

DIÁRIO DA REPÚBLICA

SUMÁRIO

**Presidência do Conselho de Ministros
e Ministérios do Planeamento
e da Administração do Território
e da Indústria e Energia**

Portaria n.º 811/89:

Estabelece regras para a publicidade à venda de veículos automóveis novos ligeiros de passageiros difundida através da rádio e da televisão 4064

Portaria n.º 812/89:

Estabelece regras para a publicidade à venda de veículos automóveis novos ligeiros de passageiros difundida através da imprensa, cartazes ou qualquer outra forma escrita 4064

**Ministérios das Finanças e da Agricultura,
Pescas e Alimentação**

Portaria n.º 813/89:

Alarga o quadro do Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA) 4065

**Ministérios das Finanças,
da Agricultura, Pescas
e Alimentação e do Comércio e Turismo**

Portaria n.º 814/89:

Estabelece as regras relativas à fixação e atribuição de restituições à exportação para os produtos visados no artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 519/85, de 31 de Dezembro 4065

Despacho Normativo n.º 90/89:

Fixa os montantes a restituir à exportação de produtos da Organização Nacional do Mercado para o sector das frutas e produtos hortícolas frescos 4066

**Ministério da Agricultura,
Pescas e Alimentação**

Portaria n.º 815/89:

Revoga a Portaria n.º 17 433, de 18 de Novembro de 1959..... 4066

Portaria n.º 816/89:

Estabelece os métodos de análise para o controlo oficial dos alimentos para animais 4066

**Ministério das Obras Públicas,
Transportes e Comunicações**

Decreto-Lei n.º 308/89:

Atribui competências de fiscalização ao Conselho de Mercados de Obras Públicas e Particulares na aplicação das normas constantes dos Decretos n.ºs 41 821, de 11 de Agosto de 1958, e 46 427, de 10 de Julho de 1965..... 4085

Portaria n.º 817/89:

Lança em circulação, cumulativamente com as que estão em vigor, uma emissão de selos com tarja fosforescente alusiva aos «Peixes da Madeira» 4086

Declaração:

De terem sido autorizadas alterações orçamentais no Ministério das Obras Públicas, Transportes e Comunicações no montante de 195 717 contos..... 4087

**PRESIDÊNCIA DO CONSELHO DE MINISTROS
E MINISTÉRIOS DO PLANEAMENTO
E DA ADMINISTRAÇÃO DO TERRITÓRIO
E DA INDÚSTRIA E ENERGIA**

Portaria n.º 811/89

de 14 de Setembro

Manda o Governo, pelos Ministros do Planeamento e da Administração do Território, da Indústria e Energia e Adjunto e da Juventude, nos termos do n.º 5 do artigo 25.º do Decreto-Lei an.º 303/83, de 28 de Junho, na redacção que lhe foi dada pelo artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 266/89, de 18 de Agosto, o seguinte:

1.º A presente portaria aplica-se à publicidade à venda de veículos automóveis novos ligeiros de passageiros difundida através da rádio e da televisão.

2.º Os encargos anuais inerentes ao veículo a considerar na respectiva publicidade são:

- a) Consumo de combustível;
- b) Seguro obrigatório de responsabilidade civil automóvel;
- c) Impostos.

3.º Tais encargos serão calculados tendo por base 15 000 km percorridos por ano de utilização do veículo e os preços vigentes numa data compreendida nos seis meses anteriores ao início da difusão da campanha.

4.º Para efeitos da alínea a) do n.º 2.º ter-se-á em conta a média dos valores de consumo constantes da «Ficha de recepção CEE» do veículo a publicitar, a quilometragem prevista no número anterior e os preços dos combustíveis.

5.º Para efeitos da alínea b) do n.º 2.º, o montante dos encargos a indicar será o que o Instituto de Seguros de Portugal vier a definir, a pedido dos interessados, como valor médio dos prémios praticados pelas companhias seguradoras para aquele tipo de veículo.

6.º Para efeitos da alínea c) do n.º 2.º, ter-se-ão em conta o imposto sobre veículos e os impostos de compensação e especial sobre veículos, se aplicáveis.

7.º A informação sobre os encargos previstos no n.º 2.º poderá fazer-se de forma agregada, através da menção de um quantitativo global.

8.º Tal informação deverá conter referência expressa de que o valor ou valores indicados respeitam a

15 000 km por ano de utilização e ainda menção do mês e ano a que se reportam os preços utilizados no cálculo.

9.º Sempre que a mensagem publicitária tenha por objecto diferentes modelos ou versões de veículos automóveis ligeiros de passageiros, deverá a informação sobre os encargos indicar os valores mínimos e máximos aplicáveis.

Presidência do Conselho de Ministros e Ministérios do Planeamento e da Administração do Território e da Indústria e Energia.

Assinada em 1 de Setembro de 1989.

Pelo Ministro do Planeamento e da Administração do Território, *José Macário Correia*, Secretário de Estado do Ambiente e dos Recursos Naturais. — Pelo Ministro da Indústria e Energia, *Nuno Manuel Franco Ribeiro da Silva*, Secretário de Estado da Energia. — Pelo Ministro Adjunto e da Juventude, *Albino Azevedo Soares*, Secretário de Estado Adjunto do Ministro Adjunto e da Juventude.

Portaria n.º 812/89

de 14 de Setembro

Manda o Governo, pelos Ministros do Planeamento e da Administração do Território, da Indústria e Energia e Adjunto e da Juventude, nos termos do n.º 5 do artigo 25.º do Decreto-Lei n.º 303/83, de 28 de Junho, na redacção que lhe foi dada pelo artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 266/89, de 18 de Agosto, o seguinte:

1.º A presente portaria aplica-se à publicidade à venda de veículos automóveis novos ligeiros de passageiros difundida através da imprensa, cartazes ou qualquer outra forma escrita.

2.º Os encargos anuais inerentes ao veículo a considerar na respectiva publicidade são:

- a) Consumo de combustível;
- b) Seguro obrigatório de responsabilidade civil automóvel;
- c) Impostos.

3.º Tais encargos serão calculados tendo por base 15 000 km percorridos por ano de utilização do veículo e os preços vigentes numa data compreendida nos seis meses anteriores ao início da difusão da campanha.

4.º Para efeitos da alínea *a*) do n.º 2.º ter-se-á em conta a média dos valores de consumo constantes da «Ficha de recepção CEE» do veículo a publicitar, a quilometragem prevista no número anterior e os preços dos combustíveis.

5.º Para efeitos da alínea *b*) do n.º 2.º, o montante dos encargos a indicar será o que o Instituto de Seguros de Portugal vier a definir a pedido dos interessados como valor médio dos prémios praticados pelas companhias seguradoras para aquele tipo de veículo.

6.º Para efeitos da alínea *c*) do n.º 2.º, ter-se-ão em conta o imposto sobre veículos e os impostos de compensação e especial sobre veículos, se aplicáveis.

7.º A taxa anual efectiva dos encargos financeiros globais deverá ser calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$S = \sum_{k=1}^n \frac{A_k}{t_k (1+i)}$$

em que:

- S — montante do crédito;
- A_k — montante de cada pagamento efectuado;
- t_k — número de anos de vida do crédito (não é necessariamente um número inteiro);
- i — taxa anual efectiva;
- n — número de pagamentos.

8.º A informação obrigatória prevista na presente portaria deverá apresentar de forma discriminada cada um dos encargos e seus quantitativos, indicação do mês e ano a que se reportam os preços utilizados no respectivo cálculo e a menção de que tais encargos se referem a 15 000 km percorridos por ano de utilização.

9.º Sempre que a mensagem publicitária tenha por objecto diferentes modelos ou versões de veículos automóveis ligeiros de passageiros, deverá a informação sobre os encargos indicar os valores mínimos e máximos aplicáveis.

Presidência do Conselho de Ministros e Ministérios do Planeamento e da Administração do Território e da Indústria e Energia.

Assinada em 1 de Setembro de 1989.

Pelo Ministro do Planeamento e da Administração do Território, *José Macário Correia*, Secretário de Estado do Ambiente e dos Recursos Naturais. — Pelo Ministro da Indústria e Energia, *Nuno Manuel Franco Ribeiro da Silva*, Secretário de Estado da Energia. — Pelo Ministro Adjunto e da Juventude, *Albino Azevedo Soares*, Secretário de Estado Adjunto do Ministro Adjunto e da Juventude.

MINISTÉRIOS DAS FINANÇAS E DA AGRICULTURA, PESCAS E ALIMENTAÇÃO

Portaria n.º 813/89

de 14 de Setembro

Considerando que o técnico superior de 1.ª classe da carreira de engenheiro José Nunes Martins Pedro, oriundo do quadro de efectivos interdepartamentais (QEI), satisfaz o preceituado no artigo 9.º do Decreto-

-Lei n.º 43/84, de 3 de Fevereiro, por prestar serviço, há mais de um ano, como excedente no Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA);

Considerando a necessidade premente de não se interromperem os projectos da responsabilidade daquele técnico — «Introdução e promoção de fruteiras tropicais e subtropicais» e «Introdução e promoção de jobo e *cuphea*»:

Ao abrigo da alínea *b*) do n.º 1 do artigo 9.º do Decreto-Lei n.º 43/84, de 3 de Fevereiro:

Manda o Governo, pelos Ministros das Finanças e da Agricultura, Pescas e Alimentação, que seja alargado o quadro do Instituto Nacional de Investigação Agrária com mais um lugar de técnico superior principal da carreira de engenheiro, que será extinto quando vagar.

Ministérios das Finanças e da Agricultura, Pescas e Alimentação.

Assinada em 17 de Agosto de 1989.

Pelo Ministro das Finanças, *Rui Carlos Alvarez Carp*, Secretário de Estado do Orçamento. — Pelo Ministro da Agricultura, Pescas e Alimentação, *Alvaro dos Santos Amaro*, Secretário de Estado da Agricultura.

MINISTÉRIOS DAS FINANÇAS, DA AGRICULTURA, PESCAS E ALIMENTAÇÃO E DO COMÉRCIO E TURISMO

Portaria n.º 814/89

de 14 de Setembro

Tendo em conta a faculdade legal de atribuição de restituições à exportação aos produtos abrangidos pela Organização Nacional do Mercado para o sector das frutas e produtos hortícolas frescos;

Considerando que o montante da restituição a conceder às exportações para a Comunidade não pode exceder a diferença de preços verificados em Portugal e na Comunidade, conforme o estipulado no artigo 271.º do Acto de Adesão;

Considerando que o montante da restituição a conceder às exportações para países terceiros deve ser limitado ao estritamente necessário para assegurar o escoamento do produto em causa no mercado de destino, conforme o estipulado no n.º 2 do artigo 283.º do Acto de Adesão;

Considerando ainda que a fixação destas restituições está sujeita a consultas prévias no âmbito do Comité de Gestão instituído pela Organização Comum de Mercado do sector em causa, nos termos do artigo 276.º e do n.º 2 do artigo 283.º do Acto de Adesão;

Ouvidos os Governos das Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira:

Manda o Governo, pelos Ministros das Finanças, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e Turismo, ao abrigo do n.º 13 do artigo 15.º do Decreto-Lei n.º 519/85, de 31 de Dezembro, o seguinte:

1.º A presente portaria estabelece as regras relativas à fixação e atribuição de restituições à exportação para os produtos visados no artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 519/85, de 31 de Dezembro.

2.º As restituições são fixadas tomando em consideração os elementos seguintes:

a) A situação e as perspectivas de evolução:

- 1) No mercado nacional, dos preços dos produtos do sector horto-frutícola;
- 2) No mercado comunitário e mundial, dos preços dos produtos do sector horto-frutícola;

b) O interesse em evitar perturbações susceptíveis de provocar um desequilíbrio prolongado entre a oferta e a procura no mercado português;

c) O impacte económico da exportação em questão.

3.º Para o cálculo da restituição ter-se-á em conta a diferença dos preços dos produtos do sector horto-frutícola nos mercados nacional, comunitário e mundial.

4.º As restituições à exportação podem ser diferenciadas consoante os países de destino, não podendo, quando destinadas ao mercado comunitário, exceder a diferença de preços praticados no mercado nacional e naquele mercado.

5.º Os produtos para os quais é fixada uma restituição à exportação e os respectivos montantes constarão de uma lista aprovada por despacho conjunto dos Ministros das Finanças, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e Turismo, sempre que as condições de mercado o exijam.

6.º O montante da restituição aplicável é o que estiver em vigor no dia da exportação.

7.º O montante da restituição é pago pelo INGA — Instituto Nacional de Intervenção e Garantia Agrícola ao interessado, a seu pedido, mediante a apresentação de documentos visados pelas entidades competentes, comprovativos de que os produtos foram exportados, são de origem portuguesa, respeitam as normas de qualidade e ainda que atingiram o país de destino.

8.º Esta portaria entra em vigor no dia seguinte ao da sua publicação.

Ministérios das Finanças, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e Turismo.

Assinada em 6 de Setembro de 1989.

O Ministro das Finanças, *Miguel José Ribeiro Cadilhe*. — O Ministro da Agricultura, Pescas e Alimentação, *Álvaro Roque de Pinho Bissaia Barreto*. — Pelo Ministro do Comércio e Turismo, *Jorge Manuel Mendes Antas*, Secretário de Estado do Comércio Interno.

Despacho Normativo n.º 90/89

1 — Nos termos do disposto no n.º 5.º da Portaria n.º 814/89, de 14 de Setembro, os produtos da Organização Nacional do Mercado para o sector das frutas e produtos hortícolas frescos aos quais será concedida uma restituição à exportação e respectivos montantes são os seguintes:

Posição pautal	Designação	Destinados a países terceiros
0808 10 91 a 0808 10 99	Maçãs	8\$50/kg

Posição pautal	Designação	Destinados a países terceiros
0808 20 31 a 0808 20 39	Peras	12\$/kg

2 — Para beneficiarem das restituições à exportação indicadas no número anterior os exportadores deverão observar os procedimentos instituídos pela Portaria n.º 814/89, de 14 de Setembro.

3 — O presente despacho normativo entra em vigor no dia imediato ao da sua publicação.

Ministérios das Finanças, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e Turismo, 6 de Setembro de 1989. — O Ministro das Finanças, *Miguel José Ribeiro Cadilhe*. — O Ministro da Agricultura, Pescas e Alimentação, *Álvaro Roque de Pinho Bissaia Barreto*. — Pelo Ministro do Comércio e Turismo, *Jorge Manuel Mendes Antas*, Secretário de Estado do Comércio Interno.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PESCAS E ALIMENTAÇÃO

Portaria n.º 815/89

de 14 de Setembro

Considerando que nos termos do disposto nas Resoluções do Conselho de Ministros n.ºs 79/86, de 20 de Novembro, e 82/86, de 24 de Novembro, e na Portaria n.º 424/87, de 21 de Maio, os armazéns e infra-estruturas de apoio à comercialização de produtos agrícolas na titularidade da ex-Junta Nacional das Frutas serão doados às cooperativas agrícolas, alterando-se, assim, substancialmente a dinâmica intervencionista do Estado neste sector de actividade;

Considerando, ainda, a necessidade de implementar as medidas de política de incentivo e apoio à produção agrícola:

Nos termos do disposto na alínea d) do artigo 202.º da Constituição:

Manda o Governo, pelo Ministro da Agricultura, Pescas e Alimentação, que seja revogada a Portaria n.º 17 433, de 18 de Novembro de 1959.

Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação.

Assinada em 1 de Setembro de 1989.

Pelo Ministro da Agricultura, Pescas e Alimentação, *Luís Gonzaga de Sousa Morais Cardoso*, Secretário de Estado da Alimentação.

Portaria n.º 816/89

de 14 de Setembro

O Regulamento de Comercialização e Utilização de Aditivos nos Alimentos para Animais, aprovado pelo

Decreto-Lei n.º 50/84, de 8 de Fevereiro, estabeleceu nos anexos I e II, depois substituídos pela Portaria n.º 521/86, de 13 de Setembro, quais os aditivos admitidos nos alimentos para animais e as doses em que podem ser utilizados.

Com a publicação da presente portaria são fixados os métodos de análise a utilizar no controlo oficial daqueles alimentos, que correspondem na íntegra ao estabelecido pelas directivas comunitárias relativas a esta matéria.

Assim:

Ao abrigo do disposto no artigo 10.º do Regulamento de Comercialização e Utilização de Aditivos nos Alimentos para Animais, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 50/84, de 8 de Fevereiro:

Manda o Governo, pelo Ministro da Agricultura, Pescas e Alimentação, que os métodos de análise para o controlo oficial dos alimentos para animais, ainda não contidos em normas portuguesas, sejam os fixados em anexo à presente portaria.

Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação.

Assinada em 14 de Agosto de 1989.

Pelo Ministro da Agricultura, Pescas e Alimentação,
Luís Gonzaga de Sousa Morais Cardoso, Secretário de Estado da Alimentação.

DOSAGEM DA AVOPARCINA POR DIFUSÃO EM GELOSE

1. OBJECTO E DOMÍNIO DE APLICAÇÃO

O método permite dosar a avoparcina nos alimentos e nas premisturas. O limite inferior da dosagem é de 2 mg/kg (2 ppm). A presença de antibióticos com políesteres pode interferir na dosagem.

2. PRINCÍPIO

A amostra é submetida a uma extração por uma mistura acetona/água/ácido clorídico. A actividade antibiótica do extrato é determinada por medida da difusão da avoparcina num meio geloso, semeado com *Bacillus subtilis*. A difusão revela-se através da formação de zonas de inibição de microorganismos. O diâmetro destas zonas é considerado como sendo directamente proporcional ao logaritmo da concentração em antibiótico para a gama das concentrações utilizadas.

3. MICROORGANISMO: *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Manutenção da estirpe

Semear o meio de cultura (4.1), em tubos inclinados, com *Bacillus subtilis*. Incubar durante uma noite a 30 °C, conservar no frigorífico a cerca de 4 °C e renovar mensalmente a sementeira.

3.2. Preparação da suspensão de esporos (*)

Recolher os germes dum tubo de gelose (3.1), de preparação recente, com a ajuda de 2 a 3 ml de água esterilizada. Semeiar com esta suspensão 300 ml do meio de cultura (4.1) num frasco de Roux e incubar durante três a cinco dias a 30 °C. Depois de ter controlado a esporulação ao microscópio, recolher os esporos em 15 ml de etanol (4.2) e homogeneizar. Esta suspensão pode ser conservada, durante pelo menos cinco meses, a cerca de 4 °C.

4. MEIO DE CULTURA REAGENTES

4.1. Meio de manutenção da estirpe (*)

Peptona	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levedura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucose	1,0 g
Gelose	15,0 g
Água	1 000 ml
pH 6,5 (após esterilização)	

4.2. Etanol a 20 % (v/v): diluir 200 ml de etanol em 800 ml de água.

4.3. Ácido clorídico, d: 1,18-1,19.

4.4. Solução 2 M de hidróxido de sódio.

4.5. Tampão fosfato 0,1 M:

dihidrogenofosfato de potássio, KH₂PO₄: 13,6 g
água ad 1 000 ml
ajustar o pH a 4,5.

