

Decreto-Lei n.º 157/2000
de 22 de Julho

Nos controlos oficiais no domínio da alimentação animal são utilizados, na análise das amostras dos produtos, os métodos oficiais de análise definidos em portaria ou norma portuguesa ou, por força das decisões comunitárias, aprovados mediante decreto-lei.

Uma vez que não existe norma portuguesa relativa ao método para a determinação dos aditivos diclazuril e carbadox nos alimentos para animais e que os métodos de análise para a determinação do amprolium, diclazuril e do carbadox se encontram comunitariamente fixados na Directiva n.º 1999/27/CE, da Comissão, de 20 de Abril, há que proceder à sua transposição para a ordem jurídica nacional.

Procede-se ainda à revogação dos métodos oficiais de análise relativos à determinação da essência de mostarda, da teobromina, do retinol (vitamina A) e do amido, da dinitolmida (DOT), da menadiona (vitamina K3) e da nicarbazina, por se considerar que à luz do progresso técnico e científico estes já não satisfazem os objectivos pretendidos.

Foram ouvidos os órgãos do governo próprio das Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira.

Nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 198.º da Constituição, o Governo decreta o seguinte:

Artigo 1.º

Adopção de métodos oficiais de análise

1 - É adoptado o método oficial de análise a utilizar na determinação do teor de amprolium nos alimentos para animais e pré-misturas, no âmbito dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal, constante da parte A do anexo ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

2 - É adoptado o método oficial de análise a utilizar na determinação do teor de diclazuril nos alimentos para animais e pré-misturas, no âmbito dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal, constante da parte B do anexo ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

3 - É adoptado o método oficial de análise a utilizar na determinação do teor de carbadox nos alimentos para animais e pré-misturas e preparações contendo o aditivo, no âmbito dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal, constante da parte C do anexo ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

Artigo 2.º

Revogação de métodos oficiais de análise

São revogados os métodos oficiais de análise relativos à determinação da essência de mostarda, da teobromina, do retinol (vitamina A) e do amido, da dinitolmida (DOT), da menadiona (vitamina K3) e da nicarbazina, constantes do anexo à Portaria n.º 816/89, de 14 de Setembro.

Artigo 3.º

Métodos oficiais constantes em norma portuguesa

Não são aplicáveis, para efeitos dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal, as seguintes normas portuguesas:

- a) NP 3994, relativa à determinação do teor de essência de mostarda;
- b) NP 4019, relativa à determinação do teor de teobromina;
- c) NP 4051, relativa à determinação do teor de retinol (vitamina A);
- d) NP 2970, relativa à determinação do teor de amprolium;
- e) NP 3257, relativa à determinação do teor de etopabato;
- f) NP 4050, relativa à determinação do teor de dinitolmida (DOT);

- g) NP 4070, relativa à determinação do teor de nicarbazina;
h) NP 4134, relativa à determinação do teor de menadiona (vitamina K3).

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 8 de Junho de 2000. - António Manuel de Oliveira Guterres - Joaquim Augusto Nunes Pina Moura - Luís Manuel Capoulas Santos - Maria Manuela de Brito Arcanjo Marques da Costa.

Promulgado em 6 de Julho de 2000.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.

Referendado em 12 de Julho de 2000.

O Primeiro-Ministro, António Manuel de Oliveira Guterres.

ANEXO

PARTE A

Determinação do amprolium

Cloridrato de cloreto de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-picolínio

1 - Objectivo e campo de aplicação - o método permite determinar o amprolium em alimentos para animais e pré-misturas. O limite de detecção é de 1 mg/kg; o limite de determinação é de 25 mg/kg.

2 - Princípio - extracção da amostra com uma mistura de metanol e água. Diluição com a fase móvel, filtração por um filtro de membrana e determinação do teor de amprolium por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de permuta catiónica, com um detector de UV.

3 - Reagentes:

3.1 - Metanol;

3.2 - Acetonitrilo para HPLC;

3.3 - Água para HPLC;

3.4 - Solução 0,1 M de di-hidrogenofosfato de sódio - num balão aferido de 1000 ml, dissolver em água (3.3) 13,80 g de di-hidrogenofosfato de sódio mono-hidratado. Completar o volume com água (3.3) até ao traço e homogeneizar;

3.5 - Solução 1,6 M de perclorato de sódio - num balão aferido de 1000 ml, dissolver em água (3.3) 224,74 g de perclorato de sódio mono-hidratado. Completar o volume com água (3.3) até ao traço e homogeneizar;

3.6 - Fase móvel para HPLC (v. 9.1) - mistura 450 + 450 + 100 (v + v + v) de acetonitrilo (3.2), solução de di-hidrogenofosfato, de sódio (3.4) e solução de perclorato de sódio (3.5). Antes de utilizar a fase móvel, filtrar por um filtro de membrana de 0,22 (µm) (4.3) e desgaseificar a solução [por exemplo, num banho de ultra-sons (4.4) durante pelo menos quinze minutos];

3.7 - Substância padrão: amprolium puro cloreto de 1-[(4-amino-2-propilpirimidino-5-il)metil]-2- metilpiridínio, na forma de cloridrato, E750 (v. 9.2):

3.7.1 - Solução padrão de reserva de amprolium, 500 (µg)/ml - num balão aferido de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 50 mg de amprolium (3.7) e dissolver em 80 ml de metanol (3.1), colocando depois o balão durante dez minutos no banho de ultra-sons (4.4). Depois do tratamento com ultra-sons, levar a solução à temperatura ambiente, completar o volume com água até ao traço e homogeneizar. A temperaturas não superiores a 4°C, a solução mantém-se estável durante um mês;

3.7.2 - Solução padrão intermédia de amprolium, 50 (µg)/ml - pipetar 5,0 ml da solução padrão de reserva de amprolium (3.7.1) para um balão aferido de 50 ml. Completar o volume com solvente de extracção (3.8) até ao traço e homogeneizar. A temperaturas não superiores a 4°C, a solução mantém-se estável durante um mês;

3.7.3 - Soluções padrão de trabalho - transferir 0,5 ml, 1,0 ml e 2,0 ml da solução padrão intermédia (3.7.2) para uma série de balões aferidos de 50 ml. Completar o volume com a fase móvel (3.6) até ao traço e homogeneizar. As soluções obtidas contêm 0,5 (mi)g, 1,0 (mi) e 2,0 (mi)g de amprolium por mililitro, respectivamente, e são preparadas imediatamente antes da utilização;

3.8 - Solvente de extracção - mistura 2:1 (v + v) de metanol (3.1) e água (3.3).

