seguintes amostras finais: uma amostra para efeitos de controlo (da aplicação da legislação) e uma destinada ao operador da empresa do setor dos alimentos para animais (para efeitos de recurso). Pode ser obtida uma amostra final adicional, para efeitos de arbitragem. Caso a amostra global completa esteja homogeneizada, as amostras finais são obtidas a partir da amostra global homogeneizada, desde que esse procedimento não colida com as regras dos Estados-Membros em matéria de direitos do operador.

— Nos termos do artigo 15.º, n.os 1 e 2, do Regulamento (UE) 2017/625, quando necessário para a realização da amostragem oficial e sempre que solicitado pelas autoridades competentes, os operadores das empresas do setor dos alimentos para animais devem:

  — facultar ao pessoal das autoridades competentes o acesso ao equipamento sob o seu controlo, incluindo, se for caso disso, a disponibilização do equipamento para a colheita de amostras e do equipamento de proteção individual necessários,

  — prestar apoio e cooperar com o pessoal das autoridades competentes a fim de permitir a amostragem, nomeadamente disponibilizando os alimentos para animais ao pessoal das autoridades competentes.

4. EQUIPAMENTO

4.1. O equipamento destinado à colheita de amostras deve ser fabricado com materiais que não contaminem os produtos amostrados. O equipamento destinado a ser utilizado várias vezes tem de ser fácil de limpar para evitar contaminações cruzadas.

4.2. **Equipamento recomendado para a amostragem dos alimentos sólidos**

4.2.1. *Amostragem manual*

4.2.1.1. Pá de amostragem com fundo plano e bordos verticais.

4.2.1.2. Sonda de fenda longa ou compartimentada. As dimensões da sonda têm de ser adequadas às características da porção amostrada (profundidade do recipiente, dimensões do saco, etc.) e ao tamanho das partículas que compõem o alimento.

Se a sonda tiver várias aberturas, para garantir que a amostra é colhida em diferentes sítios, as aberturas devem ser separadas por compartimentos ou por aberturas sequenciais.

4.2.2. *Amostragem mecânica*

Podem ser utilizados aparelhos mecânicos apropriados para a amostragem de alimentos em movimento. O aparelho mecânico será considerado adequado se, pelo menos, toda a secção do caudal for amostrada.

A amostragem de alimentos em movimento (em caudais elevados) pode ser efetuada por sistemas automáticos de recolha de amostras.

4.2.3. *Divisor*

Quando possível e adequado, devem ser utilizados aparelhos destinados a dividir a amostra em partes aproximadamente iguais, para a preparação de amostras reduzidas de uma forma representativa.

5. REQUISITOS QUANTITATIVOS QUANTO AO NÚMERO DE AMOSTRAS ELEMENTARES

— Os requisitos quantitativos estabelecidos nos pontos 5.1 e 5.2 no que se refere ao número de amostras elementares são aplicáveis a porções com uma dimensão máxima de 500 toneladas e que podem ser amostradas de forma representativa. O procedimento de amostragem descrito é igualmente válido para quantidades superiores à porção máxima prescrita, desde que o número máximo de amostras elementares indicado nos quadros seguintes, constantes dos pontos 5.1.1, 5.1.3 e 5.1.5, seja ignorado, passando a ser determinado pela fórmula de raiz quadrada apresentada na parte respetiva do procedimento (ver ponto 5.3), e na condição de a dimensão mínima da amostra global ser aumentada proporcionalmente. Tal não impede que um lote grande possa ser dividido em sublotes de menor dimensão e que cada sublote seja amostrado em conformidade com o procedimento descrito nos pontos 5.1 e 5.2.

— A dimensão da porção amostrada tem de ser suficiente para permitir a amostragem de todas as partes que a compõem.

— Para lotes ou sublotes muito grandes (> 500 toneladas) e para lotes cujo transporte ou armazenagem não permita uma amostragem segundo o procedimento estabelecido nos pontos 5.1 e 5.2 do presente ponto, deve aplicar-se o procedimento de amostragem indicado no ponto 5.3.

— Para amostras de alimentos para venda à distância, o tamanho do lote a partir do qual a quantidade do alimento é solicitada, geralmente não é conhecido pela autoridade competente. Por conseguinte, o procedimento estabelecido nos pontos 5.1 e 5.2 não pode ser utilizado. Neste caso, aplicar-se-á o processo descrito no ponto 11.

— Se for legalmente exigida ao operador da empresa do setor de alimentos para animais a aplicação do presente regulamento no âmbito de um sistema obrigatório de controlo, o operador pode divergir dos requisitos quantitativos estabelecidos no presente ponto, para ter em conta determinadas características operacionais, desde que demonstre cabalmente à autoridade competente a equivalência do procedimento de amostragem em termos de representatividade e após autorização dessa autoridade.

— Em casos excecionais, quando não seja possível aplicar o método de amostragem previsto no que diz respeito aos requisitos quantitativos, devido a danos comerciais inaceitáveis do lote (relacionados com o tipo de acondicionamento, meios de transporte, armazenagem, etc.), pode ser aplicado um método de amostragem alternativo, desde que seja tão representativo quanto possível e esteja plenamente descrito e documentado.

5.1. **Requisitos quantitativos das amostras elementares respeitantes ao controlo de substâncias ou produtos repartidos uniformemente nos alimentos para animais**

5.1.1. *Alimentos sólidos a granel*

Dimensão da porção amostrada	Número mínimo de amostras elementares
≤ 2,5 toneladas	7
> 2,5 toneladas	√ (20 vezes o número de toneladas que constituem a porção amostrada) (*) , até 40 amostras elementares

(*) Sempre que o número obtido for fracionário, deve ser arredondado para o inteiro imediatamente superior.

5.1.2. *Alimentos líquidos a granel*

Dimensão da porção amostrada	Número mínimo de amostras elementares
≤ 2,5 toneladas ou ≤ 2 500 litros	4 (*)
> 2,5 toneladas ou > 2 500 litros	7 (*)

(*) No caso de não ser possível homogeneizar o líquido, o número de amostras elementares tem de ser aumentado.

5.1.3. *Alimentos embalados*

Os alimentos para animais (sólidos e líquidos) podem ser embalados em sacos, latas, barricas, etc., que são referidos no quadro seguinte enquanto unidades. As unidades de grande dimensão (≥ 500 kg ou litros) têm de ser amostradas em conformidade com as disposições estabelecidas para os alimentos a granel (ver 5.1.1 e 5.1.2).

Dimensão da porção amostrada	Número mínimo de unidades a partir do qual deve ser obtida (pelo menos) uma amostra elementar (*)
1 a 20 unidades	1 unidade (**)
21 a 150 unidades	3 unidades (**)
151 a 400 unidades	5 unidades (**)
> 400 unidades	¼ de √ (número de unidades que compõem a porção amostrada) (***) , até 40 unidades

(*) Sempre que a abertura de uma unidade possa afetar a análise (p. ex., no caso de alimentos húmidos perecíveis), a amostra elementar é composta pela unidade não aberta.
(**) Para unidades cujo conteúdo não exceda 1 kg ou 1 litro, a amostra elementar é composta pelo conteúdo de uma unidade de origem.
(***) Sempre que o número obtido for fracionário, deve ser arredondado para o inteiro imediatamente superior.

5.1.4. *Alimentos em blocos e pedras minerais para lamber*

Será considerado, no mínimo, um bloco ou pedra para lamber por cada porção amostrada de 25 unidades e, no máximo, quatro destes produtos.

Para blocos ou pedras para lamber cujo peso unitário não exceda 1 kg, a amostra elementar é composta pelo conteúdo de um bloco ou pedra para lamber.

5.1.5. *Alimentos grosseiros/forragem*

Dimensão da porção amostrada	Número mínimo de amostras elementares (*)
≤ 5 toneladas	5
> 5 toneladas	√ (5 vezes o número de toneladas que constituem a porção amostrada) (**) , até 40 amostras elementares

(*) É um facto que, em certas situações (p. ex. na silagem) não é possível recolher as amostras elementares exigidas, sem causar danos inaceitáveis ao lote. Nessas situações, pode ser aplicado um método alternativo de amostragem, tendo sido elaborado um guia para a amostragem desses lotes, que se encontra disponível em: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/ /animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf
(**) Sempre que o número obtido for fracionário, deve ser arredondado para o inteiro imediatamente superior.

5.2. **Requisitos quantitativos das amostras elementares respeitantes ao controlo de constituintes ou substâncias suscetíveis de não estarem repartidos uniformemente nos alimentos para animais**

Estes requisitos quantitativos das amostras elementares devem ser aplicados nas seguintes situações:

— controlo de aflatoxinas, cravagem do centeio, outras micotoxinas e impurezas botânicas prejudiciais nas matérias-primas para a alimentação animal,

— controlo da contaminação cruzada por um constituinte, incluindo material geneticamente modificado, ou uma substância suscetível de repartição não uniforme nos alimentos para animais.

Sempre que a autoridade de controlo suspeitar fortemente de que essa repartição não uniforme também se verifica em caso de contaminação cruzada por um constituinte ou substância em alimentos compostos, podem ser aplicados os requisitos quantitativos previstos no quadro seguinte.

Dimensão da porção amostrada	Número mínimo de amostras elementares
< 80 toneladas	Ver requisitos quantitativos no ponto 5.1. O número de amostras elementares a colher tem de ser multiplicado por 2,5.
≥ 80 toneladas	100

5.3. **Requisitos quantitativos das amostras elementares no caso de lotes muito grandes**

No caso de porções amostradas muito grandes (porções amostradas > 500 toneladas), o número de amostras elementares a colher = 40 amostras elementares + √toneladas em relação ao controlo das substâncias ou produtos repartidos uniformemente nos alimentos para animais, ou 100 amostras elementares + √toneladas em relação ao controlo de constituintes ou substâncias suscetíveis de não estarem repartidos uniformemente nos alimentos para animais.

6. REQUISITOS QUANTITATIVOS DA AMOSTRA GLOBAL

É necessária uma única amostra global por porção amostrada.

	Natureza dos alimentos para animais	Dimensão mínima da amostra global (*) (**)
6.1.	Alimentos a granel	4 kg
6.2.	Alimentos embalados	4 kg (***)
6.3.	Alimentos líquidos ou semilíquidos	4 litros
6.4.	Alimentos em blocos ou pedras minerais para lamber:	
6.4.1.	peso unitário superior a 1 kg	4 kg
6.4.2.	peso unitário não superior a 1 kg	peso de quatro blocos ou pedras de origem
6.5.	Alimentos grosseiros/forragem	4 kg (****)

(*) No caso de o alimento para animais amostrado ter elevado valor, pode ser obtida uma quantidade mais pequena de amostra global na condição de este facto estar descrito e documentado no relatório de amostragem.

(**) Em conformidade com as disposições do Regulamento (UE) n.º 619/2011 da Comissão, de 24 de junho de 2011, que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais no que respeita à presença de material geneticamente modificado cujo procedimento de autorização está pendente ou cuja autorização expirou (JO L 166 de 25.6.2011, p. 9), a amostra global para controlar a presença de material geneticamente modificado tem de conter, pelo menos, 35 000 sementes/grãos. Tal significa que para o milho a dimensão da amostra global deve ser de pelo menos 10,5 kg e para a soja de 7 kg. No caso de outras sementes e grãos de cereais como a cevada, o painço, a aveia, o arroz, o centeio, o trigo e a colza, a dimensão da amostra global de 4 kg corresponde a mais de 35 000 sementes/grãos.

(***) No caso de alimentos embalados, pode também não ser possível atingir a dimensão de 4 kg para a amostra global devido à dimensão das unidades individuais.

(****) No caso de alimentos grosseiros/forragem com baixa densidade relativa (p. ex., o feno e a palha), a amostra global deve ter uma dimensão mínima de 1 kg.

7. REQUISITOS QUANTITATIVOS DAS AMOSTRAS FINAIS

Amostras finais

É exigida a análise de pelos menos uma amostra final. A dimensão da amostra final destinada a análise não pode ser inferior às quantidades seguintes:

Alimentos sólidos	500 g (*) (**) (***) (****)
Alimentos líquidos ou semilíquidos	500 ml (*)

(*) Em conformidade com as disposições do Regulamento (UE) n.º 619/2011, a amostra final para o controlo da presença de material geneticamente modificado deve conter, pelo menos, 10 000 sementes/grãos. Tal significa que para o milho a dimensão da amostra final deve ser de pelo menos 3 000 g e para a soja de 2 000 g. No caso de outras sementes e grãos de cereais como a cevada, o painço, a aveia, o arroz, o centeio, o trigo e a colza, a dimensão da amostra final de 500 g corresponde a mais de 10 000 sementes/grãos.

(**) Se a dimensão da amostra global for significativamente inferior a 4 kg ou litros (ver notas de rodapé, ponto 6), também pode ser colhida uma quantidade menor de amostra final na condição de este facto estar descrito e documentado no relatório de amostragem.

(***) Em caso de amostragem de leguminosas, grãos de cereais e frutos de casca rija para determinação de resíduos de pesticidas, a dimensão mínima da amostra final é de 1 kg em conformidade com as disposições da Diretiva 2002/63/CE da Comissão, de 11 de julho de 2002, que estabelece métodos de amostragem comunitários para o controlo oficial de resíduos de pesticidas no interior e à superfície de produtos de origem vegetal ou animal e revoga a Diretiva 79/700/CEE (JO L 187 de 16.7.2002, p. 30).

(****) Em caso de análise por inspeção visual ou por microscopia, a dimensão da amostra final para análise deve ser de 1 kg.

8. MÉTODO DE AMOSTRAGEM PARA LOTES MUITO GRANDES OU LOTES ARMAZENADOS OU TRANSPORTADOS DE MODO A NÃO PERMITIR UMA AMOSTRAGEM DE TODO O LOTE

8.1. **Princípios gerais**

Sempre que o tipo de transporte ou armazenagem de um lote não permita colher amostras elementares em todo o lote, a amostragem deve ser, de preferência, efetuada enquanto o lote estiver em movimento.

No caso de grandes armazéns destinados a alimentos para animais, os operadores devem ser incentivados a instalar equipamentos nos armazéns que permitam uma amostragem (automática) em todo o lote armazenado.

Em caso de aplicação dos procedimentos de amostragem previstos no presente ponto, o operador da empresa do setor de alimentos para animais ou o seu representante são informados acerca desses procedimentos. Se os referidos procedimentos de amostragem forem questionados pelo operador ou pelo seu representante, o operador ou o seu representante deve permitir que a autoridade competente proceda à amostragem em todo o lote a expensas do operador.

8.2. **Lotes grandes transportados por navio**

8.2.1. *Amostragem dinâmica de lotes grandes transportados por navio*

A amostragem de lotes grandes nos navios deve ser preferencialmente realizada enquanto o produto está em movimento (amostragem dinâmica).

A amostragem é feita por porão, podendo os porões estar fisicamente separados. Todavia, os porões são esvaziados parcialmente um após outro, deixando essa separação física inicial de existir após a transferência para as instalações de armazenamento. A amostragem pode, portanto, ser efetuada em função da separação física inicial ou da separação existente após transferência para as referidas instalações.

A descarga de um navio pode durar vários dias. Normalmente, as amostras têm de ser colhidas a intervalos regulares durante todo o período de descarga. Contudo, nem sempre é possível ou adequado para um inspetor oficial estar presente para amostragem durante toda a operação de descarga. Por conseguinte, é permitida a amostragem de uma parte (porção amostrada) da totalidade do lote. O número de amostras elementares é determinado em função da dimensão da porção amostrada.

Sempre que seja amostrada uma parte de um lote de alimentos para animais da mesma categoria ou descrição e seja considerado que essa parte do lote não satisfaz os requisitos da UE, presume-se que todos os alimentos para animais desse lote se encontram afetados da mesma forma, a menos que, na sequência de uma avaliação rigorosa, não sejam detetados indícios de que o resto do lote não cumpre os requisitos da UE.

Mesmo quando a amostragem oficial é efetuada de forma automática, é necessária a presença de um inspetor. Contudo, se a amostragem automática utilizar parâmetros preestabelecidos que não possam ser alterados durante a amostragem e se as amostras elementares forem recolhidas num recipiente selado, impedindo qualquer possível fraude, a presença de um inspetor só é exigida no início da amostragem, de cada vez que tenha de ser mudado o recipiente das amostras, e no final da amostragem.

8.2.2. *Amostragem estática de lotes transportados por navio*

No caso de a amostragem ser realizada de forma estática, têm de ser aplicados os procedimentos previstos para as instalações de armazenagem (silos) acessíveis pelo topo (ver ponto 8.4.1).

A amostragem tem de ser efetuada através da parte acessível (do topo) do lote/porão. O número de amostras elementares é determinado em função da dimensão da porção amostrada. Sempre que seja amostrada uma parte de um lote de alimentos para animais da mesma categoria ou descrição e seja considerado que essa parte do lote não satisfaz os requisitos da UE, presume-se que todos os alimentos para animais desse lote se encontram afetados da mesma forma, a menos que, na sequência de uma avaliação rigorosa, não sejam detetados indícios de que o resto do lote não cumpre os requisitos da UE.

8.3. **Amostragem de lotes grandes armazenados em armazéns**

A amostragem tem de ser efetuada através da parte acessível do lote. O número de amostras elementares é determinado em função da dimensão da porção amostrada. Sempre que seja amostrada uma parte de um lote de alimentos para animais da mesma categoria ou descrição e seja considerado que essa parte do lote não satisfaz os requisitos da UE, presume-se que todos os alimentos para animais desse lote se encontram afetados da mesma forma, a menos que, na sequência de uma avaliação rigorosa, não sejam detetados indícios de que o resto do lote não cumpre os requisitos da UE.

8.4. **Amostragem de instalações de armazenagem (silos)**

8.4.1. *Amostragem de silos (facilmente) acessíveis pelo topo*

A amostragem tem de ser efetuada através da parte acessível do lote. O número de amostras elementares é determinado em função da dimensão da porção amostrada. Sempre que seja amostrada uma parte de um lote de alimentos para animais da mesma categoria ou descrição e seja considerado que essa parte do lote não satisfaz os requisitos da UE, presume-se que todos os alimentos para animais desse lote se encontram afetados da mesma forma, a menos que, na sequência de uma avaliação rigorosa, não sejam detetados indícios de que o resto do lote não cumpre os requisitos da UE.

8.4.2. *Amostragem de silos não acessíveis pelo topo (silos fechados)*

8.4.2.1. Silos não acessíveis pelo topo (silos fechados) com dimensão > 100 toneladas

Os alimentos para animais armazenados neste tipo de silos não podem ser amostrados de forma estática. Por conseguinte, sempre que os alimentos para animais no silo tenham de ser amostrados e não exista possibilidade de movê-los, é estabelecido um acordo com o operador no sentido de informar o inspetor sobre o momento em que o silo será descarregado, para que possa ser realizada uma amostragem dinâmica dos alimentos.

8.4.2.2. Silos não acessíveis pelo topo (silos fechados) com dimensão < 100 toneladas

O procedimento de amostragem envolve a introdução num recipiente de uma quantidade de 50 kg a 100 kg e a recolha de uma amostra a partir dessa quantidade. A dimensão da amostra global corresponde a todo o lote e o número de amostras elementares é determinado em função da quantidade libertada do silo para o recipiente de amostragem. Sempre que seja amostrada uma parte de um lote de alimentos para animais da mesma categoria ou descrição e seja considerado que essa parte do lote não satisfaz os requisitos da UE, presume-se que todos os alimentos para animais desse lote se encontram afetados da mesma forma, a menos que, na sequência de uma avaliação rigorosa, não sejam detetados indícios de que o resto do lote não cumpre os requisitos da UE.

8.5. **Amostragem de alimentos a granel em contentores grandes fechados**

Muitas vezes, estes lotes só podem ser amostrados quando descarregados. Em determinados casos, não é possível proceder à descarga no ponto de importação ou de controlo, devendo a amostragem ter lugar quando os contentores são descarregados.

9. INSTRUÇÕES RELATIVAS À COLHEITA, À PREPARAÇÃO E AO ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

9.1. **Generalidades**

As amostras devem ser colhidas e preparadas tão rapidamente quanto possível, tendo em conta as precauções necessárias para evitar que o produto seja alterado ou contaminado. Os instrumentos, as superfícies e os recipientes destinados a receber as amostras têm de estar limpos e secos.

9.2. **Amostras elementares**

As amostras elementares têm de ser colhidas, aleatoriamente e de forma uniforme em termos de repartição, em toda a porção de amostragem e apresentar dimensões aproximadamente equivalentes.

As amostras elementares têm uma dimensão mínima de 100 g ou 25 g em caso de alimentos grosseiros/forragem com baixa densidade relativa.

Sempre que, em conformidade com as regras dos procedimentos de amostragem estabelecidas no ponto 8, tenham de ser colhidas menos de 40 amostras elementares, a dimensão dessas amostras é determinada em função da dimensão exigida para a amostra global (ver ponto 6).

No caso de amostragem de pequenos lotes de alimentos embalados relativamente aos quais, de acordo com os requisitos quantitativos, tenha de ser colhido um número limitado de amostras elementares, cada amostra elementar será composta pelo conteúdo de uma unidade de origem cujo conteúdo não exceda 1 kg ou 1 litro.

Em caso de amostragem de alimentos embalados constituídos por pequenas unidades (p. ex., < 250 g), a dimensão das amostras elementares depende da dimensão de cada unidade.

No caso de amostras de alimentos para venda à distância, a dimensão das amostras elementares depende da dimensão de cada unidade e pode, em casos específicos, ser inferior a 100 g ou a 100 ml.

9.2.1. *Alimentos a granel*

Sempre que adequado, a colheita das amostras pode ser efetuada quando da movimentação do lote (carga ou descarga).

9.2.2. *Alimentos embalados*

Após seleção do número requerido de unidades amostradas, como indicado no ponto 5, procede-se à colheita de uma parte do conteúdo de cada unidade com o auxílio de uma sonda ou pá. Sempre que necessário, as amostras são colhidas depois de se esvaziar separadamente as unidades.

9.2.3. *Alimentos líquidos ou semilíquidos homogéneos ou homogeneizáveis*

Após seleção do número requerido de unidades amostradas, como indicado no ponto 5, procede-se à colheita de uma quantidade em cada unidade após se ter homogeneizado o conteúdo, se necessário.

As amostras elementares podem ser colhidas quando da descarga do produto.

9.2.4. *Alimentos líquidos ou semilíquidos não homogeneizáveis*

Após seleção do número requerido de unidades amostradas, como indicado no ponto 5, procede-se à colheita das amostras a diferentes níveis.

As amostras podem igualmente ser colhidas quando da descarga do produto, mas rejeitando as primeiras frações.

Nos dois casos, o volume total colhido não pode ser inferior a 10 litros.

9.2.5. *Alimentos em blocos e pedras minerais para lamber*

Após seleção do número requerido de blocos ou pedras para lamber amostradas, como indicado no ponto 5, pode ser colhida uma parte de cada bloco ou pedra. Em caso de suspeita de bloco ou pedra não homogéneo, todo o bloco ou pedra pode ser colhido como amostra.

Para blocos ou pedras para lamber cujo peso unitário não exceda 1 kg, a amostra elementar é composta pelo conteúdo de um bloco ou pedra para lamber.

9.3. **Preparação das amostras globais**

As amostras elementares devem ser misturadas para formar uma só amostra global.

9.4. **Preparação das amostras finais**

O material da amostra global deve ser misturado cuidadosamente ([2]).

([2]) Se necessário, esmagar os aglomerados (separando-os eventualmente da massa e reconstituindo em seguida o todo).

Introduzir cada amostra num recipiente apropriado. Tomar todas as precauções necessárias para evitar qualquer modificação da composição da amostra ou qualquer contaminação ou adulteração que possam ocorrer no decurso do transporte ou armazenagem.

9.4.1. *Substâncias repartidas uniformemente*

No caso de controlo de constituintes ou substâncias repartidos uniformemente nos alimentos para animais, a amostra global pode ser reduzida de forma representativa para, pelo menos, 2,0 kg ou 2,0 litros (amostra reduzida) ([3]) de preferência utilizando um divisor mecânico ou automático. Para controlar a presença de resíduos de pesticidas em leguminosas, grãos de cereais, e frutos de casca rija, a dimensão mínima da amostra reduzida será de 3 kg. Se a natureza dos alimentos para animais não permitir a utilização de um divisor ou não estiver disponível um divisor, a amostra pode ser reduzida pelo método dos quartos.

A partir das amostras globais ou das amostras reduzidas, podem ser colhidas as amostras finais (para efeitos de controlo, recurso e eventualmente arbitragem), tendo aproximadamente a mesma quantidade e respeitando os requisitos quantitativos indicados no ponto 7.

9.4.2. *Substâncias repartidas não uniformemente*

No caso de controlo de constituintes, incluindo material geneticamente modificado, ou substâncias suscetíveis de não estarem repartidos uniformemente nos alimentos para animais, a amostra global deve ser:

i) completamente homogeneizada. A partir das amostras globais homogeneizadas, podem depois ser colhidas as amostras finais (para efeitos de controlo, recurso e eventualmente arbitragem), tendo aproximadamente a mesma quantidade e respeitando os requisitos quantitativos indicados no ponto 7, ou

ii) reduzida para, pelo menos, 2 kg ou 2 litros ([4]), utilizando um divisor mecânico ou automático. Apenas quando a natureza dos alimentos para animais não permita a utilização de um divisor, pode a amostra, se necessário, ser reduzida pelo método dos quartos. Para controlar a presença de material geneticamente modificado no âmbito do Regulamento (UE) n.º 619/2011, a amostra reduzida tem de conter, pelo menos, 35 000 sementes/grãos para obter amostras finais destinadas ao controlo, recurso e eventualmente arbitragem contendo, no mínimo, 10 000 sementes de cereais [ver nota de rodapé (**) no ponto 6 e nota de rodapé (*) no ponto 7].

A partir das amostras reduzidas, podem ser colhidas as amostras finais, tendo aproximadamente a mesma quantidade e respeitando os requisitos quantitativos indicados no ponto 7.

9.5. **Acondicionamento das amostras**

Os recipientes são selados e rotulados de forma a impedir a sua abertura sem danificação do selo. O rótulo deve estar totalmente incorporado no selo. Em alternativa, a amostra pode ser colocada num recipiente que terá de ser fechado de forma a não permitir a sua abertura sem danificação irreversível e a impedir a sua reutilização.

9.6. **Envio das amostras para o laboratório**

As amostras são enviadas sem atrasos desnecessários para o laboratório de análises designado, juntamente com a informação necessária para proceder à análise.

10. REGISTO DA AMOSTRAGEM

Tem de ser efetuado um registo de cada amostra, identificando claramente cada porção amostrada e a respetiva dimensão.

O registo deve igualmente mencionar qualquer desvio do procedimento de amostragem previsto no presente regulamento.

Além de disponibilizado ao laboratório de controlo oficial, o registo deve ser facultado ao operador da empresa do setor de alimentos para animais e/ou ao laboratório designado pelo operador.

([3]) Exceto no caso de alimentos grosseiros/forragem com baixa densidade relativa.
([4]) Exceto no caso de alimentos grosseiros/forragem com baixa densidade relativa.

11. AMOSTRAS DE ALIMENTOS PARA VENDA À DISTÂNCIA

— Para uma amostra de alimentos para venda à distância, o alimento para animais deve ser solicitado ao operador da empresa do setor de alimentos para animais através de técnicas de comunicação à distância. Neste caso, quando a autoridade competente solicita os alimentos para animais não é obrigada a identificar-se com uma identidade oficial ao operador da empresa do setor dos alimentos para animais, podendo utilizar uma identidade falsa.

— A amostra global e as amostras finais da amostra do alimento para venda à distância têm de ser colhidas imediatamente após a receção da remessa por pessoas autorizadas para o efeito. Para preparar a amostra global, tem de ser colhido, aleatoriamente e de forma uniforme em termos de repartição, um número adequado de amostras elementares a partir da quantidade total obtida, que é depois misturado cuidadosamente ou homogeneizado, em conformidade, tanto quanto possível, com os princípios estabelecidos nos pontos 5, 9.2 e 9.3. Se os alimentos para animais forem embalados em unidades individuais, devem ser obtidas no mínimo quatro unidades, a partir das quais é colhida pelo menos uma amostra elementar. Em casos individuais, quando haja conhecimento de que as unidades são provenientes de lotes diferentes, o número de unidades a amostrar tem de ser reduzido e limitado às unidades do mesmo lote. No caso da análise a amostras de alimentos para venda à distância para deteção de constituintes ou substâncias repartidos não uniformemente no alimento para animais, o número de amostras elementares tem de ser, pelo menos, 2,5 vezes superior ao das amostras analisadas para deteção de substâncias repartidas uniformemente no alimento.

  A partir das amostras globais são então colhidas as amostras finais correspondentes (para efeitos de controlo, recurso e eventualmente arbitragem), em conformidade, tanto quanto possível, com os princípios estabelecidos no ponto 9.4 e é declarado no relatório de amostragem que se trata de uma amostra de alimento para venda à distância. De seguida, a autoridade competente informa imediatamente o operador da empresa do setor de alimentos para animais acerca da amostragem. O operador é igualmente notificado de que, sempre que possível, uma amostra (de recurso) detida pela autoridade competente se encontra à sua disposição numa localização específica, para efeitos de recurso, ou foi enviada para o operador da empresa do setor de alimentos para animais, ou foi enviada para o laboratório designado pelo operador, em conformidade com as normas nacionais em vigor.

  Se a amostra for enviada diretamente para o laboratório oficial, a amostra final tem de ser preparada e selada no laboratório por pessoas autorizadas para o efeito ou na presença de pessoas autorizadas para o efeito. O relatório de amostragem da amostra do alimento para venda à distância tem de ser enviado imediatamente após a preparação das amostras finais para a autoridade competente, que informa o operador da empresa do setor de alimentos para animais acerca da amostragem.

  Considera-se que a quantidade fornecida pelo operador da empresa do setor de alimentos para animais à autoridade competente representa uma parte de um lote de alimentos para animais da mesma categoria ou descrição. Nos termos do artigo 15.º do Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho ([5]), se se concluir que essa parte do lote não satisfaz os requisitos da UE, presume-se que todos os alimentos para animais desse lote se encontram afetados da mesma forma, incluindo no caso de amostras de alimentos para venda à distância, a menos que, na sequência de uma avaliação rigorosa, não sejam detetados indícios de que o resto do lote não cumpre os requisitos da UE.»

([5]) Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios (JO L 31 de 1.2.2002, p. 1).

ANEXO II

«*ANEXO II*

DISPOSIÇÕES GERAIS RELATIVAS AOS MÉTODOS DE ANÁLISE DOS ALIMENTOS PARA ANIMAIS

A. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE

1. **Objeto**

Os procedimentos descritos no presente anexo referem-se à preparação para análise das amostras enviadas aos laboratórios de controlo, após uma amostragem efetuada segundo o disposto no anexo I.

As amostras laboratoriais têm de ser preparadas de forma que as quantidades colhidas, como previsto nos métodos de análise, sejam homogéneas e representativas das amostras finais.

Além dos procedimentos descritos no presente anexo, devem ser seguidas as orientações para a preparação de amostras previstas nas normas EN ISO 6498.

2. **Precauções a tomar**

O procedimento de preparação da amostra adotado depende dos métodos de análise a utilizar e dos constituintes ou substâncias a controlar. Importa, pois, que o procedimento aplicado se adeque ao método de análise utilizado e aos constituintes ou substâncias a controlar.

Todas as operações têm de ser efetuadas de forma a evitar tanto quanto possível a contaminação da amostra ou a alteração da sua composição.

Todas as moagens, misturas e peneiramentos devem ser efetuados rapidamente, evitando ao máximo expor a amostra ao ar e à luz. Não se devem usar moinhos ou trituradores suscetíveis de aquecer demasiado a amostra.

Recomenda-se a moagem manual para os alimentos particularmente sensíveis ao calor. Deve ainda garantir-se que o equipamento não seja uma fonte de contaminação.

A homogeneização da amostra através da preparação de uma suspensão por mistura de alto cisalhamento com água permite, por vezes, obter subamostras mais homogéneas, relativamente às obtidas por homogeneização a seco ou moagem, especialmente no caso de substâncias químicas repartidas de forma heterogénea. No entanto, subamostras homogéneas podem igualmente ser obtidas através de suficiente moagem a seco.

Em certos casos, tal como para a determinação da cravagem do centeio, impurezas botânicas prejudiciais, etc., a homogeneização da amostra é obtida através da mistura da amostra e não por moagem.

Caso a amostra não possa ser preparada sem uma variação significativa do seu teor em humidade, esse teor deve ser determinado antes e depois da preparação pelo método estabelecido na parte A do anexo III.

3. **Procedimento**

3.1. *Procedimento geral*

A alíquota de teste é colhida da amostra final homogeneizada. Não se recomenda o uso do método dos quartos, dado que pode dar origem a alíquotas de teste com uma elevada margem de erro de divisão.

3.1.1. Alimentos que podem ser moídos tal como se encontram

— Misturar a amostra final e recolhê-la para um recipiente adequado, limpo, seco e com fecho hermético. Misturar de novo a fim de garantir uma homogeneização completa, imediatamente antes de colher a quantidade para análise (alíquota de teste).

3.1.2. Alimentos que podem ser moídos após secagem

— Salvo indicação específica em contrário nos métodos de análise, secar a amostra final de maneira a baixar o seu teor de humidade para 8 % a 12 %, utilizando o processo de pré-dessecação indicado no ponto 4.3 do método de determinação do teor de humidade referido na parte A do anexo III. Proceder, em seguida, como indicado no ponto 3.1.1.

3.1.3. Alimentos líquidos ou semilíquidos

— Recolher a amostra final para um recipiente adequado, limpo, seco e com fecho hermético. Misturar cuidadosamente a fim de garantir uma homogeneização completa, imediatamente antes de colher a quantidade para análise (alíquota de teste).

3.1.4. Outros alimentos

— Caso a amostra final não possa ser preparada por qualquer dos processos acima indicados, utilizar outro processo de preparação apropriado que garanta que as quantidades colhidas para análise (alíquotas de teste) são homogéneas e representativas das amostras finais.

3.2. *Procedimento específico em caso de análise por inspeção visual ou por microscopia ou quando toda a amostra global esteja homogeneizada*

— Em caso de exame por inspeção visual (sem utilizar um microscópio), toda a amostra global ou final é utilizada para exame.

— Em caso de exame microscópico, o laboratório pode reduzir a amostra global ou reduzir mais ainda a amostra reduzida. As amostras finais para efeitos de recurso e eventualmente arbitragem, são colhidas segundo um procedimento equivalente ao procedimento adotado para obter a amostra final para efeitos de controlo.

— Caso toda a amostra global esteja homogeneizada, as amostras finais são colhidas da amostra global homogeneizada.

— Para a determinação da cravagem do centeio e de impurezas botânicas prejudiciais, a amostra final tem de ser dividida em duas subamostras de igual massa, de aproximadamente 500 gramas. Uma subamostra é analisada. Se o resultado das subamostras for igual ou inferior a 50 % (limiar analítico) do teor máximo, a amostra cumpre o teor máximo. Se o resultado for superior a 50 % do teor máximo, é necessário analisar outra subamostra e utiliza-se a média do resultado das duas subamostras para verificar o cumprimento do teor máximo.

4. **Armazenamento das amostras**

As amostras têm de ser armazenadas a uma temperatura que não altere a sua composição. As amostras destinadas a análise de vitaminas ou substâncias particularmente sensíveis à luz devem ser armazenadas em condições que impeçam que a amostra seja adversamente afetada pela luz.

B. DISPOSIÇÕES RELATIVAS AOS REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NOS MÉTODOS DE ANÁLISE

1. Salvo indicação específica em contrário nos métodos de análise, todos os reagentes analíticos têm de ser analiticamente puros (a. p.). Para a análise de vestígios, a pureza dos reagentes tem de ser controlada mediante um ensaio em branco. Consoante o resultado obtido, poderá ou não vir a ser necessária a sua purificação suplementar.

2. Todas as operações de preparação de soluções, diluição e lavagem mencionadas nos métodos de análise sem indicações quanto à natureza do solvente ou diluente a utilizar significam que deverá ser utilizada água. Regra geral, a água deve ser desmineralizada ou destilada. Em certos casos, indicados nos métodos de análise, essa água tem de ser submetida a processos de purificação específicos.

3. Atendendo ao equipamento corrente normalmente presente nos laboratórios de controlo, o método de análise indica apenas o material especial ou os instrumentos e aparelhos que devam responder a determinadas condições. Esse material tem de estar bem limpo, em especial quando têm de ser determinadas quantidades ínfimas de substâncias.

C. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

1. **Procedimento de extração**

Vários métodos determinam um procedimento de extração específico. Regra geral, podem ser usados procedimentos de extração diferentes do indicado no método de análise, desde que o procedimento usado tenha dado provas de que proporciona, para a matriz em causa, a mesma eficiência de extração que o procedimento mencionado no método de análise.

2. **Procedimento de purificação**

Vários métodos indicam um procedimento de purificação específico. Regra geral, podem ser usados procedimentos de purificação diferentes do indicado no método de análise, desde que o procedimento usado tenha dado provas de que proporciona, para a matriz em causa, resultados analíticos equivalentes aos do procedimento mencionado no método de análise.

3. **Número de determinações**

No caso de análise de substâncias indesejáveis, se o resultado da primeira determinação for significativamente (> 50 %) inferior à especificação a controlar, não são necessárias determinações adicionais, desde que se tenham aplicado os procedimentos de qualidade adequados. Nos outros casos, é necessário um ensaio em duplicado (segunda determinação) para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca acidental de amostras. A média das duas determinações é utilizada para a avaliação adicional.

Em caso de controlo dos teores mínimo e máximo de aditivos para a alimentação animal, se os resultados da primeira determinação forem superiores ao teor mínimo ou inferiores ao teor máximo, não são necessárias determinações adicionais, desde que se tenham aplicado os procedimentos de qualidade adequados. Nos outros casos, é necessário um ensaio em duplicado (segunda determinação) para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca acidental de amostras. A média das duas determinações é utilizada para a avaliação adicional.

Nos casos em que o controlo incide sobre o teor declarado de uma substância ou ingrediente, se o resultado da primeira determinação confirmar o teor declarado, ou seja, se o resultado analítico se situar dentro da gama de variação aceitável desse teor, não são necessárias mais determinações, desde que se tenham aplicado os procedimentos de qualidade adequados. Nos outros casos, é necessário um ensaio em duplicado (segunda determinação) para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca acidental de amostras. A média das duas determinações é utilizada para a avaliação adicional (a média do resultado analítico situa-se ou não dentro da gama de variação aceitável do teor declarado).

Em certos casos, a gama de variação aceitável encontra-se estabelecida na legislação, nomeadamente no Regulamento (CE) n.º 767/2009 e no Regulamento (UE) 2019/4 do Parlamento Europeu e do Conselho ([1]).

4. **Notificação do método de análise utilizado**

O relatório de análise deve mencionar o método de análise utilizado.

5. **Notificação do resultado analítico**

O resultado analítico, que deve ser expresso em conformidade com as indicações dadas no método de análise e conter o devido número de algarismos significativos, pode, caso necessário, ser corrigido em função do teor de humidade apresentado pela amostra final antes da sua preparação para análise.

A maioria dos teores regulamentares (nomeadamente os teores máximo e mínimo) na legislação da UE no domínio da alimentação animal são estabelecidos em relação a alimentos para animais com um teor de humidade de 12 %. Por conseguinte, nestes casos, a fim de avaliar o resultado analítico medido na amostra em relação ao teor regulamentar, é necessário que o resultado analítico seja primeiro dividido pelo teor de matéria seca da amostra (em %) multiplicado por 88, tal como indicado na fórmula seguinte:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

em que:

Mc: teor de humidade da amostra (em %). Por conseguinte, 100 − Mc representa o teor de matéria seca da amostra (em %).

R_{ana}: resultado analítico medido na amostra.

$R_{12\,\%}$: resultado para um alimento para animais com um teor de humidade de 12 %; a avaliar em relação ao teor regulamentar.

([1]) Regulamento (UE) 2019/4 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 11 de dezembro de 2018, relativo ao fabrico, à colocação no mercado e à utilização de alimentos medicamentosos para animais, que altera o Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga a Diretiva 90/167/CEE do Conselho (JO L 4 de 7.1.2019, p. 1).

Além disso, se as seguintes condições forem preenchidas:

— o resultado da análise é significativamente (> 50 %) inferior ou superior à informação constante do rótulo ou à especificação a controlar (dependendo se a informação constante do rótulo ou a especificação corresponde a um teor máximo ou mínimo),

— o teor de humidade do alimento para animais amostrado é conhecido e pode ser determinado que a correção em função do teor de humidade não influenciará a avaliação,

desde que se tenham aplicado os procedimentos de qualidade adequados e se a análise se destinar exclusivamente a verificar a observância das disposições legislativas, a correção em função do teor de humidade pode ser omitida (p. ex., em casos em que não existe uma especificação ou um teor regulamentar), a menos que seja necessária para a interpretação do resultado.

Se o resultado analítico for corrigido em função do teor de humidade, a incerteza de medição correspondente tem de ser igualmente corrigida no mesmo procedimento.

No caso da determinação da cravagem do centeio e de impurezas botânicas prejudiciais por inspeção visual ou por microscopia, não é necessária a correção em função do teor de humidade.

6. **Incerteza de medição analítica e taxa de recuperação no caso da análise de substâncias indesejáveis**

No que diz respeito às substâncias indesejáveis na aceção da Diretiva 2002/32/CE, um produto destinado à alimentação animal é considerado não conforme com o limite máximo fixado se se considerar que o resultado analítico expresso como a média de duas determinações independentes, em relação a um alimento com um teor de humidade de 12 %, ultrapassa o limite máximo tendo em conta a incerteza de medição analítica expandida utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %, e a correção em função da recuperação. Isto significa que, para avaliar a conformidade, usa-se a concentração analisada, corrigida em função da recuperação, e subtrai-se a incerteza de medição analítica expandida. Este procedimento só é aplicável nos casos em que o método de análise permita estimar a incerteza de medição analítica expandida e a correção em função da recuperação (p. ex., não é necessário no caso de inspeção visual ou por microscopia).

Se o resultado analítico da amostra colhida para efeitos de recurso ultrapassar o teor máximo (sem ter em conta a incerteza de medição analítica expandida), tal confirma a não conformidade em relação à amostra de controlo, na ausência de normas nacionais específicas a este respeito.

O resultado analítico será apresentado do seguinte modo (na medida em que o método de análise utilizado permita estimar a incerteza de medição analítica expandida):

a) Corrigido em função da recuperação, quando adequado e pertinente, facto que terá de ser declarado. A taxa de recuperação deve ser citada, a menos que a correção intrínseca de enviesamento faça parte do procedimento, em que o enviesamento corresponde à diferença entre o valor medido e a concentração de referência. Se a taxa de recuperação se situar entre 90 % e 110 % não é necessário efetuar a correção;

b) Como «x +/- U», em que x é o resultado analítico e U é a incerteza de medição analítica expandida, utilizando um fator de expansão de 2 ([2]), que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %.

Todavia, se o resultado da análise for significativamente (> 50 %) inferior à especificação a controlar e se a análise se destinar exclusivamente a verificar a observância das disposições legislativas, desde que se tenham aplicado os procedimentos de qualidade adequados, os valores da taxa de recuperação e da incerteza de medição analítica expandida podem ser omitidos (p. ex., em casos em que não existe uma especificação ou teor regulamentar), a menos que sejam necessários para a interpretação do resultado.

7. **Incerteza de medição analítica e taxa de recuperação no caso da análise do teor de aditivos para a alimentação animal**

Para verificar a observância dos aditivos para a alimentação animal no que diz respeito aos teores mínimo e máximo autorizados, a presença de um aditivo para a alimentação animal é considerada não conforme com os teores mínimo e máximo fixados se o resultado analítico, expresso como a média de duas determinações independentes, em relação a um alimento para animais com um teor de humidade de 12 %:

([2]) O intervalo de confiança de 95 % pode ser alcançado utilizando outros fatores, como o fator t.

— ultrapassar o teor máximo, tendo em conta a incerteza de medição analítica expandida e a correção em função da recuperação. Isto significa que, para avaliar a conformidade, usa-se a concentração analisada (ou seja, a média das duas determinações), corrigida em função da recuperação, e subtrai-se a incerteza de medição analítica expandida,

— for inferior ao teor mínimo, tendo em conta a incerteza de medição analítica expandida e a correção em função da recuperação. Isto significa que, para avaliar a conformidade, usa-se a concentração analisada (ou seja, a média das duas determinações), corrigida em função da recuperação, e soma-se a incerteza de medição analítica expandida.

Se o resultado analítico da amostra colhida para efeitos de recurso ultrapassar o teor máximo (sem ter em conta a incerteza de medição analítica expandida), tal confirma a não conformidade em relação à amostra de controlo, na ausência de normas nacionais específicas a este respeito.

O resultado analítico será apresentado do seguinte modo (na medida em que o método de análise utilizado permita estimar a incerteza de medição analítica expandida):

a) Corrigido em função da recuperação, quando adequado e pertinente, facto que terá de ser declarado. A taxa de recuperação deve ser citada, a menos que a correção intrínseca de enviesamento faça parte do procedimento, em que o enviesamento corresponde à diferença entre o valor medido e a concentração de referência. Se a taxa de recuperação se situar entre 90 % e 110 % não é necessário efetuar a correção;

b) Como «x +/- U», em que x é o resultado analítico (a média de duas determinações) e U é a incerteza de medição analítica expandida, utilizando um fator de expansão de 2 ([3]), que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %.»

([3]) O intervalo de confiança de 95 % pode ser alcançado utilizando outros fatores, como o fator t.

ANEXO III

«*ANEXO III*

MÉTODOS DE ANÁLISE PARA O CONTROLO DA COMPOSIÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS PARA A ALIMENTAÇÃO ANIMAL E DOS ALIMENTOS COMPOSTOS PARA ANIMAIS

A. DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de humidade dos alimentos para animais. Se os alimentos contiverem substâncias voláteis, como por exemplo ácidos orgânicos, deve ter-se em conta que, a par do teor de humidade, também se mede um número significativo de substâncias voláteis.

O método não abrange a análise dos produtos lácteos enquanto matérias-primas para a alimentação animal e dos alimentos compostos para animais constituídos essencialmente de produtos lácteos, a análise das matérias gordas animais e vegetais nem a análise das sementes e frutos oleaginosos.

A determinação do teor de humidade nas sementes oleaginosas é efetuada utilizando o método previsto na norma *EN ISO 665 – Sementes de oleaginosas - Determinação do teor de água e matérias voláteis*, no pressuposto de que, antes da determinação do teor de humidade, as sementes de soja têm de ser moídas.

2. **Princípio**

A amostra é dessecada em condições definidas que variam em função da natureza do alimento. A perda de massa é determinada por pesagem. É necessário proceder a uma pré-dessecação sempre que se trate de alimentos sólidos com um elevado teor de humidade.

3. **Equipamento**

3.1. Triturador construído num material que não absorva a humidade, fácil de limpar e que permita uma trituração rápida e uniforme sem provocar aquecimento sensível, que evite o mais possível o contacto com o ar exterior, e que satisfaça as exigências indicadas nos pontos 4.1.1 e 4.1.2 (p. ex., microtrituradores de martelos ou com arrefecimento por água, moinhos de cones desmontáveis, trituradores de movimento lento ou de discos dentados).