4.6. Mistura acetona/água/ácido clorídico (4.3): 65/32,5/2,5 (v/v/v).

4.7. Substância padrão: sulfato de avoparcina de actividade conhecida.

5. SOLUÇÕES-PADRÃO

Dissolver uma quantidade com o peso preciso de cerca de 10 mg de substância padrão (4.7) no tampão fosfato e diluir com esse tampão para obter uma solução mãe de avoparcina de 100 µg/ml. Esta solução, conservada num frasco tapado a 4 °C, é estável durante sete dias.

5.1. Para as premisturas

Preparar a partir desta solução e através de diluições sucessivas, com a ajuda do tampão fosfato (4.5) as soluções seguintes:

- S₁ 4 µg/ml
- S₂ 2 µg/ml
- S₃ 1 µg/ml
- S₄ 0,5 µg/ml.

5.2. Para os alimentos

Preparar a partir desta solução e através de diluições sucessivas, com a ajuda do tampão fosfato (4.5) as soluções seguintes:

- S₁ 2 µg/ml
- S₂ 1,0 µg/ml
- S₃ 0,5 µg/ml
- S₄ 0,25 µg/ml.

6. PREPARAÇÃO DO EXTRACTO E DAS SOLUÇÕES

6.1. Premisturas

De cerca de 10 mg, pesar uma quantidade de amostra que conteha de 10 a 100 mg de avoparcina, passar para um balão graduado de 100 ml, juntar 60 ml da mistura (4.6) e agitar durante 15 minutos num agitador mecânico. Verificar o pH e ajustá-lo a 2, se necessário com o ácido clorídico (4.3). Completar o volume com a mistura (4.6) e homogeneizar. Filtrar uma porção com um papel filtro apropriado (por ex. Whatman n.º 1) e eliminar os 5 primeiros ml do filtrado. Retirar uma parte alíquota e ajustar o pH a 4,5 com auxílio da solução de hidróxido de sódio (4.4). Diluir esta solução com o tampão fosfato para obter uma concentração presumida de avoparcina de 4 µg/ml (= U₄).

Preparar a partir desta solução e através de diluições sucessivas (1 + 1) com o auxílio do tampão fosfato as soluções U₁ (concentração presumida: 2 µg/ml), U₂ (concentração presumida: 1 µg/ml) e U₃ (concentração presumida: 0,5 µg/ml).

6.2. Alimentos

Pesar uma quantidade de 50,0 g de amostra, adicionar 100 ml da mistura (4.6) e agitar durante 30 minutos num agitador mecânico. Clarificar o extracto por centrifugação (em tubos rolhados), retirar uma parte alíquota do extracto limpidado (cf. quadro seguinte) e ajustar o pH a 4,5 com o auxílio da solução de hidróxido de sódio (4.4). Diluir esta solução com tampão fosfato (4.5) para obter a solução U₄ (cf. quadro seguinte).

Preparar, a partir desta solução e por diluições sucessivas (1 + 1) com o auxílio do tampão fosfato (4.5), as soluções U₁ (concentração presumida: 1,0 µg/ml), U₂ (concentração presumida: 0,5 µg/ml) e U₃ (concentração presumida: 0,25 µg/ml).

Teor presumido de avoparcina (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Peso da amostra em g (± 0,1 g)	50	50	50	50	50	50
Volume da mistura (4.6) (ml)	100	100	100	100	100	100
Volume do extracto limpidado (ml)	20	15	20	15	20	10
Volume final (ml): U ₄	25	25	50	50	100	100
Concentração presumida U ₄ em µg/ml	2	cerca de 2	2	cerca de 2	2	2

7. MODALIDADES DA DOSAGEM

7.1. Inoculação do meio de cultura

Semear a 50-60 °C o meio de base da dosagem (4.1), com a suspensão de esporos (3.2). Através de ensaios preliminares, em placas com o meio (4.1), determinar a quantidade de inóculo que permita obter, para as diferentes concentrações de avoparcina, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que sejam ainda nitidas.

7.2. Preparação das caixas

A difusão em gelose efectua-se em caixas com as quatro concentrações da solução padrão (S₁, S₂, S₃, S₄) e as quatro concentrações do extracto (U₁, U₂, U₃, U₄). Cada caixa deve necessariamente receber as quatro concentrações do padrão e do extracto. Para esse efeito, escolher a dimensão das caixas de forma a que possam ser escavadas no meio geloso, pelo menos, oito cavidades com 10 a 13 mm de diâmetro, cujos centros não distem menos de 30 mm. Podem utilizar-se como caixas, placas de vidro planas com um aro de alumínio sobreposto ou de matéria plástica com 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir nas caixas uma quantidade do meio (4.1) semeado como se indica em 7.1, que permita obter uma camada de cerca de 2 mm de espessura (60 ml para uma caixa de 200 mm de diâmetro). Deixar solidificar, fazer as cavidades e depositar nelas os volumes, exactamente medidos, das soluções do padrão e do extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidade conforme o diâmetro). Fazer, pelo menos, quatro repetições de cada concentração de modo que cada determinação seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

(*) Podem ser utilizados outros métodos, desde que seja provado que produzem as suspensões de esporos análogas.
(*) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que dê os mesmos resultados.



7.3. Incubação

Incubar as caixas durante 16 a 18 horas a 30 °C.

8. AVALIAÇÃO

Medir o diâmetro das zonas de inibição com cerca de 0,1 mm. Para cada concentração, registar os valores médios em papel semilogarítmico utilizando os logaritmos das concentrações como ordenadas e os diâmetros das zonas de inibição como abcissas. Traçar as rectas que melhor se ajustem para a solução-padrão e para o extracto ao proceder, por exemplo, como se segue.

Determinar o ponto mais adequado do nível mais baixo da solução padrão (SL) com o auxílio da seguinte fórmula:

$$(a) SL = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_3 - 2S_4}{10}$$

Determinar o ponto mais adequado ao nível mais elevado da solução padrão (SH) com o auxílio da seguinte fórmula:

$$(b) SH = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_3 - 2S_4}{10}$$

Determinar da mesma maneira os pontos mais adequados do extracto para o nível mais baixo (UL) e o nível mais elevado (UH) substituindo S_1, S_2, S_3 e S_4 nas fórmulas acima mencionadas por U_1, U_2, U_3 e U_4 .

Inserer no mesmo gráfico os valores SL e SH. Ao juntar os dois pontos obtém-se a recta que melhor se ajusta à solução padrão. Procedendo da mesma forma para UL e UH obtém-se a recta que melhor se ajusta ao extracto.

Na ausência de qualquer interferência, as rectas deveriam ser paralelas. Na prática, consideram-se como paralelas desde que (SH-SL) e (UH-UL) não de afastem mais de 10% da sua média.

Se as rectas não são paralelas pode-se eliminar ou U_1 e S_1 , ou U_4 e S_4 . Os valores SL, SH, UL e UH que permitem obter as rectas que melhor se ajustam, são calculados com o auxílio das seguintes fórmulas:

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

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

e de fórmulas análogas para UL e UH. A utilização desta alternativa deve, igualmente, ser objecto de uma verificação quanto ao paralelismo das rectas, como se indica mais acima. A obtenção de um resultado proveniente de três níveis, deverá ser mencionado no boletim de análise.

Quando as rectas são consideradas como paralelas, calcular o logaritmo da actividade relativa (log. A) por uma das seguintes fórmulas:

Para quatro níveis

$$(c) \text{Log. A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - S_1 - S_2 - S_3 - S_4) \times 0,602}{U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - U_1 - U_2 - U_3 - U_4}$$

Para três níveis

$$(d) \text{Log. A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_3 - S_1 - S_2 - S_3) \times 0,401}{U_1 + U_2 + U_3 - U_1 - U_2 - U_3}$$

ou

$$(d) \text{Log. A} = \frac{(U_2 + U_3 + U_4 - S_2 - S_3 - S_4) \times 0,401}{U_2 + U_3 + U_4 - U_2 - U_3 - U_4}$$

Actividade real = actividade presumida \times actividade relativa.

Se a actividade relativa se encontrar fora da gama dos valores compreendidos entre 0,5 e 2,0, repetir a determinação procedendo aos ajustamentos adequados das concentrações do extracto ou, eventualmente, das soluções-padrão. Quando essa actividade não possa ser levada à gama dos valores requeridos, o resultado deve considerar-se como aproximado e essa indicação deverá ser registada no boletim de análise.

Quando as rectas são consideradas como não paralelas, repetir a determinação. Se não se atingir o paralelismo, a determinação deverá ser considerada como não satisfatória.

9. REPETITIVIDADE

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas na mesma amostra, pelo mesmo analista, não deveira ultrapassar:

- 2 mg/kg, em valor absoluto, para os teores de avoparcina de 2 a 10 mg/kg,
- 20% do resultado mais elevado para os teores de 10 a 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, em valor absoluto, para os teores de 25 a 50 mg/kg,
- 10% do resultado mais elevado para os teores superiores a 50 mg/kg.

DOSAGEM DA MONENSINA-SÓDIO — POR DIFUSÃO EM GELOSE

1. OBJECTO E DOMÍNIO DE APLICAÇÃO

O método permite dosar a monensina sódica nos alimentos e nas premisturas. O limite inferior da dosagem é de 10 mg/kg (10 ppm) (*).

2. PRINCÍPIO

A amostra é submetida a uma extracção por metanol a 90%. O extracto é submetido a tratamentos adequados segundo o teor em monensina-sódio da amostra. A sua actividade antibiótica é determinada pela medida da difusão da monensina-sódio num meio geloso, semeado com *Bacillus subtilis*. A difusão revela-se pela formação de zonas de inibição do microorganismo. O diâmetro destas zonas é considerado como sendo directamente proporcional ao logaritmo da concentração em antibiótico para a gama das concentrações utilizadas. A sensibilidade deste processo é reduzida na presença de íons de sódio.

3. MICROORGANISMO: *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Manutenção da estirpe

Semear o meio de cultura (4.1), em tubos inclinados, com *Bacillus subtilis*. Incubar durante uma noite a 30 °C, conservar no frigorífico a cerca de 4 °C e renovar mensalmente a sementeira.

3.2. Preparação da suspensão de esporos (*)

Recolher os germes num tubo de gelose (3.1), de preparação recente, com a ajuda de 2 a 3 ml de água esterilizada. Semear com esta suspensão 300 ml do meio de cultura (4.1) num frasco de Roux e incubar durante três a cinco dias a 30 °C. Depois de ser controlado a esporulação ao microscópio, recolher os esporos em 15 ml de etanol (4.3) e homogeneizar. Esta suspensão pode ser conservada, durante pelo menos cinco meses, a cerca de 4 °C.

4. MEIO DE CULTURA E REAGENTES

4.1. Meio de manutenção da estirpe (*)

Triptona	10,0 g
Extracto de levedura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucose	1,0 g
Gelose (segundo a quantidade)	10,0 a 20,0 g
Água	1 000 ml
pH 6,5 (após esterilização)	

4.2. Meio de base da dosagem

Glucose	10,0 g
Extracto de levedura	2,5 g
Hidrogenofosfato de potássio, K_2HPO_4	0,69 g
Dihidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4	0,45 g
Gelose (segundo a quantidade)	10,0 a 20,0 g
Água	1 000 ml
pH 6,0 (após esterilização).	

4.3. Etanol a 20% (v/v): diluir 200 ml de etanol em 800 ml de água.

4.4. Metanol, anidro.

4.5. Metanol a 90% (v/v): diluir 900 ml de metanol (4.4) em 100 ml de água.

4.6. Metanol a 50% (v/v): diluir 500 ml de metanol (4.4) em 500 ml de água.

4.7. Óxido de alumínio granulado (Alcoa F, 20 mesh; Activated Alumina UG1; F. Lancaster and Co., ou equivalente).

4.8. Substância-padrão: monensina sódica de actividade conhecida (disponível, nomeadamente no International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey KT15 3NB, Grã-Bretanha).

5. APARELHAGEM

5.1. Aparelho rotativo para evaporação no vácuo, com balão de fundo redondo de 250 ml.

5.2. Tubo de vidro para cromatografia com 25 mm de diâmetro interno e 400 mm de comprimento, com abertura afilada, com 2 mm de diâmetro, numa extremidade.

5.3. Tubo de vidro para cromatografia com 11 mm de diâmetro e aproximadamente, 300 mm de comprimento, com uma abertura afilada, com 2 mm de diâmetro, numa extremidade.

6. SOLUÇÕES PADRÃO

Dissolver uma quantidade de peso exacto da substância padrão (4.8) no metanol (4.4) e diluir para obter uma solução mãe de monensina sódica de 800 µg. Esta solução conservada, em frasco rolhado, a 4 °C, é estável durante duas semanas.

Preparar, a partir desta solução e por diluições sucessivas com o auxílio do metanol a 50% (4.6) as seguintes soluções:

S_1	8 µg/ml
S_2	4 µg/ml
S_3	2 µg/ml
S_4	1 µg/ml.

7. PREPARAÇÃO DO EXTRACTO

7.1. Extracção

7.1.1. Pré-misturas

Pesar uma quantidade de amostra de 2,0 g adicionar 100 ml de metanol a 90% (4.5), homogeneizar e centrifugar a seguir, durante alguns minutos. Diluir a solução sobrenadante com metanol a 50% (4.6) para obter uma concentração presumida de monensina sódica de 8 µg/ml (= U_1).

7.1.2. Alimentos cujo teor de monensina sódica não é inferior a 50 ppm

Pesar uma quantidade de amostra de 10,0 a 20,0 g, adicionar 100 ml de metanol a 90% (4.5), homogeneizar durante 15 minutos e deixar repousar.

Introduzir um tampão de algodão na abertura afilada do tubo de vidro (5.2), adicionar óxido de alumínio (4.7) sacudindo ligeiramente o tubo, até que a coluna atinja de 75 a 80 mm de altura.

Decantar o extracto para a coluna de óxido de alumínio e recolher o filtrado. Diluir 30 ml do filtrado em 90 ml de água. Em seguida diluir com metanol a 50% (4.6) para obter uma concentração presumida de monensina sódica de 8 µg/ml (= U_1).

(*) 1 mg de monensina sódica equivale a 1 000 unidades «UK».

(*) Poderão ser utilizados outros métodos desde que seja provado que produzem suspensões de esporos análogos.
(*) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que dê os mesmos resultados.

7.1.3. Alimentos cujo teor de monensio sódio é inferior a 50 ppm (até ao limite de 10 ppm)

Pesar uma quantidade de amostra de 10,0 a 20,0 g, adicionar 100 ml de metanol a 90 % (4.5) e homogeneizar durante 15 minutos. Centrifugar para obter um extracto limpidos.

Recolher 40 ml de líquido sobrenadante para uma amostra cujo teor de monensio sódio seja de 50 ppm, 80 ml para uma amostra cujo teor seja de 10 ppm. Evaporar a seco no vácuo, no aparelho rotativo, (5.1) a uma temperatura que não ultrapasse 40 °C. Dissolver o resíduo em 10 ml de metanol a 90 % (4.5).

Introduzir um tampão de algodão na abertura afilada do tubo de vidro (5.3), adicionar óxido de alumínio (4.7) sacudindo ligeiramente o tubo, até que a coluna atinja 75 a 80 mm de altura.

Decantar a solução metanólica do resíduo sobre a coluna de óxido de alumínio e recolher o filtrado. Lavar a coluna com 10 ml de metanol a 90 % (4.5) e adicionar a lavagem ao filtrado.

Evaporar a solução a seco no vácuo no aparelho rotativo (5.1) a uma temperatura inferior a 40 °C. Dissolver o resíduo em 10 ml de metanol anidro (4.4) e completar até 20 ml com água. Centrifugar a 4 000 r/m pelo menos durante 5 minutos no mínimo. Diluir em seguida com metanol a 50 % (4.6) para obter uma concentração presumida de monensio sódio de 8 µg/ml (= U₁).

7.2. Soluções do extracto

Preparar a partir da solução U₁ e, por diluições sucessivas (1 + 1), com o auxílio de metanol a 50 % (4.6) as soluções U₂ (concentração presumida: 4 µg/ml), U₃ (concentração presumida: 2 µg/ml) e U₄ (concentração presumida: 1 µg/ml).

8. MODALIDADES DA DOSAGEM

8.1. Inoculação do meio de cultura

Semear a 50-60 °C o meio de base da dosagem (4.2) com a suspensão de esporos (3.2). Através de ensaios preliminares, em placas com o meio (4.2), determinar a quantidade de inóculo que permita obter, para as diferentes concentrações de monensio sódio, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que sejam ainda nítidas.

8.2. Preparação das caixas

A difusão em gelose efectua-se em caixas com as quatro concentrações da solução padrão (S₁, S₂, S₃, S₄) e as quatro concentrações do extracto (U₁, U₂, U₃, U₄). Cada caixa deve necessariamente receber as quatro concentrações do padrão e do extracto. Para esse efeito, escolher a dimensão das caixas de forma a que possam ser escavadas no meio gelosado, pelo menos, oito cavidades com 10 a 13 mm de diâmetro, cujos centros não distem menos de 30 mm. Podem utilizar-se como caixas, placas de vidro planas com um aro de alumínio sobreposto ou de matéria plástica com 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir nas caixas uma quantidade do meio (4.1) semeado como se indica em 7.1, que permita obter uma camada de cerca de 2 mm de espessura (60 ml para uma caixa de 200 mm de diâmetro). Deixar solidificar, fazer as cavidades e depositar nelas os volumes, exactamente medidos, das soluções do padrão e do extracto (6,10 a 0,15 ml por cavidade conforme o diâmetro). Fazer, pelo menos, quatro repetições de cada concentração de modo que cada determinação seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

8.3. Incubação

Incubar as caixas durante 16 a 18 horas a 30 °C.

9. AVALIAÇÃO

Medir o diâmetro das zonas de inibição com cerca de 0,1 mm. Para cada concentração, registar os valores médios em papel semilogarítmico utilizando os logaritmos das concentrações como ordenadas e os diâmetros das zonas de inibição como abcissas. Traçar as rectas que melhor se ajustem para a solução-padrão e para o extracto ao proceder, por exemplo, como se segue.

Determinar o ponto mais adequado do nível mais baixo da solução padrão (SL) com o auxílio da seguinte fórmula:

$$(a) SL = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_3 - 2S_4}{10}$$

Determinar o ponto mais adequado ao nível mais elevado da solução padrão (SH) com o auxílio da seguinte fórmula:

$$(b) SH = \frac{7S_4 + 4S_3 + S_2 - 2S_1}{10}$$

Determinar da mesma maneira os pontos mais adequados do extracto para o nível mais baixo (UL) e o nível mais elevado (UH) substituindo S₁, S₂, S₃ e S₄ nas fórmulas acima mencionadas por U₁, U₂, U₃ e U₄.

Inscriver no mesmo gráfico os valores SL e SH. Ao juntar os dois pontos obtêm-se a recta que melhor se ajusta à solução padrão. Procedendo da mesma forma para UL e UH obtêm-se a recta que melhor se ajusta ao extracto.

Na ausência de qualquer interferência, as rectas deveriam ser paralelas. Na prática, consideram-se como paralelas desde que (SH-SL) e (UH-UL) não de afastem mais de 10 % da sua média.