4 - Equipamento:

4.1 - Equipamento de HPLC com sistema de injeção com capacidade de injeção de volumes de 100 (mi)l:

4.1.1 - Coluna para cromatografia líquida com 125 mm x 4 mm e enchimento de permuta catiónica Nucleosil 10 SA com granulometria de 10 (mi)m, ou equivalente;

4.1.2 - Detector de UV com regulação do comprimento de onda ou detector de fotodíodos;

4.2 - Filtro de membrana de PTFE, de 0,45 (mi)m;

4.3 - Filtro de membrana, de 0,22 (mi)m;

4.4 - Banho de ultra-sons;

4.5 - Agitador mecânico ou magnético.

5 - Procedimento:

5.1 - Generalidades:

5.1.1 - Alimento para animais branco - na determinação da recuperação (5.1.2), analisa-se um alimento para animais branco, para comprovar a ausência de amprolium e de substâncias interferentes. O alimento para animais branco deve ser de tipo similar ao da amostra e não devem ser detectados amprolium ou substâncias interferentes;

5.1.2 - Determinação da recuperação - para determinar a recuperação, procede-se à análise de um alimento para animais branco ao qual terá sido adicionada uma quantidade de amprolium semelhante à presente na amostra. Para obter uma concentração de 100 mg/kg no branco, transferir 10,0 ml da solução padrão de reserva de amprolium (3.7.1) para um erlenmeyer de 250 ml e concentrar por evaporação até cerca de 0,5 ml. Adicionar 50 g do alimento para animais branco, misturar bem e deixar em repouso durante dez minutos, misturando de novo várias vezes antes de proceder à extracção (5.2).

Caso não se disponha de um alimento para animais branco de tipo similar ao da amostra (v. 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 amprolium 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 subtracção:

5.2 - Extracção:

5.2.1 - Pré-misturas (teor de amprolium <1%) e alimentos para animais - num erlenmeyer de 500 ml, pesar, com uma aproximação de 0,01 g, 5 g a 40 g da amostra, em função do teor de amprolium, e adicionar 200 ml do solvente de extracção (3.8). Colocar o erlenmeyer no banho de ultra-sons (4.4) e deixar actuar durante quinze minutos. Retirar o erlenmeyer do banho e agitar ou misturar durante uma hora em agitador mecânico ou magnético (4.5). Tomar e diluir uma alíquota do extracto com a fase móvel (3.6), de modo a obter um teor de amprolium de 0,5 (mi)g/ml a 2 (mi)g/ml, e homogeneizar (v. a observação 9.3). Filtrar 5 ml a 10 ml desta solução diluída por um filtro de membrana (4.2). Efectuar em seguida a determinação por HPLC (5.3);

5.2.2 - Pré-misturas (teor de amprolium ≥1% - num erlenmeyer de 500 ml, pesar, com uma aproximação de 0,01 g, 1 g a 4 g da pré-mistura, em função do teor de amprolium, e adicionar 200 ml do solvente de extracção (3.8). Colocar o erlenmeyer no banho de ultra-sons (4.4) e deixar actuar durante quinze minutos. Retirar o erlenmeyer do banho e agitar ou misturar durante uma hora em agitador mecânico ou magnético (4.5). Tomar e diluir uma alíquota do extracto com a fase móvel (3.6), de modo a obter um teor de amprolium de 0,5 (mi)g/ml a 2

(mi)g/ml, e homogeneizar. Filtrar 5 ml a 10 ml desta solução diluída por um filtro de membrana (4.2). Efectuar em seguida a determinação por HPLC (5.3).

5.3 - Determinação 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 (4.1.1): 125 mm x 4 mm e enchimento de permuta catiónica Nucleosil 10 SA com granulometria de 10 (mi)m, ou equivalente;

Fase móvel (3.6): mistura 450 + 450 + 100 (v + v + v) de acetonitrilo (3.2), solução de di-hidrogenofosfato de sódio (3.4) e solução de perclorato de sódio (3.5);

Fluxo: 0,7 ml - 1 ml/minuto;

Comprimento de onda de detecção: 264 nm;

Volume injectado: 100 (mi)l.

Para verificar a estabilidade do sistema cromatográfico, injectar várias vezes a solução de calibração (3.7.3) com 1,0 (mi)g/ml até se obterem alturas de pico e tempos de retenção constantes;

5.3.2 - Curva de calibração - injectar várias vezes cada solução de calibração (3.7.3) e determinar a altura ou área média dos picos para cada concentração. Traçar uma curva de calibração, representando em ordenadas as alturas ou áreas médias dos picos das soluções de calibração e em abcissas as concentrações correspondentes em microgramas/mililitro;

5.3.3 - Solução da amostra - injectar várias vezes um volume de extracto da amostra (5.2) idêntico ao utilizado para as soluções de calibração e determinar a altura ou área média dos picos do amprolium.

