

Portaria n.º 16/97  
de 4 de Janeiro

Considerando o disposto no Regulamento Relativo às Substâncias e Produtos Indesejáveis nos Alimentos Simples, Matérias-Primas e Alimentos Compostos Destinados à Alimentação Animal, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 442/89, de 27 de Dezembro;

Considerando que é necessário, dada a evolução dos conhecimentos científicos e técnicos, dispor de um método que permita controlar os teores muito reduzidos de aflatoxina B (índice 1), fixados pela Portaria n.º 1107/89, de 27 de Dezembro, e posteriormente alterados pela Portaria n.º 1208/91, de 19 de Dezembro;

Considerando a necessidade de harmonizar a Directiva n.º 76/372/CEE, da Comissão, de 1 de Março, com as alterações que lhe foram introduzidas pelas Directivas n.os 92/95/CEE e 94/14/CE, da Comissão, de 9 de Novembro e de 29 de Março, relativas ao método de análise comunitário para o doseamento de aflatoxina B (índice 1);

Considerando, por último, que o Conselho Consultivo de Alimentação Animal foi ouvido sobre a matéria, nos termos do artigo 4.º do Decreto-Lei n.º 372/87, de 5 de Dezembro:

Manda o Governo, pelo Ministro da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, ao abrigo do disposto no n.º 7 do artigo 5.º do Regulamento Relativo às Substâncias e Produtos Indesejáveis nos Alimentos Simples, Matérias-Primas e Alimentos Compostos Destinados à Alimentação Animal, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 442/89, de 27 de Dezembro, que seja aprovado o método oficial de análise a utilizar para a determinação do teor de aflatoxina B (índice 1) nos alimentos para animais, constante do anexo ao presente diploma e que dele faz parte integrante.

Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Assinada em 15 de Novembro de 1996.

Pelo Ministro da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Luís Manuel Capoulas Santos, Secretário de Estado da Agricultura e do Desenvolvimento Rural.

## ANEXO

Determinação do teor de aflatoxina B (índice 1) em alimentos para animais

A - Método por cromatografia monodimensional em camada fina

1 - Objectivo e campo de aplicação. - O método permite determinar o teor de aflatoxina B (índice 1) das matérias-primas e dos alimentos simples; no entanto, não se aplica à polpa de citrinos. O limite inferior de determinação é de 0,01 mg/kg (10 ppb).

Na presença de substâncias de interferência que dificultem as determinações, é necessário recomeçar a análise em conformidade com o método descrito na parte B, «Determinação de aflatoxina B (índice 1) por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)».

2 - Resumo do processo. - A amostra é submetida à extracção com clorofórmio. O extracto é filtrado e uma alíquota é tratada e purificada por cromatografia em coluna de sílica gel. O eluído é evaporado e retomado num volume determinado de clorofórmio ou de uma mistura de benzeno e acetonitrilo. Uma alíquota desta solução é submetida a cromatografia em camada fina. A quantidade de aflatoxina B (índice 1) é determinada no cromatograma, sob irradiação UV, quer visualmente quer por fluorodensitometria, por comparação com as quantidades conhecidas de padrão de aflatoxina B (índice 1). A identidade de aflatoxina B (índice 1) do extracto do alimento deve ser confirmada pelos processos indicados.

Notas

1 - As micotoxinas são substâncias extremamente tóxicas, pelo que a sua manipulação deve ser efectuada em hottes. Devem ser tomadas precauções especiais quando as micotoxinas se

apresentam sob forma liofilizada porque, pela sua natureza electrostática, têm tendência para dispersão nas áreas de trabalho.

2 - Dada a sensibilidade da aflatoxina B(índice 1) à luz, os ensaios devem realizar-se ao abrigo da luz natural ou da luz branca artificial.

3 - Para as soluções aquosas de aflatoxinas, o uso de material de vidro que não tenha sido lavado previamente com ácido pode ocasionar perdas. Deverão tomar-se cuidados especiais com o uso de material de vidro não reutilizável, tal como frascos de auto-amostragem e pipetas Pasteur.

Assim, todo o material de vidro para contacto com soluções aquosas de aflatoxinas deve ser previamente imerso em ácido (por exemplo, ácido sulfúrico,  $c = 2 \text{ mol/l}$ ) durante algumas horas e, posteriormente, bem lavado com água destilada, de modo a remover quaisquer vestígios de ácido (por exemplo, três vezes, verificando com papel indicador). Na prática, este tratamento torna-se necessário para o balão de fundo redondo (4.4), balões volumétricos, provetas, frascos ou tubos utilizados para as soluções de calibração e para os extractos finais (particularmente os frascos de auto-amostragem), bem como as pipetas Pasteur eventualmente usadas para a transferência das soluções de calibração ou dos extractos.

3 - Reagentes e auxiliares. - Todos os reagentes devem ser de qualidade «pró-análise», desde que não seja dada outra indicação.

3.1 - Acetona.

3.2 - Acetonitrilo.

3.3 - Benzeno.

3.4 - Clorofórmio, estabilizado com 0,5% a 1% de etanol a 96% (V/V).

3.5 - n-hexano.

3.6 - Metanol.

3.7 - Éter dietílico, anidro e isento de peróxidos.

3.8 - Mistura de benzeno (3.3) e de acetonitrilo (3.2) 98 + 2 (V + V).

3.9 - Mistura de clorofórmio (3.4) e de metanol (3.6) 97 + 3 (V + V).

3.10 - Gel de sílica para cromatografia em coluna, com granulometria de 0,05 mm a 0,20 mm.

3.11 - Algodão hidrófilo, previamente desengordurado com clorofórmio, ou lã de vidro.

3.12 - Sulfato de sódio, anidro, granulado.

3.13 - Gás inerte, por exemplo, azoto.

3.14 - Ácido clorídrico 1 N.

3.15 - Solução de ácido sulfúrico a 50% (V/V).

3.16 - Terra de diatomáceas, tratada com ácido.

3.17 - Gel de sílica G-HR ou equivalente, para cromatografia em camada fina.