Se as rectas não são paralelas pode-se eliminar ou U₁ e S₁, ou U₂ e S₂. Os valores SL, SH, UL e UH que permitem obter as rectas que melhor se ajustam, são calculados com o auxílio das seguintes fórmulas:

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

$$(b) SH = \frac{5S_4 + 2S_3 - S_1}{6} \quad \text{ou} \quad \frac{5S_3 + 2S_4 - S_1}{6}$$

e de fórmulas análogas para UL e UH. A utilização desta alternativa deve, igualmente, ser objecto de uma verificação quanto ao paralelismo das rectas, como se indica acima. A obtenção de um resultado proveniente de três níveis, deverá ser mencionado no boletim de análise.

Quando as rectas são consideradas como paralelas, calcular o logaritmo da actividade relativa (log. A) por uma das seguintes fórmulas:

Para quatro níveis

$$(c) \text{Log. A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - S_1 - S_2 - S_3 - S_4) \times 0,602}{U_4 + U_3 + S_4 + S_3 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Para três níveis

$$(d) \text{Log. A} = \frac{(U_1 + U_2 + U_3 - S_1 - S_2 - S_3) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1} \quad \text{ou}$$

$$(e) \text{Log. A} = \frac{(U_2 + U_3 + U_4 - S_2 - S_3 - S_4) \times 0,401}{U_1 + S_1 - U_2 - S_2}$$

Actividade real = actividade presumida × actividade relativa.

Se a actividade relativa se encontrar fora da gama dos valores compreendidos entre 0,5 e 2,0, repetir a determinação procedendo aos ajustamentos adequados das concentrações do extracto ou, eventualmente, das soluções-padrão. Quando essa actividade não possa ser levada à gama dos valores requeridos, o resultado deve considerar-se como aproximado e essa indicação deverá ser registada no boletim de análise.

Quando as rectas são consideradas como não paralelas, repetir a determinação. Se não se atingir o paralelismo, a determinação deverá ser considerada como não satisfatória.

10. REPETITIVIDADE

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas na mesma amostra, pelo mesmo analista, não deverá ultrapassar:

- 20 % do resultado mais elevado para os teores de 10 a 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, em valor absoluto para os teores de 25 a 50 mg/kg,
- 10 % do resultado mais elevado para os teores superiores a 50 mg/kg.

DOSEAMENTO DO FLAVOFOSFOLIPOL POR DIFUSÃO EM AGAR

1. FINALIDADE E OBJECTO DE APLICAÇÃO

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

2. PRINCÍPIO

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

3. MICROORGANISMO: STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538 P

3.1. Conservação da estirpe

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

3.2. Preparação da suspensão bacteriana (1)

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

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

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

4. MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

4.1. Meio de conservação da estirpe (a)

Peptona de carne	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levedura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	15,0 g
Água	1 000 ml
pH 6,5 (após esterilização)	

4.2. Meio de base do doseamento

4.2.1. Camada inferior (b)

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

4.2.2. Camada a semear

Meio de cultura (4.1), adicionado de 2 g de emulsão anti-espuma de silicone (c).

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

4.4. Metanol puro.

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

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

4.7. Tri(hidroximetil)aminometano p.a.

4.8. Solução metanólica, a 1,5 % (p/v) de cloreto de potássio: dissolver 1,5 g de cloreto de potássio p.a. em 20 ml de água, adicionando metanol (4.4) até à obtenção de um volume de 100 ml.

4.9. Permutador de catiões: Dowex 50 WX8, 20-50 mesh, forma Na (cat. Serva n.º 41600) ou equivalente.

4.10. Permutador de aniões: Dowex 1X2, 50-100 mesh, forma Cl (cat. Serva n.º 41010) ou equivalente. Antes da utilização, manter o produto em metanol a 80 % (4.6) durante 12-14 horas.

4.11. Lá de vidro.

4.12. Papel indicador de pH (pH 6,6-8,1)

4.13. Ácido ascórbico.

4.14. Substância padrão: flavofosfolipol de actividade conhecida.

5. MATERIAL

5.1. Tubo de vidro para cromatografia, com 9 mm de diâmetro interno e 150-200 mm de comprimento, torneira na parte mais afilada da extremidade inferior e rosca normalizada (para acoplamento do funil 5.2) na extremidade superior.

(1) Poderão ser utilizados outros meios desde que se prove produzirem idêntica suspensão bacteriana.

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

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

(c) Por exemplo o SE 1, de Wacker Chemie GmbH, Munique.

5.2. Funil com reservatório de 250 ml, torneira e rosca normalizada.

5.3. Frasco cónico de 250 ml, com rosca normalizada.

5.4. Refrigerador por refluxo, com rosca normalizada.

6. SOLUÇÕES PADRÃO

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

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

S_4	0,2 µg/ml
S_3	0,1 µg/ml
S_2	0,05 µg/ml
S_1	0,025 µg/ml

7. PREPARAÇÃO DO EXTRACTO

7.1. Extração

7.1.1. Concentrados, pré-misturas e alimentos minerais

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

7.1.2. Outros alimentos

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

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

Misturar 110 ml de extracto em 1 l de permutador de cátions (4.9) e ferver durante um minuto sob refrigeração por refluxo (5.4), mexendo sempre. Separar o permutador de cátions por centrifugação ou filtragem. Misturar 100 ml de extracto com 150 ml de metanol (4.4) e deixar repousar a solução 12 a 15 horas a 4 °C. Eliminar a substância flocculenta por filtração a frio.

Fechar a extremidade inferior de um tubo (5.1) com tampo de 18 de vidro (4.11), deitar no tubo 5 ml de permutador de aniões (4.10) e lavar a coluna com 100 ml de metanol a 80 % (4.6). Transvasar em seguida para a coluna, com o funil (5.2), um volume de 100 ml, pelo menos, de filtrado, que teoricamente contenha 16 µg de flavofosfolipol (200 ml por cada 30 g de alimento a 1 ppm). Se necessário diluir o filtrado antes de o transvasar para a coluna, com metanol a 80 % (4.6) para obter uma concentração teórica de flavofosfolipol de 16 µg por 100 ml. Regular o caudal de saída do líquido para cerca de 2 ml por minuto. Eliminar a totalidade do filtrado. Lavar em seguida a coluna com 50 ml de metanol a 80 % (4.6) e eliminar o filtrado.

Eluir o flavofosfolipol pela solução metanólica de cloreto de potássio (4.8), mantendo o caudal de saída a cerca de 2 ml por minuto. Recolher 50 ml de líquido eluído para uma proveta graduada, adicionar 30 ml de água e homogeneizar. O teor de flavofosfolipol desta solução deverá ser de 0,2 µg/ml (= U_2).

7.3. Soluções do extracto

Se necessário (em particular nos casos em que for dispensada a purificação), diluir o extracto obtido em 7.1.1 com metanol a 50 % (4.5) para obter uma concentração teórica de flavofosfolipol de 0,2 µg/ml (= U_2).

Preparar, a partir da solução U_2 por diluições sucessivas (1 + 1) com metanol a 50 % (4.5), as soluções U_1 (concentração teórica: 0,1 µg/ml), U_2 (concentração teórica: 0,005 µg/ml) e U_3 (concentração teórica: 0,025 µg/ml).

8. REGRAS DE DOSEAMENTO

8.1. Inoculação do meio de cultura

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

8.2. Preparação das placas

A difusão em agar é feita em placas contendo as quatro concentrações da solução-padrão S_4 , S_3 , S_2 , S_1 e as quatro concentrações do extracto (U_4 , U_3 , U_2 , U_1). Cada placa terá obrigatoriamente de receber as quatro concentrações-padrão e de extracto. Para o efeito, escolher placas cujas dimensões permitam a abertura no meio de agar, de pelo menos oito cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro e cujos centros não distem menos de 30 mm entre si. Podem ser utilizadas placas de vidro, debradas com aro de alumínio ou substância plástica, de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir nas placas uma doze de meio (4.2.1) que permita obter uma camada de aproximadamente 1,5 mm de espessura (4.5 ml, para uma placa de 200 mm de diâmetro). Deixar solidificar e adicionar o meio (4.2.2), semeado como indicado em 8.1, em quantidade suficiente para a obtenção de uma camada de 1 mm de espessura (30 ml para uma placa de 200 mm de diâmetro). Deixar solidificar, abrir as cavidades e nelas depositar os volumes, rigorosamente medidos, das soluções-padrão e do extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidade, conforme o diâmetro).

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

8.3. Incubação

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

9. AVALIAÇÃO

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

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

$$(a) SL = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_3 - 2S_4}{10}$$

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

$$(b) SH = \frac{7S_4 + 4S_3 + S_2 - 2S_1}{10}$$

Determinar da mesma forma os pontos mais representativos do extracto, tanto para o seu nível mais baixo (UL) como para o seu nível mais elevado (UH), substituindo S_1 , S_2 , S_3 e S_4 nas fórmulas supramencionadas, por U_1 , U_2 , U_3 e U_4 .

Inserver os valores SL e SH no mesmo gráfico. Unindo os dois pontos, obtém-se a resultante mais representativa da solução-padrão. Procedendo da mesma forma para UL e UH, obtém-se a resultante mais representativa do extracto.

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

Se as resultantes não forem paralelas, poder-se-á eliminar quer U_1 e S_1 quer U_4 e S_4 . Os valores SL, SH, UL e UH, que são os que permitem obter as resultantes mais fiéis, serão então calculados mediante as seguintes fórmulas:

$$(a') SL = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \quad \text{ou} \quad \frac{5S_2 + 2S_3 - S_4}{6}$$

$$(b') SH = \frac{5S_4 + 2S_3 - S_1}{6} \quad \text{ou} \quad \frac{5S_3 + 2S_2 - S_1}{6}$$

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

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

Para 4 níveis

$$(c) \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - S_1 - S_2 - S_3 - S_4) \times 0,602}{U_4 + U_3 + S_4 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Para 3 níveis

$$(d) \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_3 - S_1 - S_2 - S_3) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

$$(d') \log. A = \frac{(U_2 + U_3 + U_4 - S_2 - S_3 - S_4) \times 0,401}{U_1 + S_1 - U_2 - S_2}$$

Actividade real = actividade teórica X actividade relativa

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

10. REPRODUTIBILIDADE

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

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

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

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

5 mg/kg, em valor absoluto, para teores entre 25 mg/kg e até 50 mg/kg,

10 % do resultado mais elevado para teores superiores a 50 mg/kg.

DOAGEM DO BUQUINOLATO

(etil-4-hidroxi-6,7-diisobutoxi-3-quinoleína carboxilato)

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite dosar o buquinolato nos alimentos, nos concentrados e nas pré-misturas. O limite inferior de dosagem é de 10 ppm. O decoquinto influi na dosagem.

2. Princípio

A amostra é submetida a extração por clorofórmio. O extracto é evaporado a seco, o residuo é resuspendido em clorofórmio e seguidamente a solução é submetida a uma cromatografia em camada fina. O buquinolato é eluído pelo etanol e determinado por espectrofotofluorimetria por comparação com soluções padrão.

3. Reagentes

3.1. Clorofórmio p.a.

3.2. Etanol a 96 p. cento (v/v) p.a.

3.3. Mistura de clorofórmio e de etanol: misturar 10 volumes de clorofórmio (3.1) e 1 volume de etanol (3.2).

3.4. Etanol a 80 p. cento (v/v) p.a.

3.5. Gel de sílica G para cromatografia em camada fina.

3.6. Substância padrão: buquinolato puro.

3.7. Soluções padrão:

3.7.1. Solução padrão a 0,2 mg de buquinolato por ml: Pesar com uma aproximação de 0,1 mg, 50 mg de substância padrão (3.6). Dissolver em clorofórmio (3.1) num balão aferido de 250 ml aquecendo um banho-maria a 50 °C. Deixar arrefecer até à temperatura ambiente, completar o volume com clorofórmio (3.1) e homogeneizar.

3.7.2. Soluções padrão de trabalho: colher volumes respectivamente de 5,0-10,0-15,0-20,0 e 25,0 ml de la solução (3.7.1) e introduzi-los em balões aferidos de 25 ml. Completar o volume com clorofórmio (3.1) e homogeneizar. Preparar no momento de emprego. Estas soluções contêm respectivamente, 0,04-0,08-0,12-0,16 e 0,20 mg de buquinolato por ml.

4. Instrumentos

4.1. Balões cónicos de 50 e 250 ml, com tampa esmerilhada.

4.2. Agitador

4.3. Centrifugadora, com tubos de 15 ml, com tampa esmerilhada.

4.4. Banho-maria a 50 °C.

4.5. Instrumentos para cromatografia em camada fina.

- 4.6. Placas de vidro para cromatografia em camada fina, 200 x 200 mm, preparadas do seguinte modo: estender uniformemente nas placas uma camada de 0,5 mm de espessura de gel de sílica G (3.5) e deixar secar ao ar durante 15 minutos. Em seguida, manter as placas na estufa durante 2 horas (4.11), transferi-las depois para um dessecador munido de gel de sílica desidratante. As placas a empregar são adequadas na medida em que dêem resultados semelhantes às placas preparadas como acima se indica.
- 4.7. Micropipetas de 0,50 ml.
- 4.8. Colector de zonas para cromatografia em camada fina.
- 4.9. Lâmpada UV de ondas curtas.
- 4.10. Espectrofotofluorímetro equipado com uma lâmpada Xénon e dois monocromatógrafos.
- 4.11. Estufa munida de um ventilador e regulada para 100 °C.
- 4.12. Aparelho rotativo para evaporação no vácuo, com balão de 250 ml
5. Modo operativo
- 5.1. *Preparação da amostra*
- Triturar a amostra de modo a fazê-la passar integralmente através de uma peneira com malhas de 1 mm (em conformidade com a recomendação ISO R 565).
- 5.2. *Extração*
- Pesar com a aproximação de 1 mg, uma quantidade de amostra dividida e homogeneizada que contenha aproximadamente 1,25 mg de buquinolato. Introduzir a amostra num balão cónico de 250 ml (4.1) e acrescentar 100,0 ml de clorofórmio (3.1). Misturar, tapar o balão e agitar durante uma hora com ajuda do agitador (4.2). Deixar decantar, filtrar e eliminar os primeiros ml do filtrado.
- Introduzir 80,0 ml do filtrado limpo num copo de 150 ml ou no balão do aparelho rotativo (4.12). Evaporar quase a seco sobre banho-maria (4.4), resuspende de novo várias vezes o resíduo oleaginoso em alguns ml de clorofórmio (3.1) e transvasar quantitativamente os líquidos num balão aferido de 10 ml com a ajuda de um funil de pé estreito. Completar o volume com clorofórmio (3.1) e homogeneizar. Se a solução não se apresentar limpa, centrifugar durante 3 minutos a 3 000 r/m em tubo fechado.
- 5.3. *Cromatografia em camada fina*
- Depositar pontualmente numa placa de cromatografia em camada fina (4.6), com a ajuda de uma micropipeta (4.7) e a distâncias respectivas de 2 cm, volumes de 0,25 ml do extracto obtido em 5.2 e das cinco soluções padrão de trabalho (3.7.2).
- Revelar o cromatograma em clorofórmio (3.1) até que a linha de frente do solvente atinja praticamente o bordo superior da placa, secar em seguida com a ajuda de uma corrente de ar. Revelar seguidamente em mistura clorofórmio/etanol (3.3) até que a parte superior do solvente tenha diminuído aproximadamente de 12 cm. Deixar evaporar os solventes. Irradiar o cromatograma pela luz UV (4.9) de delimitar as manchas de buquinolato (valor Rf: 0,4 a 0,6) com ajuda de uma agulha.
- 5.4. *Eluição*
- Recolher a sílica de cada zona delimitada, com um colector de zonas (4.8), num tubo de centrifugação (4.3). Juntar em cada tubo 10,0 ml de etanol (3.4), agitar durante 20 minutos, centrifugar em seguida durante 5 minutos a 3 000 r/m. Decantar as soluções limpas em balões cónicos de 50 ml (4.1).
- 5.5. *Medidas de fluorescência*
- Regular a 100 a escala do espectrofotofluorímetro (4.10) com o líquido eluído (5.4) proveniente da solução padrão mais concentrada, utilizando para a excitação o comprimento de onda compreendido entre 200 e 280 nm que proporcione a fluorescência mais intensa e para a emissão o comprimento de onda de 375 nm.
- Medir nestas condições a intensidade de fluorescência das outras substâncias resultantes da separação (5.4). Determinar a partir dos valores encontrados a quantidade (A) de buquinolato em mg contida nos 10 ml de líquido eluído proveniente da amostra.
6. Cálculo dos resultados
- O conteúdo em mg de buquinolato por Kg de amostra é dado pela fórmula
- $$\frac{A}{P} \cdot 50\,000$$
- sendo:
- A — quantidade em mg de buquinolato determinada pela medida espectrofluorimétrica.
- P — peso em g da tomada para ensaio.
7. Repetibilidade
- A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar:
- 50 % do resultado mais elevado para os teores em buquinolato compreendidos entre 10 e 20 ppm;
- 10 ppm, em valor absoluto, para os teores compreendidos entre 20 e 100 ppm;
- 10 % do resultado mais elevado para os teores compreendidos entre 100 e 5 000 ppm;
- 500 ppm, em valor absoluto, para os teores compreendidos entre 5 000 e 10 000 ppm;
- 5 % do resultado mais elevado para os conteúdos superiores a 10 000 ppm
- DOSAGEM DA SULFAQUINOXALINA
(2-sulfanilamidoquinoxalina)
1. Objecto e domínio de aplicação
- O método permite dosar a sulfaquinoxalina nos alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior da dosagem é de 20 ppm. Outras sulfonamidas, bem como o ácido arsênico, influem na dosagem
2. Princípio
- A amostra é submetida a extração pela dimetilformamida e pelo clorofórmio. A sulfaquinoxalina é hidrolizada em meio alcalino. Após neutralização, o derivado aminado obtido é diazotado e acoplado a N-(1-naftil) etilenediamina. A densidade óptica da solução é medida a 545 nm.
3. Reagentes
- 3.1. N, N-dimetilformamida p.a.
- 3.2. Clorofórmio p.a.
- 3.3. Etanol absoluto.
- 3.4. Lixívia alcalina: dissolver em água 10 g de hidróxido de sódio p.a. e 25 g de cloreto de sódio p.a. Completar a 500 ml com água e homogeneizar.
- 3.5. Ácido clorídrico concentrado p.a. (d = 1,18).
- 3.6. Solução a 0,1 % (p/v) de nitrato de sódio: dissolver em água 100 mg de nitrato de sódio p.a., completar a 100 ml com água e homogeneizar. Preparar imediatamente antes da utilização.
- 3.7. Solução a 0,5 % (p/v) sulfonato de amónio: dissolver em água 500 mg de sulfonato de amónio p.a., completar a 100 ml com água e homogeneizar. Preparar imediatamente antes da utilização.
- 3.8. Solução a 0,1 % (p/v) de dicloridrato de N-(1-naftil) etilenediamina: Dissolver em ácido clorídrico p.a. a 0,1 % (v/v) 100 mg de dicloridrato de N-(1-naftil) etilenediamina p.a., completar a 100 ml com o mesmo ácido e homogeneizar. Preparar imediatamente antes da utilização.
- 3.9. Substância padrão: Sulfaquinoxalina pura.
- 3.10. Solução padrão: Pesar com a aproximação de 0,1 mg, 250 mg de substância padrão (3.9). Dissolver em 50 ml de uma solução de hidróxido de sódio (25 ml de solução de hidróxido de sódio p.a. 0,1 N + 25 ml de água), completar a 500 ml com água e homogeneizar. Colher 5,0 ml dessa solução e diluir a 100 ml com água. 1 ml dessa solução contém 25 microgramas de sulfaquinoxalina.
4. Instrumentos
- 4.1. Balões cónicos de 250 ml, com gargalo esmerilado normalizado.
- 4.2. Agitador.
- 4.3. Cadinho filtrante, porosidade 3, diâmetro: 80 mm, com balão em vácuo.
- 4.4. Frasco de decantação de 250 ml.
- 4.5. Balões aferidos de 50, 100, 250 e 500 ml.
- 4.6. Tubos de ensaio, 150 mm x 25 mm.
- 4.7. Banho-maria em ebulição.
- 4.8. Espectrofotómetro, com cuvetes de 20 mm de espessura.
5. Modo operativo
- 5.1. *Preparação da amostra*
- Triturar a amostra de modo a fazê-la passar integralmente através de uma peneira com malhas de 1 mm (em conformidade com a recomendação ISO R 565).
- 5.2. *Extração*
- Pesar com a aproximação de 1 mg, uma quantidade de amostra dividida e homogeneizada que contenha entre 0,25 e 1,25 mg de sulfaquinoxalina. Introduzir a amostra num balão cónico de 250 ml (4.1) e juntar 20 ml de N,N-dimetilformamida (3.1). Misturar e aquecer durante 20 minutos em banho-maria (4.7). Deixar arrefecer numa corrente de água fria. Juntar 60 ml de clorofórmio (3.2), tapar o balão e agitar durante 30 minutos com a ajuda do agitador (4.2).
- Filtrar o líquido num cadinho filtrante (4.3), aspirando ligeiramente. Lavar o balão com quatro porções de 5 ml de clorofórmio (3.2) e transvasar os líquidos para o cadinho filtrante. Transvasar de seguida o filtrado para um frasco de decantar (4.4), lavar o balão com aproximadamente 15 ml de clorofórmio e transvasar o líquido para o frasco.
- 5.3. *Hidrólise*
- Juntar no frasco 50 ml de lixívia alcalina (3.4) e 5 ml de etanol (3.3). Misturar completamente, evitando a formação de emulsão quer invertendo o frasco uma vintena de vezes, quer fazendo-o girar à volta do eixo horizontal que vai do pé à rolha. Deixar em seguida repousar até à separação das fases (a separação está geralmente terminada após aproximadamente 15 minutos).
- Transvasar a fase superior (fase aquosa) para um balão aferido de 250 ml (4.5). Extrair de novo a fase clorofórmica por três porções de 50 ml de lixívia alcalina (3.4) e transvasar após cada extração o extracto aquoso para o balão aferido. Completar o volume com água e homogeneizar.
- Introduzir 25,0 ml da solução num balão aferido de 50 ml (4.5), juntar 5,0 ml de ácido clorídrico (3.5), completar o volume com água e homogeneizar. Filtrar, se necessário, e eliminar os 15 primeiros ml do filtrado. Introduzir 10,0 ml da solução respectivamente em dois tubos de ensaio (4.6) A e B.
- 5.4. *Desenvolvimento da coloração e medida da densidade óptica*
- Juntar em cada tubo 2,0 ml de solução de nitrato de sódio (3.6), agitar e deixar repousar 3 minutos. Juntar 2,0 ml de solução de sulfamato de amónio (3.7), agitar e deixar repousar 2 minutos. Juntar em seguida 1,0 ml de solução de dicloridrato de N-(1-naftil) etilenediamina (3.8) no tubo A e 1,0 ml de água no tubo B. Misturar muito bem o conteúdo de cada tubo. Ligar os tubos a uma trompa de água com juntas de borracha e aplicar um ligeiro vácuo para eliminar do azoto dissolvido.
- Medir 10 minutos depois as densidades ópticas E_A e E_B das soluções no espectrofotómetro (4.8) a 545 nm em comparação com a água. Determinar a partir do valor E_A — E_B a quantidade (A) de sulfaquinoxalina presente em a solução da amostra, referindo-se à curva-padrão (5.5) previamente estabelecida.
- 5.5. *Curva-padrão*
- Introduzir nos balões aferidos de 100 ml (4.5) volumes respectivos de 2,0 — 4,0 — 8,0 — 10,0 ml da solução padrão (3.10) correspondentes a 50, 100, 150, 200 e 250 microgramas de sulfaquinoxalina. Juntar 8 ml de ácido clorídrico (3.5) em cada balão, completar o volume com água e homogeneizar.
- Colher 10,0 ml de cada solução (o que corresponde respectivamente a 5, 10, 15, 20 e 25 microgramas de sulfaquinoxalina) e introduzi-los nos tubos de ensaio (4.6). Desenvolver a coloração como se indica no primeiro parágrafo de 5.4. Medir em seguida as densidades ópticas a 545 nm por comparação com a água. Traçar a curva-padrão, colocando nas ordenadas os valores da densidade óptica e nas abcissas as quantidades correspondentes de sulfaquinoxalina em microgramas.
6. Cálculo de resultados
- O conteúdo em mg de sulfaquinoxalina por Kg de amostra é dado pela fórmula
- $$\frac{A}{P} \cdot 50$$
- sendo:
- A = quantidade de sulfaquinoxalina em microgramas, determinada pela medida fotométrica;
- P = peso em gramas da amostra para ensaio.
7. Repetibilidade
- A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra, não deve ultrapassar:
- 10 ppm, em valor absoluto, para os teores em sulfaquinoxalina compreendidos entre 20 e 100 ppm;
- 10 % do resultado mais elevado para os teores compreendidos entre 100 e 5 000 ppm;
- 500 ppm, em valor absoluto, para os teores compreendidos entre 5 000 e 10 000 ppm;
- 5 % do resultado mais elevado para os teores superiores a 10 000 ppm.