6 - Cálculo dos resultados - a partir da altura ou área média dos picos do amprolium da solução da amostra, determinar a concentração desta em microgramas por mililitro com base na curva de calibração (5.3.2).

O teor de amprolium, w, da amostra, expresso em miligramas por quilograma é dado pela seguinte fórmula:

$$W = [(V \times (\text{beta}) \times F)/m] \text{ [mg/kg]}$$

Em que:

V = volume, em mililitros, do solvente de extracção (3.8), de acordo com 5.2 (isto é, 200 ml);

(beta) = concentração de amprolium, em microgramas por mililitro, do extracto da amostra (5.2);

f = factor de diluição, de acordo com 5.2;

m = massa, em gramas, da toma analisada.

7 - Validação dos resultados:

7.1 - Identidade - a identidade do analito pode ser confirmada por co-cromatografia ou com um detector de foto-díodos que permita comparar os espectros do extracto da amostra (5.2) e da solução de calibração (3.7.3) com 2,0 (mi)g/ml:

7.1.1 - Co-cromatografia - adiciona-se uma quantidade apropriada da solução de calibração (3.7.3) a um extracto da amostra (5.2). A quantidade de amprolium adicionada deve ser semelhante à existente no extracto da amostra.

Daí deve resultar unicamente um aumento da altura do pico do amprolium, contabilizadas a quantidade adicionada e a diluição do extracto. A largura do pico a meia altura não poderá diferir mais de 10% da largura inicial do pico do amprolium do extracto da amostra sem adição;

7.1.2 - Detecção com um sistema de fotodíodos - a avaliação dos resultados é feita com base nos seguintes critérios:

a) O comprimento de onda da absorção máxima dos espectros da amostra e do padrão registada no vértice do pico do cromatograma é o mesmo, com uma margem de variação

dependente da resolução do sistema de detecção. No caso da detecção com um sistema de díodos, essa margem é tipicamente de (mais ou menos) 2 nm;

b) Entre 210 nm e 320 nm, os espectros da amostra e do padrão no vértice do pico do cromatograma não diferem entre si nas partes do espectro compreendidas entre 10% e 100% de absorvância relativa. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e o desvio relativo dos dois espectros não exceder 15% da absorvância do analito padrão em nenhum ponto observado;

c) Entre 210 nm e 320 nm, os espectros da curva ascendente, do vértice e da curva descendente do pico do extracto da amostra não diferem entre si nas partes do espectro compreendidas entre 10% e 100% de absorvância relativa. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e o desvio relativo dos espectros em todos os pontos observados não exceder 15% da absorvância do espectro do vértice do pico.

Se algum destes critérios não for satisfeito, a presença do analito não terá sido confirmada;

7.2 - Repetibilidade - a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas para a mesma amostra não deve exceder:

Para teores de amprolium compreendidos entre 25 mg/kg e 500 mg/kg: 15% do maior dos valores;

Para teores de amprolium compreendidos entre 500 mg/kg e 1000 mg/kg: 75 mg/kg;

Para teores de amprolium superiores a 1000 mg/kg: 7,5% do maior dos valores;

7.3 - Recuperação - utilizando uma amostra (branco) adicionada, a recuperação deve ser pelo menos de 90%.

8 - Resultados de um teste interlaboratorial - apresentam-se no quadro seguinte os resultados das análises efectuadas a três alimentos para aves de capoeira (amostras 1 a 3), um suplemento mineral (amostra 4) e uma pré-mistura (amostra 5) no âmbito de um teste interlaboratorial:

(ver quadro no documento original)

9 - Observações:

9.1 - Se a amostra contiver tiamina, o pico da tiamina aparecerá no cromatograma imediatamente antes do pico do amprolium. Como o presente método exige a separação do amprolium da tiamina, se a coluna utilizada (4.1.1) não efectuar essa separação, substituir o acetonitrilo da fase móvel (3.6) por metanol até ao máximo de 50% da proporção do primeiro naquela;

9.2 - De acordo com a British Pharmacopeia, o espectro de uma solução 0,02 M de amprolium em ácido clorídrico 0,1 M apresenta máximos a 246 nm e 262 nm. As absorvâncias serão, respectivamente, 0,84 e 0,80;

9.3 - O extracto deve ser sempre diluído com fase móvel. Caso contrário, devido a variações da força iónica, o tempo de retenção do pico do amprolium pode apresentar desvios significativos.

PARTE B

Determinação do diclazuril

2,6 cloro-alfa-(4-clorofenil)-4-,4,5-di-hidro-3,5-dioxo-1,2,4-triacina-2(3H)-il)benzeno acetonitrilo

1 - Objectivo e campo de aplicação - o método permite determinar o diclazuril em alimentos para animais e pré-misturas. O limite de detecção é de 0,1 mg/kg; o limite de determinação é de 0,5 mg/kg.

2 - Princípio - depois de adicionado um padrão interno, submete-se a amostra a uma operação de extracção com metanol acidificado. No caso dos alimentos para animais, purifica-se uma alíquota do extracto num cartucho de extracção com fase sólida C18, 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 extracto e dissolve-se o resíduo em

DMF/água. O teor de diclazuril é determinado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de fase reversa, com um detector de UV.

