

Decreto-Lei n.º 243/2000
de 27 de Setembro

A legislação aplicável aos princípios relativos à organização dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal dispõe que na análise das amostras de produtos destinados à alimentação animal são utilizados os métodos oficiais de análise definidos em legislação comunitária ou em norma portuguesa.

Atendendo a que não existe norma portuguesa relativa ao método para a determinação do lasalocido de sódio nos alimentos para animais e nas pré-misturas e tendo em conta a adopção da Directiva n.º 1999/76/CE, da Comissão, de 23 de Julho, que fixa o método de análise comunitário para a determinação do lasalocido de sódio nos alimentos para animais e nas pré-misturas, a utilizar aquando da realização das determinações analíticas previstas no controlo oficial da alimentação animal, importa transpor para o ordenamento jurídico nacional as disposições da referida directiva.

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

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

Artigo único

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

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 20 de Julho de 2000. - Jaime José Matos da Gama - Joaquim Augusto Nunes Pina Moura - Luís Manuel Capoulas Santos.

Promulgado em 6 de Setembro de 2000.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.

Referendado em 4 de Setembro de 2000.

O Primeiro-Ministro, António Manuel de Oliveira Guterres.

ANEXO

Determinação do lasalocido de sódio

Sal sódico de um ácido monocarboxílico poli-eterificado produzido por *Streptomyces lasaliensis*

1 - Objectivo e campo de aplicação. - O método destina-se à determinação do lasalocido de sódio em alimentos para animais e pré-misturas. O limite de detecção é de 5 mg/kg; o limite de determinação é de 30 mg/kg.

2 - Princípio. - O lasalocido de sódio é extraído da amostra com metanol acidificado e determinado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de fase reversa, com um detector de fluorescência.

3 - Reagentes:

3.1 - Di-hidrogenofosfato potássico (KH(índice 2)PO(índice 4)).

3.2 - Ácido ortofosfórico, w = 85%.

3.3 - Solução de ácido ortofosfórico, (sigma) = 205:

Diluir 23,5 ml de ácido ortofosfórico (3.2) para 100 ml com água.

3.4 - 6-metil-2-heptilamina (1,5-dimetil-hexilamina) w = 99%.

3.5 - Metanol para HPLC.

3.6 - Ácido clorídrico, (ρ)₂₀ = 1,19 g/ml.

3.7 - Solução-tampão de fosfatos, c = 0,01 mol/l:

Dissolver 1,36 g de KH(índice 2)PO(índice 4) (3.1) em 500 ml de água (3.11); adicionar 3,5 ml de ácido ortofosfórico (3.2) e 10 ml de 6-metil-2-heptilamina (3.4). Ajustar o pH para 4 com solução de ácido ortofosfórico (3.3) e diluir para 1000 ml com água (3.11).

3.8 - Metanol acidificado:

Transferir 5 ml de ácido clorídrico (3.6) para um balão graduado de 1000 ml, completar até ao traço com metanol (3.5) e agitar. A solução deve ser preparada imediatamente antes da utilização.

3.9 - Fase móvel para HPLC: solução-tampão de fosfatos-metanol 5 + 95 (v + v):

Misturar 5 ml de solução-tampão de fósforos (3.7) com 95 ml de metanol (3.5).

3.10 - Lasalocido de sódio-padrão de pureza garantida (C(índice 34)H(índice 53)O(índice 8)Na, sal sódico de ácido monocarboxílico poli-eterificado produzido por *Streptomyces lasaeliensis*), E763.

3.10.1 - Solução-padrão de reserva, 500 (mg)/ml, de lasalocido de sódio:

Em balão aferido de 100 ml, pesar, com uma aproximação de 0,1 mg, 50 mg de lasalocido de sódio (3.10) e dissolver em metanol acidificado (3.8). Completar o volume até ao traço com o mesmo solvente e homogeneizar. A solução deve ser preparada imediatamente antes da utilização.

3.10.2 - Solução-padrão intermédia, 50 (mg)/ml, de lasalocido de sódio:

Pipetar 10 ml da solução de reserva (3.10.1) para um balão aferido de 100 ml, completar o volume até ao traço com metanol acidificado (3.8) e homogeneizar. A solução deve ser preparada imediatamente antes da utilização.

3.10.3 - Soluções de calibração:

Transferir 0,1 ml, 2 ml, 4 ml, 5,9 ml e 10 ml da solução-padrão intermédia (3.10.2) para uma série de balões aferidos de 50 ml. Completar o volume até ao traço com metanol acidificado (3.8) e homogeneizar. As soluções obtidas contêm 1 (mg), 2 (mg), 4 (mg), 5 (mg) e 10 (mg) de lasalocido de sódio por mililitro e são preparadas imediatamente antes da utilização.

3.11 - Água para HPLC.

4 - Equipamento:

4.1 - Banho ultra-sons.

4.2 - Filtros de membrana de 0,45 (μm).

4.3 - Equipamento de HPLC com sistema de injeção com capacidade de injeção de volumes de 20 (μl).