3.18 - Solução-padrão de aflatoxina B(índice 1) a cerca de 0,1 (mg)/ml em clorofórmio (3.4) ou na mistura de benzeno e de acetonitrilo (3.8), preparada e controlada como indicado no ponto 7.

3.19 - Solução-padrão qualitativa de cerca de 0,1 (mg) de aflatoxina B(índice 1) e B(índice 2) por mililitro em clorofórmio (3.4) ou na mistura benzeno e de acetonitrilo (3.8). As concentrações são dadas a título indicativo; devem ser ajustadas de modo a obter a mesma intensidade de fluorescência para as duas aflatoxinas.

3.20 - Solventes para o desenvolvimento:

3.20.1 - Clorofórmio (3.4) + acetona (3.1): 90 + 10 (V + V), câmara não saturada.

3.20.2 - Éter dietílico (3.7) + metanol (3.6) + água 96 + 3 + 1, (V + V + V), câmara não saturada.

3.20.3 - Éter dietílico (3.7) + metanol (3.6) + água 94 + 4,5 + 1,5, (V + V + V), câmara saturada.

3.20.4 - Clorofórmio (3.4) + metanol (3.6) 94 + 6 (V + V), câmara saturada.

3.20.5 - Clorofórmio (3.4) + metanol (3.6) 97 + 3 (V + V), câmara saturada.

#### 4 - Aparelhos e utensílios:

4.1 - Triturador/misturador.

4.2 - Agitador mecânico ou magnético.

4.3 - Papel de filtro plissado para filtração rápida, tipo Schleicher et Schüll ou equivalente, diâmetro: 24 cm.

4.4 - Coluna para cromatografia, de vidro (diâmetro interno: 22 mm; comprimento: 300 mm), com torneira de teflon e reservatório de 250 ml.

4.5 - Evaporador rotativo, actuando sob vácuo, com balão de fundo redondo de 500 ml.

4.6 - Frasco de Erlenmeyer de 500 ml, munido de rolha.

4.7 - Equipamento para cromatografia em camada fina.

4.8 - Placas de vidro para cromatografia em camada fina de 200 mm x 200 mm, preparadas da seguinte forma (as quantidades indicadas são suficientes para cinco placas): introduzem-se num frasco de Erlenmeyer 30 g de gel de sílica, juntam-se 60 ml de água, tapa-se e agita-se durante um minuto. Espalha-se a suspensão sobre as placas de modo a obter uma camada uniforme de 0,25 mm de espessura. Deixam-se secar ao ar e guardam-se em seguida num exsiccador contendo sílica. Quando se utilizarem, activam-se mantendo-as em estufa a 110°C durante uma hora. Podem ser utilizadas placas preparadas comercialmente, desde que satisfaçam as características atrás referidas.

4.9 - Lâmpada UV de comprimento de onda de 360 nm. - A intensidade de radiação deve permitir a distinção nítida de uma mancha de 1,0 ng de aflatoxina B<sub>1</sub> (índice 1) sobre uma placa para cromatografia em camada fina a uma distância de 10 cm da lâmpada.

4.10 - Tubo graduado de 10 ml de capacidade e rolha de polietileno.

4.11 - Espectrómetro, que permita medições no ultravioleta.

4.12 - Fluorodensitómetro (facultativo).

#### 5 - Técnica:

5.1 - Preparação da amostra (ver observações, parte C, ponto 1).

Moer a amostra de forma que passe, na totalidade, através de um crivo de malha 1 mm (conforme recomendação ISO R 565).

#### 5.2 - Extracção:

Introduzem-se 50 g da amostra moída e homogeneizada num frasco de Erlenmeyer de 500 ml (4.6). Adicionam-se 25 g de terra de diatomáceas (3.16), 25 ml de água e 250 ml de clorofórmio (3.4). Tapar o frasco, agitar durante trinta minutos no agitador (4.2); filtram-se por papel de filtro plissado (4.3). Eliminam-se os primeiros 10 ml de filtrado e recolhem-se, em seguida, 50 ml.

#### 5.3 - Purificação em coluna:

Tapa-se a extremidade inferior da coluna de cromatografia (4.4) com um tampão de algodão ou de lã de vidro (3.11) e enche-se a coluna com clorofórmio (3.4) até um terço da altura; juntam-se 5 g de sulfato de sódio (3.12).

Verifica-se se a superfície superior da camada de sulfato de sódio está plana e juntam-se 10 g de gel de sílica em pequenas fracções. Agita-se com precaução, depois de cada adição, para eliminar as bolhas de ar. Deixa-se decantar durante quinze minutos e juntam-se, em seguida e cuidadosamente, 15 g de sulfato de sódio. Abre-se a torneira e deixa-se correr o líquido até este atingir praticamente a superfície superior da camada de sulfato de sódio.

Misturam-se os 50,0 ml do extracto recolhidos em 5.2 com 100 ml de n-hexano (3.5) e transvasa-se quantitativamente a mistura para a coluna. Deixa-se correr o líquido até à superfície superior da camada de sulfato de sódio. Adicionam-se em seguida 100 ml de éter dietílico (3.7) e deixa-se de novo correr o líquido até à superfície superior da camada de sulfato de sódio. Durante o decurso destas operações, o fluxo de escoamento deve ser de 8 ml a 12 ml por minuto, tendo o cuidado de nunca deixar secar a coluna. Eliminam-se os líquidos de escoamento.

Elui-se, em seguida, com 150 ml da solução de mistura de clorofórmio e de metanol (3.9) e recolhe-se a totalidade do eluído.

Evapora-se o eluído à secura no evaporador rotativo (4.5), de preferência sob corrente de gás inerte (3.13), sob vazio e a uma temperatura que não ultrapasse 50°C. Transvasa-se quantitativamente o resíduo para um tubo graduado de 10 ml com a ajuda de clorofórmio (3.4) ou da mistura de benzeno e de acetonitrilo (3.8).