3 - Reagentes:

3.1 - Água para HPLC;

3.2 - Acetato de amónio;

3.3 - Hidrogenossulfato de tetrabutylamónio (TBHS);

3.4 - Acetonitrilo para HPLC;

3.5 - Metanol para HPLC;

3.6 - N,N-dimetilformamida (DMF);

3.7 - Ácido clorídrico, (ρ)(índice 20) = 1,19 g/ml;

3.8 - Substância padrão: diclazuril II-24, 2,6 cloro-alfa-(4-clorofenil)-4-,4,5-di-hidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazina-2(3H)-il)benzeno acetonitrilo de grau de pureza garantido, E771:

3.8.1 - Solução padrão de reserva de diclazuril, 500 (µi)g/ml - num balão aferido de 50 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 25 mg de diclazuril padrão (3.8). Dissolver em DMF (3.6), completar o volume com DMF (3.6) até ao traço e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar num frigorífico. A temperaturas não superiores a 4°C, a solução mantém-se estável durante um mês;

3.8.2 - Solução padrão intermédia de diclazuril, 50 (µi)g/ml - transferir 5,00 ml da solução padrão de reserva (3.8.1) para um balão aferido de 50 ml, completar o volume com DMF (3.6) até ao traço e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar num 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(alfa)-(-4-clorofenil)-4-[4,5-di-hidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazina-2(3H)-il]-(alfa)-metilbenzenoacetonitrilo;

3.9.1 - Solução de reserva do padrão interno, 500 (µi)g/ml - num balão aferido de 50 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 25 mg do padrão interno (3.9), dissolver em DMF (3.6), completar o volume com DMF (3.6) até ao traço e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar num frigorífico. A temperaturas não superiores a 4°C, a solução mantém-se estável durante um mês;

3.9.2 - Solução intermédia do padrão interno, 50 (µi)g/ml - transferir 5,00 ml da solução de reserva do padrão interno (3.9.1) para um balão aferido de 50 ml, completar o volume com DMF (3.6) até ao traço e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar num 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/1000 mg/ml («p» é o teor nominal, em miligramas por quilograma, de diclazuril da pré-mistura) - num balão aferido de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, p/10 mg do padrão interno, dissolver em DMF (3.6) num banho de ultra-sons (4.6), completar o volume com DMF até ao traço e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar num frigorífico. A temperaturas não superiores a 4°C, a solução mantém-se estável durante um mês;

3.10 - Solução de padrão de trabalho, 2 (µi)g/ml - pipetar 2,00 ml da solução padrão intermédia de diclazuril (3.8.2) e 2,00 ml da solução intermédia do padrão interno (3.9.2) para um balão aferido de 50 ml. Adicionar 16 ml de DMF (3.6), completar o volume com água até ao traço e homogeneizar. Esta solução é preparada imediatamente antes da utilização;

3.11 - Cartucho de extracção com fase sólida C18, por exemplo Bond Elut; volume: 1 cm³, em massa de substância adsorvente: 100 mg;

3.12 - Solvente de extracção: metanol acidificado - pipetar 5,0 ml de ácido clorídrico (3.7) para um recipiente com 1000 ml de metanol (3.5) e homogeneizar;

3.13 - Fase móvel para: HPLC - eluente A: solução de acetato de amónio e hidrogenossulfato de tetrabutylamónio;

3.13.1 - Dissolver 5 g de acetato de amónio (3.2) e 3,4 g de TBHS (3.3) em 1000 ml de água (3.1) e homogeneizar;

3.13.2 - Eluente B: acetonitrilo (3.4);

3.13.3 - Eluente C: metanol (3.5).

4 - Equipamento:

4.1 - Agitador mecânico ou magnético;

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 com granulometria de 3 (µm), ou equivalente;

4.2.2 - Detector de UV com regulação do comprimento de onda ou detector de fotodíodos;

4.3 - Evaporador rotativo sob vácuo;

4.4 - Filtro de membrana de 0,45 (µm);

4.5 - Sistema de vácuo;

4.6 - Banho de ultra-sons;

5 - Procedimento:

5.1 - Generalidades:

5.1.1 - Alimento para animais branco - procede-se à análise de um alimento para animais branco, para comprovar a ausência de diclazuril e de substâncias interferentes. O alimento para animais branco deve ser de tipo similar ao da amostra e não devem ser detectados diclazuril ou substâncias interferentes nas análises;

5.1.2 - Determinação da recuperação - para determinar a recuperação, procede-se à análise de um alimento para animais branco ao qual terá sido adicionada uma quantidade de diclazuril semelhante à presente na amostra. Para obter uma concentração de 1 mg/kg, adicionar 0,1 ml da solução padrão de reserva de diclazuril (3.8.1) a 50 g do alimento para animais branco, misturar bem e deixar em repouso durante dez minutos, misturando de novo várias vezes antes de prosseguir (5.2).

Caso não se disponha de um alimento para animais branco de tipo similar ao da amostra (v. 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 para animais - pesar, com uma aproximação de 0,01 g, cerca de 50 g de amostra. Transferir a quantidade pesada para um erlenmeyer de 500 ml, adicionar 1,00 ml da solução do padrão interno (3.9.2) e 200 ml do solvente de extração (3.12) e tapar. Colocar o erlenmeyer no agitador (4.1) e deixar a agitar de um dia para o outro. Deixar assentar durante dez minutos. Transferir uma alíquota de 20 ml do líquido sobrenadante para um recipiente de vidro adequado e diluir com 20 ml de água. Verter esta solução num cartucho de extração (3.11) e forçar a passagem por aplicação de vácuo (4.5). Lavar o cartucho com 25 ml de uma mistura 65 + 35 (v + v) de solvente de extração (3.12) e água. Rejeitar as fracções recolhidas e eluir os compostos retidos com 25 ml de uma mistura 80 + 20 (v + v) de solvente de extração (3.12) e água. Evaporar esta fracção a 60°C num evaporador rotativo (4.3), suspendendo a operação logo que seja atingida a secura. Dissolver o resíduo em 1,0 ml de DMF (3.6), adicionar 1,5 ml de água (3.1) e homogeneizar. Filtrar por um filtro de membrana (4.4). Efectuar em seguida a determinação por HPLC (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 erlenmeyer de 500 ml, adicionar 1,00 ml da solução do padrão interno (3.9.3) e 200 ml do solvente de extração (3.12) e tapar. Colocar o

erlenmeyer no agitador (4.1) e deixar a agitar de um dia para o outro. Deixar assentar durante dez minutos;