DOSAGEM DO AMIDO

— Método da pancreatina —

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite determinar o teor em amido e em produtos de degradação com elevado peso molecular do amido dos alimentos que contém pedaços, polpas, folhas ou colos secos de beterraba, polpas de batata, leveduras desidratadas, produtos ricos em inulina (por exemplo, pedaços e farinha de topinambo) ou de resíduos. A dosagem apenas deve ser efectuada quando o exame microscópico mostrar a presença na amostra de quantidades não negligenciáveis de amido.

2. Princípio

Os açúcares presentes na amostra são eliminados pela extracção com etanol. O amido do resíduo de extracção é saccharificado pela pancreatina. Os açúcares são hidrolizados pelo ácido clorídrico e a glucose formada é dosada pelo método de Luff-Schoorl. A quantidade de glucose assim obtida, multiplicada por um factor constante, fornece o conteúdo em amido da amostra.

3. Reagentes

- 3.1. Etanol a 90 % (v/v), neutro perante a fenolftaleína.
- 3.2. Alcool n-amílico p.a.
- 3.3. Tolueno p.a.
- 3.4. Solução tampão: Dissolver em água 9,078 g de fosfato monopotássico KH_2PO_4 e 11,876 g de fosfato disódico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Completar a 1 l com água.
- 3.5. Solução de cloreto de sódio 0,2 N.
- 3.6. Solução de Carrez I: Dissolver em água 21,9 g de acetato de zinco $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3 g de ácido acético glacial. Completar a 100 ml com água.
- 3.7. Solução de Carrez II: Dissolver em água 10,6 g de ferrocianeto de potássio $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Completar a 100 ml com água.
- 3.8. Ácido clorídrico N.
- 3.9. Ácido clorídrico p.a., aproximadamente 8 N, d: 1,125.
- 3.10. Solução de hidróxido de sódio p.a., aproximadamente 10 N, d: 1,33.
- 3.11. Indicador: solução a 0,1 % (p/v) de metiloranja.
- 3.12. Pancreatina, pulverulenta, que corresponda às exigências dadas no ponto B: conservas em frascos fechados, ao abrigo da luz e da humidade.
- 3.13. Reagente segundo Luff-Schoorl: deixar, agitando prudentemente, a solução de ácido cítrico (3.13.2) na solução de carbonato de sódio (3.13.3). Juntar em seguida a solução de sulfato de cobre (3.13.1) e completar a 1 l com água. Deixar repousar uma noite e filtrar. Verificar a normalidade do reagente assim obtido (Cu 0,1 N; Na_2CO_3 2N). O pH da solução deve ser de aproximadamente 9,4.
 - 3.13.1. Solução de sulfato de cobre: dissolver 25 g de sulfato de cobre p.a. $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de água.
 - 3.13.2. Solução de ácido cítrico: dissolver 50 g de ácido cítrico p.a. $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 50 ml de água.
 - 3.13.3. Solução de carbonato de sódio: dissolver 143,8 g de carbonato de sódio anidro p.a. em aproximadamente 300 mg de água quente. Deixar arrefecer.
- 3.14. Grânulos de pedra-pomes fervidos em ácido clorídrico, lavados com água e secos.
- 3.15. Solução a 30 % (p/v) de iodeto de potássio p.a.
 - 3.16. Ácido sulfúrico, 6 N aproximadamente, d: 1,18.
 - 3.17. Solução de tiosulfato de sódio 0,1 N.
- 3.18. Solução de amido: juntar uma mistura de 5 g de amido solúvel em 30 ml de água com 1 l de água a ferver. Ferver durante 3 minutos e deixar arrefecer depois. Preparar imediatamente antes da utilização.

4. Instrumentos

- 4.1. Extractor (ver esquema da página 12), que inclui:
 - 4.1.1. Um erlenmeier de 500 ml, de colo largo.
 - 4.1.2. Um refrigerante de refluxo ajustado ao erlenmeier por uma rolha,
 - 4.1.3. Um tubo que desliza na tubuladura central do refrigerante, munido de um gancho na sua extremidade inferior e de uma pinça para fixar a serpentina,
 - 4.1.4. Um cesto metálico, destinado a ser suspenso no gancho da serpentina (4.1.3.) e a sustentar o cadinho filtrante (4.1.5.),
 - 4.1.5. Um cadinho filtrante para filtração rápida, dimensão máxima dos poros: 90 a 150 μm (por exemplo G1), aproximadamente 30 ml,
 - 4.1.6. Papéis-filtros, de formato adequado para o cadinho filtrante (4.1.5.).
- 4.2. Estufa para incubação, regulada para 38 °C.
- 4.3. Balões aferidos de 200 ml, com um colo esmerilhado normalizado, com refrigerante de refluxo.
- 4.4. Balões aferidos de 100 ml, com colo esmerilhado normalizado, com refrigerante de refluxo.

5. Modo operativo

- 5.1. **Preparação da amostra**
Triturar a amostra de forma a fazê-la passar integralmente através de uma peneira com malhas de 0,5 mm.
- 5.2. **Extracção**
Pesar, com a aproximação de 1 mg, 2 g da amostra e introduzi-los no cadinho filtrante (4.1.5.) cujo fundo foi previamente coberto por um papel-filtro (4.1.6.) embebido em etanol (3.1.). Introduzir no Erlenmeier (4.1.1.) 55 ml de etanol (3.1.) e alguns grânulos de pedra-pomes (3.14.). Colocar o cadinho filtrante no cesto metálico (4.1.4.) e suspender este último no gancho do tubo (4.1.3.). Colocar o refrigerante sobre o Erlenmeier e baixar o tubo de forma que o fundo do cadinho toque ligeiramente a superfície do etanol. Fixar o tubo a essa altura com a ajuda da pinça. Fazer ferver o etanol e manter a fervura durante 3 horas. Seguidamente deixar arrefecer o levantar o tubo (4.1.3.) de forma a subir o cadinho o mais possível no Erlenmeier. Destapar, com cuidado, o Erlenmeier e deixar correr 45 ml de água ao longo das paredes do frasco. Colocar novamente o refrigerante no Erlenmeier e manter o cadinho filtrante a 10 cm acima do nível do líquido. Fazer ferver o líquido e manter a fervura durante 3 horas. Deixar em seguida arrefecer, destapar o erlenmeier e retirar o cadinho do cesto.
- 5.3. **Sacarificação e hidrólise**
Colocar o cadinho numa garrafa em vácuo e secar sob aspiração. Introduzir o resíduo da extracção num almorfariz e triturar bem. Transvazar quantitativamente o pó com a ajuda de aproximadamente 60 ml de água para um balão aferido de 200 ml com colo esmerilhado normalizado e juntar algumas gotas de álcool amílico (3.2.). Ajustar ao balão um refrigerante de refluxo. Aquecer até à fervura e mantê-la durante 1 hora. Deixar em seguida arrefecer e desligar o refrigerante.

Juntar 25 ml de solução tampão (3.4.), 250 mg de pancreatina (3.12.), 2,5 ml de solução de cloreto de sódio (3.5.) e 10 gotas de tolueno (3.3.). Agitar durante 2 minutos, colocar o balão na estufa de incubação (4.2.) e mantê-lo ali durante 21 h, agitando de vez em quando. Deixar em seguida arrefecer até à temperatura ambiente.

Juntar 5 ml de solução de Carrez I (3.6.) e agitar durante 1 minuto. Juntar em seguida 5 ml de solução de Carrez II (3.7.) e agitar de novo durante 1 minuto. Completar o volume com água, homogeneizar e filtrar. Recolher com a pipeta 50 ml do filtrado e deitá-lo num balão aferido de 100 ml (podrá igualmente trabalhar-se com 100 ml de filtrado num balão aferido de 200 ml). Juntar algumas gotas de indicador (3.11.) e acidificar por ácido clorídrico 8 N (3.9.) até que comece a tornar-se encarnado. Juntar em seguida um excesso de 6,25 ml de ácido clorídrico 8 N (3.9.) (12,50 ml se se trabalhar com 100 ml de filtrado). Ajustar o refrigerante de refluxo ao balão, fazer ferver a solução e manter a fervura durante 1 hora. Deixar arrefecer, neutralizar pela solução de hidróxido de sódio 10 N (3.10.) até o indicador começar a tornar-se amarelo. Acidificar em seguida ligeiramente, juntando um pouco de ácido clorídrico N (3.8.), completar o volume com água e homogeneizar. Determinar o conteúdo em glucose em conformidade com o método de Luff-Schoorl, como se indica em 5.4.

5.4. **Titulação segundo Luff-Schoorl**

Recolher com a pipeta 25 ml do reagente segundo Luff-Schoorl (3.13.) e deitá-lo num Erlenmeier de 300 ml; juntar 25 ml, medidos com exactidão, da solução obtida em (5.3.) que contenha no máximo 60 mg de glucose. Juntar dois grânulos de pedra-pomes (3.14.), aquecer, agitando com a mão, sobre chama livre de altura média e fazer ferver o líquido em aproximadamente 2 minutos. Colocar imediatamente o erlenmeier sobre uma rede metálica, guarnecida de um resguardo de amianto com um orifício de aproximadamente 6 cm de diâmetro, sob a qual se acende previamente uma chama. Esta é regulada de forma a que seja aquecido apenas o fundo do erlenmeier. Adaptar em seguida um refrigerante de refluxo ao erlenmeier. Fazer ferver, a partir deste momento, durante exactamente 10 minutos. Arrefecer imediatamente em água fria e após aproximadamente 5 minutos, titular da forma que a seguir se indica.

Juntar 10 ml de solução de iodeto de potássio (3.15.) e, imediatamente após e com cuidado (em virtude do risco de formação de espuma abundante), 25 ml de ácido sulfúrico 6 N (3.16.). Titular em seguida pela solução de tiosulfato de sódio 0,1 N (3.17.) até aparecer uma coloração amarelo pálido, juntar o indicador ao amido (3.18.), e concluir a titulação.

Efectuar a mesma titulação numa mistura medida com exactidão de 25 ml de reagente segundo Luff-Schoorl (3.13.) e 25 ml de água, após ter acrescentado 10 ml de solução de iodeto de potássio (3.15.) e 25 ml de ácido sulfúrico 6 N (3.16.), sem fazer ferver.

5.5. **Ensaio em branco**

Efectuar uma ensaio em branco, aplicando o modo operativo descrito em (5.3.) e (5.4.), na ausência de amostra.

6. Cálculo dos resultados

Com a ajuda do quadro anexo, estabelecer a quantidade em mg de glucose correspondente à diferença entre os resultados das duas titulações (expressas em ml de tiosulfato de sódio 0,1 N) e relacionada por um lado com a análise da amostra e por outro com o ensaio em branco.

O conteúdo de amido em percentagem da amostra é dado pela fórmula:

$$0,72 (a-b)$$

sendo

a = mg de glucose relacionados com a amostra,

b = mg de glucose relacionados com o ensaio em branco (ver observação 7.2.).

7. Observações

- 7.1. A presença simultânea na amostra de amido parcial ou totalmente dextrinizado e de lactose pode dar lugar a um resultado por excesso de 0,5 a 3 % de amido. Neste caso, o teor real em amido é obtido da seguinte forma:
 - a) Determinar o teor em açúcares redutores do extracto etanólico obtido em (5.2.) e exprimir o resultado em percentagem de glucose;
 - b) Determinar o teor da amostra em açúcares redutores solúveis na água e exprimir o resultado em percentagem de glucose;
 - c) Deduzir o teor obtido em a) do obtido em b) e multiplicar a diferença por 0,9;
 - d) Deduzir o valor obtido em c) do teor em amido obtido por aplicação do método e calculado como se indica em 6.
- 7.2. A quantidade de glucose relacionada com o ensaio em branco é normalmente de 0,25 mg e nunca poderá ser superior a 0,50 mg.

B. Prescrições relativas à pancreatina

Aspecto físico: pó branco-amarelado, amorfo.

Teor em glucose: a quantidade de glucose do ensaio em branco (5.5.) é normalmente de 0,25 mg. Um resultado superior a 0,50 mg indica que a pancreatina já não é utilizável.

Controlo do conteúdo de iodo: colocar em suspensão 62,5 mg de pancreatina em aproximadamente 50 ml de água aquecidos a 25-30 °C. Juntar 1 ml de solução de iodo 0,1 N. Remexer durante 2 minutos. Titular por uma solução de tiosulfato de sódio 0,1 N em presença de um indicador com amido. O consumo da solução de iodo pela pancreatina não deve ultrapassar 0,5 ml.

Controlo de actividade amilolítica: misturar 100 ml de solução de amido (3.18.), 5 ml de solução tampão (3.4.), 0,5 ml de solução de cloreto de sódio (3.5.) e 62,5 mg de pancreatina. Levar a mistura à temperatura de 25-30 °C, mexer durante 2 minutos. Juntar 1 ml de solução de iodo 0,1 N. A coloração azul deve ter desaparecido nos 15 minutos seguintes à adição da solução de iodo.

Quadro dos valores para 25 ml de reagente segundo Luff-Schoorl

ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N, 2 minutos de aquecimento, 10 minutos de ebulição

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N	Glucose, fructose, açúcares invertidos $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Lactose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N
	ml	mg	mg	diferença	mg	diferença	
1	2,4		3,6		3,9		1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,4	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10

ml	Glucose, fructose, açúcares invertidos C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		ml
	mg	diferença	mg	diferença	mg	diferença	
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2	3,1	88,0	4,1	94,6	4,6	23

3. DOSAGEM DA DINITOLMIDA (DOT)

(3,5-dinitro-o-toluamida)

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite dosar a dinitolmida (DOT) nos alimentos, concentrados e pré-misturas. Os derivados do nitrofurano têm influência. O limite inferior da dosagem é de 40 ppm.