4.3.1 - Coluna para cromatografia líquida com 125 mm x 4 mm e enchimento de fase reversa C18 com granulometria de 5 (μm), ou equivalente.

4.3.2 - Detector de fluorescência com possibilidade de ajustamento dos comprimentos de onda de emissão e de excitação.

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 lasalocido de sódio e de substâncias interferentes. O alimento para animais branco deve ser de tipo similar ao da amostra e não deve ser detectado lasalocido de sódio 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 lasalocido de sódio semelhante à presente na amostra. Para obter uma concentração de 100 mg/kg no branco, transferir 10 ml da solução-padrão de reserva (3.10.1) 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 (ver 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 lasalocido 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 subtracção.

5.2 - Extracção:

5.2.1 - Alimentos para animais:

Em erlenmeyer de 250 ml, pesar com uma aproximação de 0,01 g, 5 g a 10 g de amostra e adicionar, com uma pipeta, 100 ml de metanol acidificado (3.8). Tapar o erlenmeyer, agitar e colocar no banho de ultra-sons (4.1) a cerca de 40°C, durante vinte 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) (4.2) para um recipiente adequado. Efectuar em seguida a determinação por HPLC (5.3).

5.2.2 - Pré-misturas:

Num erlenmeyer de 250 ml, pesar, com uma aproximação de 0,001 g, cerca de 2 g da pré-mistura e adicionar 100 ml de metanol acidificado (3.8), homogeneizando por agitação. Colocar o erlenmeyer no banho de ultra-sons (4.1) a cerca de 40°C, durante vinte minutos, retirar o erlenmeyer do banho e arrefecer à temperatura ambiente. Diluir até ao traço com metanol acidificado (3.8) e agitar. 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) (4.2). Diluir um volume adequado do filtrado com metanol acidificado (3.8), de modo a obter uma solução de ensaio com cerca de 4 (µg)/ml de lasalocido de sódio. 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 (4.1.1): 125 mm x 4 mm e enchimento de fase reversa C18 com granulometria de 5 (µm), ou equivalente;

Fase móvel (3.9): mistura de solução-tampão de fosfatos (3.7) e metanol (3.5)+ 5 + 95 (v + v);

Fluxo: 1,2 ml/minuto;

Comprimentos de onda de detecção:

Excitação - 310 nm;

Emissão - 419 nm;

Volume injectado - 20 µl.

Para verificar a estabilidade do sistema cromatográfico, injectar várias vezes a solução de calibração (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:

Injectar várias vezes cada solução de calibração (3.10.3) 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 por mililitro.

5.3.3 - Solução da amostra:

Injectar várias vezes volumes dos extractos da amostra obtidos em 5.2.1 e 5.2.2, idênticos ao volume utilizado para as soluções de calibração e determinar a altura ou área média dos picos da lasalocido de sódio.

6 - Cálculo dos resultados:

A partir da altura ou área média dos picos obtidos por injeção da solução da amostra (5.3.3), determinar a concentração de lasalocido de sódio em miligrama por quilograma, com base na curva de calibração.

6.1 - Alimentos para animais:

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

(ver fórmula no documento original)

6.2 - Pré-misturas:

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

(ver fórmula no documento original)

7 - Validação dos resultados:

7.1 - Identidade:

Os métodos baseados na detecção por fluorescência são objecto de menos interferências que os métodos que utilizam um detector de ultravioletas. A identidade do analito pode ser confirmada por co-cromatografia.

7.1.1 - Co-cromatografia:

Adiciona-se uma quantidade apropriada da solução de calibração (3.10.3) a um extracto da amostra (5.2.1 ou 5.2.2). A quantidade de lasalocido de sódio adicionada deve ser semelhante à existente no extracto da amostra.

Daí deve resultar unicamente um aumento da altura do pico de lasalocido de sódio, 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 lasalocido de sódio do extracto da amostra sem adição.

7.2 - Repetibilidade:

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

Para teores de lasalocido de sódio compreendido entre 30 mg/kg e 100 mg/kg: 15% do maior dos valores;

Para teores de lasalocido de sódio compreendido entre 100 mg/kg e 200 mg/kg: 15 mg/kg;

Para teores de lasalocido de sódio superiores a 200 mg/kg: 7,5% do maior dos valores.

7.3 - Recuperação:

Utilizando uma amostra (branco) de alimento para animais adicionada, a recuperação deve ser pelo menos de 80%. Utilizando amostras de pré-misturas adicionadas, a recuperação deve ser pelo menos de 90%.

8 - Resultados de um teste interlaboratorial:

Apresentam-se no quadro seguinte (ver nota 1) os resultados das análises efectuadas a duas pré-misturas (amostras 1 e 2) e cinco alimentos para animais (amostras 3 a 7) no âmbito de um teste interlaboratorial com 12 laboratórios. Para cada amostra, efectuaram-se análises em duplicado.

(nota 1) Analyst 1995, 120, 2175-2180.

(ver quadro no documento original)