Transferir uma alíquota de 10000/p ml e («p» é o teor nominal, em miligramas por quilograma, 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 (4.3), suspendendo a operação logo que seja atingida a secura. Redissolver o resíduo em 10,0 ml de DMF (3.6), adicionar 15,0 ml de água (3.1) e homogeneizar. Efectuar em seguida a determinação por HPLC (5.3);

5.3 - Determinação 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 (4.2.1): 100 mm x 4,6 mm e enchimento Hypersil ODS com granulometria de 3 (mi)m, ou equivalente;

Fase móvel:

Eluente A (3.13.1): solução aquosa de acetato de amónio e hidrogenossulfato de tetrabutylamónio;

Eluente B (3.13.2): acetonitrilo;

Eluente C (3.13.3): metanol;

Modo de eluição:

Gradiente linear;

Condições iniciais: $a + b + c = 60 + 20 + 20$ (v + v + v);

Após dez minutos, aplicação de um gradiente de eluição por forma a atingir $a + b + c = 45 + 20 + 35$ (v + v + v) ao fim de trinta minutos;

Lavagem com B durante dez minutos;

Fluxo 1,5-2 ml/minuto;

Volume injectado - 20 (mi)l;

Comprimento de onda de detecção - 280 nm.

Para verificar a estabilidade do sistema cromatográfico, injectar várias vezes a solução de calibração (3.10), de concentração 2,0 (mi)g/ml até se obterem alturas de pico e tempos de retenção constantes;

5.3.2 - Solução de calibração - injectar várias vezes 20 (mi)l da solução padrão de trabalho (3.10) e determinar a altura ou área média dos picos do diclazuril e do padrão interno;

5.3.3 - Solução da amostra - injectar várias vezes 20 (mi)l da solução da amostra (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 para animais - o teor de diclazuril, w, da amostra, expresso em miligramas por quilograma, é dado pela seguinte fórmula:

$$w = \left[\frac{(h(\text{índice } d,s) \times h(\text{índice } i,c))}{(h(\text{índice } i,s) \times h(\text{índice } d,c))} \right] \times \left(\frac{(\text{beta})(\text{índice } d,c)}{10V} \right) [\text{mg/kg}]$$

em que:

$h(\text{índice } d,s)$ = altura ou área do pico do diclazuril da solução da amostra (5.2.1);

$h(\text{índice } i,s)$ = altura ou área do pico do padrão interno da solução da amostra (5.2.1);

$h(\text{índice } d,c)$ = altura ou área do pico do diclazuril da solução de calibração (3.10);

$h(\text{índice } i,c)$ = altura ou área do pico do padrão interno da solução de calibração, (3.10);

$(\text{beta})(\text{índice } d,c)$ = concentração de diclazuril, em microgramas por mililitro, da solução de calibração (3.10);

m = massa, em grama, da toma analisada;

V = volume, em mililitros, do extracto da amostra, de acordo com 5.2.1 (isto é, 2,5 ml).

6.2 - Pré-misturas - o teor de diclazuril, w, da amostra, expresso em miligramas por quilograma é dado pela seguinte fórmula:

$w = [((h(\text{índice } d,s) \times h(\text{índice } i,c))/(h(\text{índice } i,s)h(\text{índice } d,c))) \times ((\beta)(\text{índice } d,c) 0,02V \times p)/m)] [mg/kg]$

em que:

$h(\text{índice } d,c)$ = altura ou área do pico do diclazuril da solução de calibração (3.10);

$h(\text{índice } i,c)$ = altura ou área do pico do padrão interno da solução de calibração (3.10);

$h(\text{índice } d,s)$ = altura ou área do pico do diclazuril da solução da amostra (5.2.2);

$h(\text{índice } i,s)$ = altura ou área do pico do padrão interno da solução da amostra (5.2.2);

$(\beta)(\text{índice } d,c)$ = concentração de diclazuril da solução de calibração (3.10);

m = massa, em grama, da toma analisada;

V = volume do extracto da amostra, de acordo com 5.2. (isto é, 25 ml).

p = teor nominal, em miligramas por quilograma, de diclazuril da pré-mistura.

7 - Validação dos resultados:

7.1 - Identidade - a identidade do analito pode ser confirmada por co-cromatografia ou com um detector de fotodíodos que permita comparar os espectros do extracto da amostra (5.2.1 ou 5.2.2) e da solução de calibração (3.10).

7.1.1 - Co-cromatografia - adiciona-se uma quantidade apropriada da solução de calibração (3.10) a um extracto da amostra (5.2.1 ou 5.2.2). A quantidade de diclazuril adicionada deve ser semelhante à existente no extracto da amostra.

Daí deve resultar unicamente um aumento da altura do pico do diclazuril e do pico do padrão interno, contabilizadas a quantidade adicionada e a diluição do extracto. A largura a meia altura desses picos não poderá diferir mais de 10% da largura inicial do pico do diclazuril e do pico do padrão interno, respectivamente, do extracto da amostra sem adição;

7.1.2 - Detecção com um sistema de fotodíodos - a avaliação dos resultados é feita com base nos seguintes critérios:

a) O comprimento de onda da absorção máxima dos espectros da amostra e do padrão registada no vértice do pico do cromatograma é o mesmo, com uma margem de variação dependente da resolução do sistema de detecção. No caso da detecção com um sistema de díodos, essa margem é tipicamente de (mais ou menos) 2 nm;

b) Entre 230 nm e 320 nm, os espectros da amostra e do padrão no vértice do pico do cromatograma não diferem entre si nas partes do espectro compreendidas entre 10% e 100% de absorvância relativa. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e o desvio relativo dos dois espectros não exceder 15% da absorvância do analito padrão em nenhum ponto observado;

c) Entre 230 nm e 320 nm, os espectros da curva ascendente, do vértice e da curva descendente do pico do extracto da amostra não diferem entre si nas partes do espectro compreendidas entre 10% e 100% de absorvância relativa. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e o desvio relativo dos espectros em todos os pontos observados não exceder 15% da absorvância do espectro do vértice do pico.