2. Princípio

A amostra é submetida à extração pelo acetonitrilo. O extracto é purificado através de óxido de alumínio e filtrado. Uma parte alíquota do filtrado é evaporada a seco. O resíduo é ressuspenso em dimetilformamida e tratado pela etilenediamina. Desenvolve-se uma coloração púrpura. A dinitolmida é determinada por espectrofotómetro a 560 nm.

3. Reagentes

3.1. Acetonitrilo a 85 % (v/v): misturar 850 ml de acetonitrilo puro e 150 ml de água; destilar a mistura antes da utilização; recolher a fracção destilando entre 75 e 77 °C.

3.2. Óxido de alumínio para cromatografia em coluna.

Calcular durante 2 horas, pelo menos a 750 °C, arrefecer em dessecador e conservar em frasco de vidro castanho, com tampa esmerilada. Antes da utilização, humidificar do seguinte modo: introduzir num frasco de vidro castanho 10 g de óxido de alumínio e 0,7 ml de água, fechar hermeticamente, reaquecer durante 5 minutos em banho-maria a ferver, agitando energicamente. Deixar arrefecer, agitando. Verificar a actividade, submetendo a análise, a partir do ponto (5.1), uma quantidade determinada de solução padrão (3.6). A taxa de recuperação da dinitolmida deve ser de 100 % ± 2 %.

3.3. N,N-dimetilformamida a 95 % (v/v): misturar 95,0 ml de N,N-dimetilformamida p.a. e 5,0 ml de água.

3.4. Etilenediamina p.a., conteúdo máximo em água: 2,0 %.

3.5. Substância padrão: 3,5 dinitro-o-toluamida pura respondendo às seguintes características:

Ponto de fusão: 177 °C.
Coeficiente de extinção molecular a 248 nm no acetonitrilo: 13,1 × 10⁴.
Coeficiente de extinção molecular a 266 nm na N,N-dimetilformamida: 10,1 × 10⁴.

3.6. Solução padrão: pesar, com a aproximação de 0,1 mg, 40 mg de substância padrão (3.5). Dissolver em acetonitrilo (3.1) num balão aferido de 200 ml, completar o volume com o mesmo solvente e homogeneizar. Recolher 20,0 ml, completar a 100 ml com acetonitrilo (3.1) num balão aferido e homogeneizar. 1 ml desta solução contém 40 µg de dinitolmida.

4. Instrumentos

4.1. Balão cónico de 250 ml, com bocal esmerilado normalizado.

4.2. Refrigerante de refluxo, com bocal esmerilado normalizado.

4.3. Cadinho filtrante, porosidade G3, diâmetro 60 mm.

4.4. Aparelho de filtrar em vácuo (por exemplo, aparelho de Witt).

4.5. Banho-maria, regulado a 50 °C.

4.6. Espectrofotómetro, com cuvettes de 10 mm de espessura.

5. Modo operativo

5.1. Extração e purificação

Pesar, com a aproximação de 1 mg, 10 g de amostra perfeitamente dividida e homogeneizada. Para os concentrados e as pré-misturas pesar 1 g com a aproximação de 1 mg. Introduzir a amostra para ensaio num balão cónico de 250 ml (4.1) e juntar 65 ml de acetonitrilo (3.1). Misturar, munir o balão cónico de um refrigerante de refluxo (4.2) e aquecer no banho-maria (4.5) durante 30 minutos, agitando continuamente. Deixar arrefecer em corrente de água fria. Juntar 20 g de óxido de alumínio (3.2), agitar durante 3 minutos e deixar decantar.

Colocar um balão aferido de 100 ml no instrumento de filtrar (4.4), ajustar o cadinho filtrante (4.3) e filtrar o líquido aspirando. Transvazar em seguida o depósito do cadinho com a ajuda de alguns ml de acetonitrilo (3.1) e aspirar. Eliminar o vácuo, colocar o depósito em suspensão em alguns ml de acetonitrilo (3.1) e aspirar de novo. Repetir estas últimas operações até que o volume do filtrado atinja aproximadamente 95 ml. Completar o volume a 100 ml com acetonitrilo (3.1) e homogeneizar.

Se necessário, recolher uma parte alíquota e diluir em acetonitrilo (3.1) para obter uma solução que contenha 5 a 15 µg de dinitolmida por ml.

5.2. Revelação da coloração e medição da densidade óptica

Introduzir respectivamente nos três recipientes de 50 ml A, B e C, 4,0 ml da solução obtida em 5.1. Acrescentar além disso, unicamente no recipiente C, 1,0 ml de solução padrão (3.6). Colocar os três recipientes em banho-maria (4.5) colocado debaixo de uma chaminé bem ventilada, e evaporar a seco, em corrente de ar. Deixar arrefecer até à temperatura ambiente.

Juntar 10,0 ml de N,N-dimetilformamida (3.3) no recipiente A e 2,0 ml respectivamente nos recipientes B e C. Deixar em contacto durante alguns minutos agitando ligeiramente até à dissolução completa do resíduo. Juntar em seguida 8,0 ml de etilenediamina (3.4) nos recipientes B e C e homogeneizar. Medir exactamente 5 minutos após a adição da etilenediamina, a densidade óptica das três soluções no espectrofotómetro (4.6) a 560 nm, utilizando como branco a N,N-dimetilformamida (3.3).

6. Cálculo dos resultados

O teor de dinitolmida em mg por kg de amostra é dado pela fórmula

$$\frac{(E_B - E_A)}{(E_C - E_B)} \cdot \frac{F}{P} \cdot 1000$$

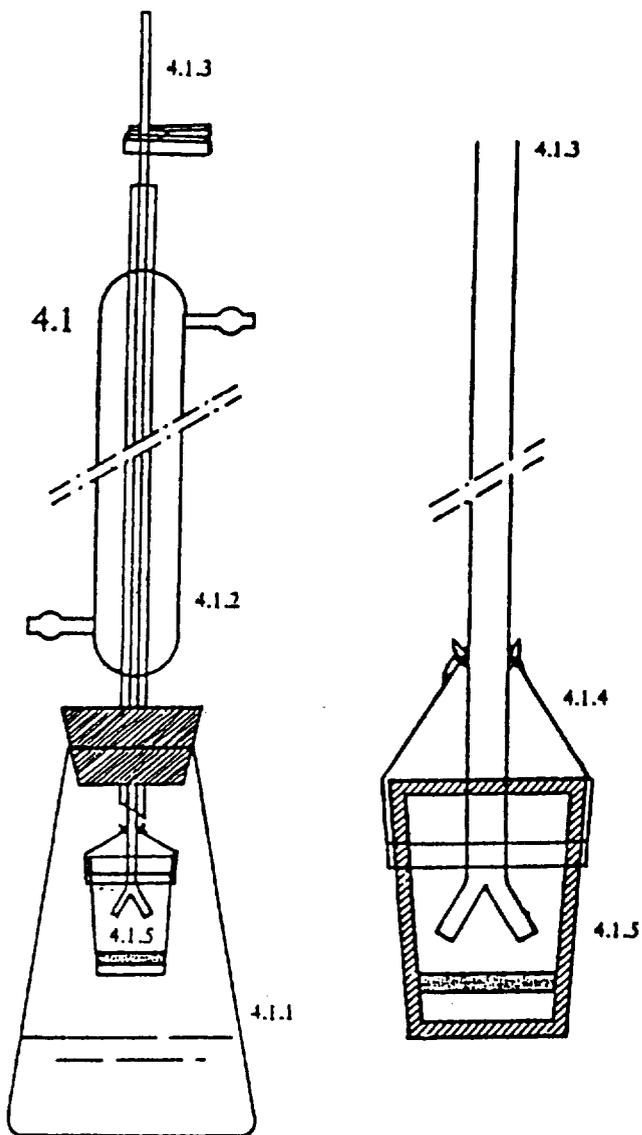
sendo:

- E_A = densidade óptica da solução A (testemunha),
- E_B = densidade óptica da solução B (amostra),
- E_C = densidade óptica da solução C (padrão interno),
- P = peso em g da amostra para ensaio,
- F = coeficiente de diluição (eventualmente efectuada em 5.1).

7. Repetibilidade

A diferença entre os resultados das duas determinações paralelas efectuadas sobre a mesma amostra não deve ultrapassar:

- 10 ppm, em valor absoluto, para os conteúdos em dinitolmida inferiores a 100 ppm,
- 10 %, em valor relativo, para os conteúdos compreendidos entre 100 e 5 000 ppm,
- 500 ppm, em valor absoluto, para os conteúdos compreendidos entre 5 000 e 10 000 ppm,
- 5 %, em valor relativo, para os conteúdos superiores a 10 000 ppm.



DOSAGEM DE NICARBAZINA

(mistura equimolecular de 4,4'-dinitrocarbaniide e 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina)

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite dosar a nicarbazina nos alimentos, concentrados e pré-misturas que não contenham mais de 5 % de farinha de ervas. Os derivados de nitrofurano, a acetileneptina e o carbadox influem. O limite inferior da dosagem é de 20 ppm.

2. Princípio

A amostra é submetida a extração pela N,N-dimetilformamida. O extracto é purificado por cromatografia em coluna de óxido de alumínio; a nicarbazina é eluída por etanol. O líquido eluído é tratado por uma solução etanólica de hidróxido de sódio, desenvolvendo-se uma coloração amarela. A nicarbazina é determinada por espectrofotometria a 430 nm.

3. Reagentes

3.1. N,N-dimetilformamida p.a.

3.2. Óxido de alumínio para cromatografia em coluna.

Calcinar durante 2 horas pelo menos a 750 °C, arrefecer em dessecador e conservar em frasco de vidro castanho com tampa esmerilhada. Antes da utilização, verificar a actividade, submetendo a análise, a partir do ponto (3.2), uma quantidade determinada de solução padrão (3.8.3).

A taxa de recuperação da nicarbazina deve ser de 100 % \pm 2 %.

3.3. Etanol a 95 % (v/v).

3.4. Etanol a 80 % (v/v).

3.5. Solução a 50 % (p/v) de hidróxido de sódio p.a.

3.6. Solução etanólica a 1 % (p/v) de hidróxido de sódio:

deitar 1 ml de solução de hidróxido de sódio (3.5) num balão aferido de 50 ml, completar o volume com etanol a 80 % (3.4). Preparar no momento da utilização.

3.7. Substância padrão: nicarbazina pura, coeficiente de extinção molecular a 362 nm na N,N-dimetilformamida: $37,8 \times 10^4$.

3.8. Soluções padrão:

3.8.1. Solução a 1,25 mg de nicarbazina por ml: pesar, com a aproximação de 0,1 mg, 125 mg de substância padrão (3.7). Dissolver em 75 ml de N,N-dimetilformamida (3.1) num balão aferido de 100 ml aquecendo ligeiramente. Deixar arrefecer, completar o volume com o mesmo solvente e homogeneizar. Conservar ao abrigo da luz.

3.8.2. Solução a 0,125 mg de nicarbazina por ml: recollectar 10,0 ml da solução (3.8.1), completar a 100 ml com N,N-dimetilformamida (3.1) num balão aferido e homogeneizar.

3.8.3. Solução a 0,025 mg de nicarbazina por ml: recollectar 20,0 ml da solução (3.8.2), completar a 100 ml com N,N-dimetilformamida (3.1) num balão aferido e homogeneizar.

4. Instrumentos

4.1. Balão cónico de 250 ml, com bucal esmerilhado normalizado.

4.2. Refrigerante de refluxo, com bucal esmerilhado normalizado.

4.3. Banho-maria em ebulição.

4.4. Centrifugadora com tubos de 120 ml.

4.5. Tubo para cromatografia em vidro (diâmetro inferior: 25 mm, comprimento: 300 mm).

4.6. Espectrofotómetro, com cuvettes de 10 mm de espessura.

4.7. Gaieta graduada a 1/10 ml.

5. Modo operativo

5.1. Extração

Pesar, com a aproximação de 1 mg, 10 g de amostra perfeitamente dividida e homogeneizada. Para os concentrados e as pré-misturas, pesar 1 g com a aproximação de 1 mg. Introduzir a amostra para ensaio num balão cónico de 250 ml (4.1) e juntar exactamente 100 ml de N,N-dimetilformamida (3.1). Misturar, munir o balão de um refrigerante de refluxo (4.2) e aquecer no banho-maria (4.3) durante 15 minutos, agitando de vez em quando. Deixar arrefecer em corrente de água fria.

Transvazar em seguida o líquido existente à superfície para um tubo de centrifugação (4.4) e centrifugar durante cerca de 3 minutos.

Se necessário, recollectar 25,0 ml do líquido existente à superfície e diluir com N,N-dimetilformamida (3.1) para obter uma solução que contenha 2,0 a 10,0 µg de nicarbazina por ml.

5.2. Cromatografia

Introduzir num tubo para cromatografia (4.5) 30 g de alumínio (3.2) em suspensão na N,N-dimetilformamida (3.1). Deixar descer o líquido até 1 cm acima da coluna de óxido de alumínio e introduzir em seguida na coluna 25,0 ml do extracto obtido em (5.1). Deixar escoar o líquido, evitando pôr a coluna a seco e lavar três vezes a coluna com 10 ml de N,N-dimetilformamida (3.1), cada vez. Eluir em seguida por 70 ml de etanol a 95 por cento (3.3). Eliminar os 10 primeiros ml do líquido eluído e recollectar o resto, fraccionando-o do seguinte modo:

uma fracção a) de 5 ml,
uma fracção b) de 50 ml num balão aferido,
uma fracção c) de 5 ml.

Verificar se as fracções a) e c) não se apresentam com coloração amarela pela adição de solução etanólica de hidróxido de sódio (3.6). Prosseguir as operações com a fracção b) como se indica em (5.3).

5.3. Revelação da coloração e medição da densidade óptica

Introduzir respectivamente 20,0 ml da fracção b) do líquido eluído em dois balões aferidos A e B de 25 ml. Juntar no balão A 5,0 ml de solução etanólica de hidróxido de sódio (3.6) e no balão B 5,0 ml de etanol a 95 % (3.3). Homogeneizar.

Medir, nos cinco minutos seguintes, a densidade óptica das duas soluções a 430 nm, utilizando como base uma mistura de 20,0 ml de etanol a 95 % (3.3) e 5,0 ml de solução etanólica de hidróxido de sódio (3.6).

Diminuir o valor da densidade óptica da solução B do da solução A. Determinar, a partir deste valor, a quantidade de nicarbazina referindo-se à curva-padrão (5.4).

5.4. Curva-padrão

Submeter 25,0 ml da solução padrão (3.8.3) à cromatografia como se indica em (5.2). Transvazar na gaieta graduada (4.7) a fracção b) do líquido eluído deitar em balões aferidos de 25 ml volumes respectivos de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 ml (correspondentes respectivamente a 0,025, 0,050, 0,075, 0,100 e 0,125 mg de nicarbazina). Juntar em cada balão 5,0 ml de solução etanólica de hidróxido de sódio (3.6), completar o volume com etanol a 95 % (3.3) e homogeneizar.

Medir nos cinco minutos seguintes a densidade óptica das soluções a 430 nm, utilizando como base uma mistura de 20,0 ml de etanol a 95 % (3.3) e 5,0 ml de solução etanólica de hidróxido de sódio (3.6).

Traçar a curva-padrão colocando nas ordenadas os valores da densidade óptica e nas abscissas as quantidades correspondentes de nicarbazina em mg.

6. Cálculo dos resultados

O conteúdo de nicarbazina em mg por kg de amostra é dado pela fórmula

$$\frac{A}{P} \cdot F \cdot 10\,000$$

sendo:

A = quantidade de nicarbazina em mg determinada pela medida fotométrica,

P = peso em g da amostra para ensaio,

F = coeficiente de diluição (eventualmente efectuada em 5.1).

7. Repetibilidade

A diferença entre os resultados das duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar:

10 ppm, em valor absoluto, para os conteúdos em nicarbazina inferiores a 100 ppm,
10 %, em valor relativo, para os conteúdos compreendidos entre 100 e 500 ppm,
500 ppm, em valor relativo, para os conteúdos compreendidos entre 5 000 e 10 000 ppm,
5 %, em valor relativo, para os conteúdos superiores a 10 000 ppm.

DOSAGEM DE MENADIONA (VITAMINA K₃)

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite dosar a menadiona (vitamina K₃) nos alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior da dosagem é de 1 ppm.

2. Princípio

A amostra é submetida a extração por etanol diluído. A mistura é depurada com uma solução de tanino e centrifugada. O extracto é tratado por uma solução de carbonato de sódio; a menadiona libertada é extraída pelo 1,2-dicloretoano. O extracto dicloretoânico é tratado, segundo o seu conteúdo em menadiona, quer directamente, quer, após evaporação, pela 2,4-dinitrofenilhidrazina em solução no etanol acidificado pelo ácido clorídrico. A hidrazona obtida, adicionada ao excesso de amoníaco, dá lugar a um complexo colorido de azul-verde cuja densidade óptica é medida a 635 nm.

3. Reagentes

3.1. Etanol a 96 % (v/v).

3.2. Etanol (3.1) diluído a 40 % em água.

3.3. Solução a 10 % (v/v) de tanino, a partir de tanino puro, em pó.

3.4. 1,2-dicloretoano p.a.

3.5. Solução a 10 % (p/v) de carbonato de sódio anidro p.a.

3.6. Ácido clorídrico a 37 % (p/v), d = 1,19.

3.7. Etanol absoluto p.a.

3.8. Reagente à 2,4-dinitrofenilhidrazina: dissolver 40 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina p.a. em cerca de 40 ml de etanol absoluto (3.7) em ebulição, deixar arrefecer e transvazar para um balão aferido de 50 ml. Juntar 1 ml de ácido clorídrico (3.6) e completar ao volume com etanol absoluto (3.7). Preparar imediatamente antes da utilização.

3.9. Amoníaco a 25 % (p/p), d = 0,91.

3.10. Solução amoniacal de etanol: misturar um volume de etanol (3.7) e um volume de amoníaco (3.9).

3.11. Soluções padrão de menadiona: dissolver 20 mg de menadiona (vitamina K₃) em 1,1-dicloretoano (3.4) e completar a 200 ml. Diluir partes alíquotas desta solução em 1,2-dicloretoano (3.4) para obter uma série de soluções, cujas concentrações em menadiona estejam compreendidas entre 2 e 10 µg por ml. Preparar pouco tempo antes da utilização.

4. Instrumentos

4.1. Agitador mecânico.

4.2. Centrifugadora (3 000 a 5 000 r/minuto).

4.3. Frascos de decantação de 100 e 250 ml, com tampa esmerilhada.

4.4. Aparelho de rotação para evaporação em vácuo, com balões de 250 ml.

4.5. Banho-maria.

4.6. Espectrofotómetro com cuvettes de 10 mm de espessura.

5. Modo operativo

N.B. Todas as manipulações devem ser feitas ao abrigo da luz directa, eventualmente num instrumento de vidro castanho.

5.1. Amostra para ensaio

Recolher uma amostra para ensaio da amostra perfeitamente dividida, proporcional ao teor presumido em menadiona, isto é:

0,1 a 5,0 g para os concentrados e pré-misturas.

20 a 30 g para os alimentos.