Evapora-se novamente a solução, de preferência sob corrente de gás inerte (3.13), e perfaz-se o volume de 2 ml com clorofórmio (3.4) ou com mistura de benzeno e de acetonitrilo (3.8).

#### 5.4 - Cromatografia em camada fina:

Aplicam-se pontualmente, por meio de micropipetas ou de microseringas, sobre uma placa para cromatografia em camada fina (4.8), a 2 cm do bordo inferior e a intervalos de 2 cm, os volumes da solução-padrão e do extracto a seguir indicados:

10 (mi)l, 15 (mi)l, 20 (mi)l, 30 (mi)l e 40 (mi)l da solução-padrão de aflatoxina B(índice 1) (3.18);

10 (mi)l do extracto obtido em 5.3 e, em sobreposição, 20 (mi)l da solução-padrão de aflatoxina B(índice 1) (3.18);

10 (mi)l e 20 (mi)l do extracto obtido em 5.3.

Desenvolve-se o cromatograma, ao abrigo da luz, com um dos solventes de desenvolvimento (3.20).

A escolha do solvente deve ser estabelecida previamente, aplicando sobre a placa 25 (mi)l da solução-padrão qualitativa (3.19), assegurando-se que, no fim do desenvolvimento, as aflatoxinas B(índice 1) e B(índice 2) estão completamente separadas.

Deixam-se evaporar os solventes ao abrigo da luz e expõe-se em seguida a placa à luz UV, colocando-a a 10 cm da lâmpada (4.9).

As manchas das aflatoxinas B(índice 1) e B(índice 2) dão uma fluorescência azul.

#### 5.5 - Determinações quantitativas:

Procede-se à determinação, quer visual quer por fluorodensitometria, como a seguir se indica:

##### 5.5.1 - Avaliação visual:

Determina-se a quantidade de aflatoxina B(índice 1) do extracto, comparando a intensidade de fluorescência das manchas do extracto com as das manchas da solução-padrão. Interpola-se, se necessário. A fluorescência obtida por sobreposição do extracto e do padrão deve ser mais forte que a correspondente à dos 10 (mi)l de extracto e deve dar lugar apenas à percepção de uma única mancha. Se a intensidade de fluorescência revelada pelos 10 (mi)l de extracto for mais forte que a dos 40 (mi)l de solução-padrão, dilui-se o extracto de 10 a 100 vezes com clorofórmio (3.4) ou mistura de benzeno e de acetonitrilo (3.8) antes de o submeter a uma nova cromatografia em camada fina.

##### 5.5.2 - Avaliação por fluorodensitometria:

Mede-se a intensidade de fluorescência das manchas de aflatoxina B(índice 1) no fluorodensitómetro (4.12), utilizando um comprimento de onda de excitação de 365 nm e um comprimento de onda de emissão de 433 nm.

Determina-se a quantidade de aflatoxina B(índice 1) do extracto aplicado, comparando as intensidades de fluorescência das manchas do extracto e da solução-padrão.

#### 5.6 - Confirmação de identidade da aflatoxina B(índice 1):

A identidade da substância a avaliar pode ser confirmada por:

##### 5.6.1 - Ensaio de pesquisa com ácido sulfúrico:

Pulveriza-se o cromatograma obtido em 5.4 com ácido sulfúrico (3.15). A fluorescência das manchas de aflatoxina B(índice 1) deve virar de azul a amarelo sob irradiação UV.

5.6.2 - Ensaio por cromatografia bidimensional, implicando a formação de aflatoxina B(índice 1)-hemiacetal (aflatoxina B(índice 2a)).

(ver documento original)

#### 5.6.2.1 - Aplicação das soluções:

Traçam-se sobre uma placa (4.8) duas paralelas a dois lados contíguos (a distâncias de 6 cm destes lados) destinadas a delimitar a migração das frentes dos solventes. Por meio de micropipetas ou de microseringas aplicam-se sobre a placa as seguintes soluções:

No ponto A: um volume de extracto purificado da amostra obtido em 5.3, contendo cerca de 2,5 ng de aflatoxina B(índice 1);

Nos pontos B e C: 25 (μl) da solução-padrão (3.18).

Seca-se por acção de uma corrente de ar à temperatura ambiente.

#### 5.6.2.2 - Desenvolvimento:

Desenvolve-se o cromatograma na direcção I (figura 1) numa câmara não saturada, com o solvente de desenvolvimento (3.20.1), que apenas deverá ocupar uma camada de 1 cm. O desenvolvimento decorre até que a frente do solvente atinja a linha de delimitação. Retira-se a placa da câmara e deixa-se secar durante cinco minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Pulveriza-se de seguida com ácido clorídrico (3.14), sobre uma banda de 2,5 cm de altura, cobrindo os pontos A e B (indicado a tracejado na figura 1), protegendo o resto da placa com uma placa de vidro. Deixar reagir dez minutos no escuro e secar com o auxílio de uma corrente de ar à temperatura ambiente.

Desenvolve-se em seguida o cromatograma na direcção II com o solvente de desenvolvimento (3.20.1), que deverá ocupar uma camada de 1 cm numa câmara não saturada. O desenvolvimento decorre até que a frente do solvente atinja a linha de delimitação.

Retira-se a placa da câmara e deixa-se secar à temperatura ambiente.

#### 5.6.2.3 - Interpretação do cromatograma:

Examina-se o cromatograma à luz UV (4.9) e verifica-se o seguinte:

a) Aparecimento de uma mancha fluorescente azul de aflatoxina B(índice 1), proveniente da solução-padrão depositada em C (migração na direcção I);

b) Aparecimento de uma mancha fluorescente azul de aflatoxina B(índice 1) (não tendo reagido com o ácido clorídrico) e de uma mancha fluorescente azul, mais intensa de aflatoxina B(índice 1)-hemicetal, proveniente da solução-padrão, depositado em B (migração na direcção II);

c) Aparecimento de manchas semelhantes às indicadas na alínea b), provenientes do extracto da amostra, depositado em A. A localização destas manchas está definida pela distância da migração da aflatoxina B(índice 1) a partir do ponto A, na direcção I (a mesma distância percorrida pelo extracto-padrão, depositado em C), seguida das distâncias de migração, percorridas na direcção II, pela aflatoxina B(índice 1) (não tendo reagido com o ácido clorídrico) e pela aflatoxina B(índice 1)-hemiacetal (as mesmas distâncias que as percorridas pelo extracto-padrão depositado em B). As intensidades de fluorescência das manchas do hemiacetal provenientes do extracto da amostra e da solução-padrão depositado em B deverão corresponder.