3.2. Balança analítica com uma sensibilidade de 1 miligrama.

3.3. Recipientes secos de metal inoxidável ou de vidro, munidos de uma tampa hermética; superfície útil que permita obter uma repartição da amostra de ensaio da ordem dos 0,3 g/cm^2.

3.4. Estufa isotérmica (± 2 °C) de aquecimento elétrico, com uma regulação rápida da temperatura e convenientemente ventilada ([1]).

3.5. Estufa de vácuo, com aquecimento elétrico regulável, munida de uma bomba de óleo e quer de um dispositivo de introdução de ar quente seco, quer de um agente desidratante (p. ex., óxido de cálcio).

3.6. Exsicador com placa de metal ou de porcelana espessa, perfurada, contendo um agente desidratante eficaz.

4. **Procedimento**

N.B.: As operações descritas nesta secção devem ser efetuadas imediatamente após a abertura das embalagens que contêm as amostras. As análises devem ser efetuadas pelo menos em duplicado.

([1]) Para a dessecação dos cereais, assim como das farinhas e sêmolas grossas e finas, a estufa deve ter uma capacidade térmica tal que, regulada previamente à temperatura de 131 °C, possa atingir de novo esta temperatura menos de 45 minutos após a colocação do número máximo de amostras de ensaio a secar simultaneamente. A estufa deverá ainda ter uma ventilação tal que, secando durante 2 horas todas as amostras de trigo mole que pode conter, os resultados apresentem uma diferença inferior a 0,15 % relativamente aos resultados obtidos após quatro horas de dessecação.

4.1. *Preparação*

4.1.1. Alimentos com exceção dos mencionados nos pontos 4.1.2 e 4.1.3

Tomar pelo menos 50 g da amostra. Se for necessário, triturar ou dividir de maneira apropriada para evitar qualquer variação do teor de humidade (ver ponto 6).

4.1.2. Cereais e sêmolas grossas

Tomar pelo menos 50 g da amostra. Moer em partículas, das quais pelo menos 50 % passem por uma peneira de malhas de 0,5 mm e não deixem mais de 10 % de resíduos sobre outro crivo de malhas redondas de 1 mm.

4.1.3. Alimentos líquidos ou pastosos, alimentos constituídos essencialmente de matérias gordas

Tomar e pesar, com uma aproximação de 10 mg, cerca de 25 g da amostra, adicionar-lhe uma quantidade adequada de areia anidra, com uma aproximação de 10 mg, misturar até à obtenção de um produto homogéneo.

4.2. *Dessecação*

Na estufa, secar um recipiente (ponto 3.3) com a tampa, a 103 °C, durante 30 minutos ± 1 minuto. Retirar da estufa e arrefecer até à temperatura ambiente, no exsicador (ponto 3.6).

4.2.1. Alimentos com exceção dos mencionados nos pontos 4.2.2 e 4.2.3

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, o recipiente com a tampa. Pesar dentro dele, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g da amostra repartindo-a uniformemente. Colocar o recipiente destapado na estufa previamente aquecida a 103 °C. Introduzir o recipiente o mais rapidamente possível, para evitar que a temperatura da estufa desça demasiado. Deixar secar durante quatro horas, a partir do momento em que a estufa tiver atingido de novo a temperatura de 103 °C. Abrir a estufa, colocar imediatamente a tampa no recipiente, retirá-lo da estufa, deixar arrefecer 30 a 45 minutos no exsicador (ponto 3.6) e pesar com uma aproximação de 1 mg.

No caso de alimentos constituídos essencialmente de matérias gordas (> 50 %), efetuar uma dessecação suplementar de 30 minutos na estufa a 103 °C. A diferença entre as duas pesagens não deve exceder o valor correspondente a 0,1 % de humidade.

4.2.2. Cereais, farinhas, sêmolas grossas e finas

Pesar, com uma aproximação de 0,5 mg, o recipiente com a tampa. Pesar dentro dele, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g da amostra triturada, repartindo-a uniformemente. Colocar o recipiente destapado na estufa previamente aquecida a 130 °C. Introduzir o recipiente o mais rapidamente possível, para evitar que a temperatura da estufa desça demasiado. Deixar secar durante duas horas, a partir do momento em que a estufa tiver atingido de novo a temperatura de 130 °C. Abrir a estufa, colocar imediatamente a tampa no recipiente, retirá-lo da estufa, deixar arrefecer 30 a 45 minutos no exsicador (ponto 3.6) e pesar com uma aproximação de 1 mg.

4.2.3. Alimentos compostos contendo mais de 4 % de sacarose ou de lactose: matérias-primas para a alimentação animal tais como alfarroba, produtos cereais hidrolisados, germes de malte, rodelas de beterraba, solúveis de peixe e açúcares;

Pesar, com uma aproximação de 0,5 mg, o recipiente com a tampa. Pesar dentro dele, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g da amostra, repartindo-a uniformemente. Colocar o recipiente destapado na estufa de vácuo (ponto 3.5) previamente aquecida a uma temperatura entre 80 °C e 85 °C. Introduzir o recipiente o mais rapidamente possível, para evitar que a temperatura da estufa desça demasiado.

Elevar a pressão a 100 Torr e deixar secar a esta pressão durante quatro horas, quer sob uma corrente de ar seco e quente, quer por meio de um agente desidratante (cerca de 300 g para 20 amostras). Neste último caso, desligar a bomba de vácuo quando a pressão indicada tiver sido atingida. Contar o tempo de secagem a partir do momento em que a estufa tiver atingido de novo a temperatura de 80 °C a 85 °C. Reduzir cuidadosamente a pressão no interior da estufa até à pressão atmosférica. Abrir a estufa, tapar imediatamente o recipiente, retirá-lo da estufa, deixar arrefecer durante 30 a 45 minutos no exsicador (ponto 3.6) e pesar com uma aproximação de 1 mg. Proceder a uma dessecação complementar de 30 minutos na estufa de vácuo a uma temperatura entre 80 °C e 85 °C e pesar novamente. A diferença entre as duas pesagens não deve exceder o valor correspondente a 0,1 % de humidade.

4.3. *Pré-dessecação (parcial)*

Os alimentos «húmidos», com uma fração mássica inferior a 85 % de matéria seca (p. ex., forragens, rações completas, alimentos para animais não líquidos), têm de ser parcialmente dessecados antes de serem moídos finamente, a fim de analisar as suas substâncias estáveis; a dessecação parcial não é possível para a determinação de substâncias instáveis.

A dessecação parcial pode ser efetuada utilizando uma estufa com ventilação forçada ou um forno de micro-ondas ou por liofilização. Exceto no caso de dessecação parcial por liofilização, o objetivo é secar o alimento para animais a uma temperatura estável inferior a 60 °C, a fim de que a composição química sofra apenas alterações mínimas. A dessecação a temperaturas superiores a 60 °C conduz a alterações na composição química do alimento (nomeadamente degradação proteica). O alimento dessecado é estabilizado durante cerca de 15 minutos à temperatura ambiente, antes de se proceder à medição da matéria seca parcial, de modo a minimizar a potencial alteração no teor de humidade durante o processo de moagem e armazenamento. A dessecação a temperaturas inferiores a 60 °C não retira toda a água do alimento para animais; por conseguinte, a matéria seca total do alimento não é obtida após uma pré-dessecação parcial. Após a dessecação, a subamostra é moída e analisada para determinação da matéria seca (final) da amostra parcialmente seca (o teor de humidade restante de 3 % a 15 %) quando os outros constituintes químicos são determinados.

Por conseguinte, recomenda-se um procedimento em duas etapas para a determinação da matéria seca. Primeiro, determinar o teor parcial de matéria seca (se inferior a 85 % de matéria seca), em seguida, determinar o restante teor de matéria seca numa amostra de ensaio moída e calcular o teor total de matéria seca multiplicando o valor de matéria seca parcial pelo valor de matéria seca restante.

5. **Cálculo dos resultados**

O teor de humidade (X), em percentagem da amostra, é dado pelas seguintes fórmulas:

5.1. *Dessecação sem pré-dessecação*

$$X = \left(\frac{m - m_0}{m}\right) \times 100$$

em que:

m = massa inicial, em gramas, da amostra de ensaio,

m_0 = massa, em gramas, da amostra de ensaio seca.

5.2. *Dessecação com pré-dessecação* ([2])

$$X_p = \left[\frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1\right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left(1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2}\right)$$

em que:

m = massa inicial, em gramas, da amostra de ensaio,

m_1 = massa, em gramas, da amostra de ensaio, depois da pré-dessecação,

m_2 = massa, em gramas, da amostra de ensaio depois da trituração ou moagem,

m_0 = massa, em gramas, da amostra de ensaio seca.

([2]) Para mais detalhes no que diz respeito ao cálculo, remete-se para a norma EN ISO 6498 – Alimentos para animais – Diretrizes para preparação de amostras.

5.3. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder 0,2 % do valor absoluto da humidade, exceto no caso de alimentos húmidos para animais de companhia e produtos de roer para cães, em que a diferença não deve exceder 0,5 % do valor absoluto da humidade.

6. **Observação**

Se for necessária uma trituração e dela resultar uma variação do teor de humidade do produto, os resultados da análise que dizem respeito aos componentes do alimento devem ser corrigidos de acordo com o teor de humidade da amostra inicial.

B. DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE NAS MATÉRIAS GORDAS ANIMAIS E VEGETAIS

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

O método permite determinar o teor em humidade (água e outras matérias voláteis) das matérias gordas animais e vegetais.

2. **Princípio**

A amostra é seca a 103 °C até massa constante (a perda de massa entre duas pesagens sucessivas deve ser igual ou inferior a 1 mg). A perda de massa é determinada por pesagem.

3. **Equipamento**

3.1. Cápsula de fundo plano, em material resistente à corrosão, diâmetro: 8 a 9 cm, altura: cerca de 3 cm.

3.2. Termómetro com globo reforçado e câmara de dilatação na extremidade superior, graduado de cerca de 80 °C a pelo menos 110 °C, comprimento: cerca de 10 cm.

3.3. Banho de areia ou placa de aquecimento elétrica.

3.4. Exsicador, contendo um agente desidratante eficaz.

3.5. Balança analítica.

4. **Procedimento**

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 20 g da amostra homogeneizada na cápsula (ponto 3.1) seca e com tara calculada, contendo o termómetro (ponto 3.2). Aquecer em banho de areia ou placa de aquecimento (ponto 3.3), agitando constantemente com a ajuda do termómetro, de modo a que a temperatura atinja 90 °C em cerca de 7 minutos.

Reduzir a intensidade do aquecimento, atendendo à frequência com que as bolhas sobem do fundo do recipiente. A temperatura não pode ultrapassar 105 °C. Continuar a agitar, raspando o fundo da cápsula até que cesse a formação de bolhas.

A fim de assegurar a eliminação total da humidade, repetir várias vezes o aquecimento a 103 °C ± 2 °C, arrefecendo até 93 °C entre os aquecimentos sucessivos. Em seguida deixar arrefecer no exsicador (ponto 3.4) até que atinja a temperatura ambiente e pesar. Repetir esta operação até que a perda de massa entre duas pesagens sucessivas deixe de exceder 2 mg.

N.B.: Um aumento de massa da amostra após aquecimento repetido indica uma oxidação da gordura. Neste caso, calcular o resultado a partir da pesagem efetuada imediatamente antes do começo do aumento de massa.

5. **Cálculo dos resultados**

O teor de humidade (X) em percentagem da amostra é dado pela fórmula:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

em que:

m = massa, em gramas, da amostra de ensaio,

m_1 = massa, em gramas, da cápsula com o respetivo conteúdo, antes do aquecimento,

m_2 = massa, em gramas, da cápsula com o respetivo conteúdo, após aquecimento.

Os resultados inferiores a 0,05 % devem ser registados com a referência "inferior a 0,05 %".

Repetibilidade

A diferença entre os resultados obtidos em duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não pode exceder 0,1 % em valor absoluto.

C. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZOTO E CÁLCULO DO TEOR DE PROTEÍNA BRUTA

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

O presente método permite determinar o teor de proteína bruta dos alimentos para animais com base no teor de azoto, determinado pelo método de Kjeldahl ([3]).

2. **Princípio**

A amostra é mineralizada com ácido sulfúrico, na presença de um catalisador. A solução ácida é alcalinizada por adição de uma solução de hidróxido de sódio. O amoníaco é destilado e recolhido numa quantidade determinada de ácido sulfúrico, cujo excesso é titulado com uma solução-padrão de hidróxido de sódio.

Alternativamente, o amoníaco libertado é destilado numa solução de ácido bórico em excesso, seguido de titulação com uma solução de ácido clorídrico ou sulfúrico.

3. **Reagentes**

3.1. Sulfato de potássio.

3.2. Catalisador: óxido de cobre (II), CuO, ou sulfato de cobre (II) penta-hidratado, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.

3.3. Zinco granulado.

3.4. Ácido sulfúrico, $\rho 20$ = 1,84 g/ml.

3.5. Ácido sulfúrico, solução volumétrica padrão, c(H_2SO_4) = 0,25 mol/l.

3.6. Ácido sulfúrico, solução volumétrica padrão, c(H_2SO_4) = 0,10 mol/l.

3.7. Ácido sulfúrico, solução volumétrica padrão, c(H_2SO_4) = 0,05 mol/l.

3.8. Indicador vermelho de metilo: dissolver 300 mg de vermelho de metilo em 100 ml de etanol, σ = 95-96 % (v/v).

3.9. Solução de hidróxido de sódio (pode utilizar-se uma solução de pureza técnica), β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %).

3.10. Hidróxido de sódio, solução volumétrica padrão, c(NaOH) = 0,25 mol/l.

3.11. Hidróxido de sódio, solução volumétrica padrão, c(NaOH) = 0,10 mol/l.

3.12. Pedra-pomes granulada, lavada em ácido clorídrico e inflamada.

3.13. Acetanilida (p.f. = 114 °C, teor de N = 10,36 %).

3.14. Sacarose (isenta de azoto).

3.15. Ácido bórico (H_3BO_3).

([3]) O teor de azoto pode ser determinado em todos os alimentos para animais, no entanto, o fator de conversão de 6,25 para o cálculo do teor de proteína bruta pode não ser aplicável no caso de matérias para a alimentação animal à base de insetos (fator de conversão inferior) e de determinados alimentos para animais de companhia e proteínas do plasma sanguíneo (fator de conversão superior).

3.16. Solução de indicador vermelho de metilo: dissolver 100 mg de vermelho de metilo em 100 ml de etanol ou metanol.

3.17. Solução de verde de bromocresol: dissolver 100 mg de verde de bromocresol em 100 ml de etanol ou metanol.

3.18. Solução de ácido bórico (10 g/l a 40 g/l, em função do equipamento utilizado).

Se se aplicar a deteção colorimétrica do ponto final, deve adicionar-se os indicadores vermelho de metilo e bromocresol às soluções de ácido bórico. Se se preparar 1 l de solução de ácido bórico, adicionam-se, antes de ajustar o volume, 7 ml de solução de indicador vermelho de metilo (ponto 3.16) e 10 ml de solução de verde de bromocresol (ponto 3.17).

O pH das soluções de ácido bórico preparadas pode diferir em função da água usada. O pH da solução de ácido bórico tem de estar compreendido entre 4,3 e 4,7. Por vezes, é necessário efetuar um ajuste com um pequeno volume de uma solução alcalina a fim de obter um resultado positivo no ensaio em branco.

Nota: Com a adição de cerca de 3 a 4 ml de NaOH (ponto 3.11) a 1 l de ácido bórico 10 g/l consegue-se normalmente um bom ajuste. A solução deve ser armazenada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e de fontes de vapores de amoníaco.

3.19. Ácido clorídrico, solução volumétrica padrão, c(HCl) = 0,10 mol/l.

Nota: Podem usar-se outras concentrações das soluções volumétricas (pontos 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11, e 3.19) desde que se efetue a respetiva correção no cálculo dos resultados. As concentrações devem sempre ser expressas com quatro casas decimais.

4. **Equipamento**

Equipamento adequado para efetuar a mineralização, a destilação e a titulação pelo método de Kjeldahl.

5. **Procedimento**

5.1. *Mineralização*

Pesar, com uma aproximação de 0,001 g, 1 g de amostra e transferi-la para o recipiente do aparelho de mineralização. Adicionar 15 g de sulfato de potássio (ponto 3.1), uma quantidade adequada de catalisador (ponto 3.2) [0,3 a 0,4 g de óxido de cobre (II) ou 0,9 a 1,2 g de sulfato de cobre (II) penta-hidratado], 25 ml de ácido sulfúrico (ponto 3.4) e, se necessário, alguns grânulos de pedra-pomes (ponto 3.12), misturando.

Começar por aquecer moderadamente a mistura, agitando ocasionalmente se necessário, até à carbonização completa da massa e o desaparecimento da espuma. Aquecer seguidamente de um modo mais vigoroso até à ebulição; o aquecimento é adequado quando se observar a condensação do ácido nas paredes do recipiente. Evitar o sobreaquecimento lateral e a adesão de partículas orgânicas às paredes.

Quando a solução ficar límpida e assumir um tom verde-claro, continuar a ebulição durante mais duas horas, arrefecendo de seguida.

5.2. *Destilação*

Adicionar cuidadosamente uma quantidade de água adequada para a dissolução completa dos sulfatos. Deixar arrefecer e adicionar, se necessário, alguns grânulos de zinco (ponto 3.3). Proceder de acordo com o disposto nos pontos 5.2.1 ou 5.2.2.

5.2.1. Destilação com recolha em ácido sulfúrico

Colocar no balão de recolha do dispositivo de destilação 25 ml, rigorosamente medidos, de ácido sulfúrico (ponto 3.5) ou (ponto 3.7), em função do teor presumido de azoto. Adicionar algumas gotas de vermelho de metilo (ponto 3.8).

Adaptar o recipiente de mineralização ao refrigerante do dispositivo de destilação, imergindo a extremidade do refrigerante no líquido contido no balão de recolha, até uma profundidade mínima de 1 cm (ver observação no ponto 8.3). Juntar cuidadosamente 100 ml de solução de hidróxido de sódio (ponto 3.9) ao recipiente de mineralização, evitando perdas de amoníaco (ver observação no ponto 8.1). Aquecer o recipiente até à destilação completa do amoníaco.

5.2.2. Destilação com recolha em ácido bórico

Sempre que a titulação do teor de amoníaco no destilado for realizada manualmente, aplica-se o procedimento mencionado a seguir. Se a unidade de destilação for totalmente automatizada e incluir a titulação do teor de amoníaco no destilado, seguir as instruções do fabricante.

Colocar um balão de recolha com 25 a 30 ml da solução de ácido bórico (ponto 3.18) sob a saída do refrigerante de forma que o tubo de saída se situe sob a superfície da solução de ácido bórico em excesso. Regular a unidade de destilação de forma a adicionar 50 ml da solução de hidróxido de sódio (ponto 3.9). Colocar a unidade de destilação em funcionamento de acordo com as instruções do fabricante e destilar o amoníaco libertado com a adição da solução de hidróxido de sódio. Recolher o destilado na solução de ácido bórico. A quantidade de destilado (duração da destilação por arrastamento de vapor) depende da quantidade de azoto na amostra. Seguir as instruções do fabricante.

Nota: Numa unidade de destilação semiautomática, a adição de hidróxido de sódio em excesso e a destilação por arrastamento de vapor são realizadas automaticamente.

5.3. *Titulação*

Proceder de acordo com o disposto nos pontos 5.3.1 ou 5.3.2.

5.3.1. Ácido sulfúrico

Titular o excesso de ácido sulfúrico existente no balão de recolha com a solução de hidróxido de sódio (pontos 3.10 ou 3.11), em função da concentração de ácido sulfúrico utilizada, até atingir o ponto final.

5.3.2. Ácido bórico

Com o auxílio de uma bureta, titular o conteúdo do balão de recolha com a solução volumétrica padrão de ácido clorídrico (ponto 3.19) ou com a solução volumétrica padrão de ácido sulfúrico (ponto 3.6) e registar o volume de solução titulante usada.

Se se aplicar a deteção colorimétrica do ponto final, este é atingido assim que a solução começa a adquirir uma cor rosa. A leitura da bureta é feita com uma aproximação de 0,05 ml. A visualização do ponto final pode ser facilitada pelo uso de uma placa de agitação magnética dotada de iluminação ou de um detetor fotométrico.

Esta operação pode ser feita automaticamente se se usar um dispositivo de destilação por arrastamento de vapor com titulação automática.

Para o funcionamento do destilador ou destilador/titulador, seguir as instruções do fabricante.

Nota: Quando se usa um sistema de titulação automática, a titulação começa assim que se dá início à destilação e usa-se a solução de ácido bórico a 1 % (ponto 3.18).

Se se recorrer a uma unidade de destilação totalmente automatizada, a titulação do amoníaco também se pode fazer com a deteção do ponto final através de um sistema potenciométrico de medição do pH.

Neste caso, usa-se um titulador automático com um medidor de pH. O medidor de pH deve estar devidamente calibrado no intervalo de pH 4 a 7, segundo procedimentos laboratoriais normais.

O ponto final da titulação é atingido a um pH de 4,6, correspondente ao ponto de inflexão da curva de titulação (ponto de maior declive).

5.4. *Ensaio em branco*

Com vista a confirmar a ausência de azoto nos reagentes, efetuar um ensaio em branco (mineralização, destilação e titulação) utilizando 1 g de sacarose (ponto 3.14) em vez da amostra.

6. **Cálculo dos resultados**

Os cálculos efetuam-se em conformidade com os pontos 6.1 ou 6.2.

6.1. *Cálculo para a titulação em conformidade com o ponto 5.3.1*

O teor de proteína bruta, expresso em percentagem ponderal, é dado pela fórmula seguinte:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0{,}014 \times 100 \times 6{,}25}{m}$$

em que:

V_0 = volume, em ml, de NaOH (pontos 3.10 ou 3.11) utilizado no ensaio em branco,

V_1 = volume, em ml, de NaOH (pontos 3.10 ou 3.11) utilizado na titulação da amostra,

c = concentração, em mol/l, da solução de hidróxido de sódio (pontos 3.10 ou 3.11),

m = massa (g) da amostra.

6.2. *Cálculo para a titulação em conformidade com o ponto 5.3.2*

6.2.1. Titulação com ácido clorídrico

O teor de proteína bruta, expresso em percentagem ponderal, é dado pela fórmula seguinte:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1{,}4 \times 6{,}25}{m}$$

em que:

m = massa (g) da toma de ensaio,

c = concentração, em mol/l, da solução volumétrica padrão de ácido clorídrico (3.19),

V_0 = volume, em ml, de ácido clorídrico utilizado no ensaio em branco,

V_1 = volume, em ml, de ácido clorídrico utilizado na toma de ensaio.

6.2.2. Titulação com ácido sulfúrico

O teor de proteína bruta, expresso em percentagem ponderal, é dado pela fórmula seguinte:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2{,}8 \times 6{,}25}{m}$$

em que:

m = massa (g) da toma de ensaio,

c = concentração, em mol/l, da solução volumétrica padrão de ácido sulfúrico (3.6),

V_0 = volume, em ml, de ácido sulfúrico (3.6) utilizado no ensaio em branco,

V_1 = volume, em ml, de ácido sulfúrico (3.6) utilizado na toma de ensaio.

7. **Verificação do método**

7.1. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder:

— 0,4 %, em valor absoluto, para teores de proteína bruta inferiores a 20 %,

— 2,0 % do maior dos valores, para teores de proteína bruta compreendidos entre 20 % e 40 %,

— 0,8 %, em valor absoluto, para teores superiores a 40 %.

7.2. *Reprodutibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações efetuadas com a mesma amostra em laboratórios diferentes não deve exceder:

— 1,8 %, em valor absoluto, para teores de proteína bruta inferiores a 20 %,

— 9,0 % do maior dos valores, para teores de proteína bruta compreendidos entre 20 % e 40 %,

— 3,6 %, em valor absoluto, para teores superiores a 40 %.

7.3. *Exatidão*

Efetuar a análise (mineralização, destilação e titulação) numa quantidade adequada de acetanilida (ponto 3.13) (p. ex., 0,2 g a 0,3 g) na presença de 1 g de sacarose (ponto 3.14); 1 g de acetanilida deverá consumir 14,80 ml de ácido sulfúrico (ponto 3.5). A taxa de recuperação deve ser de, pelo menos, 99 %.

8. **Observações**

8.1. O equipamento utilizado pode ser de tipo manual, semiautomático ou automático. Se for necessário efetuar uma operação de transferência entre os processos de mineralização e destilação, não deverão observar-se perdas. Se o recipiente do dispositivo de destilação não se encontrar munido de uma ampola de carga, adicionar o hidróxido de sódio imediatamente antes de adaptar o recipiente ao refrigerante, vertendo o líquido cuidadosamente ao longo das paredes.

8.2. Se o resíduo da mineralização solidificar, recomeçar o processo, utilizando um volume de ácido sulfúrico (ponto 3.4) superior ao especificado no ponto 5.1.

8.3. No caso de produtos com baixo teor de azoto, o volume de ácido sulfúrico (ponto 3.7) a adicionar ao balão de recolha pode ser reduzido, se necessário, para 10 ou 15 ml e diluído para 25 ml com água.

8.4. Em análises de rotina, pode recorrer-se a métodos alternativos para a determinação da proteína bruta, mas o método Kjeldahl descrito na presente parte C é o método de referência. Deve demonstrar-se, para cada matriz individualmente, a equivalência dos resultados obtidos com o método alternativo (p. ex., DUMAS) em comparação com o método de referência. Dado que os resultados obtidos com métodos alternativos, mesmo depois de verificada a sua equivalência, podem apresentar um pequeno desvio em relação aos resultados derivados do método de referência, é necessário mencionar no relatório analítico o método de análise usado na determinação da proteína bruta.

D. DETERMINAÇÃO DA UREIA

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de ureia utilizada como aditivo em alimentos para ruminantes.

2. **Princípio**

Suspende-se a amostra em água juntamente com um agente clarificante e filtra-se. Determina-se o teor de ureia do filtrado, após a adição de 4-dimetilaminobenzaldeído (4-DMAB), medindo a densidade ótica a um comprimento de onda de 420 nm.

3. **Reagentes**

3.1. Solução de 4-dimetilaminobenzaldeído: dissolver 1,6 g de 4-DMAB em 100 ml de etanol a 96 % e juntar 10 ml de ácido clorídrico (ρ_{20}: 1,19 g/ml). O tempo de conservação máximo deste reagente é de duas semanas.

3.2. Solução de Carrez I: dissolver, em água, 21,9 g de acetato de zinco, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, e 3 g de ácido acético glacial. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.3. Solução de Carrez II: dissolver em água 10,6 g de ferrocianeto de potássio, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.4. Carvão ativado, não absorvente da ureia (a verificar).

3.5. Solução de ureia a 0,1 % (m/v).

4. **Equipamento**

4.1. Misturador basculante: cerca de 35 a 40 rotações por minuto.

4.2. Tubos de ensaio: 160 × 16 mm, com tampa esmerilada.

4.3. Espetrofotómetro.

5. **Procedimento**

5.1. *Análise da amostra*

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 2 g de amostra, introduzi-la com 1 g de carvão ativado (ponto 3.4) num balão volumétrico de 500 ml. Juntar 400 ml de água e 5 ml de solução de Carrez I (ponto 3.2), misturar durante cerca de 30 segundos e juntar em seguida 5 ml de solução de Carrez II (ponto 3.3). Misturar durante 30 minutos no misturador. Completar o volume com água, agitar e filtrar.

Recolher 5 ml de filtrado límpido e incolor e transferi-los para os tubos de ensaio com tampa esmerilada, juntar 5 ml de solução de 4-DMAB (ponto 3.1) e misturar. Colocar os tubos em banho-maria a 20 °C (± 4 °C). Decorridos 15 minutos, medir a densidade ótica da solução de amostra, com o espetrofotómetro, a 420 nm. Comparar com a solução de reagentes feita no ensaio em branco.

5.2. *Curva de calibração*

Recolher volumes de 1, 2, 4, 5 e 10 ml de solução de ureia (ponto 3.5), introduzi-los em balões volumétricos de 100 ml, completando os volumes com água. De cada um dos balões, retirar 5 ml de solução e juntar 5 ml de solução de 4-DMAB (ponto 3.1), homogeneizar e medir a densidade ótica, como referido, por comparação com uma solução de referência com 5 ml de 4-DMAB e 5 ml de água, isenta de ureia. Traçar a curva de calibração.

6. **Cálculo dos resultados**

A partir da curva de calibração, determinar a quantidade de ureia na amostra.

Exprimir o resultado em mg de ureia por kg de amostra.

7. **Avaliação do método**

7.1. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações efetuadas na mesma amostra, no mesmo laboratório e pelo mesmo analista, não deve exceder:

— a 420 nm:

  — 50 % do maior dos valores, para teores de ureia compreendidos entre 3 000 mg/kg e 5 000 mg/kg,

  — 25 % do maior dos valores, para teores de ureia compreendidos entre 5 000 mg/kg e 7 000 mg/kg,

  — 20 % do maior dos valores, para teores de ureia iguais ou superiores a 7 000 mg/kg,

— a 435 nm:

  — 40 % do maior dos valores, para teores de ureia compreendidos entre 3 000 mg/kg e 5 000 mg/kg,

  — 25 % do maior dos valores, para teores de ureia compreendidos entre 5 000 mg/kg e 9 000 mg/kg,

  — 5 % do maior dos valores, para teores de ureia iguais ou superiores a 9 000 mg/kg.

7.2. *Reprodutibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações efetuadas com a mesma amostra em laboratórios diferentes e/ou por analistas diferentes não deve exceder:

— a 420 nm:

  — 3 000 mg/kg, em valor absoluto, para teores de ureia compreendidos entre 3 000 mg/kg e 12 000 mg/kg,

  — 4 500 mg/kg, em valor absoluto, para teores de ureia iguais ou superiores a 12 000 mg/kg.

— a 435 nm:

  — 50 % do maior dos valores, para teores de ureia compreendidos entre 3 000 mg/kg e 8 000 mg/kg,

  — 25 % do maior dos valores, para teores de ureia iguais ou superiores a 8 000 mg/kg.

8. **Resultados de um estudo colaborativo**

Foi organizado um exercício de comparação interlaboratorial na UE, no qual participaram 18 laboratórios. Foram analisadas cinco amostras positivas de alimentos compostos para ruminantes, designadas MAT nos quadros 1 e 2 (1 análise), em duplicados em ensaio cego, e foi analisada uma vez uma amostra em branco de um alimento composto para ruminantes.

Após a exclusão de valores anómalos, foram efetuados os cálculos para os limites de repetibilidade (r) e de reprodutibilidade (R), tal como definidos por orientações internacionais, utilizando a análise de variância dos valores válidos.

Os valores de desempenho analítico calculados (repetibilidade e reprodutibilidade) são apresentados nos quadros seguintes. De todas as amostras analisadas, incluindo o material em branco, não foram encontrados quaisquer falsos positivos ou falsos negativos.

Quadro 1

Características de desempenho analítico para a ureia medida a λ = 420 nm, em todas as matérias-primas

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovinos	Bovinos	Ovinos	Ovinos	Bovinos
Valor conhecido da fração mássica (mg/kg)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Valor médio da fração mássica (mg/kg)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Desvio-padrão da reprodutibilidade, s_R (mg/kg)	1 141	1 303	985	994	1 711
Desvio-padrão da repetibilidade, s_r (mg/kg)	723	601	549	712	737
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Limite de reprodutibilidade, R [$R = 2{,}8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Limite de repetibilidade, r [$r = 2{,}8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Quadro 2

Características de desempenho analítico para a ureia medida a λ = 435 nm, em todas as matérias-primas

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovinos	Bovinos	Ovinos	Ovinos	Bovinos
Valor conhecido da fração mássica (mg/kg)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Valor médio da fração mássica (mg/kg)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Desvio-padrão da reprodutibilidade, s_R (mg/kg)	706	1 194	675	745	1 378
Desvio-padrão da repetibilidade, s_r (mg/kg)	570	628	613	196	167

Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Limite de reprodutibilidade, R [$R = 2{,}8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Limite de repetibilidade, r [$r = 2{,}8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. **Observações**

9.1. Para teores de ureia superiores a 3 %, reduzir a amostra de ensaio para 1 g, ou diluir a solução inicial, para que o teor de ureia por cada 500 ml não seja superior a 50 mg.

9.2. Para teores de ureia pouco elevados, aumentar o peso da amostra, sem deixar, no entanto, que a quantidade de amostra impeça o filtrado de ficar límpido e incolor.

9.3. Os resultados acima referidos, obtidos em ensaios colaborativos, indicam que não existe uma diferença significativa na precisão no que diz respeito ao teor de ureia medido a 420 nm e a 435 nm.

E. DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS (COM EXCEÇÃO DO TRIPTOFANO)

Os métodos de análise a utilizar na determinação dos aminoácidos (com exceção do triptofano) são:

— *EN ISO 13903 – Animal feeding stuffs – Determination of amino acids content* (Alimentos para animais – Determinação do teor de aminoácidos),

— *EN ISO 17180 –Animal feeding stuffs – Determination of lysine, methionine, and threonine in commercial amino acid products and premixtures* ([4]) (Alimentos para animais – Determinação de lisina, metionina e treonina em produtos comerciais à base de aminoácidos e em pré-misturas),

— o método de análise a seguir descrito, nos pontos 1 a 10.

1. **Objeto e âmbito 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 matérias-primas para a alimentação animal, alimentos compostos para animais e pré-misturas contendo menos de 10 % ([5]) de cada aminoácido, utilizando um analisador de aminoácidos. O método é aplicável à determinação 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 vários sais de aminoácidos. Não é aplicável para a determinação do triptofano nem de derivados hidroxilados de aminoácidos.

2. **Princípio**

2.1. *Aminoácidos livres*

Os aminoácidos livres são extraídos com ácido clorídrico diluído. As macromoléculas azotadas co-extraídas são precipitadas com ácido sulfossalicílico 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 reação com ninidrina.

([4]) O método de análise previsto na norma EN 17180 é referido como um método alternativo a utilizar para efeitos de controlos oficiais na determinação de aminoácidos em alimentos para animais com um teor em aminoácidos superior a 10 %.

([5]) Este método não foi validado num ensaio colaborativo no que diz respeito a pré-misturas contendo mais de 10 % de aditivos para a alimentação animal. No entanto, é também aplicável a estas matrizes com pequenas modificações adequadas, desde que o método seja posteriormente validado internamente. Para mais informações, consultar https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation_en?prefLang=pt.

2.2. *Aminoácidos totais*

O procedimento a adotar depende dos aminoácidos a dosear. A cistina/cisteína e a metionina necessitam de oxidação a ácido cisteico e a metionina sulfona, respetivamente, antes da hidrólise. A tirosina é determinada nos hidrolisados de amostras não oxidadas. Todos os restantes aminoácidos referidos no ponto 1 (Objeto e âmbito de aplicação) podem ser determinados a partir de amostras oxidadas ou não oxidadas.

A oxidação é realizada a 0 °C, com uma mistura ácido perfórmico/fenol. O excesso de reagente de oxidação é decomposto com bissulfito de sódio. A amostra, oxidada ou não, é hidrolisada com ácido clorídrico (ponto 3.20) 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 reação com ninidrina.

3. **Reagentes**

Deve utilizar-se água bidestilada ou água de qualidade equivalente (condutividade inferior a 10 µS).

3.1. Peróxido de hidrogénio, w (m/m) = 30 %.

3.2. Ácido fórmico, w (m/m) = 98-100 %.

3.3. Fenol.

3.4. Bissulfito de sódio.

3.5. Hidróxido de sódio.

3.6. Ácido 5-sulfossalicílico di-hidratado.

3.7. Ácido clorídrico (densidade aproximada 1,18 g/ml).

3.8. Citrato trissódico di-hidratado.

3.9. 2,2'-Tiodietanol (tiodiglicol).

3.10. Cloreto de sódio.

3.11. Ninidrina.

3.12. Éter de petróleo, intervalo de ebulição: 40 a 60 °C.

3.13. Norleucina ou outro composto adequado, para ser usado como padrão interno.

3.14. Azoto (teor de oxigénio inferior a 10 ppm).

3.15. 1-Octanol.

3.16. Aminoácidos.

3.16.1. Substâncias-padrão dos aminoácidos referidos no ponto 1 (Objeto e âmbito de aplicação). 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, c = 7,5 mol/l:

Dissolver 300 g de NaOH (ponto 3.5) em água, e perfazer o volume de 1 litro.

3.18. Solução de hidróxido de sódio, c = 1 mol/l:

Dissolver 40 g de NaOH (ponto 3.5) em água, e perfazer o volume de 1 litro.

3.19. Solução de ácido fórmico/fenol:

Misturar 889 g de ácido fórmico (ponto 3.2) com 111 g de água e adicionar 4,73 g de fenol (ponto 3.3).

3.20. Mistura de hidrólise, c = 6 mol/l de HCl contendo 1 g de fenol/l:

Adicionar 1 g de fenol (ponto 3.3) a 492 ml de HCl (ponto 3.7) e perfazer o volume de 1 litro com água.

3.21. Mistura de extração, c = 0,1 mol/l de HCl contendo 2 % de tiodiglicol: Diluir 8,2 ml de HCl (ponto 3.7) em cerca de 900 ml de água, adicionar 20 ml de tiodiglicol (ponto 3.9) e perfazer o volume de 1 litro com água (não misturar diretamente os reagentes dos pontos 3.7 e 3.9).

3.22. Ácido 5-sulfossalicílico, ß = 6 %:

Dissolver 60 g de ácido 5-sulfossalicílico (ponto 3.6) em água e perfazer o volume de 1 litro.

3.23. Mistura oxidante (ácido perfórmico/fenol):

Misturar, num pequeno copo, 0,5 ml de peróxido de hidrogénio (ponto 3.1) com 4,5 ml de solução de ácido fórmico/fenol (ponto 3.19). Incubar a 20-30 °C durante uma 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 proteção.

3.24. Tampão citrato, c = 0,2 mol Na^+/l, pH = 2,20:

Dissolver 19,61 g de citrato de sódio (ponto 3.8), 5 ml de tiodiglicol (ponto 3.9), 1 g de fenol (ponto 3.3) e 16,50 ml de HCl (ponto 3.7) em cerca de 800 ml de água. Ajustar o pH a 2,20. Perfazer o volume de 1 litro com água.

3.25. Tampões de eluição, preparados em função do analisador utilizado (ponto 4.9).

3.26. Reagente de ninidrina, preparado em função do analisador utilizado (ponto 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 (ponto 3.16.1).

c = 2,5 µmol/ml de cada aminoácido em ácido clorídrico.

Disponíveis no comércio.

3.27.2. Solução-mãe padrão de ácido cisteico e metionina sulfona, c = 1,25 µmol/ml.

Dissolver, num balão volumétrico de 1 litro, 0,2115 g de ácido cisteico (ponto 3.16.2) e 0,2265 g de metionina sulfona (ponto 3.16.3) em tampão citrato (ponto 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. Esta solução não é necessária no caso de a solução-mãe padrão (ponto 3.27.1) conter ácido cisteico e metionina sulfona.

3.27.3. Solução-mãe de padrão interno, p. ex., norleucina, c = 20 µmol/ml.

Dissolver, num balão volumétrico de 250 ml, 0,6560 g de norleucina (ponto 3.13) em tampão citrato (ponto 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 nmol/50 µl de ácido cisteico e metionina sulfona e c = 10 nmol/50 µl dos restantes aminoácidos. Dissolver, num copo de 100 ml, 2,2 g de cloreto de sódio (ponto 3.10) em 30 ml de tampão citrato (ponto 3.24). Adicionar 4,00 ml de solução-mãe padrão de aminoácidos (ponto 3.27.1), 4,00 ml de solução-mãe padrão de ácido cisteico e metionina sulfona (ponto 3.27.2) e 0,50 ml de solução-mãe de padrão interno (ponto 3.27.3), se for caso disso. Ajustar o pH a 2,20 com a solução de hidróxido de sódio (ponto 3.18).

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

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

Ver igualmente observações no ponto 9.1.

3.27.5. Solução de calibração de aminoácidos-padrão para uso com os hidrolisados obtidos de acordo com o ponto 5.3.3.1, bem como com extratos (ponto 5.2). A solução de calibração é preparada em conformidade com o ponto 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. **Equipamento**

4.1. Balão de fundo redondo de 100 ml ou 250 ml equipado com um condensador de refluxo.

4.2. Frasco de vidro borossilicato de 100 ml munido de tampa de rosca com revestimento de borracha ou teflon (p. ex., Duran, Schott) para uso em estufa.

4.3. Estufa munida de um sistema de ventilação e de um sistema de regulação de temperatura com exatidão superior a ± 2 °C.

4.4. Medidor de pH (com leitura às milésimas).

4.5. Filtro de membrana (porosidade 0,22 μm).

4.6. Centrífuga.

4.7. Evaporador rotativo de vácuo.

4.8. Agitador mecânico ou magnético.

4.9. Analisador de aminoácidos ou aparelho de HPLC munido de uma coluna de troca iónica, derivatização pós-coluna com ninidrina e detetor fotométrico.

O enchimento da coluna é de resinas de poliestireno sulfonado que permitem separar os aminoácidos entre si, bem como de outros produtos com reação 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 ± 0,5 %, quer durante o ensaio de calibração, quer durante a execução da análise.

Em alguns analisadores de aminoácidos, é possível utilizar procedimentos de hidrólise cujos hidrolisados contenham uma concentração de sódio superior a 0,8 mol/l, bem como a totalidade do 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 do pH. A evaporação deve ser realizada sob vácuo, a uma temperatura não superior a 40 °C.

5. **Procedimento**

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 ao ar, a uma temperatura não superior a 50 °C, ou liofilizadas, antes da moagem. Se o seu teor de matérias gordas for elevado, as amostras terão de ser submetidas a uma extração com éter de petróleo (ponto 3.12) antes da moagem.

5.2. *Determinação dos aminoácidos livres*

Pesar num balão de Erlenmeyer, com uma aproximação de 0,2 mg, uma quantidade adequada (1-5 g) de amostra preparada de acordo com o ponto 5.1 e adicionar 100,0 ml de mistura de extração (ponto 3.21). Agitar durante 60 minutos em agitador mecânico ou magnético (ponto 4.8). Deixar sedimentar e pipetar 10,0 ml de solução sobrenadante para um copo de 100 ml.

Adicionar, sob agitação, 5,0 ml de solução de ácido sulfossalicílico (ponto 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 resultante num copo de 100 ml e ajustar o pH a 2,20 com solução de hidróxido de sódio (ponto 3.18), transferir para um balão volumétrico de volume adequado utilizando tampão citrato (ponto 3.24) e completar até à marca com a solução-tampão (ponto 3.24).

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

Efetuar a análise cromatográfica de acordo com o ponto 5.4.

Se os extratos 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 uma aproximação de 0,2 mg, entre 0,1 e 1 g de amostra preparada (ponto 5.1):

— num balão de fundo redondo de 100 ml (ponto 4.1), no caso de hidrólise em sistema aberto (ponto 5.3.2.3), ou

— num balão de fundo redondo de 250 ml (ponto 4.1), caso seja necessário um teor de sódio reduzido (ponto 5.3.3.1), ou

— num frasco de 100 ml munido de tampa de rosca (ponto 4.2), no caso de hidrólise em sistema fechado (ponto 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 até 0 °C, adicionar 5 ml de mistura oxidante (ponto 3.23) e misturar com uma vareta de vidro de ponta recurva. Selar o balão ou o frasco contendo a vareta com película impermeável ao ar, e colocar o conjunto constituído pelo recipiente selado e o banho de gelo no frigorífico, a 0 °C, durante 16 horas. Após este período, retirar do frigorífico e decompor o excesso de oxidante por adição de 0,84 g de bissulfito de sódio (ponto 3.4).

Continuar de acordo com o descrito no ponto 5.3.2.1.

5.3.2. Hidrólise

5.3.2.1. Hidrólise de amostras oxidadas

À amostra oxidada como descrito no ponto 5.3.1, adicionar 25 ml de mistura de hidrólise (ponto 3.20) tendo o cuidado de arrastar quaisquer resíduos de amostra das paredes do recipiente e da vareta.

Proceder em conformidade com o ponto 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 (ponto 4.1) ou num frasco de 100 ml munido de tampa de rosca (ponto 4.2), com uma aproximação de 0,2 mg, 0,1 a 1 g de amostra preparada (ponto 5.1). A porção de ensaio pesada deve ter um teor aproximado de azoto de 10 mg. Adicionar cuidadosamente 25 ml da mistura de hidrólise (ponto 3.20) e misturar. Proceder de acordo com o descrito no ponto 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 o ponto 5.3.2.1 ou 5.3.2.2 e manter em ebulição contínua, sob refluxo, durante 23 horas. Após a hidrólise, lavar o condensador pelo topo, com 5 ml de tampão citrato (ponto 3.24). Desmontar o conjunto e arrefecer o balão num banho de gelo.

Proceder de acordo com o ponto 5.3.3.

5.3.2.4. Hidrólise em sistema fechado

Colocar o frasco que contém a mistura preparada de acordo com o ponto 5.3.2.1 ou 5.3.2.2 numa estufa (ponto 4.3) a 110 °C. Durante a primeira hora, de modo a evitar um aumento da pressão (devido aos gases libertados) e para evitar uma explosão, colocar a tampa de rosca no topo do frasco sem, contudo, o vedar. Decorrida uma hora, vedar o frasco com a tampa e manter em estufa (ponto 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 citrato (ponto 3.24), transferir quantitativamente o conteúdo do frasco para um copo ou um balão de fundo redondo de 250 ml, em função do procedimento de ajuste do pH a utilizar (ponto 5.3.3).

Proceder de acordo com o ponto 5.3.3.

5.3.3. Ajuste do pH

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

5.3.3.1. Sistemas cromatográficos (ponto 4.9) que necessitem de um teor reduzido de sódio

É aconselhável utilizar uma solução-mãe de padrão interno (ponto 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).

Neste caso, adicionar 2,00 ml de solução-mãe de padrão interno (ponto 3.27.3) ao hidrolisado, antes da evaporação.

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

Em evaporador rotativo (ponto 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 (ponto 3.18), e proceder de acordo com o referido no ponto 5.3.4.

5.3.3.2. Restantes analisadores de aminoácidos (ponto 4.9)

Neutralizar parcialmente o hidrolisado obtido de acordo com o ponto 5.3.2.3 ou 5.3.2.4 mediante a adição cuidadosa, sob agitação, de 17 ml de solução de hidróxido de sódio (ponto 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 (ponto 3.17) e (ponto 3.18). Proceder de acordo com o ponto 5.3.4.

5.3.4. Solução de amostra para cromatografia

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

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 (ponto 3.24). Homogeneizar.

Efetuar a análise cromatográfica de acordo com o ponto 5.4.

Se as soluções de amostra 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 extrato (ponto 5.2) ou o produto de hidrólise (ponto 5.3.4) à temperatura ambiente. Agitar a mistura e filtrar uma quantidade adequada com um filtro de membrana de 0,22 μm (ponto 4.5). A solução límpida resultante é sujeita a cromatografia de troca iónica no analisador de aminoácidos (ponto 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 ± 0,5 %, exceto no caso de se utilizar um padrão interno, e a razão entre as concentrações de sódio e de aminoácidos na solução-padrão e na amostra deve ser tão próxima quanto possível.

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

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

Durante a cromatografia, as razões entre a altura do vale e a altura do pico referidas *infra* aplicam-se na análise de uma solução equimolar (dos aminoácidos a determinar). A solução equimolar de aminoácidos deve conter, pelo menos, 30 % da quantidade máxima de cada aminoácido que pode ser determinada com exatidão no analisador de aminoácidos (ponto 4.9).