Introduzir imediatamente a amostra para ensaio no frasco de 250 ml com tampa esmerilhada.

5.2. Extração

Juntar 96 ml de etanol diluído (3.2) e agitar mecanicamente durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Seguidamente, juntar 4,0 ml de solução de tanino (3.3), misturar, transvazar o extracto para um tubo de centrifugação, centrifugar (3 000 a 5 000 r/minuto) e decantar.

Introduzir 20 a 40 ml medidos com exactidão do extracto num frasco de decantação de 250 ml, juntar com a pipeta 50 ml de 1,2-dicloretoano (3.4), misturar e juntar com a pipeta 20 ml de solução de carbonato de sódio (3.5). Agitar energeticamente durante 30 segundos e recollectar seguidamente a fase dicloretoânica num frasco de decantação de 100 ml. Juntar 20 ml de água, agitar ainda durante 15 segundos, recollectar a fase dicloretoânica e eliminar os restos de água com a ajuda de papel-filtro.

Para os concentrados e pré-misturas, recollectar uma parte alíquota do extracto e diluir em 1,2-dicloretoano (3.4) para obter uma concentração em menadiona de 2 a 10 µg por ml. Para os alimentos, evaporar a seco uma parte alíquota do extracto sob pressão, reduzida e em atmosfera de azoto, em banho-maria a 40 °C. Ressuspender rapidamente o resíduo em 1,2-dicloretoano (3.4), para obter uma solução que contenha 2 a 10 µg de menadiona por ml.

5.3. Formação de hidrazona

Deitar 2,0 ml do extracto dicloretoânico obtido em 5.2 num balão aferido de 10 ml e juntar 3,0 ml do reactivo à 2,4-dinitrofenilhidrazina (3.8), tapar o balão com a ajuda de uma rolha de cortiça ou de teflon de modo a evitar qualquer evaporação e aquecer durante 2 horas a 70 °C em banho-maria. Deixar arrefecer, juntar 3,0 ml de solução amoniacal de etanol (3.10), misturar, completar ao volume com etanol absoluto (3.7) e misturar de novo.

5.4. Medição da densidade óptica

Medir a densidade óptica do complexo colorido azul-verde ao espectrofotómetro a 635 nm por comparação com um branco de reagentes obtido pelo tratamento de 2,0 ml de 1,2-dicloroetano (3.4) como se indica em (5.3). Determinar a quantidade de menadiona por referência a uma curva-padrão estabelecida por cada série de análises.

5.5. Curva-padrão

Proceder ao tratamento de 2,0 ml das soluções padrão de menadiona (3.11.) como se indica em (5.3). Medir a densidade óptica como se indica em (5.4.). Traçar a curva de aferição colocando nas ordenadas os valores da densidade óptica e nas abscissas as quantidades correspondentes de menadiona em µg.

6. Cálculo dos resultados

Calcular o teor em menadiona da amostra, tendo em conta o peso da amostra de ensaio e as diluições efectuadas durante a análise. Exprimir o resultado em mg de menadiona por kg.

7. Repetibilidade

A diferença entre os resultados das duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar:

- 20 %, em valor relativo, para os conteúdos em menadiona inferiores a 10 ppm,
- 2 ppm, em valor absoluto, para os conteúdos compreendidos entre 10 e 14 ppm,
- 15 %, em valor relativo, para os conteúdos compreendidos entre 14 e 100 ppm,
- 15 ppm, em valor absoluto, para os conteúdos compreendidos entre 100 e 150 ppm,
- 10 %, em valor relativo, para os conteúdos superiores a 150 ppm.

I. DOSAGEM DE RETINOL (VITAMINA A)

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite dosar o retinol (vitamina A) nos alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior de dosagem é de 10 000 UI/kg para alimentos fortemente pigmentados e de 4 000 UI/kg para os outros produtos (*). Os produtos são classificados em dois grupos, segundo o seu presumido teor em retinol:

Grupo A: teores inferiores a 200 000 UI/kg,

Grupo B: teores iguais ou superiores a 200 000 UI/kg.

2. Princípio

A amostra é hidrolisada a quente por uma solução de hidróxido de potássio em meio etanólico e em presença de um antioxidante ou em atmosfera de azoto. A mistura é submetida à extração pelo 1,2-dicloroetano. O extracto será evaporado a seco e retomado pelo éter de petróleo. A solução é cromatografada sobre coluna de óxido de alumínio (para os produtos do grupo B, a cromatografia só é exigida em certos casos). O retinol é dosado por espectrofotometria a 610 nm após desenvolvimento de um complexo corado, segundo a reacção de Carr-Price, no caso de produtos do grupo A; por espectrofotometria no UV a 325 nm no caso de produtos do grupo B.

3. Reagentes

a) Utilizados para a análise de produtos dos grupos A e B

- 3.1. Étenol a 96 % (v/v)
- 3.2. Solução a 10 % (p/v) de ascorbato de sódio p.a., ou
- 3.3. Azoto, purificado
- 3.4. Solução a 50 % (p/v) de hidróxido de potássio p.a.
- 3.5. Solução de hidróxido de potássio 1 N
- 3.6. Solução de hidróxido de potássio 0,5 N
- 3.7. 1,2-dicloroetano p.a.
- 3.8. Éter de petróleo, puro, ebulição 30-50 °C. Se necessário purificar como segue. Agitar 1 000 ml de éter de petróleo com proporções de 20 ml de ácido sulfúrico concentrado até que o ácido fique incolor. Eliminar o ácido e lavar o éter sucessivamente por 500 ml de água, duas vezes 250 ml de uma solução a 10 % de hidróxido de sódio e três vezes 500 ml de água. Eliminar a camada aquosa, secar o éter durante 1 hora em carvão activo e sulfato de sódio anidro, filtrar e destilar
- 3.9. Óxido de alumínio, estandarizado segundo Brokman; calcinar durante 8 horas a 750 °C, arrefecer em secador e conservar em frasco de vidro escuro, com rolha de rodar. Antes da utilização em cromatografia, humidificar como segue: introduzir num frasco de vidro escuro 10 g de óxido de alumínio e 0,7 ml de água, fechar hermeticamente, aquecer durante 5 minutos em banho de água a ferver, agitando energicamente. Deixar arrefecer, agitando. Verificar a actividade do óxido de alumínio assim preparado, submetendo à análise, de acordo com o estipulado em 5.3 e 5.4, uma quantidade conhecida de retinol padrão (3.17)

3.10. Óxido de alumínio básico, graduado de actividade I

3.11. Éter dietílico, puro. Eliminar os peróxidos e os traços de água para cromatografia em coluna de óxido de alumínio básico (3.10) (25 g de óxido de alumínio para 250 ml de éter dietílico)

3.12. Soluções de éter de petróleo (3.8) a 4, 8, 12, 16 e 20 % (v/v) de éter dietílico (3.11)

3.13. Solução de sulfureto de sódio 0,5 mole na glicerina a 70 % (v/v) preparada a partir de sulfureto de sódio p.a.

b) Utilizados exclusivamente para a análise dos produtos do grupo A

- 3.14. Benzeno p.a., cristalizável
- 3.15. Clorofórmio p.a. Eliminar o étanol, o fosgeno e os traços de água por cromatografia em coluna de óxido de alumínio básico (3.10) (50 g de óxido de alumínio para 200 ml de clorofórmio) contém cromatografar uma segunda vez os 50 primeiros ml de eluato
- 3.16. Reagente segundo Carr-Price: Agitar cerca de 25 g de tricloro de antimónio p.a. (conservado em secador) com 100 ml de clorofórmio (3.15) até saturação da solução. Um leve depósito de tricloro de antimónio não prejudica. Juntar 2 ml de anidrido acético p.a. Conservar em geladeira num frasco de vidro escuro com rolha de rodar. Duração de conservação: várias semanas
- 3.17. Retinol padrão, controlado por espectrofotometria

c) Utilizados exclusivamente para a análise de produtos do grupo B

- 3.18. Isopropanol, para cromatografia
4. Aparelhagem
 - 4.1. Banho de água
 - 4.2. Aparelho rotativo para evaporação em vácuo com balões redondos de diferentes capacidades
 - 4.3. Tubos para cromatografia, em vidro (comprimento: 30 mm, diâmetro interno: cerca de 3 mm)
 - 4.4. Espectrofotómetro com cuvetes de 10 mm de espessura (em quartzo para medições em UV)
 - 4.5. Lâmpada UV, 365 nm

5. Modo de operar

N.B. Todas as manipulações devem fazer-se ao abrigo de luz directa, eventualmente num aparelho de vidro escuro.

5.1. Colheita

Tomar uma colheita de amostra dividida, proporcional ao presumido teor em vitamina A, seja:

0,1 a 1,0 g para os concentrados (teores superiores a 20 000 UI/g),

3,0 a 5,0 g para as pré-misturas (teores compreendidos entre 400 e 20 000 UI/g),

10 a 20 g para as misturas minerais,

30 g para os produtos do grupo A

Introduzir imediatamente a colheita num balão de 500 ml de tampa de rodar.

5.2. Hidrólise e extração (*)

Juntar sucessivamente à colheita 40 ml de étanol (3.1), 2 ml de solução de ascorbato de sódio (3.2) (2), 10 ml de solução de hidróxido de potássio (3.4) e 2 ml de solução de sulfureto de sódio (3.13).

Aquecer durante 30 minutos a 70-80 °C sob refrigerante de refluxo e seguidamente deixar arrefecer sob corrente de água. Juntar 50 ml de étanol (3.1) e 100 ml (colhidos com pipeta) de 1,2-dicloroetano (3.7). Agitar energicamente e decantar o líquido sobrenadante numa ampola de decantar. Juntar na ampola 150 ml de solução de hidróxido de potássio (3.5), agitar durante 10 segundos e deixar repousar até separação das fases. Recolher a fase dicloroetânica (fase inferior) numa ampola e deixar repousar até separação das fases. Recolher a fase dicloroetânica numa ampola de decantar e lavar 6 a 8 vezes com ajuda de porções de 40 ml de água, até à ausência de alcalino (experiência com fenolftalina). Recolher a fase dicloroetânica e eliminar os últimos traços de água com a ajuda de tiras de papel de filtro.

Evaporar a seco uma parte alíquota da solução, a vácuo e sobre banho de água à temperatura de 40 °C. Retomar rapidamente o resíduo por 5 ml de éter de petróleo (3.8).

Para os produtos do grupo A, cromatografar como indicado em 5.3.1.

Para os produtos do grupo B, transferir a solução num balão aferido de 50 ml, completar o volume com éter de petróleo (3.8), homogeneizar e medir a densidade óptica como indicado em 5.4.2.

5.3. Cromatografia

5.3.1. Produtos do grupo A

Encher um tubo para cromatografia (4.3), até à altura de 200 mm, com óxido de alumínio (3.9) previamente impregnado de éter de petróleo (3.8). Introduzir a solução obtida em 5.2 no tubo e juntar imediatamente 20 ml de éter de petróleo (3.8).

Eluir sucessivamente em porções de 10 ml das soluções de éter de petróleo a 4, 8, 12, 16 e 20 % de éter dietílico (3.12), em vácuo parcial, ou sob pressão, sendo a velocidade de escoamento de 2 a 3 gotas por segundo.

O caroteno é eluído em primeiro lugar (*). O retinol é geralmente eluído em solução de éter de petróleo em 20 % de éter dietílico (3.12). A eluição é controlada sob luz UV (breve irradiação da coluna por uma lâmpada de mercúrio). A banda fluorescente de retinol separa-se nitidamente das bandas amarelas de xantofila que a seguem. Recolher a fracção de eluato contendo o retinol num erlenmeyer.

5.3.2. Produtos do grupo B

A cromatografia não deve ser efectuada se as medidas de densidade óptica obtidas em 5.4.2 não estão em conformidade com as indicações dadas em 5.4.2.

Se a cromatografia se afigura necessária, introduzir na coluna cromatográfica uma parte alíquota da solução em éter de petróleo obtido em 5.2, contendo cerca de 500 UI de retinol, e cromatografar como indicado em 5.3.1.

5.4. Medida de densidade óptica

5.4.1. Produtos do grupo A

Evaporar a seco, em vácuo, o eluato contendo o retinol, obtido em 5.3.1. Retomar o resíduo por 2 ml de benzeno (3.14). Tomar 0,3 ml desta solução e juntar 3 ml de reagente segundo Carr-Price (3.16). Desenvolve-se uma coloração azul. Medir a densidade óptica no espectrofotómetro a 610 nm, exactamente 30 segundos após o início da reacção. Determinar o teor em retinol, em referência a uma curva-padrão obtida a partir de soluções de benzeno de concentrações crescentes em retinol padrão tratados pelo reagente segundo Carr-Price (2 a 16 UI de vitamina A padrão (3.17) por 0,3 ml de benzeno (3.14) + 3 ml do reagente segundo Carr-Price (3.16). A curva padrão deve ser controlada regularmente e em certos intervalos de tempo, com a ajuda do padrão e de uma solução, preparada de fresco, do reagente segundo Carr-Price.

5.4.2. Produtos do grupo B

Tomar uma parte alíquota da solução em éter de petróleo obtido em 5.2, contendo cerca de 200 UI de retinol. Evaporar a seco, em vácuo, e retomar o resíduo por 25 ml de isopropanol (3.18). Medir a densidade óptica com o espectrofotómetro a 325, 310 e 334 nm. O máximo de absorção situa-se a 325 nm. O teor em retinol A da solução é calculado como segue:

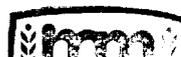
$$E_{325} \cdot 18,30 = \text{UI de retinol}$$

(*) Para os alimentos de aleitamento e os produtos com tendência para se aglomerarem ou incharem, «dobrar» a quantidade dos reagentes indicados em 5.3, primeiro e segundo parágrafos.

(*) A adição de ascorbato de sódio não é necessária quando a hidrólise é efectuada em atmosfera de azoto.

(*) O teor em caroteno pode ser determinado pela medida da densidade óptica a 450 nm. $E_{450} \cdot \frac{1,96}{1 \text{ cm}} = 2,600$.

(*) 1 UI = 0,3 µg de retinol.



contudo, os relatórios das densidades ópticas

$$E_{210} : E_{225} \text{ e } E_{334} : E_{325}$$

devem ser de 6:7 = 0,857.

Se um destes relatórios se afasta sensivelmente deste valor (0,830 ou 0,880), a medida das densidades ópticas deve ser precedida de uma cromatografia, segundo o processo indicado em 5.3.2. Se a medida das densidades ópticas efectuada, após a cromatografia, indica que os relatórios citados se afasta ainda sensivelmente do valor 0,857 (0,830 ou 0,880), a dosagem deve ser efectuada segundo o processo indicado para os produtos do grupo A.

6. Cálculo dos resultados

Calcular o teor em retinol da amostra, tendo em conta do peso da amostra em ensaio e das diluições efectuadas no decurso da análise. Expressar o resultado em UI de retinol por quilograma.

Repetibilidade

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

- 20 %, em valor relativo, para os teores em retinol inferiores a 75 000 UI/kg,
- 15 000 UI para os teores compreendidos entre 75 000 e 150 000 UI/kg,
- 10 %, em valor relativo, para os teores compreendidos entre 150 000 e 250 000 UI/kg,
- 25 000 UI para os teores compreendidos entre 250 000 e 500 000 UI/kg,
- 5 %, em valor relativo, para os teores superiores a 500 000 UI/kg.

DOSAGEM DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE ÁCIDO DE HIDROASCÓRBICO (VITAMINA C)

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite dosar a soma dos ácidos ascórbico e hidroascórbico (vitamina C) nos alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior da dosagem é de 5 ppm. Os produtos são classificados em dois grupos, segundo o seu teor presumido, em vitamina C:

Grupo A: teores inferiores a 10 g/kg

Grupo B: teores iguais ou superiores a 10 g/kg.

2. Princípio

A amostra, colocada em suspensão numa solução diluída de ácido metafosfórico, é submetida a extração por cloroformo. A fase aquosa é tratada por uma solução de 2,6-diclorofenol-indofenol, para transformar o ácido ascórbico em ácido dehidroascórbico, e seguidamente por uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina. A hidrazona formada é extrahida através de uma mistura de acetato de etilo, de ácido acético glacial e de acetona. A solução é cromatografada sobre uma coluna de «geleia» de sílica, o eluato é evaporado a seco e o resíduo é dissolvido em ácido sulfúrico diluído. A densidade óptica da solução é medida por fotómetro a 509 nm.

Para os produtos do grupo A, o eluato resultante da cromatografia em coluna, é submetido, ainda, a uma cromatografia em camada fina, para isolar a hidrazona.

3. Reagentes

- 3.1. Solução padrão a 0,05 % de ácido L-ascórbico: dissolver 50 mg de ácido L-ascórbico p.a. em cerca de 20 ml de solução de ácido metafosfórico (3.2) e completar com água até 100 ml. Preparar imediatamente antes da utilização.
- 3.2. Solução a 10 % (p/v) de ácido metafosfórico: dissolver em água 200 g de ácido metafosfórico p.a., triturados em almofariz, e completar com água até 2 000 ml. Conservar a 4 °C. Renovar após uma semana.
- 3.3. Cloroformio p.a.
- 3.4. Solução a 0,5 % (p/v) de 2,6-diclorofenol-indofenol p.a. Preparar imediatamente antes da utilização.
- 3.5. Auxiliar de filtração (S. e S. n.º 121 ou equivalente)
- 3.6. Solução ácida a 2 % (p/v) de 2,4-dinitrofenilhidrazina: dissolver 2 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina em 100 ml de ácido sulfúrico diluído (25 ml de ácido sulfúrico p.a., d: 1,84, diluídos em 100 ml através de água). Ao frio, esta solução conserva-se uma semana.
- 3.7. Azoto ou
- 3.8. Anidrido carbónico
- 3.9. Mistura de acetato de etilo p.a./ácido acético glacial/acetona p.a.: 96/2/2 em vol.
- 3.10. Mistura de diclorometano p.a./ácido acético glacial: 97/3 em vol.
- 3.11. Geleia de sílica, granulometria: 0,05 a 0,2 mm
- 3.12. Geleia de sílica H, segundo Stahl, para cromatografia em camada fina
- 3.13. Ácido sulfúrico diluído: introduzir 105 ml de água num balão aferido para 200 ml, completar o volume com ácido sulfúrico p.a., d: 1,84
- 3.14. Solvente de eluição para cromatografia em camada fina: misturar 75 ml de éter dietílico p.a. 4,0 ml de ácido acético a 96 % (p/v) p.a. Renovar após 2 a 3 cromatografias.

4. Aparelhagem

- 4.1. Banho de água regulada a 20 °C por ultratermostato
- 4.2. Centrifugadora (3 500 t/m) com tubos de 40 a 50 ml, munidos de tampas de rodar
- 4.3. Aparelho rotativo, para evaporação em vácuo, com balões de 250 ml
- 4.4. Tubos para cromatografia, em vidro (comprimento: 100 mm, diâmetro interno: 20 mm), com placa de vidro (por ex. tubos de Allihn)
- 4.5. Espectrofotómetro ou colorímetro com filtros, com cuvetas de 10 mm de espessura
- 4.6. Aparelhagem para cromatógrafo em camada fina, com placas de geleia de sílica (3.12), espessura de camada: 0,5 a 0,6 mm (servem as placas prontas para uso). Secar as placas durante 2h 30 a 3h na estufa a 120—130 °C. Deixar arrefecer e conservar seguidamente em secador durante pelo menos 24h antes de utilizar
- 4.7. Estufa, regulada para 120—130 °C.