### 6 - Cálculo dos resultados:

6.1 - A partir da avaliação visual, o teor em microgramas de aflatoxina B(índice 1) por quilograma de amostra (ppb) é dado pela fórmula:

$$(S \times Y \times V)/(m \times X)$$

na qual:

Y e X - são, respectivamente, os volumes em microlitros da solução-padrão de aflatoxina B(índice 1) (3.18) e do extracto da amostra, tendo uma intensidade de fluorescência semelhante;

S - concentração, em microgramas de aflatoxina B(índice 1) por mililitro, da solução-padrão (3.18);

V - volume final do extracto da amostra, em microlitros, tendo em conta eventuais diluições;

m - massa, em gramas, da toma da amostra, correspondente ao volume do extracto submetido à purificação por coluna.

6.2 - A partir da avaliação fluorodensitométrica, o teor em microgramas de aflatoxina B(índice 1) por quilograma de amostra (ppb) é dado pela fórmula:

$$(S \times V)/(m \times Y)$$

na qual:

Y - volume, em microlitros, de extracto depositado na placa (10 (mi)l ou 20 (mi)l);

S - quantidade em nanogramas de aflatoxina B(índice 1) do extracto depositado (tendo em conta o volume Y);

V - volume final do extracto, em microlitros, tendo em conta as eventuais diluições;

m - peso, em gramas, da toma da amostra, correspondente ao volume de extracto submetido à purificação por coluna.

7 - Preparação e controlo da solução-padrão (3.18):

7.1 - Determinação da concentração em aflatoxina B(índice 1):

Prepara-se uma solução-padrão de aflatoxina B(índice 1) em clorofórmio (3.4) ou na mistura benzeno e acetonitrilo (3.8), cuja concentração esteja entre 8 (mi)g e 10 (mi)g por mililitro. Determina-se o espectro de absorvência entre 330 nm e 370 nm, com o auxílio do espectrómetro (4.11).

Determina-se a absorvência (A) a 363 nm, no caso da solução clorofórmica, ou a 348 nm, no caso da solução na mistura benzeno e de acetonitrilo (3.8).

Calcula-se a concentração em microgramas de aflatoxina B(índice 1) por mililitro da solução, a partir das seguintes fórmulas:

$(312 \times A \times 1000)/(22300)$ , para a solução clorofórmica;

$(312 \times A \times 1000)/(19800)$ , para a solução na mistura de benzeno e de acetonitrilo;

Efectuam-se, ao abrigo da luz, as diluições convenientes para obter uma solução-padrão de trabalho, cuja concentração de aflatoxina B(índice 1) seja de 0,1 (mi)g/ml. Esta solução mantém-se estável durante duas semanas quando conservada em frigorífico, a 4°C.

7.2 - Controlo da pureza cromatográfica:

Depositam-se sobre uma placa (4.8) 5 (mi)l da solução-padrão cuja concentração é entre 8 (mi)g-10 (mi)g de aflatoxina B(índice 1) por mililitro (7.1). Desenvolve-se um cromatograma como o indicado em 5.4.

Sob luz UV, a fluorescência não deve dar lugar senão à percepção de uma única mancha e não deve ser perceptível nenhuma fluorescência na zona do depósito original.

8 - Repetibilidade. - As diferenças entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra pelo mesmo operador não deverão ultrapassar:

25% do resultado mais elevado para os teores em aflatoxina B(índice 1) de 10 (mi)g/kg a 20 (mi)g/kg;

5 (mi)g, em valor absoluto, para os teores de 20 (mi)g/kg a 50 (mi)g/kg;

10% do resultado mais elevado para os teores superiores a 50 (mi)g/kg.

9 - Reprodutibilidade. - Ver observações, parte C, ponto 2.

B - Método por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

1 - Objectivo e campo de aplicação. - O método permite determinar o teor de aflatoxina B(índice 1) em alimentos para animais, incluindo os que contenham polpa de citrinos. O limite inferior de determinação é de 0,001 mg/kg (1 ppb).

2 - Resumo do processo. - O método é baseado na separação por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com detecção de fluorescência. A amostra é extraída com clorofórmio, sendo o extracto sujeito a filtração. Purifica-se uma alíquota, por cartucho de Florisil seguido de um outro de C(índice 18). Para a separação final e doseamento recorre-se a uma coluna de HPLC de fase reversa, derivatização pós-coluna com uma solução aquosa de iodo e detecção por fluorescência.

## Notas

1 - As micotoxinas são substâncias extremamente tóxicas, pelo que a sua manipulação deve ser efectuada em hottes. Devem ser tomadas precauções especiais quando as micotoxinas se apresentam sob forma liofilizada porque, pela sua natureza electrostática, tem tendência para dispersão nas áreas de trabalho.

2 - Dada a sensibilidade da aflatoxina B(índice 1) à luz, os ensaios devem realizar-se ao abrigo da luz natural ou da luz branca artificial.

3 - Para as soluções aquosas de aflatoxinas, o uso de material de vidro que não tenha sido lavado previamente com ácido pode ocasionar perdas. Deverão tomar-se cuidados especiais com o uso de material de vidro não reutilizável, tal como frascos de auto-amostragem e pipetas Pasteur.