Para a separação treonina-serina, se os respetivos picos estiverem 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 afeta a determinação). 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 respetivo teor (X), expresso em g por kg de amostra, calculado pela fórmula:

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

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

A = área do pico do hidrolisado ou do extrato,

B = área do pico da solução-padrão de calibração,

C = área do pico do padrão interno, no hidrolisado ou no extrato,

D = área do pico do padrão interno, na solução-padrão de calibração,

M = massa molecular do aminoácido a determinar,

c = concentração da solução-padrão, em µmol/ml,

m = massa (g) da amostra (corrigida em caso de secagem ou desengorduramento),

V = volume do hidrolisado (ponto 5.3.4) ou volume de diluição total do extrato (ponto 6.1), em ml.

A cistina e a cisteína são determinadas na forma de ácido cisteico, no hidrolisado da amostra oxidada, sendo expressas em cistina ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M = 240,30 g/mol), considerando M = 120,15 g/mol (0,5 × 240,30 g/mol).

A metionina é determinada na forma de metionina sulfona, no hidrolisado da amostra oxidada, sendo expressa em metionina, considerando M = 149,21 g/mol.

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

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

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

V = volume do extrato final.

7. **Avaliação do método**

O método foi testado 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).

Nota: O método foi testado num segundo estudo internacional de comparação interlaboratorial em 2003, que utilizou pares de duplicados cegos de amostras de alimentos de acabamento para frangos, alimentos de arranque para frangos, milho, farinha de peixe e farinha de aves de capoeira. Para mais pormenores, consultar a norma EN ISO 13903.

Os resultados da comparação interlaboratorial de 1990, após eliminação dos valores anómalos, para a média e o desvio-padrão são apresentados nos quadros seguintes:

Médias, expressas em g/kg

Material de referência	Aminoácidos			
	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*

Os valores relativos à repetibilidade, expressos em termos de "desvio-padrão intralaboratorial", obtidos na comparação interlaboratorial do quadro anterior são apresentados nos quadros seguintes:

Coeficiente de variação, expresso em percentagem, da repetibilidade (CV_r)

Material de referência	Aminoácidos			
	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*

Os valores do desvio-padrão interlaboratorial obtidos na comparação interlaboratorial acima mencionada são apresentados no quadro seguinte:

Coeficiente de variação, expresso em percentagem, da reprodutibilidade (CV_R)

Material de referência	Aminoácidos			
	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 correta do método mediante a realização de ensaios em duplicado com materiais de referência certificados, 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 de aminoácidos-padrão (ver pontos 3.27.4 e 3.27.5) e do hidrolisado (ver ponto 5.3.4).

A zona de resposta linear do aparelho deve ser verificada para todos os aminoácidos.

A solução-padrão é diluída com tampão citrato de modo que os picos surjam no meio dessa zona.

9.2. Quando se utilizar um aparelho de cromatografia líquida de alta resolução para análise dos hidrolisados, as condições experimentais devem ser otimizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

9.3. A aplicação do método a alimentos compostos para animais ou pré-misturas com mais de 1 % de cloretos (concentrados, minerais, alimentos complementares para animais) pode originar uma subestimação da metionina, sendo por isso necessário um tratamento especial.

10. **Critérios de desempenho**

A compilação dos resultados (exceto para a tirosina) dos dois estudos colaborativos (de 1990, apresentado acima no ponto 7, e de 2005, apresentado na norma EN ISO 13903) define os critérios seguintes para a repetibilidade e a reprodutibilidade. Os valores decorrentes desses dois ensaios interlaboratoriais podem não ser aplicáveis a gamas de concentração e matrizes diferentes das indicadas.

10.1. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações efetuadas na mesma amostra, no mesmo laboratório e pelo mesmo analista, não deve exceder:

— 6 % do maior dos valores, para aminoácidos totais no caso da glicina, da alanina, da lisina, da prolina, do ácido glutâmico, da isoleucina e da histidina,

— 8 % do maior dos valores, para aminoácidos totais no caso da treonina, da fenilalanina, da metionina, do ácido aspártico e da leucina,

— 10 % do maior dos valores, para aminoácidos totais no caso da arginina e da valina,

— 12 % do maior dos valores, para o aminoácido total serina,

— 15 % do maior dos valores, para o aminoácido total cistina/cisteína.

10.2. *Reprodutibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações efetuadas com a mesma amostra em laboratórios diferentes e/ou por analistas diferentes não deve exceder:

— 15 % do maior dos valores, para aminoácidos totais no caso da glicina, da alanina e da treonina,

— 20 % do maior dos valores, para aminoácidos totais no caso da lisina, da prolina, da fenilalanina, da metionina e do ácido aspártico,

— 22 % do maior dos valores, para aminoácidos totais no caso do ácido glutâmico e da leucina,

— 27 % do maior dos valores, para o aminoácido total arginina,

— 32 % do maior dos valores, para o aminoácido total isoleucina,

— 35 % do maior dos valores, para aminoácidos totais no caso da valina e da serina,

— 40 % do maior dos valores, para o aminoácido total histidina,

— 50 % do maior dos valores, para o aminoácido total cistina/cisteína.

F. DETERMINAÇÃO DO TRIPTOFANO

Os métodos de análise a utilizar na determinação do triptofano são:

— *EN ISO 13904 – Animal feeding stuffs – Determination of tryptophan content* (Alimentos para animais – Determinação do teor de triptofano)

— o método de análise a seguir descrito, nos pontos 1 a 9

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

O método permite determinar o triptofano livre e total em alimentos para animais. As formas D e L não são distinguidas.

2. **Princípio**

Para a determinação do triptofano total, procede-se à hidrólise da amostra em condições alcalinas com uma solução saturada de hidróxido de bário que se aquece em seguida a 110 °C durante 20 horas. Depois de concluída a hidrólise, adiciona-se um padrão interno.

Para a determinação do triptofano livre, efetua-se uma extração da amostra em condições moderadamente ácidas na presença de um padrão interno.

O triptofano e o padrão interno no hidrolisado ou no extrato são determinados por HPLC com deteção por fluorescência.

3. **Reagentes**

3.1. Água bidestilada ou água de qualidade equivalente (condutividade inferior a 10 µS/cm).

3.2. Substância-padrão: triptofano (grau de pureza/teor ≥ 99 %) seco sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo.

3.3. Padrão interno: α-metiltriptofano (grau de pureza/teor ≥ 99 %) seco sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo.

3.4. Hidróxido de bário octa-hidratado (tomar as devidas precauções para não expor excessivamente o $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ ao ar, para evitar a formação de $BaCO_3$, que poderia perturbar a determinação) (ver observação no ponto 9.3).

3.5. Hidróxido de sódio.

3.6. Ácido ortofosfórico, w (m/m) = 85 %.

3.7. Ácido clorídrico, ρ_{20} = 1,19 g/ml.

3.8. Metanol de qualidade equivalente para HPLC.

3.9. Éter de petróleo, intervalo de ebulição: 40 a 60 °C.

3.10. Solução de hidróxido de sódio, c = 1 mol/l:

Dissolver 40,0 g de NaOH (ponto 3.5) em água e completar o volume com água (ponto 3.1) até perfazer 1 litro.

3.11. Ácido clorídrico, c = 6 mol/l:

Misturar 492 ml de HCl (ponto 3.7) com água até perfazer 1 litro.

3.12. Ácido clorídrico, c = 1 mol/l:

Misturar 82 ml de HCl (ponto 3.7) com água até perfazer 1 litro.

3.13. Ácido clorídrico, c = 0,1 mol/l:

Misturar 8,2 ml de HCl (ponto 3.7) com água até perfazer 1 litro.

3.14. Ácido ortofosfórico, c = 0,5 mol/l:

Misturar 34 ml de ácido ortofosfórico (ponto 3.6) com água (ponto 3.1) até perfazer 1 litro.

3.15. Solução concentrada de triptofano (ponto 3.2), c = 2,50 µmol/ml:

Em balão volumétrico de 500 ml, dissolver 0,2553 g de triptofano (ponto 3.2) em ácido clorídrico (ponto 3.13) e completar o volume com o mesmo ácido (ponto 3.13) até ao traço. Conservar a -18 °C no máximo durante quatro semanas.

3.16. Solução concentrada de padrão interno, c = 2,50 µmol/ml:

Em balão volumétrico de 500 ml, dissolver 0,2728 g de α-metiltriptofano (ponto 3.3) em ácido clorídrico (ponto 3.13) e completar o volume com o mesmo ácido (ponto 3.13) até ao traço. Conservar a -18 °C no máximo durante quatro semanas.

3.17. Solução-padrão de calibração de triptofano e de padrão interno:

Tomar 2,00 ml da solução concentrada de triptofano (ponto 3.15) e 2,00 ml da solução concentrada de padrão interno (α-metiltriptofano) (ponto 3.16). Diluir com água (ponto 3.1) e metanol (ponto 3.8) até obter aproximadamente o mesmo volume e aproximadamente a mesma concentração de metanol (10-30 %) que o hidrolisado pronto.

A solução é preparada imediatamente antes da utilização.

Proteger da luz solar direta durante a preparação.

3.18. Ácido acético.

3.19. 1,1,1-Tricloro-2-metil-2-propanol.

3.20. Etanolamina, w (m/m) > 98 %.

3.21. Solução de 1 g de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (ponto 3.19) em 100 ml de metanol (ponto 3.8).

3.22. Fase móvel para HPLC: 3,00 g de ácido acético (ponto 3.18) + 900 ml de água (ponto 3.1) + 50,0 ml da solução 1 g/100 ml (ponto 3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (ponto 3.19) em metanol (ponto 3.8). Ajustar o pH a 5,00 com etanolamina (ponto 3.20). Completar o volume com água (ponto 3.1) até perfazer 1 000 ml.

4. **Equipamento**

4.1. Aparelho para HPLC com espetrofluorímetro.

4.2. Coluna para cromatografia líquida com 125 mm × 4 mm e enchimento C_{18} de 3 µm, ou equivalente.

4.3. Medidor de pH.

4.4. Frasco de polipropileno de 125 ml, com colo largo e tampa de rosca.

4.5. Filtro de membrana, porosidade 0,45 µm.

4.6. Autoclave, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.

4.7. Agitador mecânico ou magnético.

4.8. Agitador vortex.

5. **Procedimento**

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 ao ar, a uma temperatura não superior a 50 °C, ou liofilizadas, antes da moagem. Se o seu teor de matérias gordas for elevado, as amostras terão de ser submetidas a uma extração com éter de petróleo (ponto 3.9) antes da moagem.

5.2. *Determinação do triptofano livre (extração)*

Pesar num balão de Erlenmeyer, com uma aproximação de 1 mg, uma quantidade adequada (1-5 g) de amostra preparada de acordo com o ponto 5.1. Adicionar 100,0 ml de ácido clorídrico (ponto 3.13) e 5,00 ml da solução concentrada de padrão interno (ponto 3.16). Agitar durante 60 minutos em agitador mecânico ou magnético (ponto 4.7). Deixar sedimentar e pipetar 10,0 ml da solução sobrenadante para um copo. Adicionar 5 ml de ácido ortofosfórico (ponto 3.14). Ajustar o pH a 3 com a solução de hidróxido de sódio (ponto 3.10). Adicionar metanol (ponto 3.8) em quantidade suficiente para obter uma concentração de metanol no volume final compreendida entre 10 % e 30 %. Transferir para um balão volumétrico de capacidade adequada e diluir com água até ao volume necessário para a cromatografia [aproximadamente o mesmo volume que a solução-padrão de calibração (ponto 3.17)].

Filtrar alguns mililitros da solução por um filtro de membrana de 0,45 µm (ponto 4.5) antes de proceder à injeção na coluna de HPLC. Efetuar a análise cromatográfica de acordo com o ponto 5.4.

Proteger a solução-padrão e os extratos da luz solar direta. Se os extratos não puderem ser analisados no mesmo dia, podem ser conservados a 5 °C durante um máximo de três dias.

5.3. *Determinação do triptofano total (hidrolisado)*

Pesar em frasco de polipropileno (ponto 4.4), com uma aproximação de 0,2 mg, 0,1 g a 1 g da amostra preparada de acordo com o ponto 5.1. A toma de amostra para ensaio deve ter um teor aproximado de azoto de 10 mg. Adicionar 8,4 g de hidróxido de bário octa-hidratado (ponto 3.4) e 10 ml de água. Agitar em agitador vortex (ponto 4.8) ou magnético (ponto 4.7) (deixar o magnete revestido a teflon no frasco). Lavar as paredes do frasco com 4 ml de água. Colocar a tampa de rosca e fechar o frasco sem enroscar muito a tampa. Colocar na autoclave (ponto 4.6) com água em ebulição e manter sob a ação do vapor durante 30-60 minutos. Fechar a autoclave e manter a 110 (± 2) °C durante 20 horas.

Antes de abrir a autoclave, reduzir a temperatura a um pouco menos de 100 °C. Para evitar a cristalização do $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, adicionar à mistura quente 30 ml de água à temperatura ambiente. Agitar com cuidado. Adicionar 2,00 ml da solução concentrada de padrão interno (α-metiltriptofano) (ponto 3.16). Arrefecer o recipiente num banho de água/gelo durante 15 minutos.

Adicionar, em seguida, 5 ml de ácido ortofosfórico (ponto 3.14). Manter o recipiente no banho de arrefecimento e neutralizar com HCl (ponto 3.11), sob agitação; ajustar o pH a 3,0 com HCl (ponto 3.12). Adicionar metanol em quantidade suficiente para obter uma concentração de metanol no volume final compreendida entre 10 % e 30 %. Transferir para um balão volumétrico de capacidade adequada e diluir com água até ao volume necessário para a cromatografia (por exemplo, 100 ml). A adição de metanol não deve produzir precipitação.

Filtrar alguns mililitros da solução por um filtro de membrana de 0,45 µm (ponto 4.5) antes de proceder à injeção na coluna de HPLC. Efetuar a análise cromatográfica de acordo com o ponto 5.4.

Proteger a solução-padrão e o hidrolisado da luz solar direta. Se o hidrolisado não puder ser analisado no mesmo dia, pode ser conservado a 5 °C durante um máximo de três dias.

5.4. *Análise por HPLC*

As condições a seguir especificadas para a eluição isocrática são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes (ver igualmente observações nos pontos 9.1 e 9.2):

Coluna para cromatografia líquida (ponto 4.2):	125 mm × 4 mm e enchimento C_{18} de 3 µm, ou equivalente
Temperatura da coluna:	Temperatura ambiente
Fase móvel (ponto 3.22):	3,00 g de ácido acético (ponto 3.18) + 900 ml de água (3.1) + 50,0 ml da solução (ponto 3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (ponto 3.19) em metanol (ponto 3.8) (1 g/100 ml). Ajustar o pH a 5,00 com etanolamina (ponto 3.20). Perfazer o volume de 1 000 ml com água (ponto 3.1).
Caudal:	1 ml/min
Tempo total de eluição:	cerca de 34 minutos
Comprimento de onda de deteção:	excitação: 280 nm; emissão: 356 nm
Volume injetado:	20 µl

6. **Cálculo dos resultados**

A quantidade de triptofano (X), expressa em gramas, por 100 gramas de amostra, é calculada através da fórmula seguinte:

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = área do pico do padrão interno na solução-padrão de calibração (ponto 3.17)

B = área do pico do triptofano no extrato (ponto 5.2) ou no hidrolisado (ponto 5.3)

V_1 = volume em ml (2 ml) de solução concentrada de triptofano (ponto 3.15) adicionado à solução de calibração (ponto 3.17)

c = concentração, em µmol/ml (= 2,50), da solução concentrada de triptofano (ponto 3.15) adicionada à solução de calibração (ponto 3.17)

V_2 = volume, em ml, da solução concentrada de padrão interno (ponto 3.16) adicionado na extração (ponto 5.2) (= 5,00 ml) ou na hidrólise (ponto 5.3) (= 2,00 ml)

C = área do pico do padrão interno no extrato (ponto 5.2) ou no hidrolisado (ponto 5.3)

D = área do pico do triptofano na solução-padrão de calibração (ponto 3.17)

V_3 = volume em ml (= 2,00 ml) de solução concentrada de padrão interno (ponto 3.16) adicionado à solução-padrão de calibração (ponto 3.17)

m = massa, em g, da amostra (corrigida para a massa original se tiver sido submetida a secagem e/ou desengorduramento)

M = massa molecular do triptofano (= 204,23 g/mol)

7. **Repetibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder 10 % do maior dos valores.

8. **Resultados de um estudo colaborativo**

Tendo em vista a certificação do método de hidrólise, foi organizado um estudo colaborativo da UE (quarta comparação interlaboratorial), no âmbito do qual foram analisadas três amostras em 12 laboratórios. Cada amostra foi analisada em quintuplicado. Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte:

	Amostra 1 Alimento para suínos	Amostra 2 Alimento para suínos com suplemento de L-triptofano	Amostra 3 Alimento concentrado para suínos
L	12	12	12
n	50	55	50
Média [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
S_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L = número de laboratórios que apresentaram resultados

n = número de resultados individuais considerado (com exceção dos valores anómalos, identificados pelo teste de Cochran, Dixon)

s_r = desvio-padrão da repetibilidade

S_R = desvio-padrão da reprodutibilidade

r = repetibilidade

R = reprodutibilidade

CV_r = coeficiente de variação da repetibilidade (%)

CV_R = coeficiente de variação da reprodutibilidade (%)

Tendo em vista a certificação do método de extração do triptofano livre, foi organizado um outro estudo colaborativo da UE (terceira comparação interlaboratorial), no âmbito do qual foram analisadas duas amostras em 13 laboratórios. Cada amostra foi analisada em quintuplicado. Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte:

	Amostra 4 Mistura de trigo e soja	Amostra 5 Mistura de trigo e soja (= amostra 4) com triptofano adicionado (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Média [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
S_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L = número de laboratórios que apresentaram resultados

n = número de resultados individuais considerado (com exceção dos valores anómalos, identificados pelo teste de Cochran, Dixon)

s_r = desvio-padrão da repetibilidade

S_R = desvio-padrão da reprodutibilidade

r = repetibilidade

R = reprodutibilidade

CV_r = coeficiente de variação da repetibilidade (%)

CV_R = coeficiente de variação da reprodutibilidade (%)

Tendo em vista a certificação do triptofano para a hidrólise, foi organizado um outro estudo de comparação interlaboratorial da UE, no âmbito do qual foram analisadas quatro amostras em sete laboratórios. Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte. Cada amostra foi analisada em quintuplicado.

	Amostra 1 Alimento misto para suínos (CRM 117)	Amostra 2 Farinha de peixe com baixo teor de matérias gordas (CRM 118)	Amostra 3 Farinha de soja (CRM 119)	Amostra 4 Leite em pó desnatado (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Média [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = número de laboratórios que apresentaram resultados

n = número de resultados individuais considerado (com exceção dos valores anómalos, identificados pelo teste de Cochran, Dixon)

s_r = desvio-padrão da repetibilidade

S_R = desvio-padrão da reprodutibilidade

r = repetibilidade

R = reprodutibilidade

CV_r = coeficiente de variação da repetibilidade (%)

CV_R = coeficiente de variação da reprodutibilidade (%)

9. **Observações**

9.1. A aplicação das condições cromatográficas a seguir especificadas pode permitir uma melhor separação entre o triptofano e o α-metiltriptofano.

Eluição isocrática seguida de lavagem da coluna com aplicação de um gradiente:

Coluna para cromatografia líquida:	125 mm × 4 mm, enchimento C_{18} de 5 µm, ou equivalente	
Temperatura da coluna:	32 °C	
Fase móvel:	A: KH_2PO_4 (0,01 mol/l)/metanol 95 + 5 (V + V)	
	B: metanol	
Gradiente a aplicar:	0 min 100 % A	0 % B
	15 min	100 % A
	17 min	60 % A
	19 min	60 % A
	21 min	100 % A
	33 min	100 % A
Caudal:	1,2 ml/min	
Tempo total de eluição:	cerca de 33 minutos	

9.2. A cromatografia varia em função do tipo de aparelho de HPLC e do material de enchimento da coluna. O sistema selecionado deve permitir separar o triptofano do padrão interno com retorno à linha de base. É também importante que os produtos de degradação sejam bem separados do triptofano e do padrão interno. Devem efetuar-se algumas passagens cromatográficas de hidrolisados sem padrão interno para avaliar da presença de impurezas na zona da linha de base correspondente ao padrão interno. É importante que o tempo total de eluição seja suficientemente longo para eluir todos os produtos de degradação; caso contrário, pode haver interferência de picos eluídos tardiamente em passagens cromatográficas posteriores.

O sistema cromatográfico deve produzir uma resposta linear nas condições de trabalho. A linearidade da resposta deve ser determinada com uma concentração constante (normal) do padrão interno e concentrações variáveis de triptofano. É importante que o tamanho dos picos do triptofano e do padrão interno esteja dentro da zona de linearidade do sistema de HPLC/fluorescência. Se o(s) pico(s) do triptofano e/ou do padrão interno for(em) muito grande(s) ou muito pequeno(s), haverá que repetir a análise com outra dimensão de amostra e/ou um volume final devidamente ajustado.

9.3. *Hidróxido de bário*

Com o tempo, a dissolução do hidróxido de bário torna-se mais difícil. Daí resulta uma solução turva para a análise por HPLC, a qual pode produzir resultados por defeito para o triptofano.

G. DETERMINAÇÃO DAS MATÉRIAS GORDAS BRUTAS

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método tem por objetivo a determinação das matérias gordas brutas nos alimentos para animais.

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

Para a determinação de matérias gordas brutas nas sementes e frutos oleaginosos, bem como nos alimentos para animais que contenham mais de 15 % de matérias gordas brutas, a extração e reextração devem ser efetuadas utilizando, respetivamente, o processo A e o processo B (ponto 5.3).

1.1. Processo A — Matérias gordas brutas extraíveis diretamente

Este método é aplicável a matérias-primas para a alimentação animal de origem vegetal, com exceção daquelas a que é aplicável o processo B.

1.2. Processo B — Matérias gordas brutas totais

Este método é aplicável a matérias-primas para a alimentação animal de origem animal e a todos os alimentos compostos para animais. Deve ser utilizado para todas as matérias-primas das quais não se possam extrair completamente as matérias gordas sem hidrólise prévia (p. ex., glúten, leveduras, proteínas de batata e produtos submetidos a processos como a extrusão, transformação em flocos 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 com éter de petróleo. O solvente é destilado e o resíduo é seco e pesado.

2.2. *Processo B*

A amostra é tratada a quente com 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, c = 3 mol/l.

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

4. **Equipamento**

4.1. Extrator. Se o dispositivo for munido de um sifão (aparelho Soxhlet), a taxa de refluxo deve ser regulada de maneira a obter cerca de 10 ciclos por hora; se se tratar de um aparelho sem sifão, a taxa de refluxo deve ser de cerca de 10 ml por minuto.

4.2. Cartuchos de extração, isentos de matérias solúveis em éter de petróleo, com uma porosidade compatível com as exigências do ponto 4.1.

4.3. Estufa, quer de vácuo, a 75 °C ± 3 °C, quer de ar, a 100 °C ± 3 °C.

5. **Procedimento**

5.1. Processo A (ver ponto 8.1)

Pesar 5 g de amostra, com uma aproximação de 1 mg, introduzi-los num cartucho de extração (ponto 4.2) e cobri-los com um tampão de algodão isento de matéria gorda.

Colocar o cartucho num extrator (ponto 4.1) e proceder à extração durante 6 horas com éter de petróleo (ponto 3.1). Recolher o extrato de éter de petróleo num balão seco com tara calculada, contendo fragmentos de pedra-pomes ([6]).

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

([6]) Substituir os fragmentos de pedra-pomes por pérolas de vidro sempre que a matéria gorda deva ser objeto de exames qualitativos posteriores.

5.2. *Processo B*

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 2,5 g de amostra (ver ponto 8.2), introduzi-los num copo de 400 ml ou num balão de Erlenmeyer de 300 ml e juntar 100 ml de ácido clorídrico (ponto 3.3) e alguns fragmentos de pedra-pomes. Cobrir o copo com um vidro de relógio ou munir o balão de Erlenmeyer 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 (ponto 3.4) suficiente para evitar qualquer perda de matéria gorda na filtração. Filtrar num papel de filtro duplo, humidificado 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 efetuada uma extração da amostra com 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 (ponto 4.3) a 100 °C ± 3 °C.

Introduzir o papel de filtro duplo contendo o resíduo seco num cartucho de extração (ponto 4.2) e cobrir com um tampão de algodão isento de matéria gorda. Colocar o cartucho num extrator (ponto 4.1) e prosseguir como indicado nos segundo e terceiro parágrafos do ponto 5.1.

5.3. *Processo A e reextração pelo processo B*

Para a determinação das matérias gordas brutas nas sementes e frutos oleaginosos, bem como nos alimentos para animais que contenham mais de 15 % de matérias gordas brutas, a extração e a reextração devem ser efetuadas utilizando, respetivamente, o processo A e o processo B.

Tal significa que após a extração com éter de petróleo (processo A), o resíduo ou uma porção do resíduo é reextraído com ácido clorídrico (processo B). O teor em matérias gordas brutas corresponde à soma dos valores obtidos pelos processos A e B.

6. **Expressão dos resultados**

Exprimir a massa do resíduo em percentagem da amostra.

7. **Repetibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra pelo mesmo analista não deve exceder:

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

— 4,0 % do maior dos valores para teores entre 5 e 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 de ensaio reduzida e homogénea, proceder como se segue:

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 20 g de amostra e misturá-los com 10 g ou mais de sulfato de sódio anidro (ponto 3.2). Extrair com éter de petróleo (ponto 3.1) como indicado no ponto 5.1. Completar o extrato obtido com éter de petróleo (ponto 3.1) até perfazer 500 ml e misturar. Introduzir 50 ml de solução num pequeno balão seco com tara calculada, contendo fragmentos de pedra-pomes. Eliminar o solvente por destilação, secar e prosseguir como indicado no último parágrafo do ponto 5.1.

Eliminar o solvente do resíduo de extração que se encontra no cartucho de extração, triturar o resíduo até atingir uma granulometria de 1 mm, colocá-lo novamente no cartucho de extração (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:

$$(10\ m_1 + m_2)\ \times\ 5$$

em que:

m_1 = massa, em gramas, do resíduo da primeira extração (alíquota do extrato),

m_2 = massa, em gramas, do resíduo da segunda extração.

8.2. No caso de determinados produtos (p. ex., produtos pobres em matérias gordas), a amostra de ensaio pode ser aumentada.

8.3. Os alimentos para animais de companhia com um elevado teor de água podem ter de ser misturados com sulfato de sódio anidro antes da hidrólise e da extração, como para o 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 uma hora e meia pode ter de ser aumentado. A secagem excessiva deve ser evitada, pois pode levar a resultados por defeito. Pode também ser utilizado um forno de micro-ondas.

H. DETERMINAÇÃO DA FIBRA BRUTA

1. Objeto e âmbito de aplicação

O presente método permite efetuar a determinação, em alimentos para animais, de substâncias orgânicas isentas de gordura e insolúveis em meio ácido e em meio alcalino, convencionalmente designadas por fibra bruta.

O método não é aplicável na determinação de lignocelulose e carvão vegetal (partículas demasiado finas).

2. Princípio

A amostra, eventualmente desengordurada, é tratada sucessivamente com soluções de ácido sulfúrico e hidróxido de potássio em ebulição, de concentrações determinadas. O resíduo é separado por filtração num filtro de vidro calcinato, lavado, seco, pesado e incinerado a uma temperatura compreendida entre 475 e 500 °C. A perda de massa resultante da incineração corresponde à fibra bruta presente na amostra de ensaio.

3. Reagentes

3.1. Ácido sulfúrico, c = 0,13 mol/l.

3.2. Agente antiespuma (p. ex., n-octanol).

3.3. Adjuvante de filtração (Celite 545 ou equivalente), aquecido a 500 °C durante quatro horas (ponto 8.6).

3.4. Acetona.

3.5. Éter de petróleo, intervalo de ebulição: 40 a 60 °C.

3.6. Ácido clorídrico, c = 0,5 mol/l.

3.7. Solução de hidróxido de potássio, c = 0,23 mol/l.

4. Equipamento

4.1. Unidade de aquecimento para a mineralização com ácido sulfúrico e hidróxido de potássio, equipada com um suporte para o cadinho de filtração (ponto 4.2) e com um tubo, munido de uma torneira, para a saída do líquido e para efetuar o vácuo, por recurso eventual a ar comprimido. Diariamente, antes do uso, proceder ao pré-aquecimento da unidade com água em ebulição, durante cinco minutos.

4.2. Cadinho de filtração de vidro, com uma placa filtrante de vidro calcinato fundido, de porosidade 40-90 µm. Antes da primeira utilização, aquecer a 500 °C durante alguns minutos, arrefecendo em seguida (ponto 8.6).

4.3. Balão, próprio para ebulição, com uma capacidade mínima de 270 ml, equipado com um condensador de refluxo.

4.4. Estufa com termóstato.

4.5. Mufla com termóstato.

4.6. Unidade de extração a frio, constituída por um suporte para o cadinho de filtração (ponto 4.2) e por um tubo de descarga equipado com torneira, para efetuar o vácuo e para a saída do líquido.

4.7. Juntas para a montagem da unidade de aquecimento (ponto 4.1), do cadinho de filtração (ponto 4.2) e do balão (ponto 4.3) assim como para a ligação da unidade de extração a frio (ponto 4.6) com o cadinho.

5. **Procedimento**

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 1 g de amostra, previamente preparada, transferindo-a para o cadinho de filtração (ponto 4.2) (ver observações nos pontos 9.1, 9.2 e 9.3) e adicionar 1 g de adjuvante de filtração (ponto 3.3).

Montar a unidade de aquecimento (ponto 4.1) e o cadinho de filtração (ponto 4.2), adaptando em seguida o balão (ponto 4.3) ao cadinho. Adicionar ao balão 150 ml de ácido sulfúrico (ponto 3.1), em ebulição, juntando algumas gotas de agente antiespuma (ponto 3.2), se necessário.

Levar o líquido à ebulição em 5 ± 2 minutos, deixando ferver vigorosamente durante exatamente 30 minutos.

Abrir a torneira do tubo de descarga (ponto 4.1) e filtrar, sob vácuo, o ácido sulfúrico através do cadinho de filtração. Ainda sob vácuo, lavar o resíduo no filtro com três porções sucessivas, de 30 ml cada, de água em ebulição. Assegurar que o resíduo fica seco por aspiração, após cada lavagem.

Fechar a torneira e adicionar mais 150 ml de hidróxido de potássio (ponto 3.7) em ebulição. Juntar algumas gotas de agente antiespuma (ponto 3.2). Levar o líquido à ebulição em 5 ± 2 minutos, deixando ferver vigorosamente durante exatamente 30 minutos. Filtrar o resíduo, lavando-o de modo idêntico ao descrito no tratamento com ácido sulfúrico.

Após a última lavagem e secagem, retirar o cadinho com o seu conteúdo e adaptá-lo à unidade de extração a frio (ponto 4.6). Ligar o vácuo e lavar o resíduo com três porções sucessivas, de 25 ml cada, de acetona (ponto 3.4), secando o resíduo por aspiração, após cada lavagem.

Secar o cadinho de filtração até massa constante, na estufa, a 130 °C. Após cada secagem, arrefecer no exsicador e pesar de imediato. Colocar o cadinho na mufla, incinerando entre 475 e 500 °C, durante pelo menos 30 minutos, até massa constante (a perda de massa entre duas pesagens sucessivas deve ser igual ou inferior a 2 mg).

Após cada calcinação, proceder ao arrefecimento na mufla e, em seguida no exsicador, antes de pesar.

Efetuar um ensaio em branco. A perda de massa resultante da incineração não deverá, neste caso, exceder 4 mg.

6. **Cálculo dos resultados**

O teor de fibra bruta, expresso em percentagem da amostra, é dado pela expressão:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

em que:

m = massa da amostra, em g,

m_0 = perda de massa após incineração, durante a determinação, em g,

m_1 = perda de massa após incineração, durante o ensaio em branco, em g.

7. **Repetibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder:

— 0,6 % em valor absoluto, para os teores de fibra bruta inferiores a 10 %,

— 6 % do maior dos valores, para os teores de fibra bruta iguais ou superiores a 10 %.

8. **Reprodutibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações efetuadas com a mesma amostra em laboratórios diferentes não deve exceder:

— 1,0 % em valor absoluto, para os teores de fibra bruta inferiores a 10 %,

— 10 % do maior dos valores, para os teores de fibra bruta iguais ou superiores a 10 %.

9. **Observações**

9.1. Os alimentos para animais cujo teor de gordura bruta seja superior a 10 % deverão ser previamente desengordurados, por recurso a éter de petróleo (ponto 3.5). Adaptar o cadinho de filtração (ponto 4.2) com o seu conteúdo à unidade de extração a frio (ponto 4.6) e lavar, sob vácuo, com três porções sucessivas, de 30 ml cada, de éter de petróleo, assegurando que o resíduo está seco. Adaptar o cadinho com o seu conteúdo à unidade de aquecimento (ponto 4.1), continuando de acordo com a descrição efetuada no ponto 5.

9.2. Os alimentos para animais que contenham gorduras que não possam ser extraídas diretamente com éter de petróleo (ponto 3.5) deverão ser desengordurados de acordo com o método descrito no ponto 8.1 e sujeitos a um novo processo de desengorduramento, precedido do tratamento com ácido em ebulição. Após tratamento com ácido e lavagem subsequente, adaptar o cadinho com o seu conteúdo à unidade de extração a frio (ponto 4.6), lavando com três porções sucessivas, de 30 ml cada, de acetona, seguidas de três porções sucessivas, também de 30 ml, de éter de petróleo. Secar por aspiração e continuar o processo de acordo com a descrição efetuada no ponto 5, começando pelo tratamento com hidróxido de potássio.

9.3. Se o teor em carbonatos dos alimentos para animais exceder 5 %, expressos em carbonato de cálcio, adaptar o cadinho (ponto 4.2) com a amostra pesada à unidade de aquecimento (ponto 4.1). Lavar a amostra com três porções sucessivas, de 30 ml cada, de ácido clorídrico (ponto 3.6). Após cada adição, deixar a amostra repousar durante cerca de um minuto, antes de filtrar. Lavar uma vez com 30 ml de água e continuar de acordo com a descrição efetuada no ponto 5.

9.4. No caso da utilização de uma bateria de aparelhos (vários cadinhos ligados à mesma unidade de aquecimento), não se deverá proceder, na mesma série, a duas determinações diferentes com a mesma amostra.

9.5. Se, após a ebulição, a filtração das soluções ácidas e alcalinas se revelar difícil, proceder à introdução de ar comprimido pelo tubo de descarga da unidade de aquecimento, continuando em seguida a filtração.

9.6. Com vista a prolongar a vida média dos cadinhos de filtração de vidro, é conveniente não utilizar temperaturas de incineração superiores a 500 °C. Dever-se-ão igualmente evitar quaisquer choques térmicos excessivos no decurso dos ciclos de aquecimento e arrefecimento.

I. DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar os açúcares redutores e os açúcares totais após inversão, expressos sob a forma de glucose ou eventualmente sob a forma de sacarose, utilizando 0,95 como fator de conversão. Este método é aplicável aos alimentos compostos. Existem métodos especiais para outros alimentos para animais. Se for necessário, poderá medir-se separadamente a lactose, não sem ter em conta o respetivo valor no cálculo dos resultados.

Este método é utilizado na determinação do teor de açúcar para o cálculo do valor energético dos alimentos para animais.

Na determinação do teor de açúcar para outros efeitos, podem utilizar-se outros métodos de análise.

2. **Princípio**

Os açúcares são extraídos com etanol diluído e a solução é clarificada com soluções de Carrez I e II. Uma vez eliminado o etanol, efetuam-se as determinações, antes e depois da inversão, aplicando o método de Luff-Schoorl.

3. **Reagentes**

3.1. Etanol, solução a 40 % (v/v), densidade: 0,948 g/ml a 20 °C, ajustado para o ponto de viragem da fenolftaleína.

3.2. Solução de Carrez I: dissolver em água 21,9 g de acetato de zinco, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2$, e 3 g de ácido acético glacial. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.3. Solução de Carrez II: dissolver em água 10,6 g de ferrocianeto de potássio, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.4. Alaranjado de metilo, solução a 0,1 % (m/v).

3.5. Ácido clorídrico 4 mol/l.

3.6. Ácido clorídrico 0,1 mol/l.

3.7. Solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/l.

3.8. Reagente de Luff-Schoorl:

Agitando lentamente, deitar a solução de ácido cítrico (ponto 3.8.2) na solução de carbonato de sódio (ponto 3.8.3). Juntar em seguida a solução de sulfato de cobre (ponto 3.8.1) e perfazer o volume de 1 litro com água. Deixar repousar durante a noite e filtrar.

Verificar a concentração do reagente assim obtido (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l), ver o último parágrafo do ponto 5.4. O pH da solução deverá ser cerca de 9,4.

3.8.1. Solução de sulfato de cobre: dissolver 25 g de sulfato de cobre, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, isento de ferro, em 100 ml de água.

3.8.2. Solução de ácido cítrico: dissolver 50 g de ácido cítrico, $C_6H_8O_7 \bullet H_2O$, em 50 ml de água.

3.8.3. Solução de carbonato de sódio: dissolver 143,8 g de carbonato de sódio anidro em cerca de 300 ml de água quente. Deixar arrefecer.

3.9. Solução de tiossulfato de sódio 0,1 mol/l.

3.10. Solução de amido: juntar uma mistura de 5 g de amido solúvel e 30 ml de água a 1 litro de água a ferver. Manter em ebulição durante três minutos, deixar arrefecer e juntar, se necessário, 10 mg de iodeto de mercúrio como conservante.

3.11. Ácido sulfúrico 3 mol/l.

3.12. Solução de iodeto de potássio a 30 % (m/v).

3.13. Pedra-pomes granulada fervida em ácido clorídrico, lavada com água e seca.

3.14. 3-Metilbutan-1-ol.

4. **Equipamento**

Misturador basculante: cerca de 35 a 40 rotações por minuto.

5. **Procedimento**

5.1. *Extração da amostra*

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 2,5 g de amostra e introduzi-la num balão volumétrico de 250 ml. Juntar 200 ml de etanol (ponto 3.1) e misturar durante uma hora no misturador. Juntar 5 ml de solução de Carrez I (ponto 3.2) e agitar durante cerca de 30 segundos. Juntar em seguida 5 ml de solução de Carrez II (ponto 3.3) e tornar a agitar, durante um minuto. Completar o volume com etanol (ponto 3.1), homogeneizar e filtrar. Recolher 200 ml de filtrado e evaporá-lo até cerca de metade do volume a fim de eliminar a maior parte do etanol. Transferir quantitativamente o resíduo da evaporação com água quente para um balão volumétrico de 200 ml, deixar arrefecer, completar o volume com água, homogeneizar e, se necessário, filtrar. Esta será a solução utilizada para a determinação dos açúcares redutores e, após inversão, dos açúcares totais.

5.2. *Determinação dos açúcares redutores*

Com uma pipeta, recolher uma quantidade de solução, não superior a 25 ml, que contenha menos de 60 mg de açúcares redutores, expressos em glucose. Se necessário, perfazer o volume de 25 ml com água destilada e determinar o teor de açúcares redutores pelo método de Luff-Schoorl. O resultado é expresso em percentagem de glucose na amostra.

5.3. *Determinação dos açúcares totais após a inversão*

Com a pipeta, recolher 50 ml de solução e deitá-la num balão volumétrico de 100 ml. Juntar algumas gotas de solução de alaranjado de metilo (ponto 3.4) e em seguida ácido clorídrico (ponto 3.5) lentamente e mexendo sempre, até que haja uma viragem nítida para vermelho. Juntar 15 ml de ácido clorídrico (3.6) e mergulhar o balão, durante 30 minutos, em água fervendo abundantemente. Arrefecer rapidamente até cerca de 20 °C e juntar 15 ml de solução de hidróxido de sódio (ponto 3.7). Perfazer o volume de 100 ml com água e homogeneizar. Recolher uma quantidade não superior a 25 ml e que contenha menos de 60 mg de açúcares redutores expressos em glucose. Se necessário, perfazer o volume de 25 ml com água destilada e determinar o teor de açúcares redutores pelo método de Luff-Schoorl. O resultado deverá ser expresso em percentagem de glucose, ou eventualmente sacarose, multiplicando pelo fator 0,95.

5.4. *Titulação pelo método de Luff-Schoorl*

Recolher, com uma pipeta, 25 ml de reagente de Luff-Schoorl (ponto 3.8) e deitá-lo para um balão de Erlenmeyer de 300 ml; juntar 25 ml exatos da solução de açúcares já clarificada. Juntar dois grânulos de pedra-pomes (ponto 3.13), aquecer, agitando manualmente sobre uma chama aberta de altura média, e levar o líquido à ebulição em cerca de dois minutos. Colocar imediatamente o balão de Erlenmeyer sobre uma placa com rede de amianto com uma abertura de cerca de 6 cm de diâmetro, sob a qual terá sido previamente acendida uma chama, regulada de forma a aquecer apenas o fundo do balão de Erlenmeyer. Ajustar ao balão de Erlenmeyer um condensador de refluxo. Deixar em ebulição durante exatamente dez minutos. Arrefecer imediatamente em água fria durante cerca de cinco minutos e titular como se segue:

Juntar 10 ml de solução de iodeto de potássio (ponto 3.12) e, imediatamente depois e com cuidado (dado o risco de formação de espuma abundante), adicionar 25 ml de ácido sulfúrico (ponto 3.11). Titular seguidamente com a solução de tiossulfato de sódio (ponto 3.9) até ao aparecimento de uma coloração amarelada, juntar o indicador de amido (ponto 3.10) e completar a titulação.

Efetuar a mesma titulação numa mistura, medida com exatidão, de 25 ml de reagente de Luff-Schoorl (ponto 3.8) e 25 ml de água, a que se juntam 10 ml de solução de iodeto de potássio (ponto 3.12) e 25 ml de ácido sulfúrico (ponto 3.11), sem levar à ebulição.

6. **Cálculo dos resultados**

Calcular por meio da tabela a quantidade de glucose, expressa em mg, correspondente à diferença entre os valores das duas titulações, expressos em ml de tiossulfato de sódio 0,1 mol/l. Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

7. **Procedimentos especiais**

7.1. No caso de alimentos muito ricos em melaço ou pouco homogéneos, pesar uma amostra de 20 g e introduzi-la com 500 ml de água num balão volumétrico de 1 litro. Misturar durante uma hora no misturador. Clarificar com soluções de Carrez I (ponto 3.2) e II (ponto 3.3) tal como se descreve no ponto 5.1, mas utilizando uma quantidade quatro vezes superior de cada solução. Completar o volume até à marca com etanol a 80 % (v/v).

Homogeneizar e filtrar. Eliminar o etanol como se descreve no ponto 5.1. Na ausência de amido dextrinizado, completar o volume até à marca com água destilada.

7.2. No caso dos melaços e das matérias-primas para a alimentação animal ricas em açúcares e praticamente isentas de amido (alfarroba, cascas secas de beterraba, etc.), pesar 5 g de amostra e introduzi-los num balão volumétrico de 250 ml, juntar 200 ml de água destilada e misturar durante uma hora ou mais, se necessário, no misturador. Clarificar em seguida com soluções de Carrez I (ponto 3.2) e II (ponto 3.3) tal como se descreve no ponto 5.1. Completar o volume com água, homogeneizar e filtrar. Para determinar os açúcares totais, proceder como descrito no ponto 5.3.

8. **Observações**

8.1. Para evitar a formação de espuma, recomenda-se a adição (independentemente do volume) de cerca de 1 ml de 3-metilbutan-1-ol (ponto 3.14) antes da ebulição com o reagente de Luff-Schoorl.

8.2. O teor de sacarose, em percentagem, será igual à diferença entre o teor de açúcares totais após a inversão, expressos em glucose, e o teor de açúcares redutores (igualmente expressos em glucose), multiplicada por 0,95.

8.3. Para determinar o teor de açúcares redutores, com exclusão da lactose, podem utilizar-se dois processos:

8.3.1. Para um cálculo aproximado, multiplica-se o teor de lactose, determinado num ensaio em separado, por 0,675 e subtrai-se o resultado obtido do teor de açúcares redutores.

8.3.2. Para um cálculo mais rigoroso dos açúcares redutores, com exclusão da lactose, é necessário utilizar a mesma amostra nas duas determinações finais, efetuando-se uma análise com parte da solução obtida no ponto 5.1 e outra com parte da solução que se utiliza no método de determinação da lactose (após a fermentação dos outros tipos de açúcares seguida de clarificação).

Em ambos os casos, a quantidade de açúcar presente determina-se pelo método de Luff-Schoorl e o respetivo cálculo faz-se em mg de glucose, subtraindo um valor do outro e exprimindo o resultado em termos percentuais relativamente à amostra.

Exemplo

Os volumes recolhidos correspondem ambos, em cada uma das determinações, a uma amostra de 250 mg.

No primeiro caso, são gastos 17 ml de solução de tiossulfato de sódio 0,1 mol/l, o que corresponde a 44,2 mg de glucose, e no segundo são gastos 11 ml, o que corresponde a 27,6 mg de glucose.

A diferença é de 16,6 mg de glucose.

O teor de açúcares redutores (exceto a lactose), calculado como glucose, será portanto de:

$$\frac{4 \times 16{,}6}{10} = 6{,}64\ \%$$

Tabela de valores para 25 ml de reagente de Luff-Schoorl

ml de $Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l, dois minutos de aquecimento e dez minutos de ebulição

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l	Glucose, frutose açúcares invertidos $C_6H_{12}O_6$		Lactose $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	diferença	mg	diferença	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

J. DETERMINAÇÃO DA LACTOSE

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de lactose em alimentos para animais que a contenham em mais de 0,5 % de lactose.

2. **Princípio**

Dissolvem-se os açúcares em água. Submete-se a solução a uma fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que não modifica a lactose. Após clarificação e filtração, determina-se o teor de lactose do filtrado pelo método Luff-Schoorl.

3. **Reagentes**

3.1. Suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*: suspender 25 g de levedura fresca em 100 ml de água. O tempo máximo de conservação desta suspensão em frigorífico é de uma semana.

3.2. Solução de Carrez I: dissolver em água 21,9 g de acetato de zinco, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, e 3 g de ácido acético glacial. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.3. Solução de Carrez II: dissolver em água 10,6 g de ferrocianeto de potássio, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.4. Reagente de Luff-Schoorl:

Agitando lentamente, deitar a solução de ácido cítrico (ponto 3.4.2) na solução de carbonato de sódio (ponto 3.4.3). Juntar em seguida a solução de sulfato de cobre (ponto 3.4.1) e perfazer o volume de 1 litro com água. Deixar repousar durante a noite e filtrar. Verificar a concentração do reagente assim obtido (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l). O pH da solução deverá ser cerca de 9,4.

3.4.1. Solução de sulfato de cobre: dissolver 25 g de sulfato de cobre, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, isento de ferro, em 100 ml de água.

3.4.2. Solução de ácido cítrico: dissolver 50 g de ácido cítrico, $C_6H_8O_7 \bullet H_2O$, em 50 ml de água.

3.4.3. Solução de carbonato de sódio: dissolver 143,8 g de carbonato de sódio anidro em cerca de 300 ml de água quente. Deixar arrefecer.