Se algum destes critérios não for satisfeito, a presença do analito não terá sido confirmada;

7.2 - Repetibilidade - a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas para a mesma amostra não deve exceder:

Para teores de diclazuril compreendidos entre 0,5 mg/kg e 2,5 mg/kg: 30% do maior dos valores;

Para teores de diclazuril compreendidos entre 2,5 mg/kg e 5 mg/kg: 0,75 mg/kg;

Para teores de diclazuril superiores a 5 mg/kg: 15% do maior dos valores.

7.3 - Recuperação - utilizando uma amostra (branco) adicionada, a recuperação deve ser pelo menos de 80%.

8 - Resultados de um teste interlaboratorial - foi organizado um teste interlaboratorial, que envolveu a análise de 5 amostras em 11 laboratórios. Foram analisadas 2 amostras de pré-misturas (uma, O 100, misturada com uma matriz orgânica; a outra, A 100, com uma matriz

inorgânica), com um teor teórico de diclazuril de 100 mg/kg, e 3 amostras (L1, Z1 e K1) de misturas alimentares para aves de capoeira de três produtores distintos dos Países Baixos, com um teor teórico de diclazuril de 1 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, pp. 1359-1361, podem ser encontrados elementos mais pormenorizados sobre o teste interlaboratorial efectuado.) Os resultados obtidos figuram no quadro seguinte:

(ver quadro no documento original)

9 - Observações - é necessário comprovar previamente a linearidade da resposta ao diclazuril em toda a gama de concentrações objecto das determinações.

PARTE C

Determinação do carbadox

N(elevado a 1), N(elevado a 4)-dióxido de metil-3-(2-quinoxalinilmetileno)carbazato

1 - Objectivo e campo de aplicação - o método permite determinar o carbadox em alimentos para animais, pré-misturas e preparações. O limite de detecção é de 1 mg/kg; o limite de determinação é de 10 mg/kg.

2 - Princípio - adição de água à amostra, estabilização e extracção com uma mistura de metanol e acetonitrilo. No caso dos alimentos para animais, limpeza de uma alíquota do extracto filtrado numa coluna de óxido de alumínio. No caso das pré-misturas e preparações, diluição apropriada de uma alíquota do extracto filtrado com água, metanol e acetonitrilo. Determinação do teor de carbadox por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de fase reversa, com um detector de UV.

3 - Reagentes:

3.1 - Metanol;

3.2 - Acetonitrilo, para HPLC;

3.3 - Ácido acético, a 100%;

3.4 - Óxido de alumínio (neutro, grau de actividade I);

3.5 - Mistura 1 + 1 (v + v) de metanol e acetonitrilo - misturar 500 ml de metanol (3.1) com 500 ml de acetonitrilo (3.2);

3.6 - Ácido acético a 10% - diluir 10 ml de ácido acético (3.3) com água até ao volume total de 100 ml;

3.7 - Acetato de sódio (CH₃(índice 3)COONa);

3.8 - Água para HPLC;

3.9 - Tampão acetato (0,01 M, pH 6,0) - dissolver 0,82 g de acetato de sódio (3.7) em 700 ml de água (3.8) e ajustar o pH a 6,0 com ácido acético (3.6). Transferir para um balão aferido de 1000 ml, completar o volume com água (3.8) até ao traço e homogeneizar;

3.10 - Fase móvel para HPLC - misturar 825 ml de tampão acetato (3.9) com 175 ml de acetonitrilo (3.2). Filtrar com um filtro de 0,22 (µm) e desgaseificar a solução (por exemplo por aplicação de ultra-sons durante dez minutos);

3.11 - Substância padrão - carbadox puro: N(elevado a 1), N(elevado a 4)-dióxido-3-(2-quinoxalinilmetileno)carbazato de metilo, E850.

3.11.1 - Solução padrão de reserva de carbadox, 100 (µg)/ml de carbadox (v. a nota ao ponto 5, «Procedimento») - num balão aferido de 250 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 25 mg de carbadox padrão (3.11) e dissolver com a mistura de metanol e acetonitrilo (3.5) por aplicação de ultra-sons (4.7). Depois do tratamento ultra-sónico, levar a solução à temperatura ambiente, completar o volume com a mistura de metanol e acetonitrilo (3.5) até ao traço e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio ou utilizar material de vidro ambarizado e guardar num frigorífico. A temperaturas não superiores a 4°C, a solução mantém-se estável durante um mês;

3.11.2 - Soluções padrão de trabalho - transferir 2,0 ml, 5,0 ml, 10,0 ml e 20,0 ml da solução padrão de reserva de carbadox (3.11.1) para uma série de balões aferidos de 100 ml.

Adicionar 30 ml de água, completar o volume com a mistura de metanol e acetonitrilo (3.5) até ao traço e homogeneizar. Envolver o balão com folha de alumínio. As soluções obtidas contêm 2,0 (mi)g, 5,0 (mi)g, 10,0 (mi)g e 20,0 (mi)g de carbadox por mililitro, respectivamente, e são preparadas imediatamente antes da utilização.

Nota. - Para a determinação de teores de carbadox inferiores a 10 mg/kg em alimentos para animais, preparar soluções de calibração com concentração inferior a 2,0 (mi)g/ml.