Assim, todo o material de vidro para contacto com soluções aquosas de aflatoxinas deve ser previamente imerso em ácido (por exemplo, ácido sulfúrico,  $c = 2 \text{ mol/l}$ ) durante algumas horas e, posteriormente, bem lavado com água destilada, de modo a remover quaisquer vestígios de ácido (por exemplo, três vezes, verificado com papel indicador). Na prática, este tratamento torna-se necessário para o balão de fundo redondo (4.4), balões volumétricos, provetas, frascos ou tubos utilizados para as soluções de calibração e para os extractos finais (particularmente os frascos de auto-amostragem), bem como as pipetas Pasteur eventualmente usadas para a transferência das soluções de calibração ou dos extractos.

3 - Reagentes e auxiliares:

3.1 - Clorofórmio, estabilizado com 0,5% a 1,0% de etanol (m/m). Ver ponto 10.2.

3.2 - Metanol, para HPLC, para preparação de 3.6.

3.3 - Acetona.

3.4 - Acetonitrilo, para HPLC.

3.5 - Solventes de eluição: preparam-se um dia antes da utilização e procede-se à remoção do ar por meio de ultra-sons.

3.5.1 - Mistura de acetona (3.3) e de água (98 + 2) (V + V).

3.5.2 - Mistura de água e de metanol (3.2) (80 + 20) (V + V).

3.5.3 - Mistura de água e de acetona (3.3) (85 + 15) (V + V).

3.6 - Fase móvel para HPLC:

Mistura de água, de metanol (3.2) e de acetonitrilo (3.4) (130 + 70 + 40) (V + V + V).

Nota. - A composição da mistura da fase móvel poderá requerer ajustamentos, de acordo com o tipo de coluna utilizada em HPLC.

3.7 - Solução aquosa saturada de iodo: adicionam-se 2 g de iodo a 400 ml de água. Dissolvem-se sob agitação, durante pelo menos noventa minutos, e filtra-se com auxílio de um filtro (4.15). Protege-se a solução da luz, de modo a evitar processos de fotodegradação.

3.8 - Celite 545 ou equivalente, tratada com ácido.

3.9 - Cartucho de Florisil (Waters SEP-PAK), ou equivalente.

3.10 - Cartucho de C(índice 18) (Waters SEP-PAK), ou equivalente.

3.11 - Gás inerte, por exemplo, azoto.

3.12 - Solução-padrão de aflatoxina B(índice 1), em clorofórmio, de concentração 10 (mg/ml). Verifica-se a concentração da solução do seguinte modo: traça-se o espectro de absorção da solução entre 300 nm e 370 nm, por meio de um espectrómetro (4.23). Mede-se a absorvência (A) a um máximo de 363 nm. Calcula-se a concentração de aflatoxina B(índice 1), expressa em microgramas por mililitro da solução, através da fórmula:

Concentração ((mg/ml) =  $(312 \times A \times 1000)/22300 = (13,991 \times A)$

3.12.1 - Solução-mãe da solução-padrão de aflatoxina B(índice 1), em clorofórmio:

Transfere-se de um modo quantitativo 2,5 ml da solução-padrão (3.12) para um balão volumétrico de 50 ml, perfazendo-se com clorofórmio (3.1), até ao traço de referência. Homogeneiza-se.

Conserva-se o balão hermeticamente fechado envolvido em folha de alumínio, em local fresco (4°C) e ao abrigo da luz.

3.13 - Soluções de calibração de aflatoxina B(índice 1), para HPLC.

Nota. - Na preparação das soluções utiliza-se material de vidro lavado com ácido.

3.13.1 - Solução de calibração de 4 ng/ml:

Deixa-se estabilizar, à temperatura ambiente, o balão que contém a solução-mãe (3.12.1), envolvido na folha de alumínio, durante algumas horas. Transferem-se 400 (μ)l da solução-mãe (200 ng de aflatoxina B(índice 1)) para balão volumétrico de 50 ml, e evapora-se à secura sob corrente de gás inerte (3.11). Dissolve-se o resíduo obtido com cerca de 20 ml da mistura de água e de acetona (3.5.3), completando-se o volume até ao traço de referência com a mesma solução. Homogeneiza-se.

3.13.2 - Solução de calibração de 3 ng/ml:

Transferem-se quantitativamente 7,5 ml da solução de calibração (3.13.1) para um balão volumétrico de 50 ml e perfaz-se o volume até ao traço de referência com a mistura de água e de acetona (3.5.3). Homogeneiza-se.

3.13.3 - Solução de calibração de 2 ng/ml:

Transferem-se quantitativamente 25 ml da solução da calibração (3.13.1) para um balão volumétrico de 50 ml e perfaz-se o volume até ao traço de referência com a mistura de água e de acetona (3.5.3). Homogeneiza-se.

Esta solução deverá também ser utilizada para injeção repetida durante o processo HPLC, sendo adiante designada por padrão de referência (5.5).

3.13.4 - Solução de calibração de 1 ng/ml:

Transferem-se quantitativamente 2,5 ml da solução de calibração (3.13.1) para um balão volumétrico de 10 ml e perfaz-se o volume até ao traço de referência com a mistura de água e de acetona (3.5.3). Homogeneiza-se.

3.14 - Balão contendo uma mistura de aflatoxina B(índice 1), B(índice 2), G(índice 1) e G(índice 2) de concentrações aproximadas de 1 (μ)g/ml, 0,5 (μ)g/ml, 1 (μ)g/ml e 0,5 (μ)g/ml, respectivamente, em 1 ml de clorofórmio.

3.14.1 - Solução para ensaio cromatográfico:

Transfere-se o conteúdo do balão (3.14) para um tubo de ensaio de vidro munido de rolha, ou para um frasco pequeno com tampa de rosca. Transferem-se 40 (μ)l desta solução para tubo de vidro de 10 ml, munido de rolha (lavado com ácido) (4.22). Evapora-se o clorofórmio sob corrente de gás inerte (3.11) e dissolve-se de novo, em 10 ml de mistura de água e de acetona (3.5.3). Poderá ser necessário guardar até dissolução completa, em local fresco e escuro, seis a oito horas.

3.15 - Reagentes para o ensaio de confirmação (6).