5. Modo de operar

5.1. Extração

Introduzir em dois balões aferidos para 250 ml, A e B, com tampa de rodar, quantidades idênticas à amostra, dividida igualmente, contendo cerca de 200 µg de vitamina C. Juntar, somente, no balão A, 0,4 ml de solução padrão (3.1) e homogeneizar, agitando ligeiramente (padrão interno).

Juntar em cada balão 30 ml de cloroformio (3.3) e 25 ml de solução de ácido metafosfórico (3.2) a 4 °C. Agitar rapidamente e em seguida deixar repousar 10 a 15 minutos. Juntar 25 ml de água, tapar os balões, agitar vigorosamente durante 10 segundos e deixar arrefecer 10 a 15 minutos em banho de água (4.1). Centrifugar para separar a fase aquosa de fase cloroformica. Prosseguir as operações simultaneamente sobre os extractos aquosos A (padrão interno) e B, como indicado seguidamente.

5.2. Oxidação

Com uma pipeta, tomar 40 ml da solução aquosa sobrenadante (ligeiramente turva) obtida em 5.1, introduzir num tubo de reacção com tampa de rodar, juntar 0,5 a 1 ml de solução de 2,6-diclorofenol-indofenol (3.4) e homogeneizar. Forma-se uma coloração vermelha que deve persistir pelo menos 15 minutos. Juntar em seguida cerca de 300 mg de auxiliar de filtração (3.5), agitar e filtrar em filtro de pregas, seco. O filtrado não tem obrigatoriamente que ser limpo.

5.3. Reacção com a 2,4-dinitrofenilhidrazina e extração da hidrazona

Com a pipeta, tomar 10 ml do filtrado obtido em 5.2, introduzi-lo num tubo centrifugador (4.2), juntar 2 ml de solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (3.6) e homogeneizar. Fazer passar rapidamente pelo tubo uma corrente de azoto ou de ácido carbónico (3.8), tapar o tubo e metulhá-lo durante cerca de 15 h (uma noite) em banho de água (4.1). Juntar seguidamente 3 ml de água, 20 ml de mistura acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (3.9) e cerca de 800 mg de auxiliar de filtração (3.5). Tapar o tubo, agitar vigorosamente durante 30 segundos e centrifugar. Introduzir 15 ml da fase sobrenadante num balão de evaporação, e evaporar sob pressão reduzida no evaporador rotativo (4.3) até obtenção de um resíduo oleoso. Dissolver o resíduo em 2 ml da mistura acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (3.9) aquecendo a 50 °C, deixar arrefecer, juntar 10 ml da mistura diclorometano/ácido acético glacial (3.10) e homogeneizar.

5.4. Cromatografia em coluna

Encher um tubo para cromatografia (4.4) até uma altura de 30 mm, com a mistura diclorometano/ácido acético glacial (3.10). Colocar em suspensão (agitando vigorosamente) 5 g de geleia de sílica (3.11) em 30 ml da mistura diclorometano/ácido acético glacial (3.10), deixar a suspensão no tubo. Deixar formar depósito e comprimir seguidamente sob fraca pressão de azoto (3.7).

Transvazar no tubo a solução obtida em 5.3, lavar o balão com uma pequena quantidade da mistura diclorometano/ácido acético glacial (3.10) e transvazar no tubo. Seguidamente encher este com a mistura (3.10) e prosseguir a lavagem da coluna com a mesma (3 a 4 porções de cerca de 5 ml) até obtenção de um eluato incolor. Eliminar a fracção de eluato colorido de amarelo.

Eluir a zona avermelhada no cimo da coluna pela mistura de acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (3.9), recolher o eluato e evaporar a seco.

5.4.1. Para os produtos do grupo A (teores em vitamina C inferiores a 10 g/kg) dissolver o resíduo em 2,0 ml da mistura acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (3.9) e proceder imediatamente à cromatografia em camada fina, como indicado em 5.5.

5.4.2. Para os produtos do grupo B (teores em vitamina C iguais ou superiores a 10 g/kg), retomar o resíduo oleoso em 4,0 ml de ácido sulfúrico diluído (3.13), agitar vigorosamente para dissolver completamente o resíduo e proceder à medida da densidade óptica como indicado em 5.6.

5.5. Cromatografia em camada fina

Efectuar duas vezes as operações indicadas seguidamente. Depositar, sob forma de marca, na placa para cromatografia em camada fina (4.6) 0,5 ml da solução obtida em 5.4.1. Desenvolver durante, pelo menos, 20 minutos com ácido solvente de eluição (3.14), em cuba saturada, até separação nítida da zona de hidrazona colorida em rosa. Deixar secar ao ar. Delimitar a zona rosa, raspar esta com a ajuda de uma espátula e transferir quantitativamente a massa pulverulenta num tubo para cromatografia (4.4).

Eluir sucessivamente, uma vez em 2 ml e duas vezes em 1,5 ml de mistura acetato de etilo/ácido acético glacial/acetona (3.9). Recolher o eluato num pequeno balão (a última fracção deve ser incolor). Evaporar a seco, retomar o resíduo oleoso em 4,0 ml de ácido sulfúrico diluído (3.13) agitar vigorosamente para dissolver completamente o resíduo e proceder à medida da densidade óptica.

5.6. Medida da densidade óptica

Medir a densidade óptica no fotómetro a 509 nm, 20 a 30 minutos depois da colocação em solução do resíduo em ácido sulfúrico. Efectuar as medidas por comparação com o ácido sulfúrico diluído (3.13).

5.7. Ensaio a branco

Na ausência de amostra efectuar um ensaio a branco, aplicando o mesmo modo de operar.

6. Cálculo dos resultados

O teor em g de vitamina C por kg de amostra é dado pela fórmula:

$$\frac{(c - a) \cdot 2}{(b - c) \cdot 10 \cdot d}$$

na qual:

- a = densidade óptica do branco
- b = densidade óptica da solução do padrão interno
- c = densidade óptica da solução da amostra
- d = peso, em gramas, da amostra em ensaio.

Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas, efectuadas em relação à mesma amostra, não deverá exceder 10 %, em valor relativo, para os teores em vitamina C inferiores a 10 g/kg e 5 %, em valor relativo, para os teores iguais ou superiores a 10 g/kg.

4. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA PEPSINA

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite controlar a actividade da pepsina utilizada para o doseamento de proteínas brutas solubilizadas pela pepsina e pelo ácido clorídrico.

2. Princípio

A hemoglobina é tratada, em condições definidas, pela pepsina em meio clorídrico. A fracção não hidrolizada das proteínas é precipitada pelo ácido tricloroacético. Ao filtrado é adicionado hidróxido de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu. A densidade óptica desta solução é medida a 750 nm e a quantidade de tirosina que lhe corresponde é lida numa curva-padrão.

Definição: A unidade de pepsina é definida como a quantidade desta enzima que libera, por minuto, nas condições do método, uma quantidade de grupos hidroxilares cuja coloração pelo reagente de Folin-Ciocalteu tem uma densidade óptica correspondente à de uma mole de tirosina, nas mesmas condições.

3. Reagentes

3.1. Ácido clorídrico 0,2 N.

3.2. Ácido clorídrico 0,06 N.

3.3. Ácido clorídrico 0,025 N.

3.4. Solução a 5 % (p/v) de ácido tricloroacético

3.5. Solução de hidróxido de sódio 0,5 N

3.6. Reagente de Folin-Ciocalteu. Introduzir 100 g de tungstato de sódio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 700 ml de água num balão de fundo redondo de 2 l de colo esmerilado normalizado. Juntar 50 ml de ácido fosfórico (d : 1,71) e 100 ml de ácido clorídrico concentrado (d : 1,19), ajustar ao balão um refrigerador de refluxo, aquecer até à ebulição e manter a solução em ebulição suave durante 10 h. Deixar arrefecer, desligar o refrigerador de refluxo. Adicionar 175 g de sulfato de lítio ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 50 ml de água e 1 ml de bromo. Ferver durante 15 minutos para eliminar o excesso de bromo.

Deixar arrefecer, transvasar a solução num balão aferido de 1 litro, completar o volume com água, homogeneizar e filtrar. Não poderá subsistir qualquer coloração esverdeada. Antes de utilizar, diluir um volume de reagente com dois volumes de água.

3.7. Solução de hemoglobina: Pesar uma quantidade de hemoglobina, substrato proteico de Anson (cerca de 2 g) correspondente a 354 mg de azoto (*) e introduzir num balão de 200 ml de colo esmerilado normalizado. Juntar alguns ml de ácido clorídrico (3.2), ligar o balão à bomba de vácuo e agitar até à dissolução completa da hemoglobina. Desligar o vácuo e adicionar, agitando sempre, o ácido clorídrico (3.2) para completar a 100 ml. Preparar imediatamente antes de utilizar.

3.8. Solução-padrão de tirosina: dissolver 181,2 mg de tirosina em ácido clorídrico (3.1) e completar para 1 litro com o mesmo ácido (solução em). Recolher 20,0 ml e diluir para 100 ml pelo ácido clorídrico (3.1). 1 ml desta solução contém 0,2 mole de tirosina.

4. Instrumentos

4.1. Banho-maria, regulado a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por ultratermostato.

4.2. Espectrofotómetro.

4.3. Cronómetro, precisão: 1 segundo.

4.4. Aparelho medidor de pH.

5. Modo operativo

5.1. Preparação da solução (v. observação 7.1)

Dissolver 150 mg de pepsina em 100 ml de ácido clorídrico (3.2). Recolher com uma pipeta 2 ml da solução, introduzi-la num balão aferido de 50 ml e completar o volume com ácido clorídrico (3.2). O pH, verificado no aparelho medidor de pH, deve ser de $1,6 \pm 0,1$. Mergulhar o balão no banho-maria (4.1).

5.2. Hidrólise

Introduzir com a pipeta num tubo de ensaio 5,0 ml de solução de hemoglobina (3.7), elevar a temperatura a 25°C em banho-maria (4.1), adicionar 1,0 ml da solução de pepsina obtida em (5.1) e misturar com uma haste de vidro engrossada numa extremidade, com cerca de 10 movimentos de vaivém. Manter o tubo de ensaio no banho a 25°C durante 10 minutos, contados exactamente a partir da adição da solução de pepsina (a duração e a temperatura devem ser rigorosamente respeitadas). Em seguida, juntar 10,0 ml de solução de ácido tricloroacético (3.4) a 25°C , homogeneizar e filtrar num filtro seco.

5.3. Desenvolvimento da coloração e medição da densidade óptica

Recolher com uma pipeta 5,0 ml do filtrado, introduzi-lo num erlenmeyer de 50 ml, adicionar 10,0 ml de solução de hidróxido de sódio (3.5) e, agitando sempre, 3,0 ml do reagente diluído de Folin-Ciocalteu (3.6). Após 5 a 10 minutos, determinar a densidade óptica da solução em espectrofotómetro, a 750 nm em «cuvettes» de 1 cm de espessura, por comparação com a água.

5.4. Ensaio em branco

Para cada determinação, proceder a um ensaio em branco como se segue: Introduzir num tubo de ensaio com uma pipeta 5,0 ml de solução de hemoglobina (3.7), elevar a temperatura a 25°C num banho-maria (4.1), adicionar 10,0 ml de solução de ácido tricloroacético (3.4) a 25°C , homogeneizar e adicionar em seguida, 1,0 ml de solução de pepsina obtida em (5.1). Misturar com uma vareta de vidro e manter o tubo de ensaio exactamente 10 minutos no banho-maria (4.1) a 25°C . Homogeneizar e filtrar num filtro seco. Prosseguir como indicado em (5.3).

5.5. Curva-padrão

Introduzir em erlenmeyer de 50 ml volumes de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ml de solução-padrão de tirosina (3.8), correspondente, respectivamente, a quantidades de tirosina de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 moles. Completar a série por um testemunho sem tirosina. Completar os volumes para 5,0 ml com ácido clorídrico (3.1). Adicionar 10,0 ml de solução de hidróxido de sódio (3.5) e, agitando sempre 3,0 ml de reagente diluído de Folin-Ciocalteu (3.6). Medir a densidade óptica como indicado em (5.3), na última frase. Traçar a curva-padrão, correlacionando as densidades ópticas com as quantidades de tirosina.

6. Cálculo dos resultados

Ler na curva-padrão a quantidade de tirosina, em mole, correspondente à densidade óptica da solução corada, diminuída dos valores do ensaio em branco.

A actividade da pepsina, em mole de tirosina por mg e por minuto, a 25°C , é dada pela fórmula:

$$\text{Unidades por mg (U/mg)} = \frac{0,32 \cdot a}{p}$$

(*) Determinar o teor de azoto por um semi-mikrokjeldahl (concentração teórica: 17,7 % de azoto).

em que:

a — quantidade de tirosina, em μmole , lida na curva-padrão

p — peso em mg da quantidade de pepsina adicionada em 5.2.

7. Observações

7.1. A quantidade de pepsina a pôr em solução deve ser escolhida de maneira a obter, na medição fotométrica final, uma densidade óptica de $0,35 \pm 0,035$.

7.2. Duas unidades por mg obtidas pelo presente método correspondem a: 3,64 milunidades Anson/mg (μmole de tirosina/mg min a $35,5^\circ\text{C}$) ou 36,400 unidades comerciais/g (μmole de tirosina/g em 10 min a $35,5^\circ\text{C}$).

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DO GRUPO DAS TETRACICLINAS

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite revelar e identificar os antibióticos do grupo das tetraciclínas nos alimentos que contenham pelo menos em 0,1 ppm destes, nos concentrados e nas pré-misturas.

2. Princípio

A amostra é submetida a extracção por uma mistura de metanol e de ácido clorídrico. O extracto é cromatografado em papel, por via ascendente, em comparação com as soluções de referência. Os antibióticos são revelados e identificados por comparação dos seus valores R_f , com os das substâncias-padrão, quer por fluorescência aos UV (fortes concentrações de antibióticos), quer por bioautografia em meio de ágar-ágar, inoculado com *B. cereus*.

3. Reagentes e meio de cultura

3.1. Tampão, pH 3,5

Ácido cítrico monohidratado p.a.	10,256 g
Fosfato dissódico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a.	7,45 g
Acetona p.a.	300 ml
Água destilada para	1 000 ml

3.2. Tampão de fosfato, pH 5,5

Fosfato monopotássico KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Fosfato dissódico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a.	6,947 g
Água destilada para	1 000 ml

3.3. Eluente I: Mistura de nitrometano puro/clorofórmio puro/ α -dicloridrina: 20/10/1,5 em volume. Preparar no momento da utilização.

3.4. Eluente II: mistura de nitrometano puro/clorofórmio puro/ α -picolina: 20/10/3 em volume. Preparar no momento da utilização.

3.5. Mistura de metanol puro/ácido clorídrico (d : 1,19): 98/2 em volume.

3.6. Ácido clorídrico 0,1 N.

3.7. Amoníaco, d: 0,91.

3.8. Substâncias-padrão: clorotetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina cuja actividade é expressa em cloridrato.

3.9. Microorganismo: *B. cereus* ATCC nº 11.778

Conservação da estirpe, preparação da suspensão de esporos e inoculação do meio de cultura: aplicar as prescrições 3.1 e 3.2 do método de doseamento da clorotetraciclina, da oxitetraciclina e da tetraciclina por difusão em ágar-ágar, constantes da Parte 2 do presente anexo.

3.10. Meio de cultura (*)

Glicose	1 g
Peptona tripsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levedura	3 g
Ágar-ágar	20 g
Água destilada para	1 000 ml
Ajustar o pH a 5,8 no momento da utilização.	

3.11. Solução a 0,1 % (p/v) de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e 5 % (p/v) de glicose.

4. Instrumentos

4.1. Aparelhagem de cromatografia ascendente em papel (altura do papel: 25 cm): Papel Schleicher e Schull 2040 b ou 2043 b, ou equivalente.

4.2. Centrifugadora.

4.3. Estufa de incubadora, regulada a 30°C .

4.4. Lâmpada UV para detecção da fluorescência.

4.5. Placas de vidro de cerca de 20×30 cm, permitindo a montagem de uma caixa achatada para a bioautografia.

(*) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que conduza aos mesmos resultados.

5. Soluções-padrão

5.1. Soluções-mãe

Preparar, a partir das substâncias-padrão (3.8.) com ácido clorídrico (3.6.), soluções cuja concentração corresponda, respectivamente, a 500 µg de clorotetraciclina-HCl por ml e de tetraciclina-HCl por ml.

5.2. Soluções de referência para a detecção aos UV

Diluir as soluções (5.1.) com tampão fosfato (3.2.) para obter soluções cuja concentração corresponda a 100 µg de clorotetraciclina-HCl, de oxitetraciclina-HCl e de tetraciclina-HCl por ml.

5.3. Soluções de referência para a detecção por bioautografia

Diluir as soluções (5.1.) com tampão fosfato (3.2.) para obter soluções cuja concentração corresponda a 5 µg de clorotetraciclina-HCl, de oxitetraciclina-HCl e de tetraciclina-HCl por ml.

6. Extração

Sempre que se espera uma concentração de antibiótico inferior a 10 ppm, pode utilizar-se quer a amostra homogeneizada, quer a fracção mais fina separada através de uma peneira, dado que os antibióticos se encontram preferencialmente nesta fracção.

Resuspender a amostra na mistura (3.5.) e centrifugar. Recolher o sobrenadante para utilizar tal como esteja, ou diluí-lo, se necessário com a mistura (3.5.), para obter concentrações de antibiótico de cerca de 100 µg (6.1.) e 5 µg (6.2.) por ml.

7. Detecção e identificação

7.1. Cromatografia

Mergulhar o papel na solução tampão pH 3,5 (3.1.). Eliminar o excesso de líquido comprimindo o papel entre folhas de papel de filtro seco. Em seguida, depositar no papel, volumes de 0,01 ml das soluções de referência (5.2. e 5.3.) e do extracto (6.1. e 6.2.). Para obter uma boa separação é muito importante, o teor apropriado de humidade do papel; deixar secar ligeiramente, se necessário.

Revelar por cromatografia ascendente. Utilizar o eluente I (3.3.) para a detecção por bioautografia, o eluente II (3.4.) para a detecção aos UV. Logo que a linha de frente do solvente atingir 15 a 20 cm de altura (cerca de 1 h 30 m), interromper a cromatografia e secar o papel.

7.2. Detecção aos UV

Logo que a concentração de antibiótico seja superior a 1 µg/cm², observam-se manchas fluorescentes douradas por irradiação com UV (4.4.), após tratamento do cromatograma por vapores amoniacais (3.7.).

7.3. Detecção por bioautografia

Deixar o meio de cultura (3.10.), previamente inoculado com *B. cereus* (3.9.), sobre placas de vidro (4.5.) e colocar o papel sobre o meio de cultura. Depois de 5 minutos de contacto, tirar o papel e colocá-lo sobre um outro ponto do meio de cultura, onde deve ser mantido durante o período de incubação. Incubar em seguida, durante uma noite, na estufa a 30 °C. A presença de um antibiótico do grupo das tetraciclinas reconhece-se por zonas de inibição claras no meio de cultura turvo.