3.12 - Mistura 300 + 700 (v + v) de água e mistura de metanol e acetonitrilo (3.5) - misturar 300 ml de água com 700 ml da mistura de metanol e acetonitrilo (3.5).

4 - Equipamento:

4.1 - Agitador mecânico ou magnético;

4.2 - Papel de filtro de fibra de vidro (Whatman GF/A ou equivalente);

4.3 - Coluna de vidro sintetizado (300 mm a 400 mm de comprimento e diâmetro interno aproximado de 10 mm) com válvula de escoamento.

Nota. - Também pode utilizar-se uma coluna de vidro com torneira ou uma coluna de vidro com uma das extremidades afunilada; neste caso, inserir um tampão de fibra de vidro com uma vareta de vidro e comprimir contra o fundo.

4.4 - Equipamento de HPLC com sistema de injeção com capacidade de injeção de volumes de 20 (mi)l;

4.4.1 - Coluna para cromatografia líquida com 300 mm x 4 mm e enchimento C18 com granulometria de 10 (mi)m, ou equivalente;

4.4.2 - Detector de UV com regulação do comprimento de onda ou detector de fotodíodos para comprimentos de onda compreendidos entre 225 nm e 400 nm;

4.5 - Filtro de membrana, de 0,22 (mi)m;

4.6 - Filtro de membrana, de 0,45 (mi)m;

4.7 - Banho de ultra-sons.

5 - Procedimento:

Nota. - O carbadox é sensível à luz. Trabalhar com luz difusa ou utilizar material de vidro ambarizado ou envolvido em folha de alumínio.

5.1 - Generalidades:

5.1.1 - Alimento para animais branco - na determinação da recuperação (5.1.2), analisa-se um alimento para animais branco, para comprovar a ausência de carbadox e de substâncias interferentes. O alimento para animais branco deve ser de tipo similar ao da amostra e não devem ser detectados carbadox ou substâncias interferentes nas análises;

5.1.2 - Determinação da recuperação - para determinar a recuperação, procede-se à análise de um alimento para animais branco (5.1.1) ao qual terá sido adicionada uma quantidade de carbadox semelhante à presente na amostra. Para obter uma concentração de 50 mg/kg no branco, transferir 5,0 ml da solução padrão de reserva de carbadox (3.11.1) para um erlenmeyer de 200 ml e concentrar por evaporação numa corrente de azoto até cerca de 0,5 ml. Adicionar 10 g do alimento para animais branco, misturar e deixar em repouso durante dez minutos antes de proceder à extracção (5.2);

Caso não se disponha de um alimento para animais branco de tipo similar ao da amostra (v. 5.1.1), pode determinar-se a recuperação pelo método da adição de padrão. Nesse caso, adiciona-se à amostra uma quantidade de carbadox 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 subtracção;

5.2 - Extracção:

5.2.1 - Alimentos para animais - pesar, com uma aproximação de 0,01 g, cerca de 10 g de amostra. Transferir a quantidade pesada para um erlenmeyer de 200 ml, adicionar 15,0 ml de água, homogeneizar e deixar estabilizar durante cinco minutos. Adicionar 35,0 ml da mistura de metanol e acetonitrilo (3.5), tapar e agitar ou misturar durante trinta minutos no agitador

mecânico ou magnético (4.1). Filtrar a solução obtida por um papel de filtro de fibra de vidro (4.2). Guardar a solução para posterior purificação (5.3);

5.2.2 - Pré-misturas (0,1%-2,0%) - pesar, com uma aproximação de 0,001 g, cerca de 1 g de amostra não triturada. Transferir a quantidade pesada para um erlenmeyer de 200 ml, adicionar 15,0 ml de água, homogeneizar e deixar estabilizar durante cinco minutos. Adicionar 35,0 ml da mistura de metanol e acetonitrilo (3.5), tapar e agitar ou misturar durante trinta minutos no agitador mecânico ou magnético (4.1). Filtrar a solução obtida por um papel de filtro de fibra de vidro (4.2);

Pipetar uma alíquota do filtrado para um balão aferido de 50 ml. Adicionar 15,0 ml de água, completar o volume com a mistura de metanol e acetonitrilo (3.5) até ao traço e homogeneizar. A concentração de carbadox na solução final deve ser próxima de 10 (mg)/ml. Filtrar uma alíquota com um filtro de 0,45 (μm) (4.6). Efectuar em seguida a determinação por HPLC (5.4);

5.2.3 - Preparações (> 2%) - pesar, com uma aproximação de 0,001 g, cerca de 0,2 g de amostra não triturada. Transferir a quantidade pesada para um erlenmeyer de 250 ml, adicionar 45,0 ml de água, homogeneizar e deixar estabilizar durante cinco minutos. Adicionar 105,0 ml da mistura de metanol e acetonitrilo (3.5), tapar e homogeneizar. Aplicar ultra-sons (4.7) à amostra durante quinze minutos e agitar ou misturar durante mais quinze minutos (4.1). Filtrar a solução obtida com um papel de filtro de fibra de vidro (4.2);

Diluir uma alíquota do filtrado com a mistura de água, metanol e acetonitrilo (3.12) de modo a obter uma concentração final de carbadox de 10 (mg)/ml-15 (mg)/ml (para uma preparação a 10%, o factor de diluição é 10). Filtrar uma alíquota com um filtro de 0,45 (μm) (4.6). Efectuar em seguida a determinação por HPLC (5.4);

5.3 - Purificação:

5.3.1 - Preparação da coluna de óxido de alumínio - pesar 4 g de óxido de alumínio (3.4) e transferir a quantidade pesada para a coluna de vidro (4.3);

5.3.2 - Purificação da amostra - verter 15 ml do extracto filtrado (5.2.1) na coluna de óxido de alumínio e rejeitar os primeiros 2 ml de eluato. Recolher os 5 ml seguintes e filtrar uma alíquota por um filtro de 0,45 (μm) (4.6). Efectuar em seguida a determinação por HPLC (5.4);

5.4 - Determinação 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 (4.4.1) - 300 mm x 4 mm e enchimento C18 com granulometria de 10 (μm), ou equivalente;

Fase móvel (3.10) - mistura 825 + 175 (v + v) de tampão acetato (3.9) e acetonitrilo (3.2);

Fluxo - 1,5-2 ml/minuto;

Comprimento de onda de detecção - 365 nm;

Volume injectado - 20 (μl).