3.5. Pedra-pomes granulada fervida em ácido clorídrico, lavada com água e seca.

3.6. Solução de iodeto de potássio a 30 % (m/v).

3.7. Ácido sulfúrico 3 mol/l.

3.8. Solução de tiossulfato de sódio 0,1 mol/l.

3.9. Solução de amido: juntar uma mistura de 5 g de amido solúvel e 30 ml de água a 1 litro de água a ferver. Manter em ebulição durante três minutos, deixar arrefecer e juntar, se necessário, 10 mg de iodeto de mercúrio como conservante.

4. **Equipamento**

Tina de banho-maria, com termóstato regulado para 38-40 °C.

5. **Procedimento**

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 1 g de amostra e introduzi-la num balão volumétrico de 100 ml. Juntar 25 a 30 ml de água, colocar o balão durante trinta minutos em banho-maria a ferver, deixando arrefecer em seguida até cerca de 35 °C. Juntar 5 ml da suspensão de levedura (ponto 3.1) e homogeneizar. Deixar o balão durante duas horas em banho-maria a uma temperatura de 38 a 40 °C e deixar arrefecer em seguida até cerca de 20 °C.

Juntar 2,5 ml de solução de Carrez I (ponto 3.2) e agitar durante 30 segundos; adicionar seguidamente 2,5 ml de solução de Carrez II (ponto 3.3), agitando novamente durante 30 segundos. Perfazer o volume de 100 ml com água, misturar e filtrar. Com uma pipeta, recolher uma quantidade de filtrado não superior a 25 ml, que contenha, de preferência, entre 40 e 80 mg de lactose, e introduzi-lo num balão de Erlenmeyer de 300 ml. Se necessário, perfazer o volume de 25 ml com água.

Efetuar segundo o mesmo processo um ensaio em branco com 5 ml de suspensão de levedura (ponto 3.1). Determinar o teor de lactose em conformidade com o método de Luff-Schoorl, como se indica a seguir: juntar a 25 ml exatos de reagente de Luff-Schoorl (ponto 3.4) dois grânulos de pedra-pomes (ponto 3.5). Aquecer, agitando manualmente sobre uma chama aberta de altura média e levar o líquido à ebulição em cerca de dois minutos. Colocar imediatamente o balão de Erlenmeyer sobre uma placa com rede de amianto com uma abertura

de cerca de 6 cm de diâmetro, sob a qual terá sido previamente acendida uma chama, regulada de forma a aquecer apenas o fundo do balão de Erlenmeyer. Ajustar ao balão de Erlenmeyer um condensador de refluxo. Deixar em ebulição durante exatamente dez minutos. Arrefecer imediatamente em água fria durante cerca de cinco minutos e titular como se segue:

Juntar 10 ml de solução de iodeto de potássio (ponto 3.6) e, imediatamente depois e com cuidado (dado o risco de formação de espuma abundante), adicionar 25 ml de ácido sulfúrico (ponto 3.7). Titular seguidamente com a solução de tiossulfato de sódio (ponto 3.8) até ao aparecimento de uma coloração amarelada, juntar o indicador de amido (ponto 3.9) e completar a titulação.

Efetuar a mesma titulação numa mistura, medida com exatidão, de 25 ml de reagente de Luff-Schoorl (ponto 3.4) e 25 ml de água, a que se juntam 10 ml de solução de iodeto de potássio (ponto 3.6) e 25 ml de ácido sulfúrico (ponto 3.7), sem levar à ebulição.

6. **Cálculo dos resultados**

Utilizando a tabela, determinar a quantidade de lactose, em mg, correspondente à diferença entre os resultados das duas titulações, expressos em ml de tiossulfato de sódio 0,1 mol/l.

Exprimir o resultado obtido para a lactose anidra em percentagem da amostra.

7. **Observação**

1. Para os produtos que contenham mais de 40 % de açúcares fermentáveis, utilizar mais de 5 ml de suspensão de levedura (ponto 3.1).

2. Em alimentos para animais com um «teor de lactose reduzido», a lactose é convertida em frutose, a qual não é completamente fermentada em 2 horas, resultando em valores mais elevados ou falsos positivos (uma vez que continuam a ocorrer resíduos de frutose no extrato).

Tabela de valores para 25 ml de reagente de Luff-Schoorl

ml de $Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l, dois minutos de aquecimento e dez minutos de ebulição

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l	Glucose, frutose açúcares invertidos $C_6H_{12}O_6$		Lactose $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	diferença	mg	diferença	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. DETERMINAÇÃO DO AMIDO

MÉTODO POLARIMÉTRICO

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

O presente método permite determinar o teor de amido e dos seus produtos de degradação de elevado peso molecular em alimentos para animais, tendo em vista verificar o cumprimento do valor energético declarado (disposições do anexo VII) e do Regulamento (CE) n.º 767/2009.

Este método é utilizado na determinação do teor de amido para o cálculo do valor energético dos alimentos para animais.

Na determinação do teor de amido para outros efeitos, podem utilizar-se outros métodos de análise.

2. **Princípio**

O método inclui duas determinações. Na primeira, a amostra é tratada com ácido clorídrico diluído. Depois de clarificada e filtrada, mede-se a rotação ótica da solução por polarimetria.

Na segunda, a amostra é submetida a extração com etanol a 40 %. Depois de acidificado o filtrado com ácido clorídrico, clarificação e filtração, mede-se a rotação ótica tal como na primeira determinação.

A diferença entre as duas medições, multiplicada por um fator conhecido, dá o teor de amido da amostra.

3. **Reagentes**

3.1. Ácido clorídrico, solução a 25 % (m/m), densidade: 1,126 g/ml.

3.2. Ácido clorídrico, solução a 1,13 % (m/v).

A concentração é verificada por titulação com uma solução 0,1 mol/l de hidróxido de sódio, na presença de vermelho de metilo a 0,1 % (m/v) em etanol a 94 % (v/v). Para a neutralização de 10 ml, são necessários 30,94 ml de NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Solução de Carrez I: dissolver em água 21,9 g de acetato de zinco, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, e 3 g de ácido acético glacial. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.4. Solução de Carrez II: dissolver em água 10,6 g de ferrocianeto de potássio, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.5. Etanol, solução a 40 % (v/v), densidade: 0,948 g/ml a 20 °C.

4. **Equipamento**

4.1. Balão de Erlenmeyer de 250 ml com esmerilado normalizado e condensador de refluxo.

4.2. Polarímetro ou sacarímetro.

5. **Procedimento**

5.1. *Preparação da amostra*

Triturar a amostra de maneira a passar a totalidade da mesma por um crivo de malha redonda de 0,5 mm de diâmetro.

5.2. Determinação da rotação ótica total (P ou S) (ver observação no ponto 7.1)

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 2,5 g da amostra triturada para um balão volumétrico de 100 ml. Adicionar 25 ml de ácido clorídrico (ponto 3.2), agitar, para homogeneizar a amostra de ensaio, e adicionar mais 25 ml de ácido clorídrico (ponto 3.2). Introduzir o balão num banho de água em ebulição e agitar enérgica e regularmente durante três minutos, para evitar a formação de aglomerados. A quantidade de água no banho deve ser suficiente para que este se mantenha em ebulição quando o balão for introduzido. O balão não pode ser retirado do banho durante a agitação. Decorridos 15 minutos exatos, retirar o balão do banho, adicionar 30 ml de água fria e arrefecer imediatamente até 20 °C.

Juntar 5 ml de solução de Carrez I (ponto 3.3) e agitar durante cerca de 30 segundos. Adicionar em seguida 5 ml da solução de Carrez II (ponto 3.4) e agitar de novo durante cerca de 30 segundos. Completar o volume com água, homogeneizar e filtrar. Se o filtrado não ficar perfeitamente límpido (o que é pouco frequente), recomeçar a análise utilizando uma quantidade maior das soluções de Carrez I e II, por exemplo, 10 ml.

Medir, em seguida, a rotação ótica da solução num tubo de 200 mm com o polarímetro ou o sacarímetro.

5.3. *Determinação da rotação ótica (P' ou S') de substâncias solúveis em etanol a 40 %*

Introduzir, num balão volumétrico de 100 ml, 5 g de amostra, pesada com uma aproximação de 1 mg, e adicionar cerca de 80 ml de etanol (ponto 3.5) (ver observação no ponto 7.2). Deixar o balão em repouso à temperatura ambiente durante uma hora; durante esse lapso de tempo, agitar energicamente por seis vezes, para que a amostra de ensaio fique bem misturada com o etanol. Perfazer o volume com etanol (ponto 3.5), homogeneizar e filtrar.

Pipetar 50 ml de filtrado (correspondentes a 2,5 g de amostra) para um balão de Erlenmeyer de 250 ml, adicionar 2,1 ml de ácido clorídrico (ponto 3.1) e agitar energicamente. Adaptar um condensador de refluxo ao balão de Erlenmeyer e mergulhar este num banho de água em ebulição. Decorridos exatamente 15 minutos, retirar o balão de Erlenmeyer do banho, transferir o conteúdo para um balão volumétrico de 100 ml, lavar com um pouco de água fria e arrefecer até 20 °C.

Clarificar, em seguida, com as soluções de Carrez I (ponto 3.3) e II (ponto 3.4), completar o volume com água, homogeneizar, filtrar e medir a rotação ótica como indicado nos segundo e terceiro parágrafos do ponto 5.2.

6. **Cálculo dos resultados**

O teor percentual de amido é calculado como segue:

6.1. *Medições polarimétricas*

$$\text{Teor de amido (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

P = rotação ótica total, em graus de ângulo

P' = rotação ótica, em graus de ângulo, das substâncias solúveis em etanol a 40 % (v/v)

$[\alpha]_D^{20°}$ = rotação ótica específica do amido puro. Os valores convencionalmente admitidos para este fator são os seguintes:

+ 185,9 °: amido de arroz

+ 185,7 °: amido de batata

+ 184,6 °: amido de milho

+ 182,7 °: amido de trigo

+ 181,5 °: amido de cevada

+ 181,3 °: amido de aveia

+ 184,0 °: outros tipos de amido e misturas de amidos em alimentos compostos para animais.

6.2. *Medições sacarimétricas*

$$\text{Teor de amido } (\%) = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20°}} \times \frac{(2\,N \times 0{,}665) \times (S - S')}{100} - \frac{26{,}6\,N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

S = rotação ótica total, em graus sacarimétricos

S' = rotação ótica, em graus sacarimétricos, das substâncias solúveis em etanol a 40 % (v/v)

N = massa (g), de sacarose dissolvida em 100 ml de água, correspondente a um poder rotatório de 100 graus sacarimétricos, quando medido com um tubo de 200 mm

16,29 g para os sacarímetros franceses

26,00 g para os sacarímetros alemães

20,00 g para os sacarímetros mistos

$[\alpha]_D^{20°}$ = rotação ótica específica do amido puro (ver ponto 6.1).

6.3. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder 0,4, em valor absoluto, para teores de amido inferiores a 40 %, ou 1 %, em valor relativo, para teores de amido iguais ou superiores a 40 %.

7. **Observações**

7.1. Se a amostra contiver mais de 6 % de carbonatos, expressos em carbonato de cálcio, estes devem ser destruídos por tratamento com a quantidade apropriada, exata, de ácido sulfúrico diluído antes da determinação da rotação ótica total.

7.2. No caso dos produtos com teor de lactose elevado, como o soro de leite em pó ou o leite em pó desnatado, proceder como segue depois da adição de 80 ml de etanol (ponto 3.5): adaptar um condensador de refluxo ao balão e mergulhar este durante 30 minutos num banho de água a 50 °C. Em seguida, deixar arrefecer e prosseguir a análise como indicado no ponto 5.3.

7.3. Caso estejam presentes em quantidades significativas, as seguintes matérias-primas para a alimentação animal produzem comprovadamente interferências na determinação do teor de amido por polarimetria, podendo originar resultados incorretos:

— produtos derivados da beterraba (sacarina), nomeadamente polpa de beterraba (sacarina), melaço de beterraba (sacarina), polpa de beterraba (sacarina) melaçada, vinassa de beterraba (sacarina), açúcar (de beterraba),

— polpa de citrinos,

— sementes de linho, bagaço de linho, obtido por pressão, bagaço de linho, obtido por extração,

— colza, bagaço de colza, obtido por pressão, bagaço de colza, obtido por extração, cascas de colza,

— sementes de girassol, bagaço de girassol, obtido por extração, bagaço de girassol, parcialmente descascado, obtido por extração,

— bagaço de copra (coco), obtido por pressão, bagaço de copra (coco), obtido por extração,

— polpa de batata,

— leveduras desidratadas,

— produtos ricos em inulina (p. ex., lascas e farinha de tupinambos),

— torresmos,

— produtos à base de soja.

Nestes casos, pode utilizar-se o método de análise indicado no Regulamento (CE) n.º 121/2008 da Comissão ([7]). Este método pode igualmente ser utilizado em alimentos para animais com um teor de amido inferior a 1 %.

([7]) Regulamento (CE) n.º 121/2008 da Comissão, de 11 de fevereiro de 2008, que estabelece o método de análise para a determinação do teor de amido em preparações dos tipos utilizados na alimentação de animais (código NC 2309) (JO L 37 de 12.2.2008, p. 3).

L. DETERMINAÇÃO DAS CINZAS BRUTAS

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de cinzas brutas em alimentos para animais.

2. **Princípio**

Incinera-se amostra a 550 °C e pesa-se o resíduo.

3. **Reagentes**

Nitrato de amónio, solução a 20 % (m/v).

4. **Equipamento**

4.1. Placa de aquecimento.

4.2. Mufla elétrica com termóstato.

4.3. Cadinhos para incineração em sílica, porcelana ou platina, retangulares (aprox. 60 × 40 × 25 mm) ou circulares (diâmetro: 60 a 75 mm, altura: 20 a 40 mm).

5. **Procedimento**

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g de amostra (2,5 g para os produtos com tendência para aumentar de volume) num cadinho para incineração previamente aquecido a 550 °C, arrefecido e tarado. Colocar o cadinho na placa de aquecimento e aquecer progressivamente até à carbonização da matéria. Proceder à incineração de acordo com o disposto no ponto 5.1 ou 5.2.

5.1. Introduzir o cadinho na mufla calibrada e regulada para 550 °C. Manter esta temperatura até à obtenção de cinzas brancas, de cor cinzenta-clara ou avermelhada, e sem partículas de carvão visíveis. Colocar o cadinho num exsicador, deixar arrefecer e pesar imediatamente.

5.2. Introduzir o cadinho na mufla calibrada e regulada para 550 °C. Incinerar durante 3 horas. Colocar o cadinho num exsicador, deixar arrefecer e pesar imediatamente. Incinerar de novo por 30 minutos por forma a garantir que a massa das cinzas permanece constante (a perda de massa entre duas pesagens sucessivas deve ser igual ou inferior a 1 mg).

6. **Cálculo dos resultados**

Calcular a massa do resíduo subtraindo-lhe a tara.

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

7. **Observações**

7.1. As cinzas de *substâncias de difícil incineração* devem ser submetidas a uma primeira incineração de pelo menos três horas e arrefecidas, adicionando-se-lhes em seguida algumas gotas de solução de nitrato de amónio a 20 % ou de água (com extremo cuidado, para evitar a dispersão das cinzas ou a formação de aglomerados). Prosseguir com a calcinação, após secagem em estufa. Repetir eventualmente a operação até à incineração total.

7.2. Para as *substâncias que resistam ao tratamento* indicado no ponto 7.1, proceder do modo seguinte: depois de uma incineração de três horas, recolher as cinzas em água quente e filtrá-las num pequeno filtro, isento de cinzas. Incinerar o filtro e o seu conteúdo no primeiro cadinho. Colocar o filtrado no cadinho arrefecido, evaporar até à secura, incinerar e pesar.

7.3. No caso das *matérias gordas*, pesar rigorosamente 25 g de amostra num cadinho de capacidade adequada. Carbonizar, inflamando a substância com uma torcida de papel de filtro isento de cinzas. Terminada a combustão, humedecer com o mínimo de água possível. Secar e incinerar como indicado no ponto 5.

M. DETERMINAÇÃO DAS CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO CLORÍDRICO

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de substâncias minerais insolúveis em ácido clorídrico existentes nos alimentos para animais. Podem utilizar-se dois processos, em função do tipo de amostra:

1.1. *Processo A:* aplicável às matérias-primas orgânicas e à maior parte dos alimentos compostos.

1.2. *Processo B:* aplicável aos compostos e misturas minerais, assim como aos alimentos compostos cujo teor de substâncias minerais insolúveis em ácido clorídrico, determinado segundo o Processo A, seja superior a 1 %.

2. **Princípio**

2.1. *Processo A:* incinera-se a amostra, tratam-se as cinzas em ácido clorídrico em ebulição, filtra-se o resíduo insolúvel e pesa-se.

2.2. *Processo B:* trata-se a amostra com ácido clorídrico. Filtra-se a solução, incinera-se o resíduo e tratam-se as cinzas assim obtidas como no Processo A.

3. **Reagentes**

3.1. Ácido clorídrico 3 mol/l.

3.2. Ácido tricloroacético, solução a 20 % (m/v).

3.3. Ácido tricloroacético, solução a 1 % (m/v).

4. **Equipamento**

4.1. Placa de aquecimento.

4.2. Mufla elétrica com termóstato.

4.3. Cadinhos para incineração em sílica, porcelana ou platina, retangulares (aprox. 60 × 40 × 25 mm) ou circulares (diâmetro: 60 a 75 mm, altura: 20 a 40 mm).

4.4. Filtros isentos de cinzas.

5. **Procedimento**

5.1. *Processo A:*

Incinerar a amostra de acordo com o método indicado para a determinação do teor de cinzas brutas. Podem igualmente utilizar-se as cinzas obtidas nessa determinação.

Introduzir as cinzas num copo de 250 a 400 ml com 75 ml de ácido clorídrico (ponto 3.1). Levar cuidadosamente o líquido a uma ebulição suave mantendo-a durante 15 minutos. Filtrar a solução quente com papel de filtro isento de cinzas e lavar o resíduo com água quente até desaparecer a reação ácida. Secar o filtro que contém o resíduo e incinerá-lo, num cadinho tarado, a uma temperatura de 550 °C (mín.) a 700 °C (máx.). Arrefecer num exsicador e pesar.

5.2. *Processo B*

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 5 g de amostra e introduzi-la num copo de 250 a 400 ml. Juntar sucessivamente 25 ml de água e 25 ml de ácido clorídrico (ponto 3.1), misturar e deixar que acabe a efervescência. Juntar mais 50 ml de ácido clorídrico (ponto 3.1). Caso se verifique libertação de gás, aguardar que esta cesse completamente, colocar em seguida o copo num banho-maria em ebulição durante 30 minutos ou mais, se necessário, para hidrolisar completamente o amido eventualmente presente. Filtrar a quente com um filtro isento de cinzas e lavar o filtro com 50 ml de água quente (ver observação no ponto 7). Colocar o filtro com o resíduo num cadinho para incineração, secar e incinerar a uma temperatura entre 550 °C (mín.) e 700 °C (máx.). Introduzir as cinzas num copo de 250 a 400 ml com 75 ml de ácido clorídrico (ponto 3.1); prosseguir como indicado no segundo parágrafo do ponto 5.1.

6. **Cálculo dos resultados**

Calcular a massa do resíduo subtraindo-lhe a tara. Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

7. **Observação**

Se a filtração for difícil, repetir a análise substituindo os 50 ml de ácido clorídrico (ponto 3.1) por 50 ml da solução de ácido tricloracético a 20 % (m/v) (ponto 3.2), lavando o filtro com uma solução quente de ácido tricloracético a 1 % (ponto 3.3).

N. DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO TOTAL

O fósforo total é determinado pelo

— pelo método de análise previsto na norma *EN 15510 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum and lead by ICP-AES* (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação do cálcio, sódio, fósforo, magnésio, potássio, ferro, zinco, cobre, manganês, cobalto, molibdénio e chumbo por ICP-AES), ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN 15621 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES* (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação do cálcio, sódio, fósforo, magnésio, potássio, enxofre, ferro, zinco, cobre, manganês e cobalto por ICP-AES após mineralização sob pressão), ou

— pelo método fotométrico, a seguir descrito.

MÉTODO FOTOMÉTRICO

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de fósforo total dos alimentos para animais. É particularmente indicado para a análise de produtos pobres em fósforo. Em alguns casos (produtos ricos em fósforo), pode ser aplicado um método gravimétrico.

2. **Princípio**

A amostra é mineralizada, quer por via seca (para os alimentos orgânicos) quer por via húmida (para os compostos minerais e os alimentos líquidos) e colocada em solução ácida. A solução é tratada pelo reagente vanadomolíbdico. A densidade ótica da solução amarela assim obtida é medida em espetrofotómetro a 430 nm.

3. **Reagentes**

3.1. Carbonato de cálcio.

3.2. Ácido clorídrico, ρ_{20} = 1,10 g/ml (aprox. 6 mol/l).

3.3. Ácido nítrico, ρ_{20} = 1,045 g/ml.

3.4. Ácido nítrico, ρ_{20} = 1,38 a 1,42 g/ml.

3.5. Ácido sulfúrico, ρ_{20} = 1,84 g/ml.

3.6. Reagente vanadomolíbdico: misturar 200 ml de solução de heptamolibdato de amónio (ponto 3.6.1), 200 ml de solução de monovanadato de amónio (ponto 3.6.2) e 134 ml de ácido nítrico (ponto 3.4) num balão volumétrico de 1 litro. Perfazer o volume com água.

3.6.1. Solução de heptamolibdato de amónio: dissolver em água quente 100 g de heptamolibdato de amónio, $(NH_4)6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$. Juntar 10 ml de amónia (densidade 0,91 g/ml) e perfazer 1 litro com água.

3.6.2. Solução de monovanadato de amónio: em 400 ml de água quente, dissolver 2,35 g de monovanadato de amónio, NH_4VO_3. Adicionar lentamente, e agitando sempre, 20 ml de ácido nítrico diluído [7 ml de HNO_3 (ponto 3.4) + 13 ml de H_2O] e perfazer o volume de 1 litro com água.

3.7. Solução-padrão a 1 mg/ml de fósforo: dissolver em água 4,387 g de di-hidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4. Perfazer o volume de 1 litro com água.

4. **Equipamento**

4.1. Cadinhos para incineração em sílica, porcelana ou platina.

4.2. Mufla elétrica com termóstato regulado para 550 °C.

4.3. Balão Kjeldahl, 250 ml.

4.4. Balões volumétricos e pipetas de precisão.

4.5. Espetrofotómetro.

4.6. Tubos de ensaio, diâmetro: cerca de 16 mm, de rosca normalizada de 14,5 mm; capacidade: 25 a 30 ml.

5. **Procedimento**

5.1. *Preparação da solução*

Consoante a natureza da amostra, preparar uma solução tal como indicado nos pontos 5.1.1 ou 5.1.2.

5.1.1. Caso geral

Pesar 1 g ou mais de amostra, com uma aproximação de 1 mg. Introduzir a amostra de ensaio num balão Kjeldahl, adicionar 20 ml de ácido sulfúrico (ponto 3.5) agitar para impregnar completamente a substância com ácido e evitar que adira às paredes do balão, aquecer e manter em ebulição durante 10 minutos. Deixar arrefecer ligeiramente, adicionar 2 ml de ácido nítrico (ponto 3.4), aquecer lentamente, deixar arrefecer ligeiramente, juntar de novo um pouco de ácido nítrico (ponto 3.4) e levar à ebulição. Repetir estas operações até à obtenção de uma solução incolor. Arrefecer, juntar um pouco de água, transferir o líquido para um balão volumétrico de 500 ml, enxaguando o balão de Kjeldahl com água quente. Deixar arrefecer, completar o volume com água, homogeneizar e filtrar.

5.1.2. Amostras contendo substâncias orgânicas e isentas de di-hidrogenofosfatos de cálcio e de magnésio

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 2,5 g de amostra num cadinho de incineração. Misturar intimamente a amostra de ensaio com 1 g de carbonato de cálcio (ponto 3.1). Incinerar na mufla a 550 °C até à obtenção de cinzas brancas ou cinzentas (uma pequena quantidade de carvão não prejudica). Transferir as cinzas para um copo de precipitação de 250 ml. Juntar 20 ml de água e ácido clorídrico (ponto 3.2) até que cesse a efervescência. Juntar mais 10 ml de ácido clorídrico (ponto 3.2). Colocar o copo num banho de areia e evaporar até à secura para insolubilizar a sílica. Redissolver o resíduo em 10 ml de ácido nítrico (ponto 3.3) e levar à ebulição, durante 5 minutos num banho de areia ou placa de aquecimento, sem evaporar até à secura. Transferir o líquido para um balão volumétrico de 500 ml, enxaguando o copo de precipitação várias vezes com água quente. Deixar arrefecer, completar o volume com água, homogeneizar e filtrar.

5.2. *Desenvolvimento da coloração e medição da densidade ótica*

Diluir uma alíquota do filtrado obtido no ponto 5.1.1 ou 5.1.2 de modo a obter uma concentração em fósforo não superior a 40 µg/ml. Introduzir 10 ml desta solução num tubo de ensaio (ponto 4.6) e adicionar 10 ml do reagente vanadomolíbdico (ponto 3.6). Homogeneizar e deixar repousar 10 minutos, pelo menos, à temperatura de 20 °C. Medir a densidade ótica em espetrofotómetro a 430 nm por comparação com uma solução obtida por adição de 10 ml do reagente vanadomolíbdico (ponto 3.6) a 10 ml de água.

5.3. *Curva de calibração*

A partir da solução-padrão (ponto 3.7) preparar soluções contendo respetivamente 5, 10, 20, 30 e 40 µg de fósforo por ml. Tomar 10 ml de cada uma destas soluções e adicionar 10 ml do reagente vanadomolíbdico (ponto 3.6). Homogeneizar e deixar repousar 10 minutos, pelo menos, à temperatura de 20 °C. Medir a densidade ótica como indicado no ponto 5.2. Traçar a curva de calibração representando em ordenadas os valores da densidade ótica e, em abcissas, as quantidades correspondentes de fósforo. A curva é linear para concentrações compreendidas entre 0 e 40 µg/ml.

6. **Cálculo dos resultados**

Recorrendo à curva de calibração, determinar a quantidade de fósforo na amostra de ensaio.

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder:

— 3 % do maior dos valores, para os teores de fósforo inferiores a 5 %,

— 0,15 % em valor absoluto para os teores de fósforo iguais ou superiores a 5 %.

O. DETERMINAÇÃO DO CLORO SOB A FORMA DE CLORETOS

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o cloro dos cloretos solúveis em água, convencionalmente expressos como cloreto de sódio. É aplicável aos alimentos compostos.

2. **Princípio**

Dissolvem-se os cloretos em água. Se o produto contiver matérias orgânicas, procede-se à sua clarificação. Acidifica-se ligeiramente a solução com ácido nítrico e os cloretos precipitam sob a forma de cloreto de prata com uma solução de nitrato de prata. Titula-se o excesso de nitrato de prata com uma solução de tiocianato de amónio segundo o método de Volhard.

3. **Reagentes**

3.1. Solução de tiocianato de amónio 0,1 mol/l.

3.2. Solução de nitrato de prata 0,1 mol/l.

3.3. Solução saturada de sulfato férrico de amónio, $(NH_4)Fe(SO_4)_2$.

3.4. Ácido nítrico, densidade: 1,38 g/ml.

3.5. Éter dietílico.

3.6. Acetona.

3.7. Solução de Carrez I: dissolver em água 21,9 g de acetato de zinco, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, e 3 g de ácido acético glacial. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.8. Solução de Carrez II: dissolver em água 10,6 g de ferrocianeto de potássio, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Perfazer o volume de 100 ml com água.

3.9. Carvão ativado, isento de cloretos e não absorvente.

4. **Equipamento**

Misturador basculante: cerca de 35 a 40 rotações por minuto.

5. **Procedimento**

5.1. *Preparação da solução*

Conforme o tipo de amostra, preparar uma solução como se indica no ponto 5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3.

Efetuar ao mesmo tempo, sem a amostra, um *ensaio em branco*.

5.1.1. Amostras sem matéria orgânica

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, uma amostra de ensaio não superior a 10 g, que não contenha mais de 3 g de cloro sob a forma de cloretos, e introduzi-la, com 400 ml de água, num balão volumétrico de 500 ml, a cerca de 20 °C. Misturar durante 30 minutos no misturador, completar o volume, homogeneizar e filtrar.

5.1.2. Amostras com matéria orgânica, à exceção dos produtos mencionados no ponto 5.1.3

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g de amostra e introduzi-la com 1 g de carvão ativado num balão volumétrico de 500 ml. Adicionar 400 ml de água a cerca de 20 °C e 5 ml de solução de Carrez I (ponto 3.7), agitar durante 30 segundos e juntar em seguida 5 ml de solução de Carrez II (ponto 3.8). Misturar durante 30 minutos no misturador, completar o volume, homogeneizar e filtrar.

5.1.3. Alimentos cozidos, bagaços e farinha de linhaça, produtos ricos em farinha de linhaça e outros produtos ricos em mucilagens ou substâncias coloidais (amido dextrinado, por exemplo)

Preparar a solução como se indica no ponto 5.1.2, mas sem filtrar. Decantar (se necessário, centrifugar), recolher 100 ml do líquido sobrenadante e introduzi-lo num balão volumétrico de 200 ml. Adicionar acetona (ponto 3.6), completando o volume, homogeneizar e filtrar.

5.2. *Titulação*

Com uma pipeta, transferir para um balão de Erlenmeyer 25 a 100 ml do filtrado (dependendo do teor presumido de cloro) obtido no ponto 5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3. A alíquota não deverá conter mais de 150 mg de cloro (Cl). Se for necessário, diluir com água, para obter, pelo menos, 50 ml de filtrado, juntar 5 ml de ácido nítrico (ponto 3.4), 2 ml de solução saturada de sulfato férrico de amónio (ponto 3.3) e duas gotas de solução de tiocianato de amónio (ponto 3.1), que se deitam com uma bureta cheia até à marca zero. Em seguida, juntar-lhe a solução de nitrato de prata (ponto 3.2) com uma bureta até obter um excesso de 5 ml. Adicionar 5 ml de éter dietílico (ponto 3.5) e agitar fortemente para formar o precipitado. Titular o excesso de nitrato de prata com a solução de tiocianato de amónio (ponto 3.1) até a viragem para vermelho acastanhado se manter durante um minuto.

6. **Cálculo dos resultados**

O teor de cloro (X), expresso em percentagem de cloreto de sódio, é dado pela seguinte fórmula:

$$X = \frac{5{,}845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

em que:

V_1 = ml de solução de nitrato de prata 0,1 mol/l adicionada,

V_2 = ml da solução de tiocianato de amónio 0,1 mol/l gasta na titulação,

m = gramas da alíquota de amostra.

Se o ensaio em branco revelar que houve consumo de solução de nitrato de prata 0,1 mol/l, subtrair o valor da quantidade consumida ao volume (V_1 - V_2).

7. **Observações**

7.1. A titulação pode igualmente fazer-se por potenciometria ou amperometria.

7.2. Para os produtos muito ricos em matérias gordas, proceder a um desengorduramento prévio com éter dietílico ou éter de petróleo.

7.3. Para as farinhas de peixe, a titulação pode ser efetuada pelo método de Mohr.»

ANEXO IV

«*ANEXO IV*

MÉTODOS DE ANÁLISE PARA O CONTROLO DO TEOR DE ADITIVOS AUTORIZADOS NOS ALIMENTOS PARA ANIMAIS

A. DETERMINAÇÃO DA VITAMINA A

A vitamina A é determinada:

— pelo método de análise previsto na norma *EN 17547 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of vitamin A, E and D* ([1]) *content - Method using solid phase extraction (SPE) clean-up and high-performance liquid chromatography (HPLC)* [Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação do teor de vitamina A, vitamina E e vitamina D – Método que utiliza purificação com extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)] ou

— por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC) com um detetor de UV ou de fluorescência, tal como descrito a seguir, nos pontos 1 a 9.

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de vitamina A (retinol) em alimentos para animais. A vitamina A determinada pelo presente método abrange o álcool retinílico totalmente *trans* e os seus isómeros *cis*. O teor de vitamina A é expresso em unidades internacionais (UI) por quilograma. Uma UI corresponde à atividade de 0,300 μg de vitamina A totalmente *trans* na forma de álcool, 0,344 μg de vitamina A totalmente *trans* na forma de acetato ou 0,550 μg de vitamina A totalmente *trans* na forma de palmitato.

O limite de quantificação é 2 000 UI de vitamina A por kg.

2. **Princípio**

A amostra é hidrolisada com solução etanólica de hidróxido de potássio e a vitamina A é extraída com éter de petróleo. Remove-se o solvente por evaporação e dissolve-se o resíduo em metanol; se necessário, dilui-se até à concentração requerida. O teor de vitamina A é determinado por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC), com um detetor de UV ou de fluorescência. Os parâmetros cromatográficos são escolhidos de forma a não haver separação entre a vitamina A na forma de álcool totalmente *trans* e os seus isómeros *cis*.

3. **Reagentes**

3.1. Etanol, σ = 96 %.

3.2. Éter de petróleo, intervalo de ebulição: 40 a 60 °C.

3.3. Metanol.

3.4. Solução de hidróxido de potássio, c = 50 g/100 ml.

3.5. Solução de ascorbato de sódio, c = 10 g/100 ml (ver observações no ponto 7.7).

3.6. Sulfureto de sódio, $Na_2S{\cdot}xH_2O$ (x = 7 - 9).

3.6.1. Solução de sulfureto de sódio, c = 0,5 mol/l em glicerol, ß = 120 g/l (para x = 9) (ver observações no ponto 7.8).

3.7. Solução de fenolftaleína, c = 2 g/100 ml em etanol (ponto 3.1).

3.8. 2-Propanol.

3.9. Fase móvel para HPLC: mistura de metanol (ponto 3.3) e água, p. ex. 980 + 20 (v + v). A proporção exata dependerá das características da coluna utilizada.

3.10. Azoto, isento de oxigénio.

([1]) Refere-se o método de análise previsto na norma EN 17547 como um método alternativo a utilizar para efeitos de controlos oficiais na determinação da vitamina A e da vitamina E em lugar dos métodos de determinação da vitamina A e da vitamina E descritos, respetivamente, na parte A e na parte B do presente anexo.

3.11. Vitamina A totalmente *trans* na forma de acetato, extrapura, de atividade certificada, p. ex. 2,80 × 106 UI/g.

3.11.1. Solução-mãe de vitamina A totalmente *trans* na forma de acetato: num balão volumétrico de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 50 mg de vitamina A na forma de acetato (ponto 3.11). Dissolver com 2-propanol (ponto 3.8) e completar o volume com o mesmo solvente até ao traço. A concentração nominal desta solução é de 1 400 UI de vitamina A por ml. A concentração exata é determinada conforme descrito no ponto 5.6.3.1.

3.12. Vitamina A totalmente *trans* na forma de palmitato, extrapura, de atividade certificada, p. ex. 1,80 × 106 UI/g.

3.12.1. Solução-mãe de vitamina A totalmente *trans* na forma de palmitato: num balão volumétrico de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 80 mg de vitamina A na forma de palmitato (ponto 3.12). Dissolver com 2-propanol (ponto 3.8) e completar o volume com o mesmo solvente até ao traço. A concentração nominal desta solução é de 1 400 UI de vitamina A por ml. A concentração exata é determinada conforme descrito no ponto 5.6.3.2.

3.13. 2,6-Di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) (ver observações no ponto 7.5).

4. **Equipamento**

4.1. Evaporador rotativo de vácuo.

4.2. Material de vidro ambarizado.

4.2.1. Balões de 500 ml de fundo plano ou Erlenmeyer, com colo esmerilado.

4.2.2. Balões volumétricos de 10, 25, 100 e 500 ml, com colo estreito e tampa esmerilada.

4.2.3. Ampolas de decantação, de 1 000 ml, com tampa esmerilada.

4.2.4. Balões em forma de pera, de 250 ml, com colo esmerilado.

4.3. Condensador de Allihn, com camisa de 300 mm, com junta esmerilada e adaptador para alimentação de gás.

4.4. Papel de filtro de pregas, com 185 mm de diâmetro, para a separação de fases (p. ex., Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. Aparelho para HPLC com sistema de injeção.

4.5.1. Coluna para cromatografia líquida com 250 mm × 4 mm e enchimento C_{18} de 5 ou 10 µm, ou equivalente (critério de eficiência: pico único para todos os isómeros do retinol nas condições da HPLC).

4.5.2. Detetor de UV ou de fluorescência, com comprimento de onda regulável.

4.6. Espetrofotómetro com células de quartzo de 10 mm.

4.7. Banho de água equipado com um agitador magnético.

4.8. Aparelho de extração, constituído por (ver figura 1):

4.8.1. Cilindro de vidro de 1 litro com colo esmerilado e tampa.

4.8.2. Dispositivo de vidro com colo esmerilado, adaptável ao precedente, com uma tubuladura lateral e um tubo axial ajustável. O tubo ajustável termina em U na extremidade inferior e é afilado na extremidade oposta, para permitir a transferência da fase líquida superior do cilindro para uma ampola de decantação.

5. **Procedimento**

Nota: A vitamina A é sensível à luz (ultravioleta) e à oxidação. Efetuar todas as operações na ausência de luz (utilizando material de vidro ambarizado ou protegido com folha de alumínio) e de oxigénio (sob corrente de azoto). Durante a extração, o ar acima do líquido deve ser substituído por azoto (para evitar excessos de pressão, soltar a tampa de vez em quando).

5.1. *Preparação da amostra*

Moer a amostra de forma a poder passá-la por um crivo de 1 mm, tomando as devidas precauções para evitar a geração de calor. Efetuar a moagem imediatamente antes da pesagem e saponificação; caso contrário, pode haver perdas de vitamina A. Não moer as amostras se a distribuição granulométrica for adequada (p. ex., pré-misturas e aditivos para a alimentação animal).

5.2. *Saponificação*

Em função do teor de vitamina A, pesar, com uma aproximação de 1 mg, 2 g a 25 g de amostra num balão de 500 ml de fundo plano ou Erlenmeyer (ponto 4.2.1). Em caso de concentrações baixas, a massa da toma de ensaio pode ser aumentada a fim de obter partículas suficientes para a análise. Adicionar sucessivamente, sob agitação, 130 ml de etanol (ponto 3.1), aproximadamente 100 mg de BHT (ponto 3.13), 2 ml da solução de ascorbato de sódio (ponto 3.5) e 2 ml da solução de sulfureto de sódio (ponto 3.6). Adaptar o condensador (ponto 4.3) ao balão e mergulhar este último no banho de água equipado com um agitador magnético (ponto 4.7). Aquecer até à ebulição e deixar em refluxo durante 5 minutos. Adicionar em seguida, pelo condensador (ponto 4.3), 25 ml da solução de hidróxido de potássio (ponto 3.4) e deixar em refluxo durante mais 25 minutos, com agitação e sob uma corrente ligeira de azoto. Lavar o condensador com cerca de 20 ml de água e arrefecer o conteúdo do balão até à temperatura ambiente.

5.3. *Extração*

Transferir quantitativamente a solução de saponificação para uma ampola de decantação de 1 000 ml (ponto 4.2.3) ou para o aparelho de extração (ponto 4.8), lavando com um volume total de 250 ml de água. Lavar o balão de saponificação sucessivamente com 25 ml de etanol (ponto 3.1) e 100 ml de éter de petróleo (ponto 3.2) e transferir os líquidos de lavagem para a ampola de decantação ou o aparelho de extração. A proporção de água e etanol na solução combinada assim constituída deve ser aproximadamente 2:1. Agitar vigorosamente durante 2 minutos e deixar em repouso durante 2 minutos.

5.3.1. Extração com uma ampola de decantação (ponto 4.2.3)

Depois da separação das fases (ver observação no ponto 7.3), transferir a fase etérea para outra ampola de decantação (ponto 4.2.3). Repetir duas vezes a operação de extração com 100 ml de éter de petróleo (ponto 3.2) e mais duas vezes com 50 ml de éter de petróleo (ponto 3.2).

Lavar os extratos combinados na ampola de decantação por duas vezes, com volumes de 100 ml de água cada, agitando suavemente por rotação (para evitar a formação de emulsões), e, em seguida, agitar vigorosamente com mais volumes de 100 ml de água até esta permanecer incolor à solução de fenolftaleína (ponto 3.7) (quatro lavagens são normalmente suficientes). Filtrar o extrato lavado com um filtro de pregas para a separação de fases (ponto 4.4) seco para um balão volumétrico de 500 ml (ponto 4.2.2), a fim de remover alguma água ainda em suspensão. Lavar a ampola de decantação e o filtro com 50 ml de éter de petróleo (ponto 3.2), completar o volume com éter de petróleo (ponto 3.2) até ao traço e homogeneizar.

5.3.2. Extração com aparelho de extração (ponto 4.8)

Depois da separação das fases (ver observação no ponto 7.3), substituir a tampa do cilindro de vidro (ponto 4.8.1) pelo dispositivo de vidro com esmerilado (ponto 4.8.2) e colocar a extremidade inferior em U do tubo ajustável de modo a que fique imediatamente acima do nível da interface. Aumentar a pressão por alimentação de azoto através da tubuladura lateral e transferir a fase etérea superior para uma ampola de decantação de 1 000 ml (ponto 4.2.3). Adicionar 100 ml de éter de petróleo (ponto 3.2) ao cilindro, tapar e agitar vigorosamente. Depois da separação das fases, transferir a fase superior para a ampola de decantação conforme descrito acima. Repetir a operação de extração com mais 100 ml de éter de petróleo (ponto 3.2) e duas vezes com volumes de 50 ml de éter de petróleo (ponto 3.2), transferindo as fases etéreas para a ampola de decantação.

Lavar os extratos etéreos combinados conforme descrito no ponto 5.3.1 e proceder conforme descrito no mesmo ponto.

5.4. *Preparação da solução de amostra para a HPLC*

Pipetar uma alíquota da solução de éter de petróleo (obtida no ponto 5.3.1 ou 5.3.2) para um balão em forma de pera de 250 ml (ponto 4.2.4). Evaporar o solvente quase até à secura no evaporador rotativo (ponto 4.1), sob pressão reduzida, num banho a uma temperatura não superior a 40 °C. Restabelecer a pressão atmosférica com uma alimentação de azoto (ponto 3.10) e retirar o balão do evaporador rotativo. Remover o solvente restante sob uma corrente de azoto (ponto 3.10) e dissolver imediatamente o resíduo com um volume conhecido (10 ml - 100 ml) de metanol (ponto 3.3) (a concentração de vitamina A tem de estar compreendida entre 5 UI/ml e 30 UI/ml).

5.5. *Determinação por HPLC*

Procede-se à separação da vitamina A numa coluna de fase reversa C_{18} (ponto 4.5.1) e determina-se a sua concentração com um detetor de UV (325 nm) ou de fluorescência (excitação: 325 nm; emissão: 475 nm) (ponto 4.5.2).

Injetar uma alíquota (p. ex., 20 µl) da solução metanólica obtida no ponto 5.4 e eluir com a fase móvel (ponto 3.9). Calcular a altura ou área média dos picos correspondentes a várias injeções da mesma solução de amostra e a altura ou área média dos picos correspondentes a várias injeções das soluções de calibração (ponto 5.6.2).

Condições da HPLC

As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia líquida (ponto 4.5.1):	250 mm × 4 mm, enchimento C_{18} de 5 ou 10 µm, ou equivalente
Fase móvel (ponto 3.9):	Mistura de metanol (ponto 3.3) e água, p. ex. 980 + 20 (v + v)
Caudal:	1-2 ml/minuto
Detetor (ponto 4.5.2):	Detetor de UV (325 nm) ou de fluorescência (excitação: 325 nm/emissão: 475 nm)

5.6. *Calibração*

5.6.1. Preparação das soluções-padrão de trabalho

Pipetar 20 ml da solução-mãe de vitamina A na forma de acetato (ponto 3.11.1) ou 20 ml da solução-mãe de vitamina A na forma de palmitato (ponto 3.12.1) para um balão de 500 ml de fundo plano ou Erlenmeyer (ponto 4.2.1) e efetuar a hidrólise conforme descrito no ponto 5.2, mas sem adicionar BHT. Proceder, em seguida, à extração com éter de petróleo (ponto 3.2) conforme descrito no ponto 5.3 e completar o volume com éter de petróleo (ponto 3.2) até perfazer 500 ml. Evaporar 100 ml do extrato obtido no evaporador rotativo (ver ponto 5.4) quase até à secura, remover o solvente restante sob uma corrente de azoto (ponto 3.10) e redissolver o resíduo com 10,0 ml de metanol (ponto 3.3). A concentração nominal desta solução é de 560 UI de vitamina A por ml. A concentração exata é determinada conforme descrito no ponto 5.6.3.3. Preparar a solução-padrão de trabalho imediatamente antes da sua utilização.

Pipetar 2,0 ml desta solução-padrão de trabalho para um balão volumétrico de 20 ml, completar o volume com metanol (ponto 3.3) até ao traço e homogeneizar. A concentração nominal desta solução-padrão de trabalho diluída é de 56 UI de vitamina A por ml.

5.6.2. Preparação das soluções de calibração e traçado da curva de calibração

Pipetar 1,0, 2,0, 5,0 e 10,0 ml da solução-padrão de trabalho diluída para uma série de balões volumétricos de 20 ml, completar o volume com metanol (ponto 3.3) até ao traço e homogeneizar. A concentração nominal destas soluções é de 2,8, 5,6, 14,0 e 28,0 UI de vitamina A por ml.

Injetar vários volumes de 20 µl de cada solução de calibração e determinar as alturas (ou áreas) médias dos picos. Traçar uma curva de calibração com base nas alturas (ou áreas) médias dos picos e nos resultados obtidos na padronização no UV (ponto 5.6.3.3).

5.6.3. Padronização no UV das soluções-padrão

5.6.3.1. Solução-mãe de vitamina A na forma de acetato

Pipetar 2,0 ml da solução-mãe de vitamina A na forma de acetato (ponto 3.11.1) para um balão volumétrico de 50 ml (ponto 4.2.2) e completar o volume com 2-propanol (ponto 3.8) até ao traço. A concentração nominal desta solução é de 56 UI de vitamina A por ml. Pipetar 3,0 ml desta solução diluída de vitamina A na forma de acetato para um balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com 2-propanol (ponto 3.8) até ao traço. A concentração nominal desta solução é de 6,72 UI de vitamina A por ml. Traçar o espetro de UV desta solução no espetrofotómetro (ponto 4.6), entre 300 nm e 400 nm, em relação ao 2-propanol (ponto 3.8). O máximo de extinção deve estar compreendido entre 325 nm e 327 nm.

Cálculo do teor de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

($E^{1\,\%}_{1\,cm}$ da vitamina A na forma de acetato = 1 530 a 326 nm, em 2–Propanol)

5.6.3.2. Solução-mãe de vitamina A na forma de palmitato

Pipetar 2,0 ml da solução-mãe de vitamina A na forma de palmitato (ponto 3.12.1) para um balão volumétrico de 50 ml (ponto 4.2.2) e completar o volume com 2-propanol (ponto 3.8) até ao traço. A concentração nominal desta solução é de 56 UI de vitamina A por ml. Pipetar 3,0 ml desta solução diluída de vitamina A na forma de acetato para um balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com 2-propanol (ponto 3.8) até ao traço. A concentração nominal desta solução é de 6,72 UI de vitamina A por ml. Traçar o espetro de UV desta solução no espetrofotómetro (ponto 4.6), entre 300 nm e 400 nm, em relação ao 2-propanol (ponto 3.8). O máximo de extinção deve estar compreendido entre 325 nm e 327 nm.