3.15.1 - Solução aquosa saturada de NaCl.

3.15.2 - Sulfato de sódio anidro, granulado.

4 - Aparelhos e utensílios:

4.1 - Triturador misturador.

4.2 - Crivo de malha de 1,0 mm (ISO R 565).

4.3 - Agitador mecânico.

4.4 - Evaporador rotativo de vácuo, equipado com balão de fundo redondo de capacidade compreendida entre 150 ml e 250 ml.

4.5 - Aparelho para cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), equipado com injetor apropriado para injeções de 250 (μ)l.

Ver instruções do fabricante para enchimento total ou parcial do loop.

4.6 - Coluna analítica para HPLC, com enchimento de C(índice 18) de 3 (μ)m-5 (μ)m de partícula.

4.7 - Bomba pneumática para débito do reagente do iodo, pós-coluna.



- 4.8 - Junta em T, em aço inoxidável (1/16 nm x 0,75 mm) de volume morto nulo.
- 4.9 - Reactor em espiral de teflon ou aço inoxidável. As dimensões compreendidas entre 3000 mm x 0,5 mm e de 5000 mm x 0,5 mm têm-se revelado apropriadas para combinação com colunas de HPLC de partículas de 5 (mi)m ou 3 (mi)m.
- 4.10 - Banho de água equipado com controlo termostático, ajustado para 60°C, susceptível de regular a temperatura com precisão (mais ou menos) 0,1°C.
- 4.11 - Detector de fluorescência susceptível de fornecer um comprimento de onda de excitação da ordem de 365 nm e um comprimento de onda de emissão da ordem de 435 nm (no caso de aparelhos com filtro, o comprimento de onda de emissão deverá ser superior a 400 nm).
- Deverá permitir a detecção de quantidades de aflatoxina B(índice 1) da ordem de 0,05 ng. Com vista a eliminar eventuais bolhas de ar presentes na célula, poderá ser necessário utilizar uma certa contra-pressão (por exemplo, através da ligação de uma válvula ou espiral de teflon ou de aço inoxidável à saída do detector).
- 4.12 - Registador contínuo.
- 4.13 - Integrador electrónico (opcional).
- 4.14 - Papel de filtro plissado, diâmetro: 24 cm. Macherey-Nagel 617 1/4, ou equivalente.
- 4.15 - Filtro de membrana de porosidade 0,45 (mi)m, Millipore HAWP 04700 ou equivalente.
- 4.16 - Erlenmeyer de 500 ml, munido de rolha de vidro.
- 4.17 - Coluna de vidro (diâmetro interno aproximado: 1 cm; comprimento aproximado: 30 cm), equipado com uma ponta Luer.
- 4.18 - Torneira Luer de nylon, resistente ao clorofórmio (Bio-rad 7328017, Analytichem Al 6078, J. T. Baker 4514 ou equivalente).
- 4.19 - Seringa Luer de 10 ml, resistente ao ataque químico.
- 4.20 - Seringa apropriada para HPLC, para injeções de 250 (mi)l (ver 4.5).
- 4.21 - Microseringa de 100 (mi)l, para preparação das soluções de calibração (deve verificar-se, por pesagem, se a precisão é da ordem de 2%).
- 4.22 - Tubos de vidro de 10 ml, munidos de rolha.
- 4.23 - Espectrofotómetro apropriado para determinações na zona de UV.
- 4.24 - Equipamento para o ensaio de confirmação (6):
- 4.24.1 - Ampola de decantação de 100 ml, com torneira de teflon, lavada com ácido.
- 4.24.2 - Unidade de aquecimento 40°C-50°C.

## 5 - Técnica:

### 5.1 - Preparação de amostra para análise:

Mói-se a amostra de modo a que esta passe pelo crivo (4.2).

### 5.2 - Toma para análise:

Pesam-se para um Erlenmeyer (4.16) 50 g da amostra previamente preparada.

### 5.3 - Extração:

Adicionam-se 25 g de celite (3.8), 250 ml de clorofórmio (3.1) e 25 ml de água à amostra (5.2). Rolha-se o Erlenmeyer e agita-se durante trinta minutos com auxílio de um agitador mecânico (4.14), recolhendo-se 50 ml do filtrado. Se necessário, toma-se uma alíquota do filtrado e dilui-se para 50 ml em clorofórmio, de modo que a concentração de aflatoxina B(índice 1) não seja superior a 4 ng/ml.

### 5.4 - Purificação da amostra (as operações devem efectuar-se sem interrupções significativas). Cuidados a ter:

Protegem-se convenientemente as salas de trabalho onde são efectuadas as análises da luz do dia. Isto pode ser conseguido, usando:

1) Janelas com filtros de radiação UV em associação com luz difusa (evitando-se a luz solar directa);

2) Cortinas ou persianas em associação com luz artificial (os tubos de fluorescência são aceitáveis);

Protegem-se o mais possível da luz as soluções que contêm aflatoxinas (armazenam-se em local escuro e envolvem-se em folhas de alumínio).

#### 5.4.1 - Purificação por cartucho de Florisil.

##### 5.4.1.1 - Preparação do sistema coluna-cartucho:

Adapta-se uma torneira (4.18) à extremidade mais curta do cartucho de Florisil (3.9) (ver figura 2). Lava-se o cartucho utilizando uma seringa de 10 ml (4.19), efectua-se uma toma de 10 ml de clorofórmio (3.1) e procede-se à remoção do ar mediante a injeção pela torneira de 8 ml de clorofórmio, fazendo-o passar rapidamente através do cartucho. Liga-se a extremidade mais longa do cartucho a uma coluna de vidro (4.17) e fazem-se passar os restantes 2 ml de clorofórmio pela coluna, através do cartucho.

Fecha-se a torneira e remove-se a seringa.

(ver documento original)

##### 5.4.1.2 - Purificação:

Introduz-se o filtrado recolhido (5.3) no conjunto coluna-cartucho de Florisil e faz-se escoar por acção da gravidade. Lava-se com 5 ml de clorofórmio (3.1) seguidos de 20 ml de metanol (3.2). Desprezam-se os eluídos.