Para verificar a estabilidade do sistema cromatográfico, injectar várias vezes a solução padrão de trabalho (3.11.2) com 5,0 (mg)/ml até se obterem alturas ou áreas de pico e tempos de retenção constantes;

5.4.2 - Curva de calibração - injectar várias vezes cada solução de calibração (3.11.2) e determinar as alturas ou áreas dos picos para cada concentração. Traçar uma curva de calibração, representando em ordenadas as alturas ou áreas médias dos picos das soluções de calibração e em abcissas as concentrações correspondentes em microgramas por mililitro.

5.4.3 - Solução da amostra - injectar várias vezes o extracto da amostra [(5.3.2) no caso dos alimentos para animais, (5.2.2) no caso das pré-misturas e (5.2.3) no caso das preparações] e determinar a altura ou área média dos picos do carbadox.

6 - Cálculo dos resultados - a partir da altura ou área média dos picos do carbadox da solução da amostra, determinar a concentração desta em microgramas por mililitro com base na curva de calibração (5.4.2);

6.1 - Alimentos para animais - o teor de carbadox, w, da amostra, expresso em miligramas por quilograma, é dado pela seguinte fórmula:

$$W = [((\beta) \times V(\text{índice 1}))/m] \text{ [mg/kg]}$$

em que:

(β) = concentração de carbadox, em microgramas por mililitro, do extracto da amostra (5.3.2);

V(índice 1) = volume de extracção, em mililitros (isto é, 50 ml);

m = massa, em gramas, da toma analisada;

6.2 - Pré-misturas e preparações - o teor de carbadox, w, da amostra, expresso em miligramas por quilograma, é dado pela seguinte fórmula:

$$W = [((\beta) \times V(\text{índice 2}) \times F)/m] \text{ [mg/kg]}$$

em que:

(β) = concentração de carbadox, em microgramas/mililitro, do extracto da amostra (5.2.2 ou 5.2.3);

V(índice 2) = volume de extracção, em mililitros (isto é, 50 ml no caso das pré-misturas e 150 ml no caso das preparações);

f = factor de diluição de acordo com 5.2.2 (pré-misturas) ou 5.2.3 (preparações);

m = massa, em gramas, da toma analisada;

7 - Validação dos resultados:

7.1 - Identidade - a identidade do analito pode ser confirmada por co-cromatografia ou com um detector de fotodíodos que permita comparar os espectros do extracto da amostra e da solução de calibração (3.11.2) com 10,0 (mi)g/ml;

7.1.1 - Co-cromatografia - adiciona-se uma quantidade apropriada da solução de calibração (3.11.2) a um extracto da amostra. A quantidade de carbadox adicionada deve ser semelhante à que se prevê existir no extracto da amostra. Daí deve resultar unicamente um aumento da altura do pico do carbadox, contabilizadas a quantidade adicionada e a diluição do extracto. A largura do pico a meia altura não poderá diferir mais de 10% da largura inicial;

7.1.2 - Detecção com um sistema de fotodíodos - a avaliação dos resultados é feita com base nos seguintes critérios:

a) O comprimento de onda da absorção máxima dos espectros da amostra e do padrão registada no vértice do pico do cromatograma é o mesmo, com uma margem de variação dependente da resolução do sistema de detecção. No caso da detecção com um sistema de díodos, essa margem é tipicamente de (mais ou menos) 2 nm;

b) Entre 225 nm e 400 nm, os espectros da amostra e do padrão no vértice do pico do cromatograma não diferem entre si nas partes do espectro compreendidas entre 10% e 100% de absorvância relativa. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e o desvio relativo dos dois espectros não exceder 15% da absorvância do analito padrão em nenhum ponto observado;

c) Entre 225 nm e 400 nm, os espectros da curva ascendente, do vértice e da curva descendente do pico do extracto da amostra não diferem entre si nas partes do espectro compreendidas entre 10% e 100% de absorvância relativa. Este critério considera-se satisfeito se estiverem presentes os mesmos máximos e o desvio relativo dos espectros em todos os pontos observados não exceder 15% da absorvância do espectro do vértice do pico.

Se algum destes critérios não for satisfeito, a presença do analito não terá sido confirmada;

7.2 - Repetibilidade - para teores iguais ou superiores a 10 mg/kg, a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas para a mesma amostra não deve exceder 15% do maior dos valores;

7.3 - Recuperação - utilizando uma amostra (branco) adicionada, a recuperação deve ser pelo menos de 90%.

8 - Resultados de um teste interlaboratorial - foi organizado um teste interlaboratorial, que envolveu a análise de seis alimentos para animais, quatro pré-misturas e três preparações em oito laboratórios. Cada amostra foi analisada em duplicado. (No Journal of the AOAC, vol. 71, 1988, pp. 484-490, podem ser encontrados elementos mais pormenorizados sobre o teste interlaboratorial efectuado.) Os resultados obtidos (com excepção dos valores anómalos) são apresentados no quadro seguinte:

QUADRO N.º 1

Resultados do teste interlaboratorial com alimentos para animais
(ver quadro no documento original)

QUADRO N.º 2

Resultados do teste interlaboratorial com pré-misturas e preparações
(ver quadro no documento original)