Cálculo do teor de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

($E^{1\,\%}_{1\,cm}$ da vitamina A na forma de palmitato = 957 a 326 nm, em 2–Propanol)

5.6.3.3. Solução-padrão de trabalho de vitamina A

Pipetar 3,0 ml da solução-padrão de trabalho não diluída de vitamina A, preparada conforme descrito no ponto 5.6.1, para um balão volumétrico de 50 ml (ponto 4.2.2) e completar o volume com 2-propanol (ponto 3.8) até ao traço. Pipetar 5,0 ml desta solução para um balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com 2-propanol (ponto 3.8) até ao traço. A concentração nominal desta solução é de 6,72 UI de vitamina A por ml. Traçar o espetro de UV desta solução no espetrofotómetro (ponto 4.6), entre 300 nm e 400 nm, em relação ao 2-propanol (ponto 3.8). O máximo de extinção deve estar compreendido entre 325 nm e 327 nm.

Cálculo do teor de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,30$$

($E^{1\,\%}_{1\,cm}$ da vitamina A na forma de álcool = 1 821 a 325 nm, em 2–Propanol)

6. **Cálculo dos resultados**

A partir da altura ou área média dos picos da vitamina A da solução de amostra, determinar a concentração desta em UI/ml, com base na curva de calibração (ponto 5.6.2).

O teor de vitamina A, w, da amostra, expresso em UI/kg, é dado pela seguinte fórmula:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m}\,[\text{UI/kg}]$$

em que:

c = concentração, em UI/ml, de vitamina A da solução de amostra (ponto 5.4),

V_1 = volume, em ml, de solução de amostra (ponto 5.4),

V_2 = volume, em ml, da alíquota tomada no ponto 5.4,

m = massa, em g, da toma de ensaio.

7. **Observações**

7.1. No caso das amostras com baixas concentrações de vitamina A, pode ser útil combinar os extratos etéreos de duas saponificações (quantidade pesada: 25 g) numa única solução de amostra para a determinação por HPLC.

7.2. A toma de amostra utilizada na análise não deve conter mais de 2 g de matérias gordas.

7.3. Se não se der a separação de fases, adicionar aproximadamente 10 ml de etanol (ponto 3.1), para desfazer a emulsão.

7.4. No caso do óleo de fígado de bacalhau e outras matérias gordas puras, o tempo de saponificação deve ser aumentado para 45-60 minutos.

7.5. Em vez de BHT, pode utilizar-se hidroquinona.

7.6. É possível separar os isómeros do retinol com uma coluna de fase normal. Mas, neste caso, para a realização dos cálculos, devem somar-se as alturas (ou áreas) dos picos correspondentes a todos os isómeros *cis* e *trans*.

7.7. Em vez da solução de ascorbato de sódio, podem utilizar-se aproximadamente 150 mg de ácido ascórbico.

7.8. Em vez da solução de sulfureto de sódio, podem utilizar-se aproximadamente 50 mg de EDTA.

7.9. No caso das análises da vitamina A nos substitutos do leite, deve dedicar-se uma atenção especial aos seguintes aspetos:

— quando da saponificação (ponto 5.2): devido à quantidade de matéria gorda presente na amostra, pode ser necessário aumentar a quantidade de solução de hidróxido de potássio (ponto 3.4),

— quando da extração (ponto 5.3): devido à presença de emulsões, pode ser necessário adaptar a proporção 2:1 entre a água e o etanol.

Para verificar se o método de análise utilizado produz resultados fiáveis nesta matriz específica (substituto do leite) deve realizar-se um ensaio de recuperação com uma toma de ensaio adicional. Se a taxa de recuperação for inferior a 80 %, o resultado analítico tem de ser corrigido em função da recuperação.

8. **Repetibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder 15 % do maior dos valores.

9. **Resultados de um estudo colaborativo** ([2])

	Pré-mistura	Alimento pré-misturado	Concentrado de minerais	Alimento proteico	Alimento para leitões
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
média [UI/kg]	17,02 × 106	1,21 × 106	537 100	151 800	18 070
sr [UI/kg]	0,51 × 106	0,039 × 106	22 080	12 280	682
r [UI/kg]	1,43 × 106	0,109 × 106	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [UI/kg]	1,36 × 106	0,069 × 106	46 300	23 060	3 614
R [UI/kg]	3,81 × 106	0,193 × 106	129 640	64 568	10 119

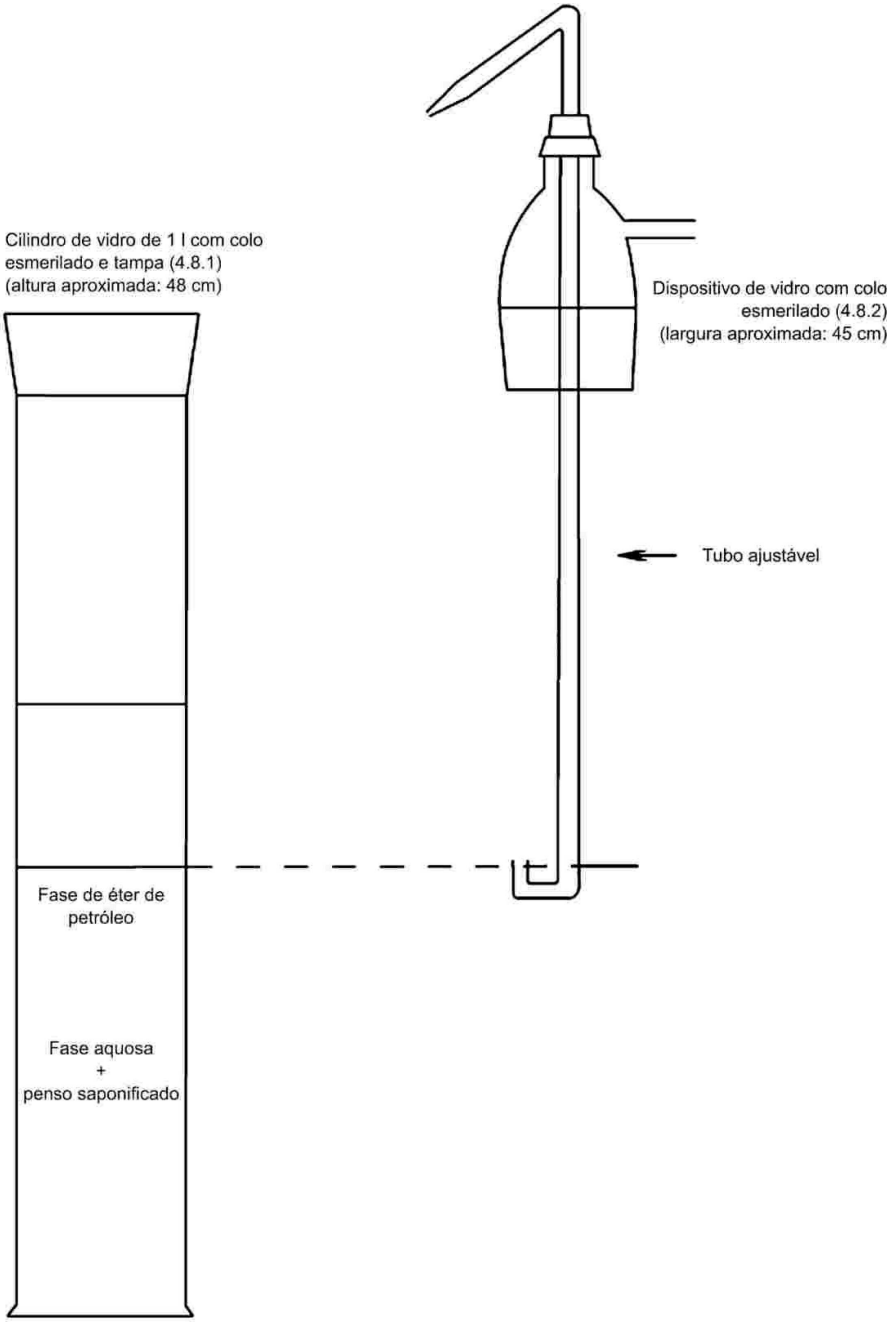
([2]) Organizado pelo grupo de trabalho "Alimentos para animais" do Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: número de laboratórios
n: número de valores individuais
sr: desvio-padrão da repetibilidade
sR: desvio-padrão da reprodutibilidade
r: repetibilidade
R: reprodutibilidade
CVr: coeficiente de variação da repetibilidade
CVR: coeficiente de variação da reprodutibilidade

Figura 1

Aparelho de extração (ponto 4.8)



B. DETERMINAÇÃO DA VITAMINA E

A vitamina E é determinada:

— pelo método de análise previsto na norma *EN 17547 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of vitamin A, E and D* ([3]) *content - Method using solid phase extraction (SPE) clean-up and high-performance liquid chromatography (HPLC)* [Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação do teor de vitamina A, vitamina E e vitamina D – Método que utiliza purificação com extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)] ou

— por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC) com um detetor de UV ou de fluorescência, tal como descrito a seguir, nos pontos 1 a 9.

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de vitamina E em alimentos para animais. O teor de vitamina E é expresso em mg de acetato de DL-α-tocoferol por quilograma; 1 mg de acetato de DL-α-tocoferol corresponde a 0,91 mg de DL-α-tocoferol (vitamina E).

O limite de quantificação é 2 mg de vitamina E/kg e só pode ser alcançado com um detetor de fluorescência. Com um detetor de UV, o limite de quantificação é de 10 mg/kg.

2. **Princípio**

A amostra é hidrolisada com solução etanólica de hidróxido de potássio e a vitamina E é extraída com éter de petróleo. Remove-se o solvente por evaporação e dissolve-se o resíduo em metanol; se necessário, dilui-se até à concentração requerida. O teor de vitamina E é determinado por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC), com um detetor de fluorescência ou de UV.

3. **Reagentes**

3.1. Etanol, σ = 96 %.

3.2. Éter de petróleo, intervalo de ebulição: 40 a 60 °C.

3.3. Metanol.

3.4. Solução de hidróxido de potássio, c = 50 g/100 ml.

3.5. Solução de ascorbato de sódio, c = 10 g/100 ml (ver observações no ponto 7.7).

3.6. Sulfureto de sódio, $Na_2S{\cdot}xH_2O$ (x = 7 - 9).

3.6.1. Solução de sulfureto de sódio, c = 0,5 mol/l em glicerol, β = 120 g/l (para x = 9) (ver observações no ponto 7.8).

3.7. Solução de fenolftaleína, c = 2 g/100 ml em etanol (ponto 3.1).

3.8. Fase móvel para HPLC: mistura de metanol (ponto 3.3) e água, p. ex. 980 + 20 (v + v). A proporção exata dependerá das características da coluna utilizada.

3.9. Azoto, isento de oxigénio.

3.10. Acetato de DL-α-tocoferol, extrapuro, de atividade certificada.

3.10.1. Solução-mãe de acetato de DL-α-tocoferol: num balão volumétrico de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 100 mg de acetato de DL-α-tocoferol (ponto 3.10). Dissolver com etanol (ponto 3.1) e completar o volume com o mesmo solvente até ao traço; 1 ml desta solução contém 1 mg de acetato de DL-α-tocoferol (padronização no UV: ver o ponto 5.6.1.3; estabilização: ver observações no ponto 7.4).

([3]) Refere-se o método de análise previsto na norma EN 17547 como um método alternativo a utilizar para efeitos de controlos oficiais na determinação da vitamina A e da vitamina E em lugar dos métodos de determinação da vitamina A e da vitamina E descritos, respetivamente, na parte A e na parte B do presente anexo.

3.11. DL-α-tocoferol, extrapuro, de atividade certificada.

3.11.1. Solução-mãe de DL-α-tocoferol: num balão volumétrico de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 100 mg de DL-α-tocoferol (ponto 3.11). Dissolver com etanol (ponto 3.1) e completar o volume com o mesmo solvente até ao traço; 1 ml desta solução contém 1 mg de DL-α-tocoferol. (padronização no UV: ver o ponto 5.6.2.3; estabilização: ver observações no ponto 7.4).

3.12. 2,6-Di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) (ver observações 7.5).

4. **Equipamento**

4.1. Evaporador rotativo.

4.2. Material de vidro ambarizado.

4.2.1. Balões de 500 ml de fundo plano ou Erlenmeyer, com colo esmerilado.

4.2.2. Balões volumétricos de 10, 25, 100 e 500 ml, com colo estreito e tampa esmerilada.

4.2.3. Ampolas de decantação, de 1 000 ml, com tampa esmerilada.

4.2.4. Balões em forma de pera, de 250 ml, com colo esmerilado.

4.3. Condensador de Allihn, com camisa de 300 mm, com junta esmerilada e adaptador para alimentação de gás.

4.4. Papel de filtro de pregas, com 185 mm de diâmetro, para a separação de fases (p. ex., Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. Aparelho para HPLC com sistema de injeção.

4.5.1. Coluna para cromatografia líquida com 250 mm × 4 mm e enchimento C_{18} de 5 ou 10 µm, ou equivalente.

4.5.2. Detetor de fluorescência ou de UV, com comprimento de onda regulável.

4.6. Espetrofotómetro com células de quartzo de 10 mm.

4.7. Banho de água equipado com um agitador magnético.

4.8. Aparelho de extração, constituído por (ver figura 2):

4.8.1. Cilindro de vidro de 1 litro com colo esmerilado e tampa.

4.8.2. Dispositivo de vidro com colo esmerilado, adaptável ao precedente, com uma tubuladura lateral e um tubo axial ajustável. O tubo ajustável termina em U na extremidade inferior e é afilado na extremidade oposta, para permitir a transferência da fase líquida superior do cilindro para uma ampola de decantação.

5. **Procedimento**

Nota: A vitamina E é sensível à luz (UV) e à oxidação. Efetuar todas as operações na ausência de luz (utilizando material de vidro ambarizado ou protegido com folha de alumínio) e de oxigénio (sob corrente de azoto). Durante a extração, o ar acima do líquido deve ser substituído por azoto (para evitar excessos de pressão, soltar a tampa de vez em quando).

5.1. *Preparação da amostra*

Moer a amostra de forma a poder passá-la por um crivo de 1 mm, tomando as devidas precauções para evitar a geração de calor. Efetuar a moagem imediatamente antes da pesagem e da saponificação; caso contrário, pode haver perdas de vitamina E.

5.2. *Saponificação*

Em função do teor de vitamina E, pesar com uma aproximação de 0,01 g, 2 g a 25 g de amostra num balão de fundo plano ou Erlenmeyer de 500 ml (ponto 4.2.1). Adicionar sucessivamente, sob agitação, 130 ml de etanol (ponto 3.1), aproximadamente 100 mg de BHT (ponto 3.12), 2 ml da solução de ascorbato de sódio (ponto 3.5) e 2 ml da solução de sulfureto de sódio (ponto 3.6). Adaptar o condensador (ponto 4.3) ao balão e mergulhar este último no banho de água equipado com um agitador magnético (ponto 4.7). Aquecer até à ebulição e deixar em refluxo durante 5 minutos. Adicionar em seguida, pelo condensador (ponto 4.3), 25 ml da solução de hidróxido de potássio (ponto 3.4) e deixar em refluxo durante mais 25 minutos, com agitação e sob uma corrente ligeira de azoto. Lavar o condensador com cerca de 20 ml de água e arrefecer o conteúdo do balão até à temperatura ambiente.

5.3. *Extração*

Transferir quantitativamente a solução de saponificação para uma ampola de decantação de 1 000 ml (ponto 4.2.3) ou para o aparelho de extração (ponto 4.8), lavando com um volume total de 250 ml de água. Lavar o balão de saponificação sucessivamente com 25 ml de etanol (ponto 3.1) e 100 ml de éter de petróleo (ponto 3.2) e transferir os líquidos de lavagem para a ampola de decantação ou o aparelho de extração. A proporção de água e etanol na solução combinada assim constituída deve ser aproximadamente 2:1. Agitar vigorosamente durante 2 minutos e deixar em repouso durante 2 minutos.

5.3.1. Extração com uma ampola de decantação (ponto 4.2.3)

Depois da separação das fases (ver observação no ponto 7.3), transferir a fase etérea para outra ampola de decantação (ponto 4.2.3). Repetir duas vezes a operação de extração com 100 ml de éter de petróleo (ponto 3.2) e mais duas vezes com 50 ml de éter de petróleo (ponto 3.2).

Lavar os extratos combinados na ampola de decantação por duas vezes, com volumes de 100 ml de água cada, agitando suavemente por rotação (para evitar a formação de emulsões), e, em seguida, agitar vigorosamente com mais volumes de 100 ml de água até esta permanecer incolor à solução de fenolftaleína (ponto 3.7) (quatro lavagens são normalmente suficientes). Filtrar o extrato lavado com um filtro de pregas para a separação de fases (ponto 4.4) seco para um balão volumétrico de 500 ml (ponto 4.2.2), a fim de remover alguma água ainda em suspensão. Lavar a ampola de decantação e o filtro com 50 ml de éter de petróleo (ponto 3.2), completar o volume com éter de petróleo (ponto 3.2) até ao traço e homogeneizar.

5.3.2. Extração com aparelho de extração (ponto 4.8)

Depois da separação das fases (ver observação no ponto 7.3), substituir a tampa do cilindro de vidro (ponto 4.8.1) pelo dispositivo de vidro com esmerilado (ponto 4.8.2) e colocar a extremidade inferior em U do tubo ajustável de modo a que fique imediatamente acima do nível da interface. Aumentar a pressão por alimentação de azoto através da tubuladura lateral e transferir a fase etérea superior para uma ampola de decantação de 1 000 ml (ponto 4.2.3). Adicionar 100 ml de éter de petróleo (ponto 3.2) ao cilindro, tapar e agitar vigorosamente. Depois da separação das fases, transferir a fase superior para a ampola de decantação conforme descrito acima. Repetir a operação de extração com mais 100 ml de éter de petróleo (ponto 3.2) e duas vezes com volumes de 50 ml de éter de petróleo (ponto 3.2), transferindo as fases etéreas para a ampola de decantação.

Lavar os extratos etéreos combinados conforme descrito no ponto 5.3.1 e proceder conforme descrito no mesmo ponto.

5.4. *Preparação da solução de amostra para a HPLC*

Pipetar uma alíquota da solução de éter de petróleo (obtida no ponto 5.3.1 ou 5.3.2) para um balão em forma de pera de 250 ml (ponto 4.2.4). Evaporar o solvente quase até à secura no evaporador rotativo (ponto 4.1), sob pressão reduzida, num banho a uma temperatura não superior a 40 °C. Restabelecer a pressão atmosférica com uma alimentação de azoto (ponto 3.9) e retirar o balão do evaporador rotativo. Remover o solvente restante sob uma corrente de azoto (ponto 3.9) e dissolver imediatamente o resíduo com um volume conhecido (10 ml - 100 ml) de metanol (ponto 3.3) (a concentração de DL-α-tocoferol tem de estar compreendida entre 5 µg/ml e 30 µg/ml).

5.5. *Determinação por HPLC*

Procede-se à separação da vitamina E numa coluna de fase reversa C_{18} (ponto 4.5.1) e determina-se a sua concentração com um detetor de fluorescência (excitação: 295 nm; emissão: 330 nm) ou um detetor de UV (292 nm) (ponto 4.5.2).

Injetar uma alíquota (p. ex., 20 µl) da solução metanólica obtida no ponto 5.4 e eluir com a fase móvel (ponto 3.8). Calcular a altura ou área média dos picos correspondentes a várias injeções da mesma solução de amostra e a altura ou área média dos picos correspondentes a várias injeções das soluções de calibração (ponto 5.6.2).

Condições da HPLC

As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia líquida (ponto 4.5.1):	250 mm × 4 mm, enchimento C_{18} de 5 ou 10 µm, ou equivalente
Fase móvel (ponto 3.8):	Mistura de metanol (ponto 3.3) e água, p. ex., 980 + 20 (v + v)
Caudal:	1-2 ml/minuto
Detetor (ponto 4.5.2):	Detetor de fluorescência (excitação: 295 nm; emissão: 330 nm) ou detetor de UV (292 nm)

5.6. *Calibração (acetato de DL-α-tocoferol ou DL-α-tocoferol)*

5.6.1. Padrão de acetato de DL-α-tocoferol

5.6.1.1. Preparação da solução-padrão de trabalho

Pipetar 25 ml da solução-mãe de acetato de DL-α-tocoferol (ponto 3.10.1) para um balão de 500 ml de fundo plano ou Erlenmeyer (ponto 4.2.1) e efetuar a hidrólise conforme descrito no ponto 5.2. Proceder, em seguida, à extração com éter de petróleo (ponto 3.2) conforme descrito no ponto 5.3 e completar o volume com éter de petróleo até perfazer 500 ml. Evaporar 25 ml do extrato obtido no evaporador rotativo (ver ponto 5.4) quase até à secura, remover o solvente restante sob uma corrente de azoto (ponto 3.9) e redissolver o resíduo com 25,0 ml de metanol (ponto 3.3). A concentração nominal desta solução é 45,5 µg de DL-α-tocoferol/ml, equivalente a 50 µg de acetato de DL-α-tocoferol/ml. Preparar a solução-padrão de trabalho imediatamente antes da sua utilização.

5.6.1.2. Preparação das soluções de calibração e traçado da curva de calibração

Pipetar 1,0, 2,0, 4,0 e 10,0 ml da solução-padrão de trabalho para uma série de balões volumétricos de 20 ml, completar o volume com metanol (ponto 3.3) até ao traço e homogeneizar. A concentração nominal destas soluções é de 2,5, 5,0, 10,0 e 25,0 µg de acetato de DL-α-tocoferol/ml, equivalentes a 2,28, 4,55, 9,10 e 22,8 µg de DL-α-tocoferol/ml.

Injetar vários volumes de 20 µl de cada solução de calibração e determinar as alturas (ou áreas) médias dos picos. Traçar uma curva de calibração com base nas alturas (ou áreas) médias dos picos.

5.6.1.3. Padronização no UV da solução-mãe de acetato de DL-α-tocoferol (ponto 3.10.1)

Diluir, com etanol, 5,0 ml da solução-mãe de acetato de DL-α-tocoferol (ponto 3.10.1) até perfazer 25,0 ml e traçar o espetro de UV desta solução no espetrofotómetro (ponto 4.6), entre 250 nm e 320 nm, em relação ao etanol (ponto 3.1).

O máximo de absorção deve situar-se nos 284 nm:

$$E^{1\,\%}_{1\,cm} = 43,6 \text{ a } 284 \text{ nm, em etanol}$$

Para esta diluição, deve obter-se uma extinção compreendida entre 0,84 e 0,88.

5.6.2. Padrão de DL-α-tocoferol

5.6.2.1. Preparação da solução-padrão de trabalho

Pipetar 2 ml da solução-mãe de DL-α-tocoferol (ponto 3.11.1) para um balão volumétrico de 50 ml, dissolver com metanol (ponto 3.3) e completar o volume com metanol até ao traço. A concentração nominal desta solução é 40 µg de DL-α-tocoferol/ml, equivalente a 44,0 µg de acetato de DL-α-tocoferol/ml. Preparar a solução-padrão de trabalho imediatamente antes da sua utilização.

5.6.2.2. Preparação das soluções de calibração e traçado da curva de calibração

Pipetar 1,0, 2,0, 4,0 e 10,0 ml da solução-padrão de trabalho para uma série de balões volumétricos de 20 ml, completar o volume com metanol (ponto 3.3) até ao traço e homogeneizar. A concentração nominal destas soluções é de 2,0, 4,0, 8,0 e 20,0 µg de DL-α-tocoferol/ml, equivalentes a 2,20, 4,40, 8,79 e 22,0 µg de acetato de DL-α-tocoferol/ml.

Injetar vários volumes de 20 µl de cada solução de calibração e determinar as alturas (ou áreas) médias dos picos. Traçar uma curva de calibração com base nas alturas (ou áreas) médias dos picos.

5.6.2.3. Padronização no UV da solução-mãe de DL-α-tocoferol (ponto 3.11.1)

Diluir, com etanol, 2,0 ml da solução-mãe de DL-α-tocoferol (ponto 3.11.1) até perfazer 25,0 ml e traçar o espetro de UV desta solução no espetrofotómetro (ponto 4.6), entre 250 nm e 320 nm, em relação ao etanol (ponto 3.1). O máximo de absorção deve situar-se nos 292 nm:

$$E_{1\,cm}^{1\,\%} = 75,8 \text{ a } 292 \text{ nm, em etanol}$$

Para esta diluição, deve obter-se uma extinção de 0,6.

6. **Cálculo dos resultados**

A partir da altura ou área média dos picos da vitamina E da solução de amostra, determinar a concentração desta em µg/ml (expressa em acetato de DL-α-tocoferol) com base na curva de calibração (ponto 5.6.1.2 ou 5.6.2.2).

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

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m}\,[mg/kg]$$

em que:

c = concentração, em µg/ml, de vitamina E (expressa em acetato de DL-α-tocoferol) da solução de amostra (ponto 5.4),

V_1 = volume, em ml, de solução de amostra (ponto 5.4),

V_2 = volume, em ml, da alíquota tomada no ponto 5.4,

m = massa, em g, da toma de ensaio.

7. **Observações**

7.1. No caso das amostras com baixas concentrações de vitamina E, pode ser útil combinar os extratos etéreos de duas saponificações (quantidade pesada: 25 g) numa única solução de amostra para a determinação por HPLC.

7.2. A toma de amostra utilizada na análise não deve conter mais de 2 g de matérias gordas.

7.3. Se não se der a separação de fases, adicionar aproximadamente 10 ml de etanol (ponto 3.1), para desfazer a emulsão.

7.4. Depois das medições espetrofotométricas efetuadas com a solução de acetato de DL-α-tocoferol ou de DL-α--tocoferol de acordo com os pontos 5.6.1.3 ou 5.6.2.3, respetivamente, adicionar à solução (ponto 3.10.1 ou 3.10.2) cerca de 10 mg de BHT (ponto 3.12) e conservar a mesma em frigorífico (prazo de validade: máximo quatro semanas).

7.5. Em vez de BHT, pode utilizar-se hidroquinona.

7.6. É possível separar os isómeros α-, β-, γ- e δ-tocoferol com uma coluna de fase normal.

7.7. Em vez da solução de ascorbato de sódio, podem utilizar-se aproximadamente 150 mg de ácido ascórbico.

7.8. Em vez da solução de sulfureto de sódio, podem utilizar-se aproximadamente 50 mg de EDTA.

7.9. Em condições alcalinas, o acetato de vitamina E hidrolisa muito rapidamente, pelo que é muito sensível à oxidação, especialmente na presença de oligoelementos como o ferro ou o cobre. A determinação da vitamina E em pré-misturas com teores superiores a 5 000 mg/kg pode ter por consequência a degradação da vitamina E. Assim, recomenda-se a confirmação através de um ensaio por HPLC que inclua uma digestão enzimática da formulação com vitamina E sem a etapa de saponificação em meio alcalino.

8. Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder 15 % do maior dos valores.

9. **Resultados de um estudo colaborativo** ([4])

	Pré-mistura	Alimento pré-misturado	Concentrado de minerais	Alimento proteico	Alimento para leitões
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
média [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CVr [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s_R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CVR [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: número de laboratórios

n: número de valores individuais

s_r: desvio-padrão da repetibilidade

s_R: desvio-padrão da reprodutibilidade

r: repetibilidade

R: reprodutibilidade

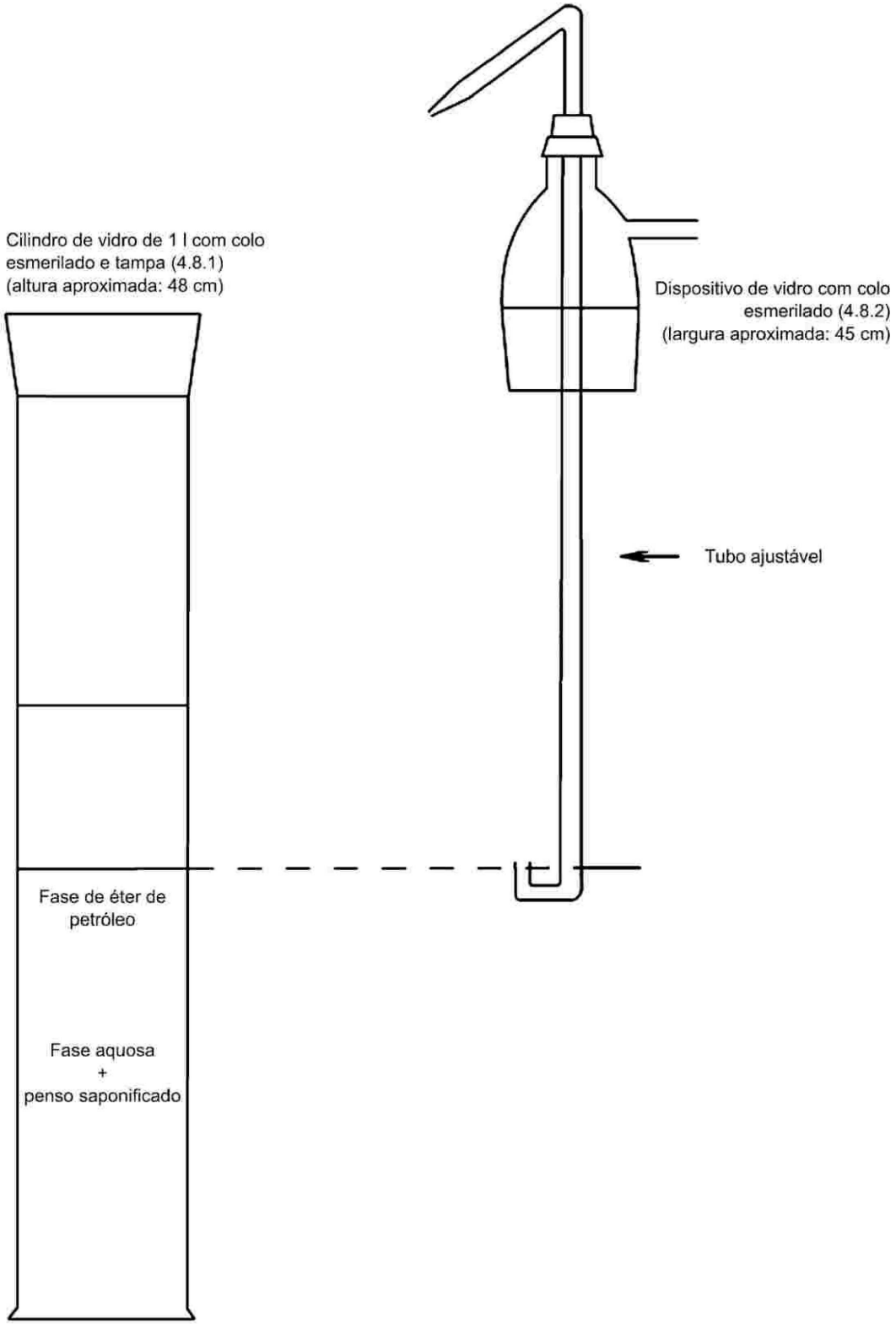
CV_r: coeficiente de variação da repetibilidade

CV_R: coeficiente de variação da reprodutibilidade

([4]) Organizado pelo grupo de trabalho "Alimentos para animais" do Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Figura 2

Aparelho de extração (ponto 4.8)



C. DETERMINAÇÃO DOS OLIGOELEMENTOS FERRO, COBRE, MANGANÊS E ZINCO

Os teores de ferro, cobre, manganês e zinco podem ser determinados:

— pelo método de análise previsto na norma *EN 15510 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum and lead by ICP-AES* (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação do cálcio, sódio, fósforo, magnésio, potássio, ferro, zinco, cobre, manganês, cobalto, molibdénio e chumbo por ICP-AES), ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN 15621 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES* (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação do cálcio, sódio, fósforo, magnésio, potássio, enxofre, ferro, zinco, cobre, manganês e cobalto por ICP-AES após mineralização sob pressão), ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN 17053 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of trace elements, heavy metals and other elements in feed by ICP-MS (multi-method)* [Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação de oligoelementos, metais pesados e outros elementos nos alimentos para animais por ICP-MS (vários métodos)], ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN ISO 6869 – Alimentos para animais – Determinação dos teores de cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, potássio, sódio e zinco – Método por espetrometria de absorção atómica*, ou

— pelo método de espetrometria de absorção atómica de chama (FAAS), tal como descrito a seguir, nos pontos 1 a 8.

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar os oligoelementos ferro, cobre, manganês e zinco nos alimentos para animais ([5]). Os limites de quantificação são os seguintes:

— ferro (Fe): 20 mg/kg,

— cobre (Cu): 10 mg/kg,

— manganês (Mn): 20 mg/kg,

— zinco (Zn): 20 mg/kg.

2. **Princípio**

A amostra é colocada em solução em ácido clorídrico, após a destruição da matéria orgânica eventualmente presente. Os elementos ferro, cobre, manganês e zinco são determinados, após uma diluição apropriada, por espetrometria 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 catiões a determinar, devendo obter-se mediante dupla destilação num aparelho em borossilicato ou sílica, ou por tratamento duplo com uma resina de permuta iónica.

Os reagentes devem ser, pelo menos, de pureza analítica. 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 (d: 1,19 g/ml).

3.2. Ácido clorídrico (6 mol/l).

3.3. Ácido clorídrico (0,5 mol/l).

3.4. Ácido fluorídrico a 38-40 % (v/v), com um teor de ferro (Fe) inferior a 1 mg/l e resíduo de evaporação inferior a 10 mg (expressos em sulfato)/litro.

([5]) Este método foi validado num ensaio colaborativo para várias matrizes de alimentos para animais. Para mais informações, consultar https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation_en?prefLang=pt.

3.5. Ácido sulfúrico (d: 1,84 g/ml).

3.6. Peróxido de hidrogénio [aproximadamente 100 vol. de oxigénio (30 % em massa)].

3.7. Solução-padrão de ferro (1 000 µg Fe/ml), preparada da seguinte forma, ou solução comercial equivalente: dissolver 1 g de arame de ferro em 200 ml de ácido clorídrico 6 mol/l (ponto 3.2), adicionar 16 ml de peróxido de hidrogénio (ponto 3.6) e perfazer o volume de 1 litro com água.

3.7.1. Solução-padrão de trabalho de ferro (100 µg Fe/ml): diluir a solução-padrão (ponto 3.7) em água, na proporção 1:9.

3.8. Solução-padrão de cobre (1 000 µg Cu/ml), preparada da seguinte forma, ou solução comercial equivalente:

— dissolver 1 g de cobre em pó em 25 ml de ácido clorídrico 6 mol/l (ponto 3.2), adicionar 5 ml de peróxido de hidrogénio (ponto 3.6) e perfazer o volume de 1 litro com água.

3.8.1. Solução-padrão de trabalho de cobre (10 µg Cu/ml): diluir a solução-padrão (ponto 3.8) em água na proporção de 1:9; diluir em seguida esta solução em água, novamente na proporção de 1:9.

3.9. Solução-padrão de manganês (1 000 µg Mn/ml), preparada da seguinte forma, ou solução comercial equivalente:

— dissolver 1 g de manganês em pó em 25 ml de ácido clorídrico 6 mol/l (ponto 3.2), perfazer o volume de 1 litro com água.

3.9.1. Solução-padrão de trabalho de manganês (10 µg Mn/ml): diluir a solução-padrão (ponto 3.9) em água na proporção de 1:9; diluir em seguida esta solução em água, novamente na proporção de 1:9.

3.10. Solução-padrão de zinco (1 000 µg Zn/ml), preparada da seguinte forma, ou solução comercial equivalente:

— dissolver 1 g de zinco em barra ou placa em 25 ml de ácido clorídrico 6 mol/l (ponto 3.2), perfazer o volume de 1 litro com água.

3.10.1. Solução-padrão de trabalho de zinco (10 µg Zn/ml): diluir a solução-padrão (ponto 3.10) em água na proporção de 1:9; diluir em seguida esta solução em água, novamente na proporção de 1:9.

3.11. Solução de cloreto de lantânio preparada da seguinte forma: dissolver 12 g de óxido de lantânio em 150 ml de água, adicionar 100 ml de ácido clorídrico 6 mol/l (ponto 3.2) e perfazer o volume de 1 litro com água.

4. **Equipamento**

4.1. Mufla de temperatura regulável e, de preferência, com registador.

4.2. Material de vidro em borossilicato resistente. Recomenda-se a utilização de material que sirva exclusivamente para a determinação dos oligoelementos.

4.3. Espetrofotómetro de absorção atómica, com características de sensibilidade e precisão compatíveis com as exigências desta técnica.

5. **Procedimento** ([6])

5.1. *Amostras com matéria orgânica*

5.1.1. Incineração e preparação da solução a analisar ([7])

5.1.1.1. Colocar entre 5 e 10 g de amostra, pesados com uma aproximação de 0,2 mg, num cadinho de quartzo ou platina [ver nota b)], secar em estufa a 105 °C e introduzir o cadinho na mufla (ponto 4.1) a frio. Fechar a mufla [ver nota c)] e elevar progressivamente a sua temperatura por forma a que atinja os 450 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 transferi-las em seguida para um copo de 250 ml. Lavar o cadinho com cerca de 5 ml de ácido clorídrico (ponto 3.1) e transferir, lentamente e com precaução, a solução de lavagem para o copo (poderá produzir-se uma reação violenta pela formação de CO_2). Em seguida adicionar ácido clorídrico (ponto 3.1) gota a gota, com agitação, até que cesse a efervescência. Evaporar até à secura, mexendo regularmente com uma vareta de vidro.

Juntar ao resíduo 15 ml de ácido clorídrico 6 mol/l (ponto 3.2) e, em seguida, aproximadamente 120 ml de água. Agitar com vareta de vidro, que deve ser deixada no copo, e tapar 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 de filtro, isento de cinzas, e recolher o filtrado num balão volumétrico de 250 ml. Lavar o copo e o filtro com 5 ml de ácido clorídrico 6 mol/l (ponto 3.2) quente e duas vezes com água a ferver. Completar o volume com água (a concentração em HCl é aproximadamente de 0,5 mol/l).

5.1.1.2. Se o resíduo que ficou no filtro for de cor negra (carbonosa) colocá-lo de novo na mufla e incinerá-lo a 450-475 °C. Esta incineração, que requer apenas algumas horas (três a cinco horas, aproximadamente), considerar-se-á terminada quando as cinzas se apresentarem de cor branca ou quase branca. Dissolver o resíduo em aproximadamente 2 ml de ácido clorídrico (ponto 3.1), evaporá-lo até à secura e adicionar 5 ml de ácido clorídrico 6 mol/l (ponto 3.2). Aquecer, filtrar a solução para o balão volumétrico e completar o volume com água (a concentração em HCl é de aproximadamente 0,5 mol/l).

Notas:

a) Na determinação dos oligoelementos, convém estar atento ao risco de contaminação, designadamente pelo zinco, cobre e ferro. É por essa razão que o equipamento utilizado na preparação das amostras deve estar isento destes metais.

Para reduzir o risco de contaminação, é conveniente trabalhar numa atmosfera isenta de poeiras, com equipamento rigorosamente limpo e material de vidro cuidadosamente lavado. A determinação do zinco é especialmente propícia à contaminação, em especial com origem no material de vidro, reagentes, poeiras, etc.

b) Calcular a massa da amostra a incinerar em função do teor estimado de oligoelementos presentes no alimento e da sensibilidade do espetrofotómetro utilizado. Para certos alimentos pobres em oligoelementos, poderá ser necessário partir de uma amostra de 10 a 20 g e limitar o volume da solução final a 100 ml.

c) A incineração deve ser feita numa mufla fechada, sem injeção de ar nem de oxigénio.

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

([6]) Poderão ser utilizados outros métodos de mineralização desde que se tenha demonstrado terem resultados semelhantes (por exemplo, a mineralização por micro-ondas sob pressão).

([7]) As forragens verdes (frescas ou desidratadas) são suscetíveis de conter grandes quantidades de sílica vegetal que pode reter oligoelementos e tem de ser eliminada. As amostras destes alimentos devem ser submetidas ao seguinte procedimento modificado: efetuar a operação do ponto 5.1.1.1 até ao estádio da filtração. Lavar duas vezes, em água a ferver, o papel de filtro que contém o resíduo insolúvel e colocá-lo num cadinho de quartzo ou platina.
Incinerar na mufla (ponto 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 (ponto 3.4) e evaporar até à secura, a aproximadamente 150 °C. Se o resíduo ainda contiver sílica, dissolvê-la em alguns ml de ácido fluorídrico (ponto 3.4) e evaporar até à secura. Juntar 5 gotas de ácido sulfúrico (ponto 3.5) e aquecer até ao desaparecimento do fumo branco. Juntar 5 ml de ácido clorídrico 6 mol/l (ponto 3.2) e aproximadamente 30 ml de água, aquecer, filtrar a solução para um balão volumétrico de 250 ml e completar o volume com água (a concentração em HCl é aproximadamente de 0,5 mol/l). Prosseguir a operação a partir do ponto 5.1.2.

5.1.2. Determinação espetrofotométrica

5.1.2.1. Preparação das soluções de calibração

A partir das soluções-padrão de trabalho dos pontos 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 e 3.10.1, preparar, para cada oligoelemento a determinar, uma gama de soluções de calibração, apresentando cada uma delas uma concentração em HCl de aproximadamente 0,5 mol/l e, no caso do ferro, do manganês e do zinco, uma concentração em cloreto de lantânio correspondente a 0,1 % de lantânio (m/v).

As concentrações de oligoelementos escolhidas deverão situar-se na zona de sensibilidade do espetrofotómetro utilizado. Os quadros adiante apresentados indicam, a título de exemplo, as composições de gamas típicas de soluções de calibração; poderá ser necessário, conforme o tipo e a sensibilidade do espetrofotómetro utilizado, optar por outras concentrações.

Ferro

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de solução-padrão de trabalho (ponto 3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (ponto 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de solução de cloreto de lantânio (ponto 3.11); perfazer o volume de 100 ml com água.							

Cobre

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

Manganês

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solução-padrão de trabalho (ponto 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (ponto 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de solução de cloreto de lantânio (ponto 3.11); perfazer o volume de 100 ml com água.							

Zinco

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml de solução-padrão de trabalho (ponto 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (ponto 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de solução de cloreto de lantânio (ponto 3.11); perfazer o volume de 100 ml com água.							

5.1.2.2. Preparação da solução para análise

Para a determinação do cobre, a solução preparada como indicado no ponto 5.1.1 poderá, regra geral, ser utilizada diretamente. Se for necessário diluir a solução de forma a que a sua concentração se situe na gama de concentrações das soluções de calibração, poderá pipetar-se uma alíquota para um balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com ácido clorídrico 0,5 mol/l (ponto 3.3).

Para a determinação do ferro, manganês e zinco, pipetar uma alíquota da solução preparada como indicado no ponto 5.1.1 para um balão volumétrico de 100 ml, adicionar 10 ml de solução de cloreto de lantânio (ponto 3.11) e completar o volume com ácido clorídrico 0,5 mol/l (ponto 3.3) (ver também o ponto 8 "Observação").

5.1.2.3. Ensaio em branco

Efetuar, sem a amostra, um ensaio em branco que inclua todas as etapas constantes do método. A solução de calibração "0" não deve ser utilizada como "branco".

5.1.2.4. Medição da absorção atómica

Medir a absorção atómica das soluções de calibração e da solução a analisar utilizando uma chama oxidante ar-acetileno aos 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. *Alimentos minerais*

Na ausência de matérias orgânicas é inútil a incineração prévia. Seguir o método a partir do segundo parágrafo do ponto 5.1.1.1. Pode ser dispensada a evaporação em presença de ácido fluorídrico.

6. **Cálculo dos resultados**

Calcular a concentração do oligoelemento na solução a analisar, por meio de uma curva de calibração, e exprimir o resultado em mg de oligoelemento por kg de amostra (ppm).

7. **Repetibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra pelo mesmo analista não deve exceder:

— 5 mg/kg, em valor absoluto, para teores do oligoelemento em causa inferiores a 50 mg/kg,

— 10 % do maior dos valores, para teores entre 50 e 100 mg/kg,

— 10 mg/kg, em valor absoluto, para teores entre 100 e 200 mg/kg,

— 5 % do maior dos valores, para teores superiores a 200 mg/kg.

8. **Observação**

A presença de grandes quantidades de fosfatos poderá interferir com a determinação do ferro, manganês e zinco. Esta interferência deve ser corrigida por adição de uma solução de cloreto de lantânio (ponto 3.11). Se, no entanto, a amostra apresentar uma razão ponderal [(Ca + Mg)/P] > 2, pode ser dispensada a adição da solução de cloreto de lantânio (ponto 3.11) à solução a analisar e às soluções de calibração.

D. DETERMINAÇÃO DA HALOFUGINONA

Bromidrato de DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil]-quinazolin-4(3H)-ona

O teor de halofuginona é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma EN 17299 –*Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em fase reversa com um detetor de UV, tal como descrito a seguir, nos pontos 1 a 8.

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

O presente método destina-se à determinação da halofuginona em alimentos para animais. O limite de quantificação é 1 mg/kg.

2. **Princípio**

Após tratamento com água quente, a halofuginona é extraída com acetato de etilo sob a forma de base livre e posteriormente transferida por partição, sob a forma de cloridrato, para uma solução aquosa de ácido acético. O extrato é purificado por cromatografia de troca iónica, sendo o teor de halofuginona determinado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em fase reversa, com um detetor de UV.

3. **Reagentes**

3.1. Acetonitrilo de qualidade equivalente para HPLC.

3.2. Resina Amberlite XAD-2.

3.3. Acetato de amónio.

3.4. Acetato de etilo.

3.5. Ácido acético glacial.

3.6. Halofuginona, substância-padrão (bromidrato de DL-*trans*-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil]--quinazolin-4-(3H)-ona, E 764).

3.6.1. Solução-mãe padrão de halofuginona, 100 µg/ml

Pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 50 mg de halofuginona (ponto 3.6) num balão volumétrico de 500 ml. Dissolver com solução-tampão de acetato de amónio (ponto 3.18), perfazer o volume com a mesma solução e homogeneizar. Esta solução mantém-se estável durante três semanas, a 5 °C, na ausência de luz.

3.6.2. Soluções de calibração

Transferir, respetivamente, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 6,0 ml de solução-mãe padrão de halofuginona (ponto 3.6.1) para uma série de balões volumétricos de 100 ml. Perfazer o volume com a fase móvel (ponto 3.21) e homogeneizar. As soluções resultantes possuem concentrações de halofuginona de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 6,0 µg/ml, respetivamente. Estas soluções têm que ser preparadas antes de cada utilização.

3.7. Ácido clorídrico, ρ_{20} = 1,16 g/ml, aproximadamente.

3.8. Metanol.

3.9. Nitrato de prata.

3.10. Ascorbato de sódio.

3.11. Carbonato de sódio.

3.12. Cloreto de sódio.

3.13. EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético).

3.14. Água de qualidade equivalente para HPLC.

3.15. Solução de carbonato de sódio, c = 10 g/100 ml.

3.16. Solução de carbonato de sódio saturada com cloreto de sódio, c = 5 g/100 ml

Dissolver 50 g de carbonato de sódio (ponto 3.11) em água, diluir para 1 litro e adicionar cloreto de sódio (ponto 3.12) até obter uma solução saturada.

3.17. Ácido clorídrico, 0,1 mol/l, aproximadamente

Diluir 10 ml de HCl (ponto 3.7) em água e perfazer o volume de 1 litro.