Durante a execução destas operações deve-se assegurar que o sistema coluna-cartucho não seque.

Elui-se a aflatoxina B(índice 1) com 40 ml de mistura de acetona e de água (3.5.1), recolhendo a totalidade do eluído no balão de fundo redondo do evaporador rotativo (4.4).

Concentra-se o eluído no evaporador rotativo a 40°C-50°C, até terminar a destilação da acetona.

Nota. - Nesta fase deve permanecer no balão cerca de 0,5 ml de líquido. A experiência tem revelado que o prosseguimento da evaporação não prejudica o processo e que a quantidade de acetona presente em 0,5 ml de líquido não é significativa. Resíduos de acetona eventualmente presentes poderiam originar perdas de aflatoxina B(índice 1) no cartucho de C(índice 18).

Junta-se 1 ml de metanol (3.2), agita-se o balão, para facilitar a dissolução dos resíduos de aflatoxina B(índice 1) presentes nas paredes, e adicionam-se 4 ml de água, agitando. Desliga-se e elimina-se o cartucho de Florisil.

Lava-se a coluna com água e guarda-se para o processo de purificação com o cartucho de C(índice 18).

#### 5.4.2 - Purificação por cartucho de C(índice 18).

##### 5.4.2.1 - Preparação do sistema coluna-cartucho:

Adapta-se uma torneira (4.18) à extremidade mais curta de um cartucho de C(índice 18) (3.10) (ver figura 2). Com auxílio de uma seringa (4.19), remove-se o ar do cartucho, mediante a injeção rápida, pela torneira, de 10 ml de metanol (3.2) (as bolhas de ar no interior do invólucro são visíveis sob a forma de pontos luminosos num fundo acinzentado).

Procede-se à toma de 10 ml de água numa outra seringa e fazem-se passar 8 ml através do cartucho (evita-se a introdução de ar no mesmo durante a mudança do metanol para a água).

Adapta-se a extremidade mais longa do cartucho à coluna de vidro (4.17) e fazem-se passar os restantes 2 ml pela coluna, através do cartucho. Fecha-se a torneira e remove-se a seringa.

##### 5.4.2.2 - Purificação:

Transfere-se quantitativamente para a coluna (4.17) o extracto recolhido em 5.4.1.2 e lava-se o balão com duas porções de 5 ml de mistura de água e de metanol (3.5.2), deixando escoar por acção da gravidade. Durante a execução destas operações, evita-se a secagem do sistema coluna-cartucho (se ocorrer a formação de bolhas de ar no estreitamento próximo do cartucho deve-se interromper o fluxo e bate-se levemente no topo da coluna, de forma a eliminá-las,

retomando em seguida as operações). Elui-se com 25 ml de mistura de água e de metanol (3.5.2), desprezando-se o eluído.

Elui-se a aflatoxina B(índice 1) com 50 ml de mistura de água e de acetona (3.5.3) e recolhe-se a totalidade do eluído num balão volumétrico de 50 ml. Completa-se até ao traço de referência com água e homogeneiza-se; a solução resultante é utilizada no ensaio cromatográfico (5.5).

Nota. - Em geral, não é necessário filtrar o extracto final antes do processo de HPLC. Se, contudo, se verificar a necessidade de tal operação, dever-se-á evitar o uso de filtros à base de celulose, susceptíveis de ocasionar perdas de aflatoxina B(índice 1). Poder-se-ão utilizar filtros de teflon.

#### 5.5 - Cromatografia líquida de alta resolução:

(ver figura 3 para montagem do equipamento). Deve-se prever o tempo suficiente para permitir o condicionamento e a estabilização dos aparelhos, antes do uso.

(ver documento original)

##### 5.5.1 - Regulação da bomba de HPLC:

Regula-se a bomba do aparelho de HPLC (4.5) de modo a obter um fluxo de 0,5 ml/min ou 0,3 ml/min, para uma coluna de HPLC de 5 (mi)m ou 3 (mi)m de partícula (4.6), respectivamente, utilizando a fase móvel (3.6).

##### 5.5.2 - Regulação da bomba para a reacção pós-coluna:

Regula-se a bomba (4.7) de modo a obter um fluxo de 0,2 ml/min-0,4 ml/min de solução aquosa saturada de iodo (3.7).

A título indicativo é aconselhável a utilização de fluxos da ordem de 0,4 ml/min ou 0,2 ml/min associados a fluxos da fase móvel (3.6) de 0,5 ml/min e 0,3 ml/min, respectivamente.

##### 5.5.3 - Detector de fluorescência:

Regula-se o detector de fluorescência (4.11) para um comprimento de onda de excitação de 365 nm e um comprimento de onda de emissão de 435 nm (no caso de aparelhos com filtro superior a 400 nm). Ajusta-se a atenuação de modo a obter, para 1 ng de aflatoxina B(índice 1), uma deflexão da caneta do registador de cerca de 80% da escala total.

##### 5.5.4 - Injector:

Injectam-se, para todas as soluções, quantidades da ordem de 250 (mi)l, procedendo de acordo com as instruções do fabricante.

##### 5.5.5 - Verificação da separação cromatográfica:

Injecta-se a solução para ensaio cromatográfico (3.14.1). As inflexões observadas na curva registada deverão ser inferiores a 5% da soma das alturas dos picos adjacentes.

##### 5.5.6 - Verificação da estabilidade do sistema:

Antes de cada série de análises, procede-se à injeção repetida de solução de calibração (3.13.3), até obtenção de picos com áreas estáveis.

Nota. - Os picos produzidos pela aflatoxina B(índice 1) não deverão apresentar, em injeções consecutivas, diferenças superiores a 6%.

Procede-se de imediato à verificação da linearidade (5.5.7).

##### 5.5.7 - Verificação da linearidade:

Injectam-se as soluções de calibração de aflatoxina B(índice 1) (3.13.1 a 3.13.4). Utiliza-se em cada terceira injeção a solução de calibração (3.13.3), para correcção do desvio das respostas.