3.18. Solução-tampão de acetato de amónio, 0,25 mol/l, aproximadamente

Dissolver 19,3 g de acetato de amónio (ponto 3.3) e 30 ml de ácido acético (ponto 3.5) em água (ponto 3.14), perfazendo o volume de 1 litro.

3.19. Preparação da resina Amberlite XAD-2

Lavar com água uma quantidade adequada de Amberlite (ponto 3.2), até à remoção completa dos iões cloreto, verificada através da realização do teste com nitrato de prata (ponto 3.20) com a fase aquosa recolhida. Seguidamente, lavar a resina com 50 ml de metanol (ponto 3.8), rejeitar o metanol e armazenar a resina numa nova porção de metanol fresco.

3.20. Solução de nitrato de prata, 0,1 mol/l, aproximadamente:

Dissolver 0,17 g de nitrato de prata (ponto 3.9) em 10 ml de água.

3.21. Fase móvel para HPLC

Misturar 500 ml de acetonitrilo (ponto 3.1) com 300 ml de solução-tampão de acetato de amónio (ponto 3.18) e 1 200 ml de água (ponto 3.14). Ajustar o pH a 4,3 com ácido acético (ponto 3.5). Filtrar com um filtro de 0,22 µm (ponto 4.8) e desgaseificar a solução (p. ex. por aplicação de ultra-sons durante 10 minutos). A solução permanece estável durante um mês, se for armazenada na ausência de luz e num recipiente fechado.

4. **Equipamento**

4.1. Banho de ultrassons.

4.2. Evaporador rotativo.

4.3. Centrífuga.

4.4. Aparelho para HPLC com detetor de ultravioleta de comprimento de onda variável ou detetor de rede de díodos.

4.4.1. Coluna para cromatografia líquida com 300 mm × 4 mm e enchimento C_{18} de 10 µm, ou coluna equivalente.

4.5. Coluna de vidro (300 mm × 10 mm), equipada com um filtro de vidro calcinato e torneira.

4.6. Filtros de fibra de vidro de 150 mm de diâmetro.

4.7. Filtros de membrana, porosidade 0,45 µm.

4.8. Filtros de membrana, porosidade 0,22 µm.

5. **Procedimento**

Nota: Sob a forma de base livre, a halofuginona é instável em soluções alcalinas e em acetato de etilo, não devendo permanecer neste último durante mais de 30 minutos.

5.1. *Generalidades*

5.1.1. De modo a comprovar a ausência de halofuginona e outras substâncias suscetíveis de interferir no processo, deve proceder-se à análise de uma amostra em branco de um alimento para animais (ensaio em branco).

5.1.2. Deve efetuar-se um ensaio de recuperação utilizando a amostra do ensaio em branco, fortificada com uma quantidade conhecida de halofuginona semelhante à quantidade presente na amostra. Para obter uma fortificação a um nível de 3 mg/kg, adicionam-se 300 µl de solução-mãe padrão (ponto 3.6.1) a 10 g de amostra para o ensaio em branco. Misturar, deixar em repouso 10 minutos e proceder à extração (ponto 5.2).

Nota: Para os fins do presente método, a amostra para o ensaio em branco deve ter composição semelhante à da amostra em análise e não deve acusar a presença de halofuginona.

5.2. *Extração*

Pesar, com uma aproximação de 0,1 g, 10 g da amostra previamente preparada para um tubo de centrífuga de 200 ml. Adicionar 0,5 g de ascorbato de sódio (ponto 3.10), 0,5 g de EDTA (ponto 3.13) e 20 ml de água e homogeneizar. Colocar o tubo num banho de água a 80 °C, durante 5 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionar 20 ml de solução de carbonato de sódio (ponto 3.15) e homogeneizar. Adicionar imediatamente 100 ml de acetato de etilo (ponto 3.4) e agitar manualmente com vigor durante 15 segundos. Colocar o tubo durante três minutos num banho de ultrassons (ponto 4.1), desenroscando a rolha. Centrifugar durante dois minutos e decantar a fase de acetato de etilo, através de um filtro de fibra de vidro (ponto 4.6), para uma ampola de decantação de 500 ml. Repetir a extração da amostra com uma segunda porção de 100 ml de acetato de etilo. Lavar os extratos combinados durante um minuto com 50 ml de solução de carbonato de sódio saturada com cloreto de sódio (ponto 3.16), rejeitando a fase aquosa.

Extrair a fase orgânica durante um minuto com 50 ml de ácido clorídrico (ponto 3.17). Transferir a camada inferior de ácido para uma ampola de decantação de 250 ml. Extrair novamente a fase orgânica durante 1,5 minutos com uma nova porção de 50 ml de ácido clorídrico, combinando este extrato com o primeiro. Lavar os extratos ácidos combinados por agitação com 10 ml de acetato de etilo (ponto 3.4), durante cerca de 10 segundos.

Transferir quantitativamente a fase aquosa para um balão de fundo redondo de 250 ml, rejeitando a fase orgânica. Evaporar o acetato de etilo remanescente da solução ácida, por recurso a um evaporador rotativo (ponto 4.2). A temperatura do banho de água não deve exceder 40 °C. A uma pressão aproximada de 25 mbar, todo o acetato de etilo residual deverá ser removido em 5 minutos, a 38 °C.

5.3. *Purificação*

5.3.1. Preparação da coluna de Amberlite

Deve preparar-se uma coluna de XAD-2 para cada extrato de amostra. Com o auxílio de metanol (ponto 3.8), transferir para uma coluna de vidro (ponto 4.5) 10 g de Amberlite preparada (ponto 3.19). Colocar um pequeno tampão de lã de vidro no topo do leito de resina. Remover o metanol da coluna e lavar a resina com 100 ml de água, suspendendo o fluxo quando o nível de líquido atingir o topo do leito de resina. Deixar a coluna estabilizar durante 10 minutos antes da utilização. Não permitir, em caso algum, a secagem da coluna.

5.3.2. Purificação da amostra

Transferir quantitativamente o extrato (ponto 5.2) para o topo da coluna de Amberlite preparada (ponto 5.3.1) e eluir, desprezando o eluato. O caudal de eluição não deverá exceder 20 ml/min. Lavar o balão de fundo redondo com 20 ml de ácido clorídrico (ponto 3.17), aproveitando a solução residual para lavar a coluna de resina. Remover quaisquer resíduos de solução ácida por recurso a uma corrente de ar. Rejeitar os resíduos de lavagem. Adicionar à coluna 100 ml de metanol (ponto 3.8) e deixar eluir 5 a 10 ml, recolhendo o eluato num balão de fundo redondo de 250 ml. Estabilizar a resina com o metanol remanescente durante 10 minutos e continuar a eluição a um caudal não superior a 20 ml/min, recolhendo o eluato no mesmo balão de fundo redondo. Evaporar o metanol no evaporador rotativo (ponto 4.2); a temperatura do banho de água não deverá exceder 40 °C. Com o auxílio da fase móvel (ponto 3.21), transferir quantitativamente o resíduo para um balão volumétrico de 10 ml. Perfazer o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar uma alíquota através de um filtro de membrana (ponto 4.7). Guardar esta solução para a análise por HPLC (ponto 5.4).

5.4. *Análise por HPLC*

5.4.1. Parâmetros

As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia líquida (ponto 4.4.1)

Fase móvel para HPLC (ponto 3.21)

Caudal: 1,5 a 2 ml/minuto

Comprimento de onda de deteção: 243 nm

Volume injetado: 40 to 100 µl

Verificar a estabilidade do sistema cromatográfico mediante a injeção repetida da solução de calibração (ponto 3.6.2), que contém 3,0 µg/ml de halofuginona, até obter picos com alturas (ou áreas) e tempos de retenção reprodutíveis.

5.4.2. Curva de calibração

Injetar várias vezes cada solução de calibração (ponto 3.6.2) e medir a altura (ou área) dos picos correspondentes a cada concentração. Traçar uma curva de calibração, colocando a altura (ou área) média dos picos das soluções de calibração em ordenadas e as concentrações correspondentes, expressas em µg/ml, em abcissas.

5.4.3. Solução de amostra

Injetar várias vezes o extrato de amostra (ponto 5.3.2), utilizando o mesmo volume utilizado para as soluções de calibração, e determinar a altura (ou área) média dos picos correspondentes à halofuginona.

6. **Cálculo dos resultados**

A partir da altura (ou área) média dos picos da halofuginona da solução de amostra, determinar a concentração desta em µg/ml, com base na curva de calibração (ponto 5.4.2).

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

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

em que:

c: concentração de halofuginona da solução de amostra, expressa em µg/ml,

m: massa, em gramas, da toma de ensaio.

7. **Validação dos resultados**

7.1. *Identidade*

A identidade do analito pode ser confirmada por cocromatografia ou por recurso a um detetor de rede de díodos, comparando os espetros do extrato de amostra e da solução de calibração (ponto 3.6.2) que contém 6,0 µg/ml de halofuginona.

7.1.1. Cocromatografia

Fortificar um extrato de amostra com a adição de uma quantidade adequada de uma solução de calibração (ponto 3.6.2). A quantidade de halofuginona adicionada deve ser idêntica à quantidade de halofuginona presumida no extrato de amostra.

Apenas se deverá verificar um aumento da altura do pico correspondente à halofuginona, atendendo à quantidade adicionada e à diluição do extrato. A largura do pico a meia altura não poderá diferir mais de 10 % da largura inicial.

7.1.2. Deteção com um detetor de rede de díodos

Os resultados são avaliados de acordo com os seguintes critérios:

a) O comprimento de onda de absorção máxima dos espetros da amostra e do padrão, registado no máximo do pico cromatográfico, deve ser o mesmo, com uma margem de variação dependente da resolução do sistema de deteção. No caso de um detetor de rede de díodos, esta margem é, em geral, de ± 2 nm;

b) Entre 225 e 300 nm, os espetros da amostra e do padrão, registados no máximo dos picos cromatográficos, não devem diferir entre si no que respeita às zonas do espetro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 e 100 %. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e a diferença entre ambos os espetros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do analito-padrão;

c) Entre 225 e 300 nm, os espetros na curva ascendente, no máximo e na curva descendente do pico do extrato da amostra não devem diferir entre si nas partes do espetro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e a diferença entre os espetros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do espetro no máximo do pico.

Se algum destes critérios não for satisfeito, a presença do analito não pode ser confirmada.

7.2. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não pode exceder 0,5 mg/kg, para teores de halofuginona até 3 mg/kg.

7.3. *Recuperação*

A taxa de recuperação da amostra em branco fortificada deve ser de, pelo menos, 80 %.

8. **Resultados de um estudo colaborativo**

Num estudo colaborativo ([8]), procedeu-se à análise de três amostras por oito laboratórios.

Resultados

	Amostra A (branco) quando da receção	Amostra B (farinha)		Amostra C (granulado)	
		quando da receção	decorridos dois meses	quando da receção	decorridos dois meses
Média [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

ND= não detetado

S_R= desvio-padrão da reprodutibilidade

CV_R= coeficiente de variação da reprodutibilidade (%)

Rec.= recuperação (%)

E. DETERMINAÇÃO DA ROBENIDINA

Cloridrato de 1,3-bis[(4-clorobenzilideno)amino]guanidina

O teor de robenidina é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma EN 17299 –*Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em fase reversa com um detetor de UV, tal como descrito a seguir, nos pontos 1 a 8.

([8]) *The Analyst*, vol. 108, 1983, p. 1252.

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método destina-se à determinação da robenidina em alimentos para animais. O limite de quantificação é 5 mg/kg.

2. **Princípio**

A amostra é extraída com metanol acidificado. O extrato é seco, sendo uma alíquota submetida a purificação numa coluna de óxido de alumínio. A robenidina é eluída da coluna com metanol, concentrada e posteriormente diluída com fase móvel para um volume adequado. O teor de robenidina é determinado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em fase reversa, com um detetor de UV.

3. **Reagentes**

3.1. Metanol.

3.2. Metanol acidificado

Transferir 4,0 ml de ácido clorídrico (ρ20 = 1,18 g/ml) para um balão volumétrico de 500 ml, completar até ao traço com metanol (ponto 3.1) e homogeneizar. A solução deve ser preparada antes de cada utilização.

3.3. Acetonitrilo de qualidade equivalente para HPLC.

3.4. Crivo molecular

Tipo 3A, partículas com malha de dimensão 8-12 (partículas de aluminossilicato cristalino com 1,6-2,5 mm de diâmetro e poros com 0,3 mm de diâmetro).

3.5. Óxido de alumínio ácido, de grau de atividade I, para cromatografia em coluna

Transferir 100 g de óxido de alumínio para um recipiente adequado e adicionar 2,0 ml de água. Tapar e agitar durante cerca de 20 minutos. Guardar num recipiente bem rolhado.

3.6. Solução de di-hidrogenofosfato de potássio, c = 0,025 mol/l

Dissolver, num balão volumétrico de 1 000 ml, 3,40 g de di-hidrogenofosfato de potássio em água de qualidade para HPLC, perfazer o volume e homogeneizar.

3.7. Solução de hidrogenofosfato dissódico, c = 0,025 mol/l

Dissolver, num balão volumétrico de 1 000 ml, 3,55 g de hidrogenofosfato dissódico anidro (ou 4,45 g de hidrogenofosfato dissódico di-hidratado, ou ainda 8,95 g de hidrogenofosfato dissódico dodeca-hidratado) em água de qualidade equivalente para HPLC, completar até ao traço e homogeneizar.

3.8. Fase móvel para HPLC

Misturar os seguintes reagentes:

650 ml de acetonitrilo (ponto 3.3)

250 ml de água (qualidade equivalente para HPLC)

50 ml de solução de di-hidrogenofosfato de potássio (ponto 3.6)

50 ml de solução de hidrogenofosfato dissódico (ponto 3.7)

Filtrar com um filtro de 0,22 µm (ponto 4.6) e desgaseificar a solução (p. ex. por aplicação de ultrassons durante 10 minutos).

3.9. Substância-padrão

Robenidina pura: cloridrato de 1,3-bis[(4-clorobenzilideno)amino]guanidina.

3.9.1. Solução-mãe padrão de robenidina: 300 µg/ml

Pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 30 mg de robenidina padrão (ponto 3.9). Dissolver em metanol acidificado (ponto 3.2) num balão volumétrico de 100 ml, perfazer o volume com o mesmo solvente e homogeneizar. Envolver o balão em folha de alumínio e armazenar ao abrigo da luz.

3.9.2. Solução-padrão intermédia de robenidina: 12 µg/ml

Transferir 10,0 ml de solução-mãe padrão (ponto 3.9.1) para um balão volumétrico de 250 ml, completar o volume com fase móvel (ponto 3.8) e homogeneizar. Envolver o balão em folha de alumínio e armazenar ao abrigo da luz.

3.9.3. Soluções de calibração

Transferir, respetivamente, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 ml de solução-padrão intermédia (ponto 3.9.2) para balões volumétricos de 50 ml. Perfazer o volume com a fase móvel (ponto 3.8) e homogeneizar. As soluções assim obtidas contêm, respetivamente, 1,2; 2,4, 3,6, 4,8 e 6,0 µg/ml de robenidina. Estas soluções têm que ser preparadas antes de cada utilização.

3.10. Água de qualidade equivalente para HPLC.

4. **Equipamento**

4.1. Coluna de vidro:

Coluna de vidro ambarizado, equipada com torneira e reservatório de cerca de 150 ml, possuindo 10-15 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento.

4.2. Agitador mecânico ou magnético.

4.3. Evaporador rotativo.

4.4. Aparelho para HPLC com detetor de ultravioleta de comprimento de onda variável ou detetor de rede de díodos adequado para determinações na gama de comprimentos de onda de 250 a 400 nm.

4.4.1. Coluna para cromatografia líquida: 300 mm × 4 mm, com enchimento C_{18} de 10 µm ou equivalente.

4.5. Filtro de fibra de vidro (Whatman GF/A ou equivalente).

4.6. Filtros de membrana, porosidade 0,22 µm.

4.7. Filtros de membrana, porosidade 0,45 µm.

5. **Procedimento**

Nota: A robenidina é fotossensível, devendo utilizar-se material de vidro ambarizado para todas as operações.

5.1. *Generalidades*

5.1.1. De modo a comprovar a ausência de robenidina e outras substâncias suscetíveis de interferir no processo, deve proceder-se à análise de uma amostra em branco de um alimento para animais (ensaio em branco).

5.1.2. Deve efetuar-se um ensaio de recuperação utilizando a amostra do ensaio em branco (ponto 5.1.1), fortificada com uma quantidade conhecida de robenidina semelhante à quantidade presente na amostra. Para obter uma fortificação a um nível de 60 mg/kg, transferir 3,0 ml de solução-mãe padrão (ponto 3.9.1) para um balão de Erlenmeyer de 250 ml. Evaporar a solução sob uma corrente de azoto até obter um volume aproximado de 0,5 ml. Adicionar 15 g de amostra para o ensaio em branco, misturar e esperar 10 minutos antes de iniciar a extração (ponto 5.2).

Nota: Para os fins do presente método, a amostra para o ensaio em branco deve ter composição semelhante à da amostra em análise e não deve acusar a presença de robenidina.

5.2. *Extração*

Pesar, com uma aproximação de 0,01 g, cerca de 15 g de amostra preparada. Transferi-la para um balão de Erlenmeyer de 250 ml e adicionar 100,0 ml de metanol acidificado (ponto 3.2). Tapar e agitar durante uma hora no agitador (ponto 4.2). Filtrar a solução num filtro de fibra de vidro (ponto 4.5) e recolher a totalidade do filtrado num balão de Erlenmeyer de 150 ml. Adicionar 7,5 g de crivo molecular (ponto 3.4), tapar e agitar durante cinco minutos. Filtrar imediatamente num filtro de fibra de vidro. Guardar esta solução para as operações de purificação (ponto 5.3).

5.3. *Purificação*

5.3.1. Preparação da coluna de óxido de alumínio

Colocar um pequeno tampão de fibra de vidro na extremidade inferior da coluna de vidro (ponto 4.1), comprimindo-o com o auxílio de uma vareta de vidro. Pesar 11,0 g de óxido de alumínio preparado de acordo com o descrito no ponto 3.5 e transferi-lo para a coluna. Devem tomar-se precauções no sentido de minimizar a exposição ao ar no decurso destas operações. Bater levemente na extremidade inferior da coluna para que o óxido de alumínio assente.

5.3.2. Purificação da amostra

Pipetar para a coluna 5,0 ml de extrato de amostra preparado de acordo com o ponto 5.2. Colocar a ponta da pipeta junto da parede da coluna e esperar que a solução seja absorvida pelo óxido de alumínio. Eluir a robenidina da coluna por recurso a 100 ml de metanol (ponto 3.1), a um caudal de 2-3 ml/minuto, recolhendo o eluato num balão de fundo redondo de 250 ml. Evaporar até à secura a solução de metanol, sob pressão reduzida, a 40 °C, com o auxílio de um evaporador rotativo (ponto 4.3). Dissolver o resíduo em 3-4 ml de fase móvel (ponto 3.8) e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 10 ml. Lavar o balão de fundo redondo com diversas porções de 1-2 ml de fase móvel, transferindo as mesmas para o balão volumétrico. Perfazer o volume com o mesmo solvente e homogeneizar. Filtrar uma alíquota com um filtro de membrana de 0,45 µm (ponto 4.7). Guardar esta solução para a análise por HPLC (ponto 5.4).

5.4. *Análise por HPLC*

5.4.1. Parâmetros

As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia líquida (ponto 4.4.1)

Fase móvel para HPLC (ponto 3.8)

Caudal: 1,5 a 2 ml/minuto

Comprimento de onda de deteção: 317 nm

Volume injetado: 20 to 50 µl

Verificar a estabilidade do sistema cromatográfico mediante a injeção repetida da solução de calibração (ponto 3.9.3), que contém 3,6 µg/ml de robenidina, até obter picos com alturas (ou áreas) e tempos de retenção reprodutíveis.

5.4.2. Curva de calibração

Injetar várias vezes cada solução de calibração (ponto 3.9.3) e medir a altura (ou área) dos picos correspondentes a cada concentração. Traçar uma curva de calibração, colocando a altura (ou área) média dos picos das soluções de calibração em ordenadas e as concentrações correspondentes, expressas em µg/ml, em abcissas.

5.4.3. Solução de amostra

Injetar várias vezes o extrato de amostra (ponto 5.3.2), utilizando o mesmo volume utilizado para as soluções de calibração, e determinar a altura (ou área) média dos picos correspondentes à robenidina.

6. **Cálculo dos resultados**

A partir da altura (ou área) média dos picos da robenidina da solução de amostra, determinar a concentração desta em µg/ml, com base na curva de calibração (ponto 5.4.2).

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

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

em que:

c = concentração de robenidina da solução de amostra, expressa em µg/ml,

m = massa, em gramas, da toma de ensaio.

7. **Validação dos resultados**

7.1. *Identidade*

A identidade do analito pode ser confirmada por cocromatografia ou por recurso a um detetor de rede de díodos, comparando os espetros do extrato de amostra e da solução de calibração (ponto 3.9.3) que contém 6 µg/ml de robenidina.

7.1.1. Cocromatografia

Fortificar um extrato de amostra com a adição de uma quantidade adequada de solução de calibração (ponto 3.9.3). A quantidade de robenidina adicionada deve ser idêntica à quantidade de robenidina presumida no extrato de amostra.

Apenas se deverá verificar um aumento da altura do pico correspondente à robenidina, atendendo à quantidade adicionada e à diluição do extrato. A largura do pico a meia altura não poderá diferir mais de 10 % da largura inicial.

7.1.2. Deteção com um detetor de rede de díodos

Os resultados são avaliados de acordo com os seguintes critérios:

a) O comprimento de onda de absorção máxima dos espetros da amostra e do padrão, registado no máximo do pico cromatográfico, deve ser o mesmo, com uma margem de variação dependente da resolução do sistema de deteção. No caso de um detetor de rede de díodos, esta margem é, em geral, de cerca de 2 nm;

b) Entre 250 e 400 nm, os espetros da amostra e do padrão, registados no máximo dos picos cromatográficos, não devem diferir entre si no que respeita às zonas do espetro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 e 100 %. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e a diferença entre ambos os espetros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do analito-padrão;

c) Entre 250 e 400 nm, os espetros na curva ascendente, no máximo e na curva descendente do pico do extrato da amostra não devem diferir entre si nas partes do espetro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e a diferença entre os espetros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do espetro no máximo do pico.

Se algum destes critérios não for satisfeito, a presença do analito não pode ser confirmada.

7.2. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder 10 % do maior dos valores, para teores de robenidina superiores a 15 mg/kg.

7.3. *Recuperação*

A taxa de recuperação de uma amostra em branco fortificada deve ser de, pelo menos, 85 %.

8. **Resultados de um estudo colaborativo**

Num estudo colaborativo da UE, procedeu-se à análise por 12 laboratórios de quatro amostras de alimentos para aves de capoeira e coelhos, sob a forma de farinha e granulado. Para cada amostra, foram efetuadas análises em duplicado. Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte:

	Aves de capoeira		Coelhos	
	Farinha	Granulado	Farinha	Granulado
Média [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66

CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Recuperação [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r= desvio-padrão da repetibilidade

CV_r= coeficiente de variação da repetibilidade (%)

S_R= desvio-padrão da reprodutibilidade

CV_R= coeficiente de variação da reprodutibilidade (%)

F. DETERMINAÇÃO DO DICLAZURIL

(+)-4-clorofenil[2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetra-hidro–3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-il)fenil]-acetonitrilo

O teor de diclazuril é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma EN 17299 –*Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em fase reversa com gradiente ternário, com um detetor de UV, tal como descrito a seguir, nos pontos 1 a 9.

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de diclazuril em alimentos compostos para animais e pré-misturas ([9]). O limite de deteção é de 0,1 mg/kg; o limite de quantificação é de 0,5 mg/kg. Limites de deteção inferiores são alcançáveis, mas devem ser validados pelo utilizador.

2. **Princípio**

Depois de adicionado um padrão interno, submete-se a amostra a uma operação de extração com metanol acidificado. No caso dos alimentos para animais, purifica-se uma alíquota do extrato num cartucho de extração com fase sólida C_{18}, elui-se o diclazuril do cartucho com uma mistura de metanol acidificado e água, evapora-se e dissolve-se o resíduo em DMF/água. No caso das pré-misturas, evapora-se o extrato e dissolve-se o resíduo em DMF/água. O teor de diclazuril é determinado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em fase reversa com gradiente ternário, com um detetor de UV.

3. **Reagentes**

3.1. Água de qualidade equivalente para HPLC.

3.2. Acetato de amónio.

3.3. Hidrogenossulfato de tetrabutilamónio (TBHS).

3.4. Acetonitrilo de qualidade equivalente para HPLC.

3.5. Metanol de qualidade equivalente para HPLC.

3.6. *N,N*-Dimetilformamida (DMF).

3.7. Ácido clorídrico, ρ_{20} = 1,19 g/ml.

3.8. Substância-padrão: diclazuril, (+)-4-clorofenil[2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetra-hidro– 3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-il)fenil]-acetonitrilo de grau de pureza garantido.

([9]) O método pode ser igualmente aplicável para a determinação do diclazuril em matérias-primas para a alimentação animal.

3.8.1. Solução-mãe padrão de diclazuril, 500 µg/ml.

Num balão volumétrico de 50 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 25 mg de diclazuril-padrão (ponto 3.8). Dissolver em DMF (ponto 3.6), completar o volume com DMF (ponto 3.6) e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar no frigorífico. A temperaturas não superiores a 4 °C, a solução mantém-se estável durante um mês ([10]).

3.8.2. Solução-padrão de diclazuril, 50 µg/ml.

Transferir 5,00 ml da solução-mãe padrão (ponto 3.8.1) para um balão volumétrico de 50 ml, completar o volume com DMF (ponto 3.6) e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar no frigorífico. A temperaturas não superiores a 4 °C, a solução mantém-se estável durante um mês.

3.9. Padrão interno: a substância utilizada é o 2,6-dicloro-α-(4-clorofenil)-4-[4,5-di-hidro– 3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-il]-α-metilbenzenoacetonitrilo (diclazuril metilo).

3.9.1. Solução-mãe de padrão interno, 500 µg/ml.

Num balão volumétrico de 50 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 25 mg de padrão interno (ponto 3.9). Dissolver em DMF (ponto 3.6), completar o volume com DMF (ponto 3.6) e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar no frigorífico. A temperaturas não superiores a 4 °C, a solução mantém-se estável durante um mês.

3.9.2. Solução de padrão interno, 50 µg/ml.

Transferir 5,00 ml da solução-mãe padrão interno (ponto 3.9.1) para um balão volumétrico de 50 ml, completar o volume com DMF (ponto 3.6) e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar no frigorífico. A temperaturas não superiores a 4 °C, a solução mantém-se estável durante um mês.

3.9.3. Solução do padrão interno para as pré-misturas, p/1 000 mg/ml (p = teor nominal, em mg/kg, de diclazuril da pré-mistura)

Num balão volumétrico de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, p/10 mg do padrão interno, dissolver em DMF (ponto 3.6) num banho de ultrassons (ponto 4.7), completar o volume com DMF e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar no frigorífico. A temperaturas não superiores a 4 °C, a solução mantém-se estável durante um mês.

3.10. Soluções de calibração

3.10.1. Solução de calibração, 1 µg/ml (diclazuril)

Pipetar 1,00 ml da solução-padrão de diclazuril (ponto 3.8.2) e 2,00 ml da solução de padrão interno (ponto 3.9.2) para um balão volumétrico de 50 ml. Adicionar 17 ml de DMF (ponto 3.6), completar o volume com água (ponto 3.1) e homogeneizar. A solução é preparada imediatamente antes da utilização.

3.10.2. Solução de calibração, 2 µg/ml (diclazuril)

Pipetar 2,00 ml da solução-padrão de diclazuril (ponto 3.8.2) e 2,00 ml da solução de padrão interno (ponto 3.9.2) para um balão volumétrico de 50 ml. Adicionar 16 ml de DMF (ponto 3.6), completar o volume com água (ponto 3.1) e homogeneizar. A solução é preparada imediatamente antes da utilização.

3.10.3. Solução de calibração, 3 µg/ml (diclazuril)

Pipetar 3,00 ml da solução-padrão de diclazuril (ponto 3.8.2) e 2,00 ml da solução de padrão interno (ponto 3.9.2) para um balão volumétrico de 50 ml. Adicionar 15 ml de DMF (ponto 3.6), completar o volume com água (ponto 3.1) e homogeneizar. A solução é preparada imediatamente antes da utilização.

([10]) Uma estabilidade mais prolongada, por um período máximo de um ano, pode ser conseguida, mas tem de ser confirmada pelo laboratório individual.

3.10.4. Solução de calibração, 4 µg/ml (diclazuril)

Pipetar 4,00 ml da solução-padrão de diclazuril (ponto 3.8.2) e 2,00 ml da solução de padrão interno (ponto 3.9.2) para um balão volumétrico de 50 ml. Adicionar 14 ml de DMF (ponto 3.6), completar o volume com água (ponto 3.1) e homogeneizar. A solução é preparada imediatamente antes da utilização.

3.10.5. Solução de calibração, 5 µg/ml (diclazuril)

Pipetar 5,00 ml da solução-padrão de diclazuril (ponto 3.8.2) e 2,00 ml da solução de padrão interno (ponto 3.9.2) para um balão volumétrico de 50 ml. Adicionar 13 ml de DMF (ponto 3.6), completar o volume com água (ponto 3.1) e homogeneizar. A solução é preparada imediatamente antes da utilização.

Nota: As soluções de calibração (pontos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) indicadas no presente protocolo cobrem concentrações de diclazuril em alimentos para animais entre 0,5 e 2,5 mg/kg.

3.11. Cartucho de extração com fase sólida C_{18}, p. ex., Mega Bond Elut; volume: 20 cm^3, massa de substância sorvente: 5 000 mg (pré-condicionamento de acordo com as orientações do fornecedor).

3.12. Solvente de extração: metanol acidificado.

Pipetar 5,0 ml de ácido clorídrico (ponto 3.7) para um recipiente com 1 000 ml de metanol (ponto 3.5) e homogeneizar.

3.13. Fase móvel para HPLC

3.13.1. Eluente A: solução de acetato de amónio e hidrogenossulfato de tetrabutilamónio.

Dissolver 5 g de acetato de amónio (ponto 3.2) e 3,4 g de TBHS (ponto 3.3) em 1 000 ml de água (ponto 3.1) e homogeneizar.

3.13.2. Eluente B: acetonitrilo (ponto 3.4).

3.13.3. Eluente C: metanol (ponto 3.5).

4. **Equipamento**

4.1. Agitador mecânico.

4.2. Equipamento para HPLC com gradiente ternário:

4.2.1. Coluna para cromatografia líquida com 100 mm x 4,6 mm e enchimento Hypersil ODS de 3 µm, ou equivalente.

4.2.2. Detetor de UV com comprimento de onda regulável ou detetor de rede de díodos.

4.3. Evaporador rotativo.

4.4. Filtros de membrana (p. ex., *nylon* com resistência química), porosidade 0,45 µm.

4.5. Seringas não reutilizáveis, 5 ml.

4.6. Sistema de vácuo.

4.7. Banho de ultrassons.

5. **Procedimento**

5.1. *Generalidades*

5.1.1. Amostra de alimento para animais para o ensaio em branco

De modo a comprovar a ausência de diclazuril e outras substâncias suscetíveis de interferir no processo, deve proceder-se à análise de uma amostra em branco de um alimento para animais (ensaio em branco). Essa amostra em branco deve ser de tipo similar ao da amostra em análise e não devem ser detetados diclazuril nem substâncias suscetíveis de interferir no processo.

5.1.2. Ensaio de recuperação

Deve efetuar-se um ensaio de recuperação utilizando a amostra do ensaio em branco, fortificada com uma quantidade conhecida de diclazuril semelhante à quantidade presente na amostra. Para obter uma fortificação a um nível de 1 mg/kg, adicionar 0,1 ml da solução-mãe padrão (ponto 3.8.1) a 50 g da amostra para o ensaio em branco, homogeneizar e deixar em repouso durante 10 minutos, misturando de novo várias vezes antes de prosseguir (ponto 5.2).

Caso não se disponha de um alimento para animais para o ensaio em branco de tipo similar ao da amostra (ver ponto 5.1.1), pode determinar-se a recuperação pelo método da adição de padrão. Nesse caso, adiciona-se à amostra a analisar uma quantidade de diclazuril semelhante à que já se encontra presente e analisa-se a amostra assim obtida juntamente com a amostra sem adição. A recuperação é calculada por subtração.

5.2. *Extração*

5.2.1. Alimentos compostos para animais

Pesar, com uma aproximação de 0,01 g, cerca de 50 g de amostra. Transferir a quantidade pesada para um balão de Erlenmeyer de 500 ml, adicionar 1,00 ml da solução de padrão interno (ponto 3.9.2) e 200 ml do solvente de extração (ponto 3.12) e tapar. Colocar o balão de Erlenmeyer no agitador (ponto 4.1) e deixar a agitar durante a noite. Deixar assentar durante 10 minutos. Transferir uma alíquota de 20 ml do líquido sobrenadante para um recipiente de vidro adequado e diluir com 20 ml de água (ponto 3.1). Verter esta solução num cartucho de extração (ponto 3.11) e forçar a passagem por aplicação de vácuo (ponto 4.6). Lavar o cartucho com 25 ml de uma mistura 65 + 35 (V + V) de solvente de extração (ponto 3.12) e água (ponto 3.1). Rejeitar as frações recolhidas e eluir os compostos retidos com 25 ml de uma mistura 80 + 20 (V + V) de solvente de extração (ponto 3.12) e água. Evaporar esta fração a 60 °C num evaporador rotativo (ponto 4.3), suspendendo a operação logo que seja atingida a secura. Dissolver o resíduo em 1,0 ml de DMF (ponto 3.6), adicionar 1,5 ml de água (ponto 3.1) e homogeneizar. Filtrar por um filtro de membrana (ponto 4.4) montado numa seringa não reutilizável (ponto 4.5). Efetuar em seguida a análise por HPLC (ponto 5.3).

5.2.2. Pré-misturas

Pesar, com uma aproximação de 0.001 g, cerca de 1 g de amostra. Transferir a quantidade pesada para um balão de Erlenmeyer de 500 ml, adicionar 1,00 ml da solução de padrão interno (ponto 3.9.3) e 200 ml do solvente de extração (ponto 3.12) e tapar. Colocar o balão de Erlenmeyer no agitador (ponto 4.1) e deixar a agitar durante a noite. Deixar assentar durante 10 minutos. Transferir uma alíquota de 10 000/p ml (p = teor nominal, em mg/kg, de diclazuril na pré-mistura) do líquido sobrenadante para um balão de vidro de fundo redondo de volume adequado. Evaporar a 60 °C, sob pressão reduzida, num evaporador rotativo (ponto 4.3), suspendendo a operação logo que seja atingida a secura. Redissolver o resíduo em 10,0 ml de DMF (ponto 3.6), adicionar 15,0 ml de água (ponto 3.1) e homogeneizar. Efetuar em seguida a análise por HPLC (ponto 5.3).

5.3. *Análise por HPLC*

5.3.1. Parâmetros

As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes ou melhores.

— Coluna para cromatografia líquida (ponto 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm e enchimento Hypersil ODS de 3 µm, ou equivalente

— Fase móvel:

  — Eluente A (ponto 3.13.1): solução aquosa de acetato de amónio e hidrogenossulfato de tetrabutilamónio

  — Eluente B (ponto 3.13.2): acetonitrilo

  — Eluente C (ponto 3.13.3): metanol

— Modo de eluição – gradiente linear

  — condições iniciais: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)

  — após 10 minutos, aplicação de um gradiente de eluição por forma a atingir A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V) ao fim de 30 minutos

  — De seguida, efetuar uma lavagem com B durante 10 minutos

— Caudal: 1,5-2 ml/minuto

— Volume injetado: 20 µl

— Comprimento de onda de deteção: 280 nm

Para verificar a estabilidade do sistema cromatográfico, injetar várias vezes a solução de calibração (ponto 3.10.2) com 2 µg/ml de diclazuril e de padrão interno até se obterem alturas de pico e tempos de retenção constantes.

5.3.2. Análise cromatográfica das soluções de calibração

Injetar 20 µl das soluções de calibração (pontos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5), duas vezes cada, identificar e integrar os picos do diclazuril e do padrão interno, e traçar a curva de calibração com base na razão entre a altura ou área média do pico correspondente ao diclazuril e a altura ou área média do pico correspondente ao padrão interno contra a concentração de diclazuril nas soluções de calibração (µg/ml).

5.3.3. Análise cromatográfica das soluções de calibração

Injetar duas vezes 20 µl da solução da amostra (ponto 5.2.1 ou 5.2.2) e determinar a altura ou área média dos picos do diclazuril e do padrão interno.

6. **Cálculo dos resultados**

6.1. *Alimentos compostos para animais*

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

$$w = \frac{\frac{Altura(d,s)}{Altura(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ ou} w = \frac{\frac{Área(d,s)}{Área(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

em que:

— altura(d,s) = altura do pico do diclazuril da solução de amostra (ponto 5.2.1),

— área(d,s) = área do pico do diclazuril da solução de amostra (ponto 5.2.1),

— altura(i,s) = altura do pico do padrão interno da solução de amostra (ponto 5.2.1),

— área(i,s) = área do pico do padrão interno da solução de amostra (ponto 5.2.1),

— b = ordenada na origem da curva de calibração em função das soluções de calibração (pontos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) em conformidade com o ponto 5.3.2

— a = declive da curva de calibração em função das soluções de calibração (pontos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) em conformidade com o ponto 5.3.2,

— m = massa, em gramas, da toma de ensaio,

— V = volume, em ml, do extrato de amostra, de acordo com o ponto 5.2.1 (ou seja, 2,5 ml).

6.2. *Pré-misturas*

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

$$w = \frac{\frac{Altura(d,s)}{Altura(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times \text{p ou} w = \frac{\frac{Área(d,s)}{Área(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times \text{p}$$

em que:

— altura(d,s) = altura do pico do diclazuril da solução de amostra (ponto 5.2.2),

— área(d,s) = área do pico do diclazuril da solução de amostra (ponto 5.2.2),

— altura(i,s) = altura do pico do padrão interno da solução de amostra (ponto 5.2.2),

— área(i,s) = área do pico do padrão interno da solução de amostra (ponto 5.2.2),

— b = ordenada na origem da curva de calibração em função das soluções de calibração (pontos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) em conformidade com o ponto 5.3.2,

— a = declive da curva de calibração em função das soluções de calibração (pontos 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) em conformidade com o ponto 5.3.2,

— m = massa, em gramas, da toma de ensaio,

— V = volume, em ml, do extrato de amostra, de acordo com o ponto 5.2.2 (ou seja, 25 ml).

— p = teor nominal, em mg/kg, de diclazuril na pré-mistura.

7. **Validação dos resultados**

7.1. *Identidade*

A identidade do analito pode ser confirmada por cocromatografia ou com um detetor de rede de díodos que permita comparar os espetros do extrato de amostra (pontos 5.2.1 ou 5.2.2) e da solução de calibração (ponto 3.10.2).

7.1.1. Cocromatografia

Fortificar um extrato de amostra (ponto 5.2.1 ou 5.2.2) com a adição de uma quantidade adequada de solução de calibração (ponto 3.10.2). A quantidade de diclazuril adicionada deve ser semelhante à existente no extrato de amostra.

Apenas se deverá verificar um aumento da altura dos picos correspondentes ao diclazuril e ao padrão interno, atendendo à quantidade adicionada e à diluição do extrato. A largura desses picos a meia altura não poderá diferir mais de 10 % da largura inicial do pico do diclazuril e do pico do padrão interno, respetivamente, do extrato de amostra não fortificado.

7.1.2. Deteção com um detetor de rede de díodos

Os resultados são avaliados de acordo com os seguintes critérios:

a) O comprimento de onda de absorção máxima dos espetros da amostra e do padrão, registado no máximo do pico cromatográfico, deve ser o mesmo, com uma margem de variação dependente da resolução do sistema de deteção. No caso de um detetor de rede de díodos, essa margem é, em geral, de ± 2 nm;

b) Entre 230 e 320 nm, os espetros da amostra e do padrão, registados no máximo dos picos cromatográficos, não devem diferir entre si no que respeita às zonas do espetro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e a diferença entre ambos os espetros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do analito-padrão;

c) Entre 230 e 320 nm, os espetros na curva ascendente, no máximo e na curva descendente do pico do extrato da amostra não devem diferir entre si nas partes do espetro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e a diferença entre os espetros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do espetro no máximo do pico.

Se algum destes critérios não for satisfeito, a presença do analito não pode ser confirmada.

7.2. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações independentes efetuadas com duas subamostras não deve exceder:

— 30 % do maior dos valores, para teores de diclazuril entre 0,5 mg/kg e 2,5 mg/kg,

— 0,75 mg/kg, para teores de diclazuril compreendidos entre 2,5 mg/kg e 5 mg/kg,

— 15 % do maior dos valores, para teores de diclazuril superiores a 5 mg/kg.

7.3. *Recuperação*

Utilizando uma amostra (em branco) fortificada, a recuperação deve ser, pelo menos, de 80 %.

8. **Resultados de um estudo colaborativo**

Foram realizados dois estudos colaborativos. No primeiro, realizado por outro grupo de laboratórios em 1994, foram analisadas duas amostras de pré-misturas (O 100 e A 100) e três amostras de alimentos complementares para aves de capoeira (L1, Z1 e K1). Uma pré-mistura foi misturada com uma matriz orgânica (O 100) e a outra com uma matriz inorgânica (A 100), com teores teóricos de diclazuril de 100 mg/kg. Os laboratórios receberam instruções para analisarem cada amostra uma vez ou em duplicado (no *Journal of AOAC International*, vol. 77, n.º 6, 1994, p. 1359, podem ser encontrados elementos mais pormenorizados sobre o primeiro estudo colaborativo realizado).

No segundo estudo colaborativo, foram analisados três alimentos compostos para aves de capoeira, com concentrações de diclazuril de 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) e uma amostra de alimento para animais para o ensaio em branco (MAT 3) (no relatório técnico do JRC, de 2016, e no *Journal of AOAC International*, vol. 102, n.º 2, 2019, p. 646, podem ser encontrados elementos mais pormenorizados sobre o segundo estudo interlaboratorial realizado). Os resultados dos dois estudos colaborativos são apresentados no quadro seguinte:

	Amostra 1A 100	Amostra 2O 100	Amostra 3 L1	Amostra 4 Z1	Amostra 5 K1	Amostra 6 MAT 1	Amostra 7 MAT 2	Amostra 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Média (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ
S_r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV_r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S_R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV_R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Teor nominal (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Referência (*)	Primeiro estudo de 1 994	Primeiro estudo de 1 994	Primeiro estudo de 1 994	Primeiro estudo de 1 994	Primeiro estudo de 1 994	Segundo estudo de 2 015	Segundo estudo de 2 015	Segundo estudo de 2 015

L = número de laboratórios

n = número de valores individuais

S_r = desvio-padrão da repetibilidade

CV_r = coeficiente de variação da repetibilidade

S_R = desvio-padrão da reprodutibilidade

CV_R = coeficiente de variação da reprodutibilidade

LOQ = limite de quantificação

(*) Primeiro estudo de 1994: *Journal of AOAC International*, vol. 77, n.º 6, 1994, p. 1359; Segundo estudo de 2015: Relatório técnico do JRC, *Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study*, 2016.

9. **Observações gerais**

É necessário comprovar previamente a linearidade da resposta do diclazuril em toda a gama de concentrações objeto das determinações.

Pelo menos para a análise do diclazuril em alimentos compostos para animais com elevado teor de matérias gordas (para efeitos do presente método, que excedam 12 % de matérias gordas), o método analítico pode ser substituído por outro método baseado em HPLC, p. ex., um método baseado em cromatografia líquida de alta resolução associada a espetrometria de massa (HPLC-MS), desde que esse método alternativo apresente características de desempenho equivalentes (taxa de recuperação, precisão nas condições de repetibilidade e reprodutibilidade).

G. DETERMINAÇÃO DA LASALOCIDA DE SÓDIO

Sal sódico de um ácido monocarboxílico polieterificado produzido por Streptomyces lasaliensis

O teor de lasalocida de sódio é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma EN 17299 –*Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em fase reversa com um detetor espetrofluorimétrico (de fluorescência), tal como descrito a seguir, nos pontos 1 a 8.

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método permite determinar o teor de lasalocida de sódio em alimentos para animais. O limite de deteção é de 5 mg/kg; o limite de quantificação é de 10 mg/kg.

2. **Princípio**

A lasalocida de sódio é extraída da amostra com metanol acidificado e determinada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em fase reversa, com um detetor espetrofluorimétrico (de fluorescência).

3. **Reagentes**

3.1. Di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4).

3.2. Ácido ortofosfórico, w (m/m) = 85 %.

3.3. Solução de ácido ortofosfórico, c = 20 %.

Diluir 23,5 ml de ácido ortofosfórico (ponto 3.2) para 100 ml, com água.

3.4. 6-Metil-2-heptilamina (1,5-dimetil-hexilamina), w (m/m) = 99 %.

3.5. Metanol de qualidade equivalente para HPLC.

3.6. Ácido clorídrico, densidade = 1,19 g/ml.

3.7. Solução de tampão fosfato, c = 0,01 mol/l

Dissolver 1,36 g de KH_2PO_4 (ponto 3.1) em 500 ml de água (ponto 3.11); adicionar 3,5 ml de ácido ortofosfórico (ponto 3.2) e 10,0 ml de 6-metil-2-heptilamina (ponto 3.4). Ajustar o pH a 4,0 com solução de ácido ortofosfórico (ponto 3.3) e diluir para 1 000 ml com água (ponto 3.11).

3.8. Metanol acidificado

Transferir 5,0 ml de ácido clorídrico (ponto 3.6) para um balão volumétrico de 1 000 ml, perfazer o volume com metanol (ponto 3.5) e homogeneizar. A solução é preparada imediatamente antes da utilização.

3.9. Fase móvel para HPLC: solução de tampão fosfato-metanol 5 + 95 (V + V)

Misturar 5 ml de solução de tampão fosfato (ponto 3.7) com 95 ml de metanol (ponto 3.5).

3.10. Lasalocida de sódio-padrão de pureza garantida, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (sal sódico de um ácido monocarboxílico polieterificado produzido por *Streptomyces lasaliensis*), E 763.

3.10.1. Solução-mãe padrão de lasalocida de sódio, 500 µg/ml

Num balão volumétrico de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 50 mg de lasalocida de sódio (ponto 3.10) e dissolver em metanol acidificado (ponto 3.8). Completar o volume com o mesmo solvente e homogeneizar. A solução tem de ser preparada imediatamente antes da utilização.

3.10.2. Solução-padrão intermédia de lasalocida de sódio, 50 µg/ml

Pipetar 10,0 ml da solução-mãe padrão (ponto 3.10.1) para um balão volumétrico de 100 ml, completar o volume com metanol acidificado (ponto 3.8) e homogeneizar. A solução é preparada imediatamente antes da utilização.

3.10.3. Soluções de calibração

Transferir 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 e 10,0 ml da solução-padrão intermédia (ponto 3.10.2) para uma série de balões volumétricos de 50 ml. Perfazer o volume com metanol acidificado (ponto 3.8) e homogeneizar. As soluções obtidas contêm 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 e 10,0 µg de lasalocida de sódio por ml, respetivamente, e têm de ser preparadas imediatamente antes da utilização.

3.11. Água de qualidade equivalente para HPLC.

4. **Equipamento**

4.1. Banho de ultrassons (ou banho de água com agitação) com temperatura regulável.

4.2. Filtros de membrana, porosidade 0,45 µm.

4.3. Aparelho para HPLC com sistema de injeção com capacidade de injeção de volumes de 20 µl.

4.3.1. Coluna para cromatografia líquida em fase reversa com 125 mm × 4 mm e enchimento C_{18} de 5 µm, ou equivalente.

4.3.2. Espetrofluorímetro com comprimentos de onda de emissão e de excitação reguláveis.

5. **Procedimento**

5.1. *Generalidades*

5.1.1. Amostra de alimento para animais para o ensaio em branco

Para a realização do ensaio de recuperação (ponto 5.1.2) analisa-se uma amostra em branco de um alimento para animais para comprovar a ausência de lasalocida de sódio e de substâncias suscetíveis de interferir no processo. Essa amostra em branco deve ser de tipo similar ao da amostra em análise e não devem ser detetadas lasalocida de sódio nem substâncias suscetíveis de interferir no processo.

5.1.2. Ensaio de recuperação

Deve efetuar-se um ensaio de recuperação utilizando a amostra do ensaio em branco, fortificada com uma quantidade conhecida de lasalocida de sódio semelhante à quantidade presente na amostra. Para obter uma fortificação a um nível de 100 mg/kg, adicionar 10,0 ml de solução-mãe padrão (ponto 3.10.1) a um balão de Erlenmeyer de 250 ml e concentrar por evaporação até cerca de 0,5 ml. De seguida, adicionar 50 g de alimento para animais em branco, homogeneizar e esperar 10 minutos, misturando de novo várias vezes antes de proceder à extração (ponto 5.2).

Caso não se disponha de um alimento para animais para o ensaio em branco de tipo similar ao da amostra (ver ponto 5.1.1), pode determinar-se a recuperação pelo método da adição de padrão. Nesse caso, adiciona-se à amostra a analisar uma quantidade de lasalocida de sódio semelhante à que já se encontra presente e analisa-se a amostra assim obtida juntamente com a amostra sem adição. A recuperação é calculada por subtração.

5.2. *Extração*

5.2.1. Alimentos para animais

Num balão de Erlenmeyer de 250 ml, pesar, com uma aproximação de 0,01 g, 5 a 10 g de amostra. Com uma pipeta, adicionar 100,0 ml de metanol acidificado (ponto 3.8), homogeneizando por agitação. Colocar no banho de ultrassons (ponto 4.1) a cerca de 40 °C, durante 20 minutos. Retirar o Erlenmeyer do banho e arrefecer à temperatura ambiente. Deixar repousar durante cerca de uma hora, até à deposição das matérias em suspensão, e filtrar uma alíquota com um filtro de membrana de 0,45 µm (ponto 4.2) para um recipiente adequado. Efetuar em seguida a análise por HPLC (ponto 5.3).

5.2.2. Pré-misturas

Num balão de Erlenmeyer de 250 ml, pesar, com uma aproximação de 0,001 g, cerca de 2 g da pré-mistura não moída. Adicionar 100,0 ml de metanol acidificado (ponto 3.8), homogeneizando por agitação. Colocar no banho de ultrassons (ponto 4.1) a cerca de 40 °C, durante 20 minutos. Retirar o Erlenmeyer do banho e arrefecer à temperatura ambiente. Diluir até ao traço com metanol acidificado (ponto 3.8) e homogeneizar. Deixar repousar durante cerca de uma hora, até à deposição das matérias em suspensão, e filtrar uma alíquota com um filtro de membrana de 0,45 µm (ponto 4.2). Diluir um volume adequado do filtrado clarificado com metanol acidificado (ponto 3.8), de modo a obter uma solução de ensaio com cerca de 4 µg/ml de lasalocida de sódio. Efetuar em seguida a análise por HPLC (ponto 5.3).

5.3. *Análise por HPLC*

5.3.1. Parâmetros

As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia líquida em fase reversa com 125 mm × 4 mm (ponto 4.3.1):	enchimento C_{18} de 5 µm, ou equivalente
Fase móvel (ponto 3.9):	mistura de solução de tampão fosfato (ponto 3.7) com metanol (ponto 3.5) 5 + 95 (V + V)
Caudal:	1,2 ml/min
Comprimentos de onda de deteção:	Excitação: 310 nm
	Emissão: 419 nm
Volume injetado:	20 µl

Para verificar a estabilidade do sistema cromatográfico, injetar várias vezes a solução de calibração (ponto 3.10.3) com 4,0 µg/ml até se obterem alturas (ou áreas) de pico e tempos de retenção constantes.

5.3.2. Curva de calibração

Injetar várias vezes cada solução de calibração (ponto 3.10.3) e determinar a altura ou área média dos picos para cada concentração. Traçar uma curva de calibração, colocando a altura (ou área) média dos picos das soluções de calibração em ordenadas e as concentrações correspondentes, expressas em µg/ml, em abcissas.

5.3.3. Solução de amostra

Injetar várias vezes volumes dos extratos de amostra obtidos nos pontos 5.2.1 e 5.2.2, idênticos ao volume utilizado para as soluções de calibração e determinar a altura ou a área média dos picos de lasalocida de sódio.

6. **Cálculo dos resultados**

A partir da altura ou área média dos picos obtidos por injeção da solução da amostra (ponto 5.3.3), determinar a concentração de lasalocida de sódio em µg/ml com base na curva de calibração.

6.1. *Alimentos para animais*

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

$$w = \frac{c \times V_1}{m} [mg/kg]$$

em que:

c = concentração de lasalocida de sódio, em µg/ml, do extrato da amostra (ponto 5.2.1),

V_1 = volume, em ml, do extrato, de acordo com o ponto 5.2.1 (isto é, 100 ml),

m = massa, em g, da toma de ensaio.

6.2. *Pré-misturas*

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

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} [mg/kg]$$

em que:

c = concentração de lasalocida de sódio, em µg/ml, do extrato da amostra (ponto 5.2.2),

V_2 = volume, em ml, do extrato, de acordo com o ponto 5.2.2 (isto é, 250 ml),

f = fator de diluição, de acordo com o ponto 5.2.2,

m = massa, em g, da toma de ensaio.

7. **Validação dos resultados**

7.1. *Identidade*

Os métodos baseados na espetrofluorimetria estão menos sujeitos a interferências que os métodos que utilizam um detetor de UV. A identidade do analito pode ser confirmada por cocromatografia.

7.1.1. Cocromatografia

Fortificar um extrato de amostra (ponto 5.2.1 ou 5.2.2) com a adição de uma quantidade adequada de solução de calibração (ponto 3.10.3). A quantidade de lasalocida de sódio adicionada deve ser semelhante à existente no extrato da amostra. Apenas se deverá verificar um aumento da altura do pico correspondente à lasalocida de sódio, atendendo à quantidade adicionada e à diluição do extrato. A largura do pico a meia altura não poderá diferir mais de 10 % da largura inicial do pico da lasalocida de sódio do extrato da amostra não fortificado.

7.2. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder:

— 15 % do maior dos valores, para teores de lasalocida de sódio entre 30 mg/kg e 100 mg/kg,

— 15 mg/kg, para teores de lasalocida de sódio entre 100 mg/kg e 200 mg/kg,

— 7,5 % do maior dos valores, para teores de lasalocida de sódio superiores a 200 mg/kg.

7.3. *Recuperação*

Utilizando uma amostra (em branco) fortificada, a recuperação deve ser pelo menos de 80 %. No respeitante às amostras de pré-misturas fortificadas, a recuperação deve ser pelo menos de 90 %.

8. **Resultados de um estudo colaborativo**

Apresentam-se no quadro seguinte os resultados das análises efetuadas a duas pré-misturas (amostras 1 e 2) e cinco alimentos para animais (amostras 3 a 7) no âmbito de um estudo colaborativo (*) com 12 laboratórios. Para cada amostra, foram efetuadas análises em duplicado. Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte:

	Amostra 1 Pré-mistura para frangos	Amostra 2 Pré-mistura para perus	Amostra 3 Granulado para perus	Amostra 4 Farelos para frangos	Amostra 5 Alimento para perus	Amostra 6 Alimento para aves de capoeira A	Amostra 7 Alimento para aves de capoeira B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Média [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6

s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Teor nominal [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

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 da repetibilidade (%)

CV_R= coeficiente de variação da reprodutibilidade (%)

(*) *Analyst*, vol. 120, 1995, p. 2175.

(**) Teor declarado pelo fabricante.

(+) Alimento preparado no laboratório.

H. DETERMINAÇÃO DO CLORIDRATO DE AMPRÓLIO

cloreto de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridínio, monocloridrato

1. **Objeto e âmbito de aplicação**

Este método destina-se à determinação de amprólio em alimentos para animais. O limite de deteção é de 1 mg/kg; o limite de quantificação é de 5 mg/kg.

2. **Princípio**

A amostra é extraída com uma mistura metanol-água. A amostra é de seguida diluída com a fase móvel, e depois filtrada com um filtro de membrana. A determinação do teor de amprólio é efetuada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de permuta catiónica, com um detetor de UV.

3. **Reagentes**

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitrilo de qualidade equivalente para HPLC.

3.3. Água de qualidade equivalente para HPLC.

3.4. Solução de di-hidrogenofosfato de sódio, c = 0,1 mol/l

Num balão volumétrico de 1 000 ml, dissolver em água (ponto 3.3) 13,80 g de di-hidrogenofosfato de sódio mono-hidratado, completar o volume com água (ponto 3.3) e homogeneizar.

3.5. Solução de perclorato de sódio, c = 1,6 mol/l

Num balão volumétrico de 1 000 ml, dissolver em água (ponto 3.3) 224,74 g de perclorato de sódio mono--hidratado, completar o volume com água (ponto 3.3) e homogeneizar.

3.6. Fase móvel para HPLC (ver observação no ponto 9.1)

Mistura 450 + 450 + 100 (v + v + v) de acetonitrilo (ponto 3.2), solução de di-hidrogenofosfato de sódio (ponto 3.4) e solução de perclorato de sódio (ponto 3.5). Antes de utilizar a fase móvel, filtrar por um filtro de membrana de 0,22 µm (ponto 4.3) e desgaseificar a solução [p. ex., num banho de ultrassons (ponto 4.4) durante pelo menos 15 minutos].

3.7. Substância-padrão: amprólio puro, cloreto de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridínio, E 750 (ver ponto 9.2).

3.7.1. Solução-mãe padrão de amprólio, 500 µg/ml

Num balão volumétrico de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 50 mg de amprólio (ponto 3.7) e dissolver em 80 ml de metanol (ponto 3.1), colocando depois o balão durante 10 minutos no banho de ultrassons (ponto 4.4). Depois do tratamento por ultrassons, levar a solução à temperatura ambiente, perfazer o volume com água e homogeneizar. A temperaturas não superiores a 4 °C, a solução mantém-se estável durante um mês.

3.7.2. Solução-padrão intermédia de amprólio, 50 µg/ml

Pipetar 5,0 ml da solução-mãe padrão (ponto 3.7.1) para um balão volumétrico de 50 ml, completar o volume com solvente de extração (ponto 3.8) e homogeneizar. A temperaturas não superiores a 4 °C, a solução mantém-se estável durante um mês.

3.7.3. Soluções de calibração

Transferir 0,5, 1,0 e 2,0 ml da solução-padrão intermédia (ponto 3.7.2) para uma série de balões volumétricos de 50 ml. Perfazer o volume com fase móvel (ponto 3.6) e homogeneizar. As soluções obtidas contêm 0,5, 1,0, e 2,0 µg de amprólio por ml, respetivamente, e têm de ser preparadas imediatamente antes da utilização.

3.8. Solvente de extração

Mistura 2 + 1 (v + v) de metanol (ponto 3.1) e água.

4. **Equipamento**

4.1. Aparelho para HPLC com sistema de injeção, com capacidade para injeção de volumes de 100 µl

4.1.1. Coluna para cromatografia líquida com 125 mm × 4 mm e enchimento de permuta catiónica Nucleosil 10 SA de 5 ou 10 µm, ou equivalente.

4.1.2. Detetor de UV com comprimento de onda regulável ou detetor de rede de díodos.

4.2. Filtro de membrana de PTFE, porosidade 0,45 µm.

4.3. Filtro de membrana, porosidade 0,22 µm.

4.4. Banho de ultrassons.

4.5. Agitador mecânico ou magnético.

5. **Procedimento**

5.1. *Generalidades*

5.1.1. Amostra de alimento para animais para o ensaio em branco

Para a realização do ensaio de recuperação (ponto 5.1.2), analisa-se uma amostra em branco de um alimento para animais, para comprovar a ausência de amprólio e de substâncias suscetíveis de interferir no processo. Essa amostra em branco deve ser de tipo similar ao da amostra em análise e não devem ser detetados amprólio nem substâncias suscetíveis de interferir no processo.

5.1.2. Ensaio de recuperação

Deve efetuar-se um ensaio de recuperação utilizando a amostra do ensaio em branco, fortificada com uma quantidade conhecida de amprólio semelhante à quantidade presente na amostra. Para obter uma fortificação a um nível de 100 mg/kg, adicionar 10,0 ml de solução-mãe padrão (ponto 3.7.1) a um balão de Erlenmeyer de 250 ml e concentrar por evaporação até cerca de 0,5 ml. De seguida, adicionar 50 g de alimento para animais em branco, homogeneizar e esperar 10 minutos, misturando de novo várias vezes antes de proceder à extração (ponto 5.2).

Caso não se disponha de um alimento para animais para o ensaio em branco de tipo similar ao da amostra (ver ponto 5.1.1), pode determinar-se a recuperação pelo método da adição de padrão. Nesse caso, adiciona-se à amostra a analisar uma quantidade de amprólio semelhante à que já se encontra presente na amostra. A amostra assim obtida é analisada juntamente como a amostra não fortificada e a recuperação é calculada por subtração.

5.2. *Extração*

5.2.1. Pré-misturas (teor de amprólio < 1 %) e alimentos para animais

Num balão de Erlenmeyer de 500 ml, pesar, com uma aproximação de 0,01 g, 5 a 40 g da amostra, em função do teor de amprólio, e adicionar 200 ml do solvente de extração (ponto 3.8). Colocar o Erlenmeyer no banho de ultrassons (ponto 4.4) e deixar atuar durante 15 minutos. Retirar o Erlenmeyer do banho e agitar durante uma hora em agitador mecânico ou magnético (ponto 4.5). Tomar uma alíquota do extrato e diluir com a fase móvel (ponto 3.6), de modo a obter um teor de amprólio de 0,5 a 2 µg/ml, e homogeneizar (ver observação no ponto 9.3). Filtrar 5 a 10 ml desta solução diluída por um filtro de membrana (ponto 4.2). Efetuar em seguida a análise por HPLC (ponto 5.3).

5.2.2. Pré-misturas (teor de amprólio ≥ 1 %)

Num Erlenmeyer de 500 ml, pesar, com uma aproximação de 0,001 g, 1 a 4 g da pré-mistura, em função do teor de amprólio, e adicionar 200 ml do solvente de extração (ponto 3.8). Colocar o Erlenmeyer no banho de ultrassons (ponto 4.4) e deixar atuar durante 15 minutos. Retirar o Erlenmeyer do banho e agitar durante uma hora em agitador mecânico ou magnético (ponto 4.5). Tomar uma alíquota do extrato e diluí-la com a fase móvel (ponto 3.6), de modo a obter um teor de amprólio de 0,5 a 2 µg/ml, e homogeneizar. Filtrar 5 a 10 ml desta solução diluída por um filtro de membrana (ponto 4.2). Efetuar em seguida a análise por HPLC (ponto 5.3).

5.3. *Análise por HPLC*

5.3.1. Parâmetros:

As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia líquida (ponto 4.1.1):	125 mm × 4 mm e enchimento de permuta catiónica Nucleosil 10 SA de 5 ou 10 µm, ou equivalente
Fase móvel (ponto 3.6):	Mistura 450 + 450 + 100 (v + v + v) de acetonitrilo (ponto 3.2), solução de di-hidrogenofosfato de sódio (ponto 3.4) e solução de perclorato de sódio (ponto 3.5).
Caudal:	0,7-1 ml/minuto
Comprimento de onda de deteção:	264 nm
Volume injetado:	100 µl

Para verificar a estabilidade do sistema cromatográfico, injetar várias vezes a solução de calibração (ponto 3.7.3) com 1,0 µg/ml até se obterem alturas de pico e tempos de retenção constantes.

5.3.2. Curva de calibração

Injetar várias vezes cada solução de calibração (ponto 3.7.3) e determinar a altura ou área média dos picos para cada concentração. Traçar uma curva de calibração, colocando a altura (ou área) média dos picos das soluções de calibração em ordenadas e as concentrações correspondentes, expressas em µg/ml, em abcissas.

5.3.3. Solução de amostra

Injetar várias vezes um volume de extrato de amostra (ponto 5.2) idêntico ao utilizado para as soluções de calibração e determinar a altura (ou área) média dos picos de amprólio.

6. **Cálculo dos resultados**

A partir da altura (ou área) média dos picos de amprólio da solução de amostra, determinar a concentração desta em µg/ml com base na curva de calibração (ponto 5.3.2).

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

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [mg/kg]$$

em que:

V = volume, em ml, do solvente de extração (ponto 3.8), de acordo com o ponto 5.2 (isto é, 200 ml),

c = concentração de amprólio, em µg/ml, do extrato de amostra (ponto 5.2),

f = fator de diluição, de acordo com o ponto 5.2,

m = massa, em g, da toma de ensaio.

7. **Validação dos resultados**

7.1. *Identidade*

A identidade do analito pode ser confirmada por cocromatografia ou com um detetor de rede de díodos que permita comparar os espetros do extrato de amostra (ponto 5.2) e da solução de calibração (ponto 3.7.3) com 2,0 µg/ml.

7.1.1. Cocromatografia

Fortificar um extrato de amostra (ponto 5.2) com a adição de uma quantidade adequada de solução de calibração (ponto 3.7.3). A quantidade de amprólio adicionada deve ser semelhante à existente no extrato de amostra.

Apenas se deverá verificar um aumento da altura do pico correspondente ao amprólio, atendendo à quantidade adicionada e à diluição do extrato. A largura do pico a meia altura não poderá diferir mais de 10 % da largura inicial do pico de amprólio do extrato de amostra não fortificado.

7.1.2. Deteção com um detetor de rede de díodos

Os resultados são avaliados de acordo com os seguintes critérios:

a) O comprimento de onda de absorção máxima dos espetros da amostra e do padrão, registado no máximo do pico cromatográfico, deve ser o mesmo, com uma margem de variação dependente da resolução do sistema de deteção. No caso de um detetor de rede de díodos, essa margem é, em geral, de ± 2 nm;

b) Entre 210 e 320 nm, os espetros da amostra e do padrão, registados no máximo dos picos cromatográficos, não devem diferir entre si no que respeita às zonas do espetro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e a diferença entre ambos os espetros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do analito-padrão;

c) Entre 210 e 320 nm, os espetros na curva ascendente, no máximo e na curva descendente do pico do extrato da amostra não devem diferir entre si nas partes do espetro que apresentem uma absorvância relativa compreendida entre 10 % e 100 %. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e a diferença entre os espetros não exceder, em caso algum, 15 % da absorvância do espetro no máximo do pico.

Se algum destes critérios não for satisfeito, a presença do analito não pode ser confirmada.

7.2. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efetuadas com a mesma amostra não deve exceder:

— 15 % do maior dos valores, para teores de amprólio entre 25 mg/kg e 500 mg/kg,

— 75 mg/kg, para teores de amprólio compreendidos entre 500 mg/kg e 1 000 mg/kg,

— 7,5 % do maior dos valores, para teores de amprólio superiores a 1 000 mg/kg.

7.3. *Recuperação*

Utilizando uma amostra (em branco) fortificada, a recuperação deve ser, pelo menos, de 90 %.

8. **Resultados de um estudo colaborativo**

No âmbito de um estudo colaborativo, analisaram-se três alimentos para aves de capoeira (amostras 1 a 3), um suplemento mineral (amostra 4) e uma pré-mistura (amostra 5). Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte:

	Amostra 1 (amostra em branco)	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
média [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CVr [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
teor nominal [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: número de laboratórios

n: número de valores individuais

s_r: desvio-padrão da repetibilidade

CV_r: coeficiente de variação da repetibilidade

s_R: desvio-padrão da reprodutibilidade

CV_R: coeficiente de variação da reprodutibilidade

9. **Observações**

9.1. Se a amostra contiver tiamina, o pico da tiamina aparecerá no cromatograma imediatamente antes do pico do amprólio. Como o presente método exige a separação do amprólio da tiamina, se a coluna utilizada (ponto 4.1.1) não efetuar essa separação, substituir, na fase móvel (ponto 3.6) até 50 % do acetonitrilo por metanol.

9.2. De acordo com a *British Pharmacopoeia*, o espetro de uma solução de amprólio (c = 0,02 mol/l) em ácido clorídrico (c = 0,1 mol/l) apresenta máximos a 246 nm e 262 nm. As absorvâncias serão, respetivamente, 0,84 e 0,80.

9.3. O extrato deve ser sempre diluído com fase móvel. Caso contrário, devido a variações da força iónica, o tempo de retenção do pico de amprólio pode apresentar desvios significativos.

I) DETERMINAÇÃO DA NARASINA

O teor de narasina é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma *EN 17299 – Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN ISO 14183 – Animal feedingstuffs – Determination of monensin, narasin and salinomycin contents – Liquid chromatographic method using post-column derivatisation* (Alimentos para animais – Determinação dos teores de monensina, narasina e salinomicina – Método de cromatografia líquida com derivatização pós-coluna).

J) DETERMINAÇÃO DA NICARBAZINA

O teor de nicarbazina é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma *EN 17299 – Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN 15782 – Animal feedingstuffs – Determination of nicarbazin – High-performance liquid chromatographic method* (Alimentos para animais – Determinação do teor de nicarbazina – Método de cromatografia líquida de alta resolução).

K. DETERMINAÇÃO DO DECOQUINATO

O teor de decoquinato é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma *EN 17299 – Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN 16162 – Animal feedingstuffs – Determination of decoquinate by HPLC with fluorescence detection* (Alimentos para animais – Determinação do decoquinato por HPLC com deteção por fluorescência).

L. DETERMINAÇÃO DA MONENSINA

O teor de monensina é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma *EN 17299 – Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise -– Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN ISO 14183 – Animal feedingstuffs – Determination of monensin, narasin and salinomycin contents – Liquid chromatographic method using post-column derivatisation* (Alimentos para animais – Determinação dos teores de monensina, narasina e salinomicina – Método de cromatografia líquida com derivatização pós-coluna).

M. DETERMINAÇÃO DA SALINOMICINA

O teor de salinomicina é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma *EN 17299 – Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN ISO 14183 – Animal feedingstuffs – Determination of monensin, narasin and salinomycin contents – Liquid chromatographic method using post-column derivatisation* (Alimentos para animais – Determinação dos teores de monensina, narasina e salinomicina – Método de cromatografia líquida com derivatização pós-coluna).

N. DETERMINAÇÃO DA SEMDURAMICINA

O teor de semduramicina é determinado:

— pelo método de análise previsto na norma *EN 17299 – Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Pesquisa e determinação de coccidiostáticos autorizados em aditivos e a 1 % e 3 % de nível de contaminação cruzada, bem como dos coccidiostáticos não registados e de um antibiótico em níveis de subaditivos, em alimentos compostos para animais por Cromatografia Líquida de Alta Resolução – Deteção por espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*, ou

— pelo método de análise previsto na norma *EN ISO 16158 – Animal feedingstuffs – Determination of semduramicin content – Liquid chromatographic method using a "tree" analytical approach* (Alimentos para animais – Determinação do teor de semduramicina – Método de cromatografia líquida utilizando uma abordagem analítica em "árvore").

O. NORMAS EN

As normas EN indicadas a seguir são pertinentes para a aplicação do artigo 34.º, n.º 2, alínea a), do Regulamento (UE) 2017/625:

EN ISO 30024 – Animal feeding stuffs – Determination of phytase activity (Alimentos para animais – Determinação da atividade da fitase)

EN 17050 – Animal feeding stuffs – methods of sampling and analysis – Determination of iodine in animal feed by ICP-MS (Alimentos para animais – Métodos de amostragem e análise – Determinação do iodo em alimentos para animais por ICP-MS)

EN 17550 – Animal feeding stuffs: Determination of carotenoids in animal compound feed and premixtures by reverse phase high performance liquid chromatography – UV detection (RP-HPLC-UV) [Alimentos para animais: Determinação de carotenoides em alimentos compostos para animais e pré-misturas por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa com deteção por UV (RP-HPLC-UV)]

EN 15784 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Detection and enumeration of Bacillus *spp* (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Deteção e contagem de *Bacillus* spp.)

EN 15785 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis Isolation and enumeration of Bifidobacterium *spp*. (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Isolamento e contagem de *Bifidobacterium* spp.)

EN 15786 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis Detection and enumeration of Pediococcus *spp* (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Deteção e contagem de *Pediococcus* spp.)

EN 15787 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Detection and enumeration of Lactobacillus *spp. used as feed additive* (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Deteção e contagem de *Lactobacillus* spp. utilizado como aditivo na alimentação animal)

EN 15788 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Detection and enumeration of Enterococcus (E. faecium) *spp. used as feed additive* (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Deteção e contagem de *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. utilizado como aditivo na alimentação animal)

EN 15789 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Detection and enumeration of Saccharomyces cerevisiae *used as feed additive* (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Deteção e contagem de *Saccharomyces cerevisiae* utilizado como aditivo na alimentação animal)

EN 15510 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum, and lead by ICP-AES [Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação do cálcio, sódio, fósforo, magnésio, potássio, ferro, zinco, cobre, manganês, cobalto, molibdénio e chumbo por ICP-AES) (para a análise do cobalto e do molibdénio enquanto aditivos para a alimentação animal)

EN 15621 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação do cálcio, sódio, fósforo, magnésio, potássio, enxofre, ferro, zinco, cobre, manganês e cobalto por ICP-AES após mineralização sob pressão) (para a análise do cobalto enquanto aditivo para a alimentação animal)

EN 16159 – Animal feeding stuffs – Determination of selenium by hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS) after microwave digestion (digestion with 65 % nitric acid and 30 % hydrogen peroxide) [Alimentos para animais – Determinação do selénio por espetrometria de absorção atómica com geração de hidretos (HGAAS) após mineralização por micro-ondas (mineralização com 65 % de ácido nítrico e 30 % de peróxido de hidrogénio] (para a análise do selénio enquanto aditivo para a alimentação animal)

EN 17053 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of trace elements, heavy metals and other elements in feed by ICP-MS (multi-method) [Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação de oligoelementos, metais pesados e outros elementos nos alimentos para animais por ICP-MS (vários métodos)] (para a análise do cobalto, molibdénio e selénio enquanto aditivos para a alimentação animal)»

ANEXO V

«*ANEXO V*

MÉTODOS DE ANÁLISE PARA O CONTROLO DE SUBSTÂNCIAS INDESEJÁVEIS NOS ALIMENTOS PARA ANIMAIS

A. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) E DE PCB

CAPÍTULO I

MÉTODOS DE AMOSTRAGEM E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS ANALÍTICOS

1. Âmbito de aplicação e definições

As amostras destinadas ao controlo oficial do teor de dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF), bifenilos policlorados sob a forma de dioxina (PCB) ([1]) e PCB não semelhantes a dioxinas nos alimentos para animais devem ser colhidas em conformidade com os métodos descritos no anexo I. Devem aplicar-se as exigências quantitativas respeitantes ao controlo de substâncias ou produtos repartidos uniformemente nos alimentos, tal como se prevê no ponto 5.1 do anexo I. As amostras globais assim obtidas são consideradas representativas dos lotes ou sublotes dos quais foram colhidas. A observância dos teores máximos fixados pela Diretiva 2002/32/CE deve ser estabelecida com base nos teores determinados nas amostras de laboratório.

Para efeitos da presente parte, aplicam-se as definições estabelecidas no anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão ([2]).

Para além destas definições, para efeitos do disposto na presente parte são aplicáveis as seguintes definições:

([1]) Quadro dos FET (fatores de equivalência tóxica) para PCDD, PCDF e PCB sob a forma de dioxina: FET-OMS para avaliação dos riscos para o ser humano com base nas conclusões da reunião de peritos do Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) da Organização Mundial da Saúde (OMS) realizada em Genebra, em junho de 2005 (Martin van den Berg, et al., "The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds", *Toxicological Sciences*, vol. 93, n.º 2, 2006, p. 223).

Congénere	Valor do FET	Congénere	Valor do FET
Dibenzo-*p*-dioxinas ("PCDD") e dibenzo-*p*-furanos ("PCDF")		PCB "sob a forma de dioxina" PCB não-orto + PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB não-orto	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Abreviaturas utilizadas: "T" = tetra; "Pe" = penta; "Hx" = hexa; "Hp" = hepta; "O" = octa; "CDD" = clorodibenzodioxina; "CDF" = clorodibenzofurano; "CB" = clorobifenilo.

([2]) Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão, de 22 de março de 2021, relativo ao desempenho dos métodos analíticos para os resíduos de substâncias farmacologicamente ativas utilizadas em animais produtores de géneros alimentícios e à interpretação dos resultados, bem como aos métodos a utilizar na amostragem, e que revoga as Decisões 2002/657/CE e 98/179/CE (JO L 180 de 21.5.2021, p. 84).

"Métodos de rastreio": os métodos utilizados para a seleção de amostras com teores de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina que excedam os teores máximos ou os limiares de intervenção. Devem apresentar uma elevada capacidade de processamento de amostras com uma boa relação custo-eficácia, aumentando assim a oportunidade de descobrir novos incidentes com elevada exposição e riscos para a saúde dos consumidores. Os métodos de rastreio devem basear-se em métodos bioanalíticos ou em GC-MS. Os resultados de amostras que excedem o valor-limite utilizado para verificar a conformidade com o teor máximo devem ser verificados por uma reanálise completa da amostra inicial utilizando um método de confirmação.

"Métodos de confirmação": os métodos que fornecem informações completas ou complementares que permitem a identificação e quantificação inequívocas de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina no teor máximo ou, em caso de necessidade, no limiar de intervenção. Estes métodos utilizam a cromatografia gasosa/espetrometria de massa de alta resolução (GC-HRMS) ou a cromatografia gasosa/espetrometria de massa em tandem (GC-MS/MS).

2. **Conformidade do lote ou do sublote com o teor máximo**

2.1. *No que se refere a PCB não semelhantes a dioxinas*

O lote ou sublote está conforme com o teor máximo se o resultado analítico para a soma de PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180 (a seguir referidos como PCB não semelhantes a dioxinas) não for superior ao teor máximo estabelecido na Diretiva 2002/32/CE, tomando em consideração a incerteza de medição expandida ([3]). O lote ou sublote não está conforme com o teor máximo estabelecido na Diretiva 2002/32/CE se a média dos dois limites superiores ([4]) dos resultados analíticos obtidos com uma análise em duplicado ([5]), tendo em conta a incerteza de medição expandida, for superior ao teor máximo com um grau de confiança elevado, ou seja, utiliza-se, para avaliar a conformidade, a concentração analisada, após dedução da incerteza de medição expandida.

A incerteza de medição expandida é calculada utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. Um lote ou sublote não está conforme se a média dos valores medidos menos a incerteza expandida da média for superior ao teor máximo.

As regras descritas no presente ponto são aplicáveis ao resultado analítico obtido na amostra para controlo oficial. No caso de análises para efeitos de um segundo parecer de peritos ou de procedimentos de arbitragem, são aplicáveis as normas nacionais.

2.2. *No que se refere a PCDD/F e a PCB sob a forma de dioxina*

O lote ou sublote está conforme com o teor máximo se o resultado de uma única análise,

— realizada por um método de rastreio com uma taxa de falsos resultados conformes inferior a 5 %, indicar que o teor não excede o respetivo teor máximo de PCDD/F nem da soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina fixados na Diretiva 2002/32/CE,

— realizada por um método de confirmação, não exceder o respetivo teor máximo de PCDD/F nem da soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina fixados na Diretiva 2002/32/CE, tendo em conta a incerteza de medição expandida.

([3]) Devem seguir-se, quando aplicáveis, os princípios descritos em *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry*, https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf.

([4]) O conceito de "limite superior" preconiza que o contributo de cada congénere não quantificado seja igual ao limite de quantificação. O conceito de "limite inferior" preconiza que o contributo de cada congénere não quantificado seja igual a zero. O conceito de "limite médio" preconiza que o contributo de cada congénere não quantificado seja igual a metade do limite de quantificação.

([5]) Análise em duplicado: uma análise separada dos analitos pertinentes utilizando uma segunda alíquota da mesma amostra homogeneizada. De forma geral, aplicam-se os requisitos relativos à análise em duplicado previstos no anexo II, capítulo C, ponto 3. No entanto, para métodos que utilizem padrões internos marcados com ^{13}C para os analitos pertinentes, a análise em duplicado só é necessária se o resultado da primeira determinação não for conforme. A análise em duplicado é necessária para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca acidental de amostras. No caso de a análise ser realizada no contexto de um incidente de contaminação, a confirmação através de uma análise em duplicado pode ser omitida se as amostras selecionadas para análise estiverem associadas, através da rastreabilidade, a esse incidente de contaminação e o teor obtido for significativamente superior ao teor máximo.

Em relação aos ensaios de rastreio, deve ser estabelecido um valor-limite para decidir da conformidade da amostra com os respetivos teores máximos fixados quer para PCDD/F, quer para a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina.

O lote ou sublote não está conforme com o teor máximo estabelecido na Diretiva 2002/32/CE se a média dos dois limites superiores ([6]) dos resultados analíticos, obtidos com uma análise em duplicado ([7]) utilizando um método de confirmação, for superior ao teor máximo com um grau de confiança elevado, tendo em conta a incerteza de medição expandida, ou seja, utiliza-se, para avaliar a conformidade, a concentração analisada, após dedução da incerteza de medição expandida.

A incerteza de medição expandida é calculada utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. Um lote ou sublote não está conforme se a média dos valores medidos menos a incerteza expandida da média for superior ao teor máximo.

Para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina, deve utilizar-se a soma das incertezas expandidas estimadas dos resultados analíticos obtidos separadamente para PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina.

As regras descritas no presente ponto são aplicáveis ao resultado analítico obtido na amostra para controlo oficial. No caso de análises para efeitos de direito de recurso ou de arbitragem, são aplicáveis as normas nacionais.

3. **Resultados superiores aos limiares de intervenção estabelecidos no anexo II da Diretiva 2002/32/CE**

Os limiares de intervenção servem de instrumento para a seleção de amostras nos casos em que é necessário identificar uma fonte de contaminação e adotar medidas com vista à sua redução ou eliminação. Os métodos de rastreio devem estabelecer os valores-limite adequados para a seleção daquelas amostras. Caso sejam necessários esforços significativos para identificar a fonte e reduzir ou eliminar a contaminação, é adequado confirmar a superação dos limiares de intervenção por uma análise em duplicado mediante um método de confirmação e tendo em conta a incerteza de medição expandida ([8]).

CAPÍTULO II

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E REQUISITOS RESPEITANTES AOS MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS NO CONTROLO OFICIAL DOS TEORES DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) E DE PCB SOB A FORMA DE DIOXINA EM ALIMENTOS PARA ANIMAIS

1. **Âmbito de aplicação**

Os requisitos estabelecidos no presente capítulo devem ser aplicados quando se analisam alimentos para animais para efeitos de controlo oficial dos teores de PCDD/F substituídos nas posições 2,3,7,8 e de PCB sob a forma de dioxina, bem como no que se refere à preparação das amostras e aos requisitos analíticos para outros fins regulamentares, incluindo os controlos efetuados pelos operadores das empresas do setor dos alimentos para animais a fim de assegurar a conformidade com o disposto no Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ([9]).

A monitorização da presença de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina nos alimentos para animais pode ser realizada com dois tipos diferentes de métodos analíticos:

([6]) O conceito de "limite superior" preconiza que o contributo para os equivalentes tóxicos (TEQ) de cada congénere não quantificado seja igual ao limite de quantificação. O conceito de "limite inferior" preconiza que o contributo para os TEQ de cada congénere não quantificado seja igual a zero. O conceito de "limite médio" preconiza que o contributo para os TEQ de cada congénere não quantificado seja igual a metade do limite de quantificação.

([7]) De forma geral, aplicam-se os requisitos relativos à análise em duplicado previstos no anexo II, capítulo C, ponto 3. No entanto, para métodos de confirmação que utilizem padrões internos marcados com ^{13}C para os analitos pertinentes, a análise em duplicado só é necessária se o resultado da primeira determinação não for conforme. A análise em duplicado é necessária para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca acidental de amostras. No caso de a análise ser realizada no contexto de um incidente de contaminação, a confirmação através de uma análise em duplicado pode ser omitida se as amostras selecionadas para análise estiverem associadas, através da rastreabilidade, a esse incidente de contaminação e o teor obtido for significativamente superior ao teor máximo.

([8]) A explicação e os requisitos para as análises em duplicado para efeitos de controlo dos limiares de intervenção são idênticos aos referidos na nota de rodapé 5 para os teores máximos.

([9]) Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de janeiro de 2005, que estabelece requisitos de higiene dos alimentos para animais (JO L 35 de 8.2.2005, p. 1).

a) *Métodos de rastreio*

O objetivo dos métodos de rastreio é selecionar as amostras com teores de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina que excedam os teores máximos ou os limiares de intervenção. Os métodos de rastreio devem assegurar uma elevada capacidade de processamento de amostras com uma boa relação custo-eficácia, aumentando assim a oportunidade de descobrir novos incidentes com elevada exposição e riscos para a saúde dos consumidores. A sua aplicação deve ter como objetivo evitar falsos resultados conformes. Podem incluir métodos bioanalíticos e métodos GC-MS.

Os métodos de rastreio comparam o resultado analítico com um valor-limite, fornecendo uma decisão do tipo sim/não sobre a eventual superação do teor máximo ou do limiar de intervenção. É necessário que a concentração de PCDD/F e a soma de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina em amostras suspeitas de não conformidade com o teor máximo seja determinada ou confirmada por um método de confirmação.

Além disso, os métodos de rastreio podem dar uma indicação dos teores de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina presentes na amostra. Em caso de aplicação de métodos de rastreio bioanalíticos, o resultado é expresso em equivalentes bioanalíticos (BEQ), ao passo que, em caso de aplicação de métodos físico-químicos GC-MS, o resultado é expresso em equivalentes tóxicos (TEQ). Os resultados dos métodos de rastreio indicados numericamente são adequados para demonstrar a conformidade ou a suspeita de não conformidade ou a superação dos limiares de intervenção e fornecem uma indicação da gama de valores em caso de aplicação subsequente de métodos de confirmação. Não são adequados para fins como a avaliação dos níveis de base, a estimativa de ingestão, o acompanhamento das tendências temporais dos teores ou a reavaliação dos limiares de intervenção e dos teores máximos.

b) *Métodos de confirmação*

Os métodos de confirmação permitem a identificação e quantificação inequívocas de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina presentes numa amostra e fornecem uma informação exaustiva sobre os teores dos congéneres individuais. Por conseguinte, estes métodos permitem o controlo dos teores máximos e dos limiares de intervenção, incluindo a confirmação dos resultados obtidos por métodos de rastreio. Além disso, os resultados podem ser utilizados para outros fins, como a determinação de níveis de base reduzidos na monitorização dos alimentos para animais, o acompanhamento das tendências temporais, a avaliação da exposição e a criação de uma base de dados para uma eventual reavaliação dos limiares de intervenção e dos teores máximos. São também importantes para o estabelecimento de padrões de congéneres com vista a identificar a fonte de uma eventual contaminação. Tais métodos utilizam GC-HRMS. Para confirmar a conformidade ou não conformidade com o teor máximo, pode também utilizar-se a GC-MS/MS.

2. **Contexto**

Para o cálculo de concentrações de TEQ, as concentrações de cada substância numa determinada amostra devem ser multiplicadas pelos respetivos fatores de equivalência tóxica (FET) (ver nota de rodapé 1 do capítulo I), sendo subsequentemente somadas para darem a concentração total de compostos sob a forma de dioxina expressa em TEQ.

Para efeitos da presente parte A, por limite de quantificação específico aceite de um congénere individual, entende-se o teor mais baixo do analito que pode ser medido com uma certeza estatística razoável, cumprindo os critérios de identificação tal como descritos em normas reconhecidas internacionalmente, por exemplo, na norma EN 16215:2012 [*Animal feed - Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS* (Alimentação animal – Determinação de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina por GC-HRMS e de PCB indicadores por GC-HRMS)] e/ou nos métodos EPA 1613 e 1668, na sua forma revista.

O limite de quantificação de um congénere individual pode ser identificado como:

a) A concentração de um analito no extrato de uma amostra que produz uma resposta instrumental a dois iões diferentes a ser monitorizada com um rácio S/R (sinal/ruído) de 3:1 para o sinal de dados em bruto menos intensivo; ou

b) Se, por motivos de ordem técnica, o cálculo sinal/ruído não fornecer resultados fiáveis, o ponto de concentração mais baixo numa curva de calibração que apresente um desvio aceitável (≤ 30 %) e coerente (medido pelo menos no início e no final de uma série de amostras analíticas) em relação ao fator de resposta relativo médio calculado para todos os pontos da curva de calibração em cada série de amostras. O limite de quantificação (LOQ) é calculado a partir do ponto de concentração mais baixo tendo em conta a recuperação dos padrões internos e a quantidade da amostra.

Os métodos de rastreio bioanalíticos não darão resultados ao nível dos congéneres, mas apenas uma indicação ([10]) do valor TEQ, expresso em equivalente bioanalítico para ter em conta o facto de que nem todos os compostos presentes num extrato de amostra que produz uma resposta no teste podem cumprir todos os requisitos do princípio de TEQ.

Os métodos de rastreio e de confirmação apenas podem ser aplicados para o controlo de uma determinada matriz se forem suficientemente sensíveis para detetar fiavelmente os teores no limiar de intervenção ou no teor máximo.

3. **Requisitos de garantia da qualidade**

3.1. Devem ser tomadas medidas para evitar a contaminação cruzada em cada etapa do procedimento de amostragem e de análise.

3.2. As amostras devem ser conservadas e transportadas em recipientes de vidro, alumínio, polipropileno ou polietileno, adequados para o armazenamento sem qualquer influência nos teores de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina das amostras. Devem ser removidos do recipiente da amostra os vestígios de poeiras de papel.

3.3. O armazenamento e o transporte das amostras devem ser realizados de modo a manter a integridade da amostra de alimentos para animais.

3.4. Desde que relevante, cada amostra de laboratório deve ser finamente moída e cuidadosamente misturada, mediante um processo que tenha demonstrado alcançar uma homogeneização completa (por exemplo, moagem que permita passar por um crivo de 1 mm). As amostras devem ser exsicadas antes da moagem, caso o teor em humidade seja demasiado elevado.

3.5. Deve proceder-se ao controlo dos reagentes, do material de vidro e do equipamento relativamente a uma eventual influência nos resultados baseados em TEQ ou em BEQ.

3.6. Deve ser efetuada uma análise em branco através da realização de todo o procedimento analítico, omitindo apenas a amostra.

3.7. Relativamente aos métodos bioanalíticos, devem testar-se todo o material de vidro e os solventes utilizados na análise para verificar se estão isentos de compostos que interfiram com a deteção de compostos-alvo na gama de trabalho. O material de vidro deve ser enxaguado com solventes ou aquecido a temperaturas adequadas para remover da sua superfície vestígios de PCDD/F, de compostos sob a forma de dioxina e de compostos interferentes.

3.8. A quantidade da amostra utilizada para a extração deve ser suficiente para cumprir os requisitos relativos a uma gama de trabalho suficientemente baixa, incluindo as concentrações dos teores máximos ou do limiar de intervenção.

3.9. Os procedimentos específicos de preparação de amostras utilizados para os produtos em causa devem seguir orientações aceites internacionalmente, ou seja, a norma EN ISO 6498.

4. **Requisitos aplicáveis aos laboratórios**

4.1. Em conformidade com o disposto no Regulamento (UE) 2017/625, os laboratórios devem ser acreditados por um organismo reconhecido que opere em conformidade com o Guia ISO/IEC 58, a fim de assegurar que aplicam a garantia de qualidade analítica. Os laboratórios devem ser acreditados em conformidade com a norma EN ISO/IEC/17025. Devem seguir-se, quando aplicáveis, os princípios descritos nas orientações técnicas relativas à estimativa da incerteza de medição e dos limites de quantificação para a análise de PCDD/F e PCB ([11]).

4.2. A competência de um laboratório deve ser comprovada mediante uma participação contínua e bem-sucedida em estudos interlaboratoriais para a determinação de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nas matrizes de alimentos para animais e gamas de concentrações relevantes.

([10]) Os métodos bioanalíticos não são específicos para os congéneres incluídos no sistema de FET. Podem estar presentes no extrato de amostra outros compostos estruturalmente relacionados com o AhR ativo (recetor aril-hidro-carboneto), que contribuem para a resposta global. Por conseguinte, os resultados bioanalíticos não podem ser uma estimativa, mas sim uma indicação do nível TEQ na amostra.

([11]) *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry*, https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf; *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food*, https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf.

4.3. Os laboratórios que aplicam métodos de rastreio para o controlo de rotina de amostras devem estabelecer uma estreita cooperação com os laboratórios que aplicam o método de confirmação, tanto para o controlo da qualidade como para a confirmação do resultado analítico de amostras suspeitas.

5. **Requisitos básicos a cumprir pelo procedimento analítico para determinação de dioxinas (PCDD/F) e de PCB sob a forma de dioxina**

5.1. *Gama de trabalho e limites de quantificação reduzidos*

Para os PCDD/F, as quantidades detetáveis devem situar-se na gama alta dos femtogramas (10^{-15} g) devido à extrema toxicidade de alguns destes compostos. Para a maioria dos congéneres de PCB, um limite de quantificação na gama dos nanogramas (10^{-9} g) já é suficiente. Quanto à medição dos congéneres de PCB sob a forma de dioxina mais tóxicos (designadamente, os congéneres não-orto substituídos), o limite inferior da gama de trabalho deve atingir os valores inferiores dos picogramas (10^{-12} g). Para todos os restantes congéneres de PCB, é suficiente um limite de quantificação na gama dos nanogramas (10^{-9} g).

5.2. *Seletividade (especificidade) elevada*

5.2.1. É necessário estabelecer uma distinção entre PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina e inúmeros outros compostos coextraídos e eventualmente interferentes, que estão presentes em concentrações superiores em várias ordens de grandeza às dos analitos requeridos. Nos métodos de GC-MS, é necessária uma diferenciação entre vários congéneres, nomeadamente entre congéneres tóxicos (por exemplo, os dezassete PCDD/F substituídos nas posições 2,3,7,8 e os doze PCB sob a forma de dioxina) e outros congéneres.

5.2.2. Os métodos bioanalíticos devem ser capazes de detetar os compostos-alvo como a soma de PCDD/F e/ou de PCB sob a forma de dioxina. A limpeza (*clean-up*) das amostras destina-se à remoção de compostos conducentes a falsos resultados não conformes ou compostos que possam diminuir a resposta, provocando falsos resultados conformes.