Nota. - Os picos relativos à solução de calibração não deverão apresentar diferenças superiores a 10% em noventa minutos.

Corrige-se o desvio de acordo com a fórmula indicada no ponto 7. A curva de calibração deve apresentar a forma de uma recta que passa pela origem, com um erro-padrão inferior a duas vezes o valor estimado de Y.

Os valores encontrados não deverão diferir em mais de 3% dos valores nominais. Se os requisitos forem satisfeitos, prossegue-se de imediato.

No caso contrário, identificam-se e corrigem-se as causas do problema antes de continuar o processo.

#### 5.5.8 - Injecção dos extractos da amostra:

Injectam-se os extractos da amostra purificada (5.4.2.2). Após cada série de dois extractos da amostra, repetir a injeção da solução de calibração (3.13.3), de acordo com a ordem seguinte: solução de calibração, extracto, extracto, solução de calibração, extracto, extracto, solução de calibração, etc.

#### 6 - Ensaio de confirmação:

##### 6.1 - Tratamento subsequente do extracto (5.4.2.2):

Juntam-se 5 ml de solução de NaCl (3.15.1) ao extracto final obtido em 5.4.2.2 em ampola de decantação (4.24.1).

Extrai-se três vezes com 2 ml de clorofórmio (3.1) durante um minuto. Vertem-se os extractos de clorofórmio combinados numa proveta de 10 ml, através de cerca de 1 g de sulfato de sódio (3.15.2). Poderá usar-se um funil de pequenas dimensões (diâmetro de 4 cm), contendo um pedaço de algodão coberto com cerca de 1 g de sulfato de sódio (3.15.2). Lava-se a camada de sulfato com alguns mililitros de clorofórmio, recolhendo na mesma proveta ou ampola.

Evapora-se o extracto de clorofórmio à secura, recorrendo à unidade de aquecimento (4.24.2), e redissolve-se em 1 ml de clorofórmio.

##### 6.2 - Preparação do derivado e cromatografia em camada fina:

Identificam-se as aflatoxinas, procedendo-se de acordo com a Directiva n.º 76/372/CEE, do Conselho, anexo, método A, ponto 5.6.2.

#### 7 - Cálculo e resultados:

Calcula-se o teor de aflatoxina B(índice 1) presente na amostra expresso em lg/kg, recorrendo à fórmula seguinte:

(ver documento original)

Seguindo o procedimento descrito no presente método, a fórmula referida reduz-se a:

Teor de aflatoxina B(índice 1) em (m)g/kg = 20 x m

7.1 - O cálculo dos resultados pode também fazer-se recorrendo à medida da altura dos picos.

8 - Repetibilidade. - Ver ponto 10.1.

9 - Reprodutibilidade. - Ver ponto 10.1.

#### 10 - Observações:

##### 10.1 - Precisão:

Um estudo interlaboratorial (Egmond, H. P. van, Heisterkamp, S. H., e Paulsch, W. E. 1991 - Food Additives and Contaminants, 8, 17-29), efectuado à escala internacional com alimentos compostos para animais, forneceu, no que respeita à repetibilidade e à reprodutibilidade, os resultados que se apresentam no quadro n.º 1. O termo repetibilidade (r) aqui utilizado define-se como a razão máxima que, com uma probabilidade de 95%, não é significativa na comparação de dois valores obtidos para a mesma amostra, no mesmo laboratório e nas mesmas condições. O termo reprodutibilidade (R) é definido de um modo análogo, no que se refere à comparação de dois laboratórios diferentes.

Em conformidade com a norma ISO 3534-1977, no ponto 2.35, e com a Decisão n.º 89/610/CEE, da Comissão, publicada no JO, n.º L 351, de 2 de Dezembro de 1989, p. 39, os valores de r e R encontram-se também indicados no quadro n.º 1 sob a forma de coeficientes de variação.

#### QUADRO N.º 1

Repetibilidade (r) e reprodutibilidade (R), expressas sob a forma de razões, e respectivos coeficientes de variação (15 laboratórios).

(ver documento original)

#### 10.2 - Estabilidade do clorofórmio (3.1):

As características de absorção do cartucho de Florisil podem-se alterar se o elemento estabilizador for outro que não o etanol. Isto deve ser verificado de acordo com o ponto 10.3 sempre que o clorofórmio descrito não for o disponível.

#### 10.3 - Exactidão:

A aplicação correcta do método deve ser verificada através de determinações em duplicado, efectuadas com materiais de referência garantidos. Na ausência destes, a eficiência do método deverá ser verificada através de ensaios de recuperação, efectuados com amostras em branco. A diferença entre a média e o valor real, expressa em percentagem do valor real, dever-se-á situar entre os limites - 20% a +10%.

#### C - Observações relativas aos métodos A e B

1 - Extracção da gordura. - As amostras que contenham mais de 5% de matéria gorda devem ser submetidas à extracção da gordura com éter de petróleo (ponto de ebulição: 40°C a 60°C), após a preparação indicada em 5.1.

Neste caso, os resultados analíticos devem ser expressos em peso de amostra não submetida à extracção da gordura.

2 - Reprodutibilidade dos resultados do método A. - A reprodutibilidade dos resultados, ou seja, a variação entre os resultados obtidos por dois ou mais laboratórios para a mesma amostra, tem de ser estimada em:

(mais ou menos) 50% da média obtida com os valores médios de aflatoxina B(índice 1) entre 10 (mi)g/kg e 20 (mi)g/kg;

(mais ou menos) 10 (mi)g/kg em relação à média dos valores médios entre 20 (mi)g/kg e 50 (mi)g/kg;

(mais ou menos) 20% da média dos valores médios superiores a 50 (mi)g/kg.

#### QUADRO SINÓPTICO

(ver documento original)

#### QUADRO SINÓPTICO

(ver documento original)

#### QUADRO SINÓPTICO

(ver documento original)