5.3. *Exatidão elevada (rigor e precisão, recuperação aparente do bioensaio)*

5.3.1. Para os métodos GC-MS, a determinação deve fornecer uma estimativa válida da verdadeira concentração numa amostra. É necessária uma exatidão elevada para se evitar a rejeição do resultado da análise de uma amostra devido à reduzida fiabilidade do valor TEQ determinado. A exatidão é expressa em termos de *rigor* (diferença entre o valor médio medido para um analito num material certificado e o respetivo valor certificado, expresso em percentagem deste valor) e de *precisão* (RSD_R, desvio-padrão relativo, calculado a partir de resultados obtidos em condições de reprodutibilidade).

5.3.2. Para métodos bioanalíticos, deve ser determinada a recuperação aparente do bioensaio. Por recuperação aparente do bioensaio, entende-se o valor BEQ calculado a partir da curva de calibração de TCDD ou do PCB 126 corrigido em função do resultado do ensaio em branco e, em seguida, dividido pelo valor TEQ determinado pelo método de confirmação. Visa corrigir fatores como a perda de PCDD/F e de compostos sob a forma de dioxina durante as fases de extração e de limpeza, compostos coextraídos que aumentam ou diminuem a resposta (efeitos agonistas e antagonistas), a qualidade do ajustamento da curva, ou diferenças entre os valores FET e os valores da potência relativa (REP). A recuperação aparente do bioensaio é calculada a partir de amostras de referência adequadas com padrões de congéneres representativos próximos do teor requerido.

5.4. *Validação na gama do teor máximo e medidas gerais de controlo de qualidade*

5.4.1. Os laboratórios devem demonstrar o desempenho de um método na gama do teor máximo, por exemplo, 0,5 vezes, uma vez e duas vezes o teor máximo, com um coeficiente de variação aceitável para análises repetidas, durante o procedimento de validação e durante a análise de rotina.

5.4.2. Os controlos regulares com ensaios em branco, com amostras enriquecidas ou análises de amostras de controlo (de preferência, se disponível, material de referência certificado) devem ser realizados como medidas internas de controlo da qualidade. Devem registar-se e verificar-se os gráficos de controlo da qualidade para ensaios em branco, com amostras enriquecidas ou análises de amostras de controlo, a fim de garantir que o desempenho analítico está em conformidade com os requisitos.

5.5. *Limite de quantificação*

5.5.1. No que diz respeito ao método bioanalítico de rastreio, o estabelecimento do limite de quantificação (LOQ) não é um requisito indispensável, mas deve provar-se que o método consegue fazer a diferenciação de todos os valores situados entre o valor do ensaio em branco e o valor-limite. Quando se transmite um valor BEQ, deve ser estabelecido um nível de notificação para lidar com amostras com uma resposta abaixo desse nível. Deve demonstrar-se que o nível de notificação é diferente, pelo menos por um fator de três, das amostras em branco do procedimento, com uma resposta inferior à gama de trabalho. Por conseguinte, deve ser calculado a partir de amostras que contenham os compostos-alvo próximo do teor mínimo exigido, e não a partir de um rácio S/R ou de um ensaio em branco.

5.5.2. O LOQ de um método de confirmação deve ser de cerca de um quinto do teor máximo.

5.6. *Critérios analíticos*

Para se obterem resultados fiáveis de métodos de confirmação ou de rastreio, devem ser satisfeitos os seguintes critérios na gama do teor máximo para o valor TEQ ou o valor BEQ, respetivamente, quer determinado como valor TEQ total ou valor BEQ total (como a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina) quer separadamente para PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina:

	Rastreio com métodos bioanalíticos ou físico-químicos	Métodos de confirmação
Taxa de falsos resultados conformes (*)	< 5 %	
Rigor		− 20 % a + 20 %
Repetibilidade (RSD_r)	< 20 %	
Precisão intermédia (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

(*) No que diz respeito aos teores máximos.

5.7. *Requisitos específicos para métodos de rastreio*

5.7.1. No rastreio podem ser utilizados tanto GC-MS como métodos bioanalíticos. Em relação aos métodos GC-MS, devem respeitar-se os requisitos descritos no ponto 6. Quanto aos métodos bioanalíticos baseados em células, os requisitos específicos estão descritos no ponto 7.

5.7.2. Os laboratórios que aplicam métodos de rastreio para o controlo de rotina de amostras devem estabelecer uma estreita cooperação com os laboratórios que aplicam o método de confirmação.

5.7.3. A verificação do desempenho do método de rastreio é necessária durante a análise de rotina, por controlo da qualidade analítica e validação contínua do método. Deve existir um programa contínuo para o controlo dos resultados conformes.

5.7.4. Controlo da eventual supressão da resposta das células e da citotoxicidade:

20 % dos extratos de amostras devem ser medidos em ensaios de rastreio de rotina sem e com adição de 2,3,7,8-TCDD, correspondente ao teor máximo ou ao limiar de intervenção, a fim de verificar se a resposta é eventualmente suprimida por substâncias interferentes presentes no extrato da amostra. A concentração medida da amostra enriquecida deve ser comparada com a soma da concentração do extrato não enriquecido mais a concentração do enriquecimento. Se esta concentração medida for inferior, em mais de 25 %, à concentração (soma) calculada, tal é uma indicação de uma potencial supressão do sinal e a respetiva amostra deve ser submetida a análise de confirmação por GC-HRMS. Os resultados devem ser monitorizados através de gráficos de controlo de qualidade.

5.7.5. Controlo da qualidade de amostras conformes:

Aproximadamente 2 % a 10 % das amostras conformes, dependendo da matriz da amostra e da experiência adquirida no laboratório, devem ser confirmadas por GC/HRMS.

5.7.6. Determinação das taxas de falsos resultados conformes a partir de dados de controlo da qualidade:

Deve determinar-se a taxa de falsos resultados conformes obtidos no rastreio de amostras abaixo e acima do teor máximo ou do limiar de intervenção. As taxas reais de falsos resultados conformes devem ser inferiores a 5 %. Quando o controlo da qualidade de amostras conformes revelar, pelo menos, 20 resultados confirmados por matriz/grupo de matrizes, devem ser retiradas conclusões sobre a taxa de falsos resultados conformes a partir dessa base de dados. Os resultados das amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais ou durante incidentes de contaminação, abrangendo uma gama de concentrações que pode atingir, por exemplo, duas vezes o teor máximo (TM), podem também ser incluídos no mínimo de 20 resultados para a avaliação da taxa de falsos resultados conformes. As amostras devem abranger os padrões de congéneres mais frequentes, que representem diferentes fontes.

Embora os testes de rastreio devam, de preferência, ter como objetivo a deteção de amostras que excedem o limiar de intervenção, o critério para determinar as taxas de falsos resultados conformes é o teor máximo, tendo em conta a incerteza de medição expandida do método de confirmação.

5.7.7. As amostras potencialmente não conformes no rastreio devem ser sempre verificadas por uma reanálise completa da amostra inicial por um método de análise de confirmação. Estas amostras podem também servir para avaliar a taxa de falsos resultados não conformes. Relativamente aos métodos de rastreio, a taxa de falsos resultados não conformes é a fração dos resultados que foram confirmados como conformes por análises de confirmação, quando no rastreio anterior a amostra tinha sido declarada potencialmente não conforme. A avaliação das vantagens do método de rastreio deve basear-se na comparação das amostras com falsos resultados não conformes com o número total de amostras verificadas. Esta taxa deve ser suficientemente baixa para tornar vantajoso o uso do instrumento de rastreio.

5.7.8. Nas condições de validação, os métodos bioanalíticos devem fornecer uma indicação válida do valor TEQ, calculado e expresso em BEQ.

Também em relação aos métodos bioanalíticos levados a cabo em condições de repetibilidade, a RSD_r intralaboratorial é tipicamente mais baixa do que em condições de reprodutibilidade (RSD_R).

6. **Requisitos específicos aplicáveis aos métodos GC-MS usados para fins de rastreio ou de confirmação**

6.1. *Diferenças aceitáveis entre o limite superior e o limite inferior dos resultados TEQ-OMS*

A diferença entre o limite superior e o limite inferior não deve exceder 20 % no caso de confirmação da superação do teor máximo ou, em caso de necessidade, dos limiares de intervenção.

6.2. *Controlo das recuperações*

6.2.1. Logo no início do método analítico, por exemplo antes da extração, deve proceder-se à adição de padrões internos de PCDD/F marcados com ^{13}C e substituídos com cloro nas posições 2,3,7 e 8 e de padrões internos de PCB sob a forma de dioxina marcados com ^{13}C, por forma a validar o procedimento analítico. Deve ser adicionado, pelo menos, um congénere para cada grupo homólogo de PCDD/F tetra a octa-clorado e, pelo menos, um congénere para cada grupo homólogo de PCB sob a forma de dioxina (alternativamente, deve ser utilizado para o controlo de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina, pelo menos, um congénere para cada função de registo de iões selecionados por espetrometria de massa). No caso dos métodos de confirmação, deve utilizar-se a totalidade dos 17 padrões internos de PCDD/F substituídos nas posições 2,3,7 e 8 e marcados com ^{13}C e a totalidade dos 12 padrões internos de PCB sob a forma de dioxina marcados com ^{13}C.

6.2.2. Também devem ser determinados fatores de resposta relativos no caso dos congéneres para os quais não se adiciona um composto análogo marcado com ^{13}C, através da utilização de soluções de calibração adequadas.

6.2.3. Em relação aos alimentos para animais de origem vegetal e aos alimentos para animais de origem animal que contenham menos de 10 % de gorduras, a adição de padrões internos é obrigatória antes da extração. Em relação aos alimentos para animais de origem animal que contenham mais de 10 % de gorduras, os padrões internos são adicionados antes ou após a extração de gorduras. Deve ser efetuada uma validação adequada da eficiência da extração, dependendo da fase em que são introduzidos os padrões internos.

6.2.4. Antes da análise por GC-MS, devem ser adicionados 1 ou 2 padrões de recuperação (substitutos).

6.2.5. É necessário efetuar o controlo da recuperação. Para os métodos de confirmação, as recuperações de cada padrão interno devem situar-se no intervalo de 60 % a 120 %. São aceitáveis recuperações inferiores ou superiores para congéneres individuais, nomeadamente para algumas dibenzo-*p*-dioxinas e alguns dibenzofuranos hepta- e octa--clorados, desde que o seu contributo para o valor TEQ não exceda 10 % do valor TEQ total (com base na soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina). Para os métodos de rastreio GC-MS, as recuperações devem situar-se no intervalo de 30 % a 140 %.

6.3. *Remoção de substâncias interferentes*

— Os PCDD/F devem ser separados dos compostos clorados interferentes, tais como PCB não semelhantes a dioxina e éteres difenílicos clorados, através de técnicas cromatográficas adequadas (de preferência, com uma coluna de florisil, alumina e/ou carbono).

— A separação de isómeros por cromatografia gasosa deve ser < 25 % de pico a pico entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF e 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Calibração com curva padrão*

A gama da curva de calibração deve abranger a gama relevante do teor máximo ou dos limiares de intervenção.

6.5. *Critérios específicos para métodos de confirmação*

— Para GC-HRMS:

Na HRMS, a resolução deve, normalmente, ser maior ou igual a 10 000 para todo o intervalo mássico a 10 % do vale.

Cumprimento de outros critérios de identificação e confirmação, tal como descritos em normas reconhecidas internacionalmente, por exemplo, na norma EN 16215:2012 [*Animal feed - Determination of dioxins and dioxin--like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS* (Alimentação animal – Determinação de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina por GC-HRMS e de PCB indicadores por GC-HRMS)] e/ou nos métodos EPA 1613 e 1668, na sua forma revista.

— Para GC-MS/MS:

Monitorização de, pelo menos, dois iões precursores específicos, cada um com um ião-produto de transição específico correspondente, para todos os analitos marcados e não marcados no âmbito da análise.

Tolerância máxima permitida das intensidades iónicas relativas de ± 15 % para uma seleção de iões-produto de transição em comparação com os valores calculados ou medidos (média dos padrões de calibração), aplicando condições MS/MS idênticas, nomeadamente energia de colisão e pressão do gás de colisão, para cada transição de um analito.

Resolução para cada quadripolo a ser definida a um nível igual ou superior à resolução da unidade de massa (resolução da unidade de massa: resolução suficiente para separar dois picos com uma diferença de uma unidade de massa), a fim de reduzir ao mínimo as interferências possíveis sobre os analitos a analisar.

Cumprimento de outros critérios tal como descritos em normas reconhecidas internacionalmente, por exemplo, na norma EN 16215:2012 [*Animal feed - Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC-HRMS and of indicator PCBs by GC-HRMS* (Alimentação animal – Determinação de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina por GC-HRMS e de PCB indicadores por GC-HRMS)] e/ou nos métodos EPA 1613 e 1668, na sua forma revista, exceto a obrigação de utilizar GC-HRMS.

7. REQUISITOS ESPECÍFICOS PARA MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Os métodos bioanalíticos são métodos baseados na utilização de princípios biológicos, como ensaios com células, ensaios com recetores ou imunoensaios. O presente ponto estabelece requisitos para os métodos bioanalíticos em geral.

Um método de rastreio, em princípio, classifica uma amostra como conforme ou suspeita de ser não conforme. Para tal, o valor BEQ calculado é comparado com o valor-limite (ver ponto 7.3). As amostras abaixo do valor--limite são declaradas conformes, as amostras iguais ou acima do valor-limite são declaradas suspeitas de ser não conformes e necessitam de uma análise por um método de confirmação. Na prática, um valor BEQ correspondente a dois terços do limite máximo pode servir como valor-limite, desde que se assegure uma taxa de falsos resultados conformes inferior a 5 % e uma taxa aceitável de falsos resultados não conformes. Com teores máximos distintos para os PCDD/F e para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina, a verificação da conformidade das amostras sem fracionamento requer valores-limite de bioensaio adequados para os PCDD/F. Para a verificação de amostras que excedam os limiares de intervenção, uma percentagem adequada do respetivo limiar de intervenção servirá como valor-limite.

Se um teor indicativo for expresso em BEQ, os resultados da amostra devem ser apresentados na gama de trabalho e devem exceder o limite de notificação (ver pontos 7.1.1 e 7.1.6).

7.1. *Avaliação da resposta do teste*

7.1.1. Requisitos gerais

— Ao calcular as concentrações a partir de uma curva de calibração de TCDD, os valores na extremidade superior da curva apresentarão uma grande variação [coeficiente de variação (CV) elevado]. A gama de trabalho é a zona em que este CV é inferior a 15 %. A extremidade inferior da gama de trabalho (limite de notificação) deve ser estabelecida em, pelo menos, três vezes o valor dos ensaios em branco do procedimento. A extremidade superior da gama de trabalho é geralmente representada pelo valor EC_{70} (70 % da concentração efetiva máxima), mas deve ser inferior caso o CV seja superior a 15 % nesta gama. A gama de trabalho é estabelecida durante a validação. Os valores-limite (ver ponto 7.3) devem situar-se dentro da gama de trabalho.

— As soluções-padrão e os extratos de amostras devem ser testados em triplicado ou, pelo menos, em duplicado. No caso de utilização de duplicados, uma solução-padrão ou um extrato-testemunha testado em quatro a seis cavidades repartidas ao longo da placa deve produzir uma resposta ou concentração (apenas possível na gama de trabalho) com base num CV < 15 %.

7.1.2. Calibração

7.1.2.1. Calibração com curva padrão

— Podem estimar-se os teores das amostras comparando a resposta do teste com uma curva de calibração de TCDD (ou do PCB 126 ou de uma mistura-padrão de PCDD/PCDF/PCB sob a forma de dioxina) para calcular o valor BEQ no extrato e, posteriormente, na amostra.

— As curvas de calibração devem conter oito a 12 concentrações (pelo menos em duplicado), com concentrações suficientes na parte inferior da curva (gama de trabalho). Será dada especial atenção à qualidade do ajustamento da curva na gama de trabalho. Como tal, o valor R^2 tem pouco ou nenhum valor para estimar a adequação do ajustamento numa regressão não linear. Um melhor ajustamento será alcançado através da minimização da diferença entre os teores calculados e os teores observados na gama de trabalho da curva, por exemplo, minimizando a soma dos quadrados dos desvios.

— O teor estimado no extrato de amostra é posteriormente corrigido em função do valor BEQ calculado para uma amostra em branco de matriz ou solvente (para ter em conta as impurezas provenientes de solventes e produtos químicos utilizados) e da recuperação aparente (calculada a partir do valor BEQ de amostras de referência adequadas com padrões de congéneres representativos próximos do teor máximo ou do limiar de intervenção). Para a correção da recuperação, a recuperação aparente deve situar-se dentro da gama exigida (ver ponto 7.1.4). As amostras de referência utilizadas para a correção da recuperação devem cumprir os requisitos indicados no ponto 7.2.

7.1.2.2. Calibração com amostras de referência

Em alternativa, pode utilizar-se uma curva de calibração preparada a partir de, pelo menos, quatro amostras de referência (ver ponto 7.2.4): podem usar-se um ensaio em branco da matriz e três amostras de referência com 0,5 vezes, uma vez e duas vezes o teor máximo ou o limiar de intervenção, eliminando a necessidade de correção em função do ensaio em branco e da recuperação se as propriedades da matriz das amostras de referência corresponderem às das amostras com teor desconhecido. Neste caso, a resposta do teste correspondente a dois terços do teor máximo (ver ponto 7.3) pode ser calculada diretamente a partir destas amostras e servir de valor-limite. Para a verificação de amostras que excedam os limiares de intervenção, o valor-limite poderá ser uma percentagem adequada destes limiares de intervenção.

7.1.3. Determinação em separado de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina

Os extratos podem ser divididos em frações contendo PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina, permitindo uma indicação separada dos valores TEQ (em BEQ) de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina. Utilizar, de preferência, uma curva de calibração-padrão do PCB 126 para avaliar os resultados da fração que contém PCB sob a forma de dioxina.

7.1.4. Recuperações aparentes do bioensaio

A "recuperação aparente do bioensaio" deve ser calculada a partir de amostras de referência adequadas com padrões de congéneres representativos próximos do teor máximo ou do limiar de intervenção e expressa em percentagem do valor BEQ em comparação com o valor TEQ. Em função do tipo de ensaio e dos FET ([12]) utilizados, as diferenças entre os fatores FET e REP relativos aos PCB sob a forma de dioxina podem causar recuperações aparentes baixas para os PCB sob a forma de dioxina em comparação com os PCDD/F. Por conseguinte, no caso de uma determinação em separado de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina, as recuperações aparentes do bioensaio devem ser: para os PCB sob a forma de dioxina, de 20 % a 60 %, para os PCDD/F, de 50 % a 130 % (as gamas aplicam-se à curva de calibração de TCDD). Como o contributo dos PCB sob a forma de dioxina para a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina pode variar entre diferentes matrizes e amostras, as recuperações aparentes do bioensaio para a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina refletem estas gamas e devem situar-se entre 30 % e 130 %. Qualquer implicação que a revisão substancial dos valores FET tenha para a legislação da União relativa aos PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina exige a revisão destas gamas.

7.1.5. Controlo das recuperações para a limpeza (clean-up)

A perda de compostos durante a limpeza deve ser verificada durante a validação. Uma amostra em branco enriquecida com uma mistura dos diferentes congéneres deve ser submetida a limpeza (pelo menos, n = 3) e a recuperação e a variabilidade verificadas por um método de confirmação. A recuperação deve situar-se entre 60 % e 120 %, em especial para congéneres que contribuam mais de 10 % para o valor TEQ em várias misturas.

7.1.6. Limite de notificação

Ao notificar valores BEQ, deve ser determinado um limite de notificação a partir de amostras de matriz pertinentes que envolvam padrões de congéneres típicos, mas não a partir da curva de calibração dos padrões, devido à baixa precisão na gama inferior da curva. Devem ser tidos em conta os efeitos da extração e da limpeza. O limite de notificação deve ser estabelecido em, pelo menos, três vezes o valor dos ensaios em branco do procedimento.

7.2. *Utilização de amostras de referência*

7.2.1. As amostras de referência devem representar a matriz da amostra, os padrões de congéneres e as gamas de concentrações dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina próximos do teor máximo ou do limiar de intervenção.

7.2.2. Cada série de testes deve comportar um ensaio em branco da matriz e, caso tal não seja possível, um ensaio em branco do procedimento, bem como uma amostra de referência com o teor máximo ou o limiar de intervenção. Estas amostras devem ser extraídas e testadas ao mesmo tempo e em condições idênticas. A amostra de referência deve apresentar uma resposta claramente elevada em comparação com a amostra em branco, assegurando assim a adequação do teste. Essas amostras podem ser utilizadas para as correções em função do ensaio em branco e da recuperação.

7.2.3. As amostras de referência escolhidas para efetuar uma correção em função da recuperação devem ser representativas das amostras de ensaio, o que significa que os padrões dos congéneres não podem conduzir a uma subestimação dos teores.

7.2.4. Podem incluir-se amostras de referência suplementares com, por exemplo, teores 0,5 vezes e duas vezes superiores ao teor máximo ou ao limiar de intervenção, para demonstrar o desempenho correto do teste dentro da gama requerida para o controlo do teor máximo ou do limiar de intervenção. Combinadas, estas amostras podem ser utilizadas para calcular os valores BEQ das amostras de ensaio (ver ponto 7.1.2.2).

7.3. *Determinação de valores-limite*

A relação entre os resultados bioanalíticos em BEQ e os resultados do método de confirmação em TEQ deve ser estabelecida, por exemplo através de experiências de calibração ajustadas em função da matriz, envolvendo amostras de referência enriquecidas a 0, 0,5 vezes, uma vez e duas vezes o TM, com seis repetições em cada teor (n = 24). Os fatores de correção (do ensaio em branco e da recuperação) podem ser estimados a partir desta relação, mas devem ser verificados em conformidade com o ponto 7.2.2.

([12]) Os requisitos atuais baseiam-se nos FET publicados em: Van den Berg, M., et al., *Toxicol Sci*, vol. 93, n.º 2, 2006, p. 223.

Devem ser estabelecidos valores-limite para decidir da conformidade da amostra com os teores máximos ou para verificar se os limiares de intervenção, se relevantes, estão conformes aos respetivos teores máximos ou limiares de intervenção fixados tanto para os PCDD/F e os PCB sob a forma de dioxina, isoladamente, como para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina. São representados pela extremidade *inferior* da distribuição dos resultados bioanalíticos (corrigidos em função do ensaio em branco e da recuperação) correspondendo ao limite de decisão do método de confirmação com base num nível de confiança de 95 %, o que implica uma taxa de falsos resultados conformes < 5 %, e uma RSD_R < 25 %. O limite de decisão do método de confirmação é o teor máximo, tendo em conta a incerteza de medição expandida.

O valor-limite (em BEQ) pode ser calculado em conformidade com uma das abordagens mencionadas nos pontos 7.3.1, 7.3.2 e 7.3.3 (ver figura 1).

7.3.1. Utilização da faixa *inferior* do intervalo de previsão de 95 % no limite de decisão do método de confirmação

$$\text{Valor} - \text{limite} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha,f=m-2}\sqrt{1/n + 1/m + (x_1 - \bar{x})^2/Q_{xx}}$$

em que:

BEQ_{DL} =	BEQ correspondente ao limite de decisão do método de confirmação, trata-se do teor máximo, tendo em conta a incerteza de medição expandida
$s_{y,x}$ =	desvio-padrão residual
$t_{\alpha,f=m-2}$ =	fator de *Student* (α = 5 %, f = graus de liberdade, unilateral)
m =	número total de pontos de calibração (índice j)
n =	número de repetições para cada teor
x_i =	concentração da amostra (em TEQ) do ponto de calibração i, determinada por um método de confirmação
$\bar{x}$	média das concentrações (em TEQ) de todas as amostras de calibração
$Q_{xx} = \sum_{j=1}^{m}(x_1 - \bar{x})^2$	parâmetro do quadrado da soma, i = índice do ponto de calibração i

7.3.2. Cálculo a partir dos resultados bioanalíticos (corrigidos em função do ensaio em branco e da recuperação) de múltiplas análises de amostras (n ≥ 6), contaminadas no limite de decisão do método de confirmação, como a extremidade *inferior* da distribuição dos dados no valor BEQ médio correspondente:

$$\text{Valor} - \text{limite} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_{\text{R}}$$

em que:

SD_R	desvio-padrão dos resultados do bioensaio no BEQ_{DL}, medidos em condições de reprodutibilidade intralaboratorial

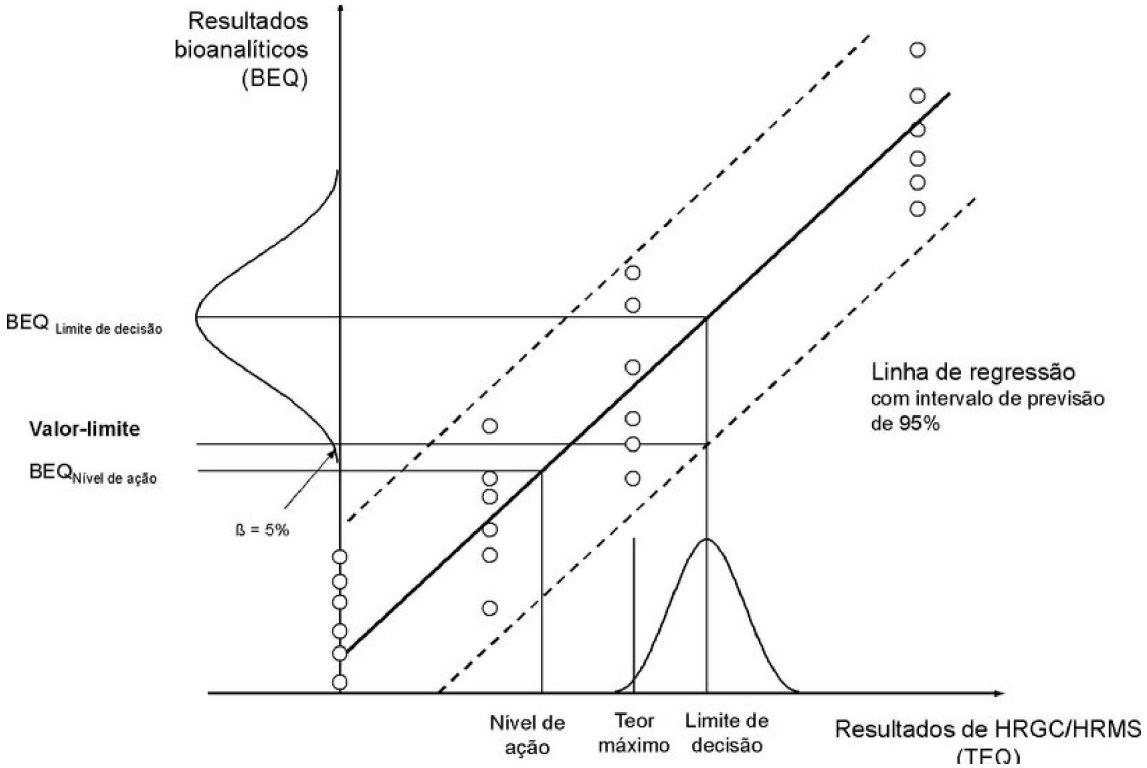
7.3.3. Cálculo como valor médio dos resultados bioanalíticos (em BEQ, corrigido em função do ensaio em branco e da recuperação) a partir de análises múltiplas de amostras (n ≥ 6) contaminadas a dois terços do teor máximo ou do limiar de intervenção, com base na observação de que este teor estará próximo do valor-limite determinado em conformidade com o ponto 7.3.1 ou com o ponto 7.3.2:

Cálculo dos valores-limite com base num nível de confiança de 95 %, o que implica uma taxa de falsos resultados conformes < 5 %, e uma RSD_R < 25 %:

1. A partir da faixa *inferior* do intervalo de previsão de 95 % no limite de decisão do método de confirmação.

2. A partir de análises múltiplas de amostras (n ≥ 6) contaminadas no limite de decisão do método de confirmação, como a extremidade *inferior* da distribuição dos dados (representado na Figura 1 por uma curva em forma de sino) no valor BEQ médio correspondente.

Figura 1



7.3.4. Restrições aos valores-limite

Os valores-limite baseados no valor BEQ, calculados a partir da RSD_R obtida durante a validação utilizando um número limitado de amostras com diferentes padrões de matrizes/congéneres, podem ser superiores aos teores máximos ou aos limiares de intervenção baseados no valor TEQ, devido a uma melhor precisão do que a que é possível em análises de rotina quando tem de ser controlado um espetro desconhecido de possíveis padrões de congéneres. Em tais casos, os valores-limite devem ser calculados a partir de uma RSD_R = 25 %, ou, de preferência, a dois terços do teor máximo ou do limiar de intervenção.

7.4. *Características de desempenho*

7.4.1. Uma vez que não se podem utilizar padrões internos nos métodos bioanalíticos, devem ser realizados testes de repetibilidade de métodos bioanalíticos para se obter informações sobre o desvio-padrão numa série de testes e entre séries de testes. A repetibilidade deve ser inferior a 20 % e a reprodutibilidade intralaboratorial inferior a 25 %. Tal deve basear-se nos valores calculados em BEQ após correção em função do ensaio em branco e da recuperação.

7.4.2. Como parte do processo de validação, o teste deve demonstrar que discrimina entre uma amostra em branco e um teor no valor-limite, permitindo a identificação de amostras acima do valor-limite correspondente (ver ponto 7.1.2).

7.4.3. Devem ser definidos os compostos-alvo, as possíveis interferências e os teores máximos toleráveis para a amostra em branco.

7.4.4. O desvio-padrão percentual na resposta ou concentração calculada a partir da resposta (apenas possível na gama de trabalho) de uma determinação em triplicado de um extrato da amostra não pode ser superior a 15 %.

7.4.5. Os resultados não corrigidos das amostras de referência expressos em BEQ (no ensaio em branco e no teor máximo ou limiar de intervenção) devem ser utilizados para a avaliação do desempenho do método bioanalítico durante um período de tempo constante.

7.4.6. Devem registar-se e verificar-se os gráficos de controlo da qualidade para os ensaios em branco do procedimento e para cada tipo de amostra de referência, a fim de garantir que o desempenho analítico está em conformidade com os requisitos, nomeadamente, no tocante aos ensaios em branco do procedimento, no que respeita à diferença mínima requerida em relação à extremidade inferior da gama de trabalho, e, no tocante às amostras de referência, no que respeita à reprodutibilidade intralaboratorial. Os ensaios em branco do procedimento devem ser controlados de modo a evitar falsos resultados conformes quando subtraídos.

7.4.7. Os resultados dos métodos de confirmação de amostras suspeitas e 2 % a 10 % das amostras conformes (mínimo de 20 amostras por matriz) devem ser recolhidos e utilizados para avaliar o desempenho do método de rastreio e a relação entre BEQ e TEQ. Esta base de dados pode ser utilizada para efeitos de reavaliação dos valores-limite aplicáveis às amostras de rotina para as matrizes validadas.

7.4.8. Os bons desempenhos do método podem também ser demonstrados pela participação em ensaios interlaboratoriais. Os resultados de amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, abrangendo uma gama de concentrações que pode atingir, por exemplo, duas vezes o teor máximo, podem ser incluídos na avaliação da taxa de falsos resultados conformes, se um laboratório estiver em condições de demonstrar os seus bons desempenhos. As amostras devem abranger os padrões de congéneres mais frequentes, que representem diferentes fontes.

7.4.9. Em caso de incidentes, os valores-limite podem ser reavaliados, refletindo a matriz e os padrões de congéneres específicos para cada incidente.

8. **Notificação dos resultados**

8.1. *Métodos de confirmação*

8.1.1. Os resultados analíticos devem conter os teores de cada congénere de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina e os valores TEQ devem ser notificados em termos de limite inferior, limite superior e limite médio, a fim de incluir o máximo de informações possível na notificação dos resultados e, deste modo, permitir a interpretação dos resultados de acordo com requisitos específicos.

8.1.2. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.

8.1.3. As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas no caso de as recuperações estarem fora da gama mencionada no ponto 6.2.5, se o teor máximo for excedido (neste caso, as recuperações para uma das duas análises em duplicado) e noutros casos mediante pedido.

8.1.4. Como a incerteza de medição expandida a deve ser tida em conta ao decidir da conformidade de uma amostra, este parâmetro deve ser disponibilizado. Assim, o resultado analítico deve ser notificado enquanto "x +/- U", em que x é o resultado analítico e U é a incerteza de medição expandida, utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. No caso de uma determinação em separado dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina, a soma da incerteza expandida estimada dos resultados analíticos separados dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina deve ser utilizada para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.

8.1.5. Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com, pelo menos, o mesmo número de algarismos significativos que os teores máximos definidos na Diretiva 2002/32/CE.

8.2. *Métodos bioanalíticos de rastreio*

8.2.1. O resultado do rastreio deve ser expresso como "conforme" ou "suspeito de ser não conforme" ("suspeito").

8.2.2. Além disso, pode ser dado um resultado indicativo de PCDD/F e/ou de PCB sob a forma de dioxina expresso em BEQ, e não TEQ.

8.2.3. As amostras com uma resposta inferior ao limite de notificação devem ser indicadas como "inferiores ao limite de notificação". As amostras com uma resposta acima da gama de trabalho devem ser indicadas como "excedendo a gama de trabalho" e o teor correspondente à extremidade superior da gama de trabalho deve ser dado em BEQ.

8.2.4. Para cada tipo de matriz da amostra, o relatório deve mencionar o teor máximo ou o limiar de intervenção em que se baseia a avaliação.

8.2.5. O relatório deve mencionar o tipo de teste aplicado, o princípio de base do teste e o tipo de calibração.

8.2.6. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.

8.2.7. Em caso de amostras suspeitas de não conformidade, o relatório deve incluir uma nota sobre as medidas a adotar. A concentração de PCDD/F e a soma de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nas amostras com teores elevados tem de ser determinada/confirmada por um método de confirmação.

8.2.8. Os resultados não conformes só devem ser notificados a partir de análises de confirmação.

8.3. *Métodos físico-químicos de rastreio*

8.3.1. O resultado do rastreio deve ser expresso como "conforme" ou "suspeito de ser não conforme" ("suspeito").

8.3.2. Para cada tipo de matriz da amostra, o relatório deve mencionar o teor máximo ou o limiar de intervenção em que se baseia a avaliação.

8.3.3. Além disso, podem ser indicados os teores de cada congénere de PCDD/F e/ou PCB sob a forma de dioxina e os valores TEQ notificados em termos de limite inferior, limite superior e limite médio. Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com, pelo menos, o mesmo número de algarismos significativos que os teores máximos definidos na Diretiva 2002/32/CE.

8.3.4. As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas no caso de as recuperações estarem fora da gama mencionada no ponto 6.2.5, se o teor máximo for excedido (neste caso, as recuperações para uma das duas análises em duplicado) e noutros casos mediante pedido.

8.3.5. O relatório deve mencionar o método GC-MS aplicado.

8.3.6. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.

8.3.7. Em caso de amostras suspeitas de não conformidade, o relatório deve incluir uma nota sobre as medidas a adotar. A concentração de PCDD/F e a soma de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nas amostras com teores elevados tem de ser determinada/confirmada por um método de confirmação.

8.3.8. Só se pode decidir que existe não conformidade após a realização de análises de confirmação.

CAPÍTULO III

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E REQUISITOS RESPEITANTES AOS MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS NO CONTROLO OFICIAL DOS TEORES DE PCB NÃO SEMELHANTES A DIOXINAS EM ALIMENTOS PARA ANIMAIS

1. **Âmbito de aplicação**

Os requisitos expostos no presente capítulo devem ser aplicados quando se analisam alimentos para animais para efeitos de controlo oficial dos teores de PCB não semelhantes a dioxinas, bem como no que se refere à preparação das amostras e aos requisitos analíticos para outros fins regulamentares, incluindo os controlos efetuados pelos operadores das empresas do setor dos alimentos para animais para assegurar a conformidade com o disposto no Regulamento (CE) n.º 183/2005.

2. **Métodos de deteção aplicáveis**

Cromatografia gasosa/deteção por captura de eletrões (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ou métodos equivalentes.

3. **Identificação e confirmação dos analitos requeridos**

3.1. Tempo de retenção relativo em relação a padrões internos ou padrões de referência (desvio aceitável de ± 0,25 %).

3.2. Separação, por cromatografia gasosa, dos PCB não semelhantes a dioxinas das substâncias interferentes, especialmente PCB coeluídos, em especial se os teores das amostras se situarem na gama dos limites legais e for necessário confirmar a não conformidade ([13]).

3.3. Requisitos aplicáveis a técnicas GC-MS

Verificação de, pelo menos, o seguinte número de iões moleculares ou de iões característicos do grupo dentro da molécula:

a) Dois iões específicos, para a HRMS;

b) Três iões específicos, para a LRMS;

c) Dois iões precursores específicos, cada um com um ião-produto de transição correspondente, para a MS-MS.

Tolerâncias máximas permitidas para os rácios de abundância de fragmentos de massa selecionados:

Desvio relativo do rácio de abundância de fragmentos de massa selecionados em relação à abundância teórica ou ao padrão de calibração para o ião-alvo (ião mais abundante controlado) e os iões qualificadores: ± 15 %.

3.4. Requisitos aplicáveis a técnicas GC-ECD

Devem confirmar-se os resultados que excedem o teor máximo por meio de duas colunas de GC com fases estacionárias de polaridade diferente.

4. **Demonstração do desempenho do método**

Deve validar-se o desempenho do método na gama do teor máximo (0,5 a duas vezes o teor máximo) com um coeficiente de variação aceitável para análises repetidas (ver requisitos aplicáveis à precisão intermédia mencionados no ponto 9).

5. **Limite de quantificação**

A soma dos LOQ ([14]) dos PCB não semelhantes a dioxinas não pode ser superior a um terço do teor máximo ([15]).

6. **Controlo da qualidade**

Controlos regulares com ensaios em branco, análise de amostras enriquecidas, amostras de controlo da qualidade, participação em estudos interlaboratoriais em matrizes relevantes.

7. **Controlo das recuperações**

7.1. Devem utilizar-se padrões internos adequados, com propriedades físico-químicas comparáveis às dos analitos requeridos.

7.2. Adição de padrões internos:

Adição a produtos (antes do processo de extração e limpeza).

7.3. Requisitos para os métodos que utilizem os seis congéneres de PCB não semelhantes a dioxinas marcados com isótopos:

a) Os resultados devem ser corrigidos em função das recuperações de padrões internos;

b) As recuperações de padrões internos marcados com isótopos devem situar-se entre 60 % e 120 %;

c) São aceitáveis recuperações inferiores ou superiores para congéneres individuais cujo contributo para a soma dos PCB não semelhantes a dioxinas seja inferior a 10 %.

([13]) Os congéneres que coeluem frequentemente são, por exemplo, os PCB 28/31, PCB 52/69 e PCB 138/163/164. Em relação à GC-MS, devem também ter-se em conta as eventuais interferências de fragmentos de congéneres mais fortemente clorados.

([14]) Quando aplicável, devem seguir-se os princípios descritos no *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food*, (https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931).

([15]) Recomenda-se vivamente que o contributo do teor do reagente no ensaio em branco seja inferior ao do teor de um contaminante na amostra. Compete ao laboratório controlar a variação dos valores do branco, especialmente se esses valores forem subtraídos.

7.4. Requisitos para os métodos que não utilizem os seis padrões internos marcados com isótopos ou que utilizem outros padrões internos:

a) A recuperação de padrões internos deve ser controlada para cada amostra;

b) As recuperações de padrões internos devem situar-se entre 60 % e 120 %;

c) Os resultados devem ser corrigidos em função das recuperações de padrões internos.

7.5. As recuperações de congéneres não marcados devem ser verificadas por amostras enriquecidas ou amostras de controlo da qualidade com concentrações na gama do teor máximo. Consideram-se aceitáveis as recuperações destes congéneres se se situarem entre 60 % e 120 %.

8. **Requisitos aplicáveis aos laboratórios**

Em conformidade com o disposto no Regulamento (UE) 2017/625, os laboratórios devem ser acreditados por um organismo reconhecido que opere em conformidade com o Guia ISO/IEC 58, a fim de assegurar que aplicam a garantia de qualidade analítica. Os laboratórios devem ser acreditados em conformidade com a norma EN ISO/IEC/17025. Além disso, devem seguir-se, quando aplicáveis, os princípios descritos nas orientações técnicas relativas à estimativa da incerteza de medição e dos limites de quantificação para a análise de PCB ([16]).

9. **Características de desempenho: critérios aplicáveis à soma dos PCB não semelhantes a dioxinas no teor máximo**

	Espetrometria de massa de diluição de isótopos (*)	Outras técnicas
Rigor	− 20 a + 20 %	− 30 a + 30 %
Precisão intermédia (RSD%)	≤ 15 %	≤ 20 %
Diferença do cálculo entre o limite superior e o limite inferior	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Devem ser utilizados como padrões internos os seis compostos análogos marcados com ^{13}C.

10. **Notificação dos resultados**

10.1. Os resultados analíticos devem conter os teores de cada congénere de PCB não semelhantes a dioxinas e da soma desses congéneres de PCB, indicados em termos de limite inferior, limite superior e limite médio, a fim de incluir o máximo de informações possível na notificação dos resultados e, deste modo, permitir a interpretação dos resultados de acordo com requisitos específicos.

10.2. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCB.

10.3. As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas no caso de as recuperações estarem fora da gama mencionada no ponto 7, se o teor máximo for excedido e noutros casos, mediante pedido.

10.4. Como a incerteza de medição expandida deve ser tida em conta ao decidir da conformidade de uma amostra, este parâmetro deve igualmente ser disponibilizado. Assim, o resultado analítico deve ser notificado enquanto "x +/- U", em que x é o resultado analítico e U é a incerteza de medição expandida, utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %.

10.5. Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com, pelo menos, o mesmo número de algarismos significativos que os teores máximos definidos na Diretiva 2002/32/CE.

([16]) Ver nota de rodapé 9.

B. NORMAS EN

As normas EN indicadas a seguir são pertinentes para a aplicação do artigo 34.º, n.º 2, alínea a), do Regulamento (UE) 2017/625:

EN 17194 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of Deoxynivalenol, Aflatoxin B1, Fumonisin B1 & B2, T-2 & HT-2 toxins, Zearalenone and Ochratoxin A in feed materials and compound feed by LC-MS/MS (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação de desoxinivalenol, aflatoxina B1, fumonisina B1 e B2, toxinas T-2 e HT-2, zearalenona e ocratoxina A em matérias-primas para a alimentação animal e em alimentos compostos para animais por LC-MS/MS)

EN 17270 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of theobromine in feed materials and compound feed, including cocoa derived ingredients, by liquid chromatography (Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação de teobromina em matérias-primas para a alimentação animal e em alimentos compostos para animais, nomeadamente em ingredientes derivados do cacau, por cromatografia líquida)

EN 17504 Métodos de amostragem e análise – Determinação do gossipol em sementes de algodão e alimentos para animais por cromatografia líquida/espetrometria de massa (LC-MS/MS)

EN 17362 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of pentachlorophenol (PCP) in feed materials and compound feed by LCMS/MS [Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação de pentaclorofenol (PCP) em matérias-primas para a alimentação animal e em alimentos compostos para animais por LC-MS/ /MS]

EN 16279 – Animal feeding stuffs – Determination of fluoride content after hydrochloric acid treatment by ion-sensitive electrode method (ISE) (Alimentos para animais – Determinação do teor de fluoreto pelo método do elétrodo sensível a iões (ISE) após tratamento com ácido clorídrico)

EN 17053 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of trace elements, heavy metals and other elements in feed by ICP-MS (multi-method) [Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação de oligoelementos, metais pesados e outros elementos nos alimentos para animais por ICP-MS (vários métodos)]

EN 15550 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of cadmium and lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS) after pressure digestion [Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação de cádmio e chumbo por espetrometria de absorção atómica com forno de grafite (GFAAS) após mineralização sob pressão]

EN 16206 – Animal feeding stuffs – Determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS) after microwave pressure digestion (digestion with 65 % nitric acid and 30 % hydrogen peroxide) [Alimentos para animais – Determinação do selénio por espetrometria de absorção atómica com geração de hidretos (HGAAS) após mineralização por micro-ondas sob pressão (mineralização com 65 % de ácido nítrico e 30 % de peróxido de hidrogénio)]

EN 16277 – Animal feeding stuffs – Determination of mercury by cold-vapour atomic absorption spectrometry (CVAAS) after microwave pressure digestion (extraction with 65 % nitric acid and 30 % hydrogen peroxide) [Alimentos para animais – Determinação do mercúrio por espetrometria de absorção atómica a vapor frio (CVAAS) após mineralização por micro--ondas sob pressão (extração com 65 % de ácido nítrico e 30 % de peróxido de hidrogénio)]

EN 16278 – Animal feeding stuffs – Determination of inorganic arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS) after microwave extraction and separation by solid phase extraction (SPE) [Alimentos para animais – Determinação do arsénio inorgânico por espetrometria de absorção atómica com geração de hidretos (HGAAS) após extração por micro--ondas e separação por extração em fase sólida (SPE)]

EN 17374 – Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of inorganic arsenic in animal feed by anion--exchange HPLC-ICP-MS [Alimentos para animais: Métodos de amostragem e análise – Determinação do arsénio inorgânico nos alimentos para animais por HPLC-ICP-MS com troca aniónica]»

ANEXO VI

«ANEXO VII

MÉTODO DE CÁLCULO DO VALOR ENERGÉTICO DOS ALIMENTOS PARA AVES DE CAPOEIRA

1. Modo de cálculo e expressão do valor energético

   O valor energético dos alimentos compostos destinados às aves de capoeira é calculado segundo a fórmula adiante indicada, a partir da percentagem de determinados componentes analíticos dos alimentos. Esse valor é expresso em megajoules (MJ), de energia metabolizável (EM), corrigida para o azoto, por quilograma de alimento composto tal que:

   MJ/kg de EM = 0,1551 × % de proteína bruta + 0,3431 × % de matérias gordas brutas + 0,1669 × % de amido + 0,1301 × % de açúcares totais (expressos em sacarose).

2. Tolerâncias aplicáveis aos valores declarados

   Se, na sequência de um controlo oficial, for constatada uma diferença entre o resultado do controlo e o valor declarado (valor energético do alimento superior ou inferior) é aplicada uma tolerância mínima de 0,4 MJ/kg de EM.

3. Expressão dos resultados

   Após a aplicação da fórmula pré-citada, o resultado obtido é expresso com uma casa decimal.

4. Métodos de amostragem e análise

   A colheita da amostra do alimento composto e a determinação do teor dos componentes analíticos indicados no método de cálculo são realizados segundo os métodos da União de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais.

   São aplicáveis:

   — para a determinação do teor de matérias gordas brutas: o procedimento B do método de determinação do teor de matérias gordas brutas, estabelecido na parte G do anexo III,

   — para a determinação do teor de amido: o método polarimétrico estabelecido na parte K do anexo III.

MÉTODO DE CÁLCULO DO VALOR ENERGÉTICO DAS MATÉRIAS-PRIMAS PARA A ALIMENTAÇÃO ANIMAL E DOS ALIMENTOS COMPOSTOS PARA CÃES E GATOS

O valor energético das matérias-primas para a alimentação animal e dos alimentos compostos para cães e gatos é calculado em conformidade com a norma *EN 16967 – Alimentos para animais: Métodos de amostragem e de análise – Equações preditivas da energia metabolizável em matérias-primas para alimentação animal e alimentos compostos para animais (para animais de estimação) para gatos e cães, incluindo alimentos dietéticos.*»