Para fixar o cromatograma, vaporiza-se a solução (3.11.) sobre o papel, depois da incubação.

7.4. Identificação

Dão-se a seguir os valores Rf relativos dos antibióticos do grupo das tetraciclinas. Estes valores podem variar ligeiramente, conforme a qualidade do papel e o seu teor de humidade.

Clorotetraciclina (CTC)	0,60
Tetraciclina (TC)	0,40
Oxitetraciclina (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

Os compostos «epi» têm uma actividade antibiótica inferior a dos compostos normais.

DOSEAMENTO DA CLOROTETRACICLINA, DA OXITETRACICLINA E DA TETRACICLINA

A. POR DIFUSÃO EM ÁGAR-ÁGAR

1. Objecto e domínio da aplicação

Este método permite dosear a clorotetraciclina (CTC), a oxitetraciclina (OTC) e a tetraciclina (TC) nos alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior do doseamento é de 5 ppm. Os teores inferiores a 5 ppm podem ser estimados por extrapolação gráfica.

2. Princípio

Para os teores iguais ou inferiores a 50 ppm, a amostra é submetida a extração pela formamida diluída. Para os teores superiores a 50 ppm, procede-se à extração por uma mistura de acetona, água e ácido clorídrico para o doseamento da CTC, e por uma mistura de metanol e de ácido clorídrico para o doseamento da OTC e da TC.

Os extractos são em seguida diluídos e a sua actividade antibiótica é determinada pela medição da difusão da CTC, da OTC ou da TC, em meio de ágar-ágar, inoculado com *B. cereus*. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença de um microrganismo. O diâmetro dessas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

3. Microrganismo: *B. cereus* ATCC nº 11.778

3.1. Conservação da estirpe

Inocular *B. cereus* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.) sem azul de metileno nem ácido bórico. Incubar durante uma noite a cerca de 30 °C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar, de 14 em 14 dias para ágar-ágar inclinado.

3.2. Preparação da suspensão de esporos

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.) com 2 a 3 ml de soro fisiológico (4.5.) Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 300 ml do meio de cultura (4.1.), sem azul de metileno nem ácido bórico, com uma concentração de ágar-ágar de 3 a 4 %. Incubar 3

a 5 dias a 28-30 °C, recolher em seguida os esporos em 15 ml de etanol (4.6.), depois de ter verificado a esporulação ao microscópio, e homogeneizar. Esta suspensão pode ser conservada no frigorífico durante 5 meses, pelo menos.

Por ensaios preliminares em placas com o meio de base do doseamento (4.1.), determinar a quantidade de inóculo que permite obter, para as diferentes concentrações de antibiótico utilizadas, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que estejam ainda limpidas. Esta quantidade é geralmente de 0,2 a 0,3 ml/1 000 ml. A inoculação do meio de cultura faz-se entre 50 e 60 °C.

4. Meios de cultura e reagentes

4.1. Meio de base do doseamento (*)

Glicose	1 g
Peptonia tripsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levedura	3 g
Ágar-ágar, segundo a quantidade	10 a 20 g
Tween 80	1 ml
Tampão fosfato, pH 5,5 (4.2)	10 ml
Solução de ácido bórico a 5 % (p/v)	15 ml
Solução etanólica de azul de metileno a 5 %	4 ml
Água destilada para	1 000 ml
Ajustar a pH 5,8 antes da utilização	

4.2. Tampão fosfato, pH 5,5

Fosfato monopotássico KH ₂ PO ₄ , p.a.	130,86 g
Fosfato disódico Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O p.a.	6,947 g
Água destilada para	1 000 ml

4.3. Tampão fosfato, pH 5,5 diluído a 1/10.

4.4. Tampão fosfato, pH 8

Fosfato monopotássico KH ₂ PO ₄ , p.a.	1,407 g
Fosfato disódico Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O p.a.	57,539 g
Água destilada para	1 000 ml

4.5. Soro fisiológico esterilizado

4.6. Etanol a 20 % (v/v).

4.7. Ácido clorídrico 0,1 N.

4.8. Formamida a 70 % (v/v): preparar, de fresco, antes de utilizar e ajustar o pH 4,5 com ácido sulfúrico 2 N, aproximadamente.

4.9. Mistura de acetona pura/água/ácido clorídrico (d : 1,19): 65/33/2, em volume.

4.10. Mistura de metanol puro/ácido clorídrico (d : 1,19): 98/2 em volume.

4.11. Substâncias-padrão: CTC, OTC, TC cuja actividade é expressa em cloridrato.

5. Soluções-padrão

5.1. Clorotetraciclina

Preparar, a partir da substância-padrão (4.11.) com ácido clorídrico (4.7.) uma solução-mãe cuja concentração corresponda a 500 µg de clorotetraciclina-HCl por ml. Esta solução conserva-se uma semana no frigorífico.

A partir desta solução-mãe, preparar uma solução-padrão de trabalho S₀ cuja concentração corresponda a 0,2 µg de clorotetraciclina-HCl por ml. A diluição é feita com tampão fosfato, pH 5,5, diluído 1/10 (4.3.), com 0,01 % de negro de amido (*).

Preparar em seguida, por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão (4.3.), as seguintes concentrações:

S ₁	0,1 µg/ml
S ₂	0,05 µg/ml
S ₃	0,025 µg/ml

5.2. Oxitetraciclina

Procedendo como indicado em (5.1.), preparar, a partir de uma solução-mãe cuja concentração corresponda a 400 µg de oxitetraciclina-HCl por ml, uma solução-padrão de trabalho S₀ a 1,6 µg de oxitetraciclina-HCl por ml e as seguintes concentrações:

S ₁	0,8 µg/ml
S ₂	0,4 µg/ml
S ₃	0,2 µg/ml

5.3. Tetraciclina

Procedendo como indicado em (5.1.), preparar, a partir de uma solução-mãe cuja concentração corresponda a 500 µg de tetraciclina-HCl por ml, uma solução-padrão de trabalho S₀ a 1,0 µg de tetraciclina-HCl por ml e as seguintes concentrações:

S ₁	0,5 µg/ml
S ₂	0,25 µg/ml
S ₃	0,125 µg/ml

6. Extração

6.1. Teores iguais ou inferiores a 50 ppm

Tratar a amostra pela formamida (4.8.), segundo as indicações dadas no quadro abaixo inserido. Agitar durante 30 minutos numa mesa vibratória. Diluir imediatamente a seguir com tampão fosfato (4.3.), segundo as indicações dadas no quadro abaixo inserido, para se obter a concentração U₁. A concentração de formamida desta solução não deve ultrapassar 40 %. Centrifugar ou deixar decantar de forma a obter uma solução limpa.

Preparar em seguida as concentrações U₁, U₂ e U₃, por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão fosfato (4.3.).

(*) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que conduza aos mesmos resultados.

(*) O negro de amido serve para caracterizar as zonas de inibição das soluções-padrão (anéis azuis).

Antibiótico	CTC		OTC		TC	
	10	50	10	50	10	50
Concentração esperada em ppm	10	50	10	50	10	50
Amostra em g	10	10	24	9,6	20	10
ml de formamida (4.8.)	100	100	80	100	80	100
ml de tampão fosfato (4.3.)	dil. 1:5 (a)	dil. 1:25 (b)	70	200	120	dil. 1:5 (a)
Concentração U ₃ em µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(a) Recolher 20 ml de extracto e completar para 100 ml com o tampão num balão aferido.
(b) Recolher 4 ml de extracto e completar para 100 ml com o tampão num balão aferido.

6.2. Teores superiores a 50 ppm

6.2.1. Clorotetraciclina

Tratar, segundo a concentração esperada de antibiótico da amostra total ou a sua garantia de fábrica, uma toma de ensaio de 2 a 10 g por 20 vezes o seu volume de mistura (4.9.). Agitar durante 30 minutos em mesa vibratória. Verificar que o pH se mantém inferior a 3 no decorrer da extração; se for necessário, ajustar a pH 3 (para os compostos minerais, com ácido acético a 10 %). Recolher uma alíquota do extracto e ajustar o pH a 5,5, com tampão fosfato, pH 8 (4.4.) em presença de verde de bromocresol (passagem do amarelo a azul). Diluir com o tampão fosfato, pH 5,5 diluído 1/10 (4.3.) para obter a concentração U₁ (ver 6.1.).

Preparar, em seguida, as concentrações U₁, U₂ e U₃ por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão fosfato (4.3.).

6.2.2. Oxitetraciclina e tetraciclina

Proceder como indicado em (6.2.1.), substituindo mistura (4.9.) pela mistura (4.10.).

7. Método de doseamento

7.1. Inoculação do meio de cultura

Inocular a 50-60 °C o meio de base do doseamento (4.1.) com a suspensão de esporos (3.2.).

7.2. Preparação das placas

A difusão em agar-agar efectua-se em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S₁, S₂, S₃, S₄) e as 4 concentrações do extracto (U₁, U₂, U₃, U₄). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de tal forma que se possam fazer no meio de agar-agar, pelo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade de meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 2 mm de espessura, aproximadamente. É preferível utilizar placas de vidro munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica completamente liso de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com a pipeta nas cavidades quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico, compreendidas entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer pelo menos 4 repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

7.3. Incubação

Incubar as placas durante cerca de 18 horas a 28-30 °C.

8. Avaliação

Medir o diâmetro das zonas de inibição, de preferência por projecção. Inscrever as medidas em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas representativas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências, as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - S_1 - S_2 - S_3 - S_4) \cdot 0,602}{U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - U_1 - U_2 - U_3 - U_4}$$

Actividade real = actividade esperada x actividade relativa

9. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

B. POR TURBIDIMETRIA

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosar a clorotetraciclina (CTC), a oxitetraciclina (OTC) e a tetraciclina (TC) em concentrações superiores a 1 g/kg desde que nenhuma outra substância interfira dando lugar a extractos turbidos. Este método é mais rápido do que o método de difusão em agar-agar.

2. Princípio

A amostra é submetida a extração por uma mistura de acetona, água e ácido clorídrico para o doseamento de CTC, e por uma mistura de metanol e de ácido clorídrico para o doseamento de OTC e TC.

Os extractos são em seguida diluídos e o seu efeito antibiótico é determinado pela medição da transmissão luminosa de um meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus*, com adição do antibiótico. A transmissão luminosa é função da concentração do antibiótico.

3. Microrganismo: *Staphylococcus aureus* K 141 (*)

3.1. Conservação da estirpe

Inocular *S. aureus* em agar-agar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.), com adição de 1,3 a 3 % de agar-agar (conforme a qualidade). Incubar durante uma noite a 37 °C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar de 4 em 4 semanas para agar-agar inclinado. Preparar simultaneamente subculturas para uso de laboratório.

3.2. Preparação do inóculo

Repicar 24 horas antes da sua utilização, uma subcultura para agar-agar inclinada e incubar durante uma noite a 37 °C. Ressuspende a totalidade da cultura de um tubo de agar-agar em cerca de 2 ml do meio de base (4.1.) e transvasar em seguida a suspensão em condições de esterilidade em cerca de 100 ml, aproximadamente, do mesmo meio de base (4.1.). Incubar em banho-maria a 37 °C, até que o crescimento da estirpe entre na fase logarítmica (1 h 30 a 2 h).

4. Meio de cultura e reagentes

4.1. Meio de base do doseamento (*)

Pepiona	5 g
Extracto de levedura	1,5 g
Extracto de carne	1,5 g
Cloreto de sódio	3,5 g
Glicose	1,0 g
Fosfato monopotássico KH ₂ PO ₄ , p.a.	1,32 g
Fosfato bipotássico K ₂ HPO ₄ , p.a.	3,68 g
Água destilada para	1 000 ml
pH depois da esterilização	6,8 a 7,0

4.2. Tampão fosfato, pH 4,5

Fosfato monopotássico KH ₂ PO ₄ , p.a.	13,6 g
Água destilada para	1 000 ml

4.3. Ácido clorídrico 0,1 N.

4.4. Mistura de acetona pura/água/ácido clorídrico (d: 1,19): 65/33/2 em volume.

4.5. Mistura de metanol puro/ácido clorídrico (d: 1,19): 98/2 em volume.

4.6. Solução de formaldeído a, aproximadamente, 10 % (p/v).

4.7. Substâncias-padrão: CTC, OTC, TC, cuja actividade é expressa em cloridrato.

5. Solução-padrão

Preparar, a partir da substância-padrão (4.7.) com ácido clorídrico (4.3.), uma solução-mãe cuja concentração corresponda a 400 a 500 µg de CTC-HCl, OTC-HCl ou TC-HCl por ml. Esta solução conserva-se uma semana no frigorífico.

6. Extração

6.1. Clorotetraciclina

Introduzir num balão aferido de 200 ou 250 ml uma amostra de 1 a 2 g. Adicionar cerca de 100 ml da mistura (4.4.) e agitar durante 30 minutos sobre uma mesa vibratória. Completar o volume com tampão fosfato, pH 4,5 (4.2.). Homogeneizar e deixar depositar.

6.2. Oxitetraciclina e tetraciclina

Introduzir num balão aferido de 200 ou 250 ml uma amostra de 1 a 2 g. Adicionar 100 ml, aproximadamente, da mistura (4.5.) e agitar durante 30 minutos sobre a mesa vibratória. Completar, o volume com tampão fosfato, pH 4,5 (4.2.). Homogeneizar e deixar depositar.

7. Método de doseamento

7.1. Preparação de séries-padrão e de extracto

Diluir de forma apropriada com tampão fosfato, pH 4,5 (4.2.) a solução-padrão (5.) e extracto (6.) de forma a obter uma série de concentrações que permita estabelecer, para cada doseamento, uma curva-padrão e a interpolação, nesta curva, de pelo menos dois valores relativos ao extracto. As diluições devem ser escolhidas em função das condições de crescimento da estirpe, que podem variar de um laboratório para outro. Proceda-se geralmente, como se segue:

7.1.1. Clorotetraciclina

Diluir a solução-padrão (5.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma solução-padrão de trabalho cuja concentração corresponda a 0,2 µg de CTC-HCl por ml. Preparar seguidamente com tampão fosfato (4.2.) como indicado a seguir e em tubos destinados ao doseamento, 6 diluições, com uma repetição de cada diluição.

ml de solução-padrão de trabalho	ml de tampão fosfato (4.2)	concentração de CTC-HCl (µg/ml)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Diluir o extracto (6.1.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma concentração esperada de CTC-HCl de 0,12 µg/l. Introduzir 1 ml desta solução em 2 tubos e 0,75 ml (= 0,09 µg) em outros 2 tubos. Completar o volume destes últimos para 1 ml com tampão fosfato (4.2.).

7.1.2. Oxitetraciclina e tetraciclina

Diluir a solução-padrão (5.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma solução de trabalho cuja concentração corresponda a 0,6 µg de OTC-HCl ou de TC-HCl

(*) Esta estirpe, isolada pela LUFA em Kiel, apresenta um crescimento mais rápido do que *S. aureus* ATCC 6328 R.

(*) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e conduzindo aos mesmos resultados.



por ml. Preparar em seguida com tampão fosfato (4.2.), como indicado a seguir, e nos tubos destinados ao doseamento, 7 diluições com uma repetição de cada diluição.

ml de solução-padrão de trabalho	ml de tampão fosfato (4.2.)	concentração em OTC-HCl ou TC-HCl (1 µg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Diluir o extracto (6.2) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma concentração teórica de OTC-HCl ou TC-HCl de 0,48 µg/ml. Introduzir 1 ml desta solução em 2 tubos e 0,5 ml (= 0,24 µg) em outros 2 tubos. Completar o volume destes últimos para 1 ml com tampão de fosfato (4.2.).

7.2. Inoculação do meio de cultura

Inocular o meio de base de doseamento (4.1) com o inóculo (3.2.), de forma a obter no fotómetro em 590 nm, uma transmissão luminosa de 85 %, numa «cuvete» de 5 cm, ou 92 % numa «cuvete» de 2 cm, estando o aparelho regulado para 100 % de transmissão com o meio de base (4.1.) não inoculado.

7.3. Inoculação

Introduzir em cada tubo (7.1.1 ou 7.1.2) 9 ml do meio de cultura inoculado (7.2.). O enchimento dos tubos deve fazer-se correctamente, mas não necessariamente em condições de esterilidade.

7.4. Incubação

A incubação deve fazer-se, obrigatoriamente, num banho-maria cuja temperatura seja mantida homogeneamente a 37 °C ± 0,1 °C, por agitação. O tempo de incubação deve ser escolhido de forma a poder traçar curvas de transmissão, cuja inclinação seja adequada a medições rigorosas (geralmente 2 h 30 a 3 h). Bloquear em seguida o crescimento, injectando rapidamente 1 ml de solução de formaldeído (4.6) em cada tubo.

7.5. Medição do crescimento

Medir as transmissões no fotómetro a 590 nm, regulando o aparelho para 100 % de transmissão com a solução-padrão mais limpa (correspondente ao teor mais elevado de antibiótico). Em virtude das fracas diferenças de turbidez apresentadas por diferentes tubos, recomenda-se a utilização de cuvetes de 2 cm, pelo menos, e, de preferência, de 5 cm.

8. Cálculo dos resultados

Traçar graficamente a curva padrão em papel milimétrico, marcando as transmissões fotométricas em correlação com as concentrações de antibiótico. Interpoler na curva as transmissões relativas ao extracto. Calcular o teor de antibiótico da amostra.

9. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

3. DOSEAMENTO DA OLEANDOMICINA

— por difusão em ágar-ágar —

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosar a oleandomicina em alimentos, concentrados e pré-misturas, mesmo em presença de tetraciclina. O limite inferior do doseamento é de 0,5 ppm.

2. Princípio

A amostra é submetida a extracção por uma solução metanólica diluída de tris (hidroximetil) aminometano. Depois da centrifugação, o extracto é diluído e a sua actividade antibiótica determinada pela medição da difusão da oleandomicina em meio de ágar-ágar inoculado com *B. cereus*. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença do microorganismo. O diâmetro destas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

3. Microorganismo *B. cereus* K 205 TR (*) (resistente às tetraciclinas)

3.1. Conservação da estirpe

Inocular *B. cereus* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.) com adição de 100 µg de oxitetraciclina por 5 ml. Incubar durante uma noite a cerca de 30 °C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar de 4 em 4 semanas em ágar-ágar inclinado.

3.2. Preparação da suspensão de esporos

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.) com cerca de 3 ml de soro fisiológico (4.3.). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 300 ml do meio de cultura (4.1.) cuja concentração de ágar-ágar seja de 3 a 4 %. Incubar 3 a 5 dias a 28-30 °C, recolher em seguida os esporos em 15 ml de etanol (4.4.), depois de ter verificado a esporulação ao microscópio e homogeneizar. Esta suspensão pode ser conservada no frigorífico durante 5 meses, pelo menos.

Por ensaios preliminares em placas com o meio de base de doseamento (4.2.), determinar a quantidade de inóculo, que permite obter, para as diferentes concentrações de oleandomicina utilizadas, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que sejam ainda limpas. Esta quantidade é geralmente de 0,1 a 0,2 ml/1 000 ml. A inoculação do meio de cultura faz-se a 60 °C.

4. Meios de cultura e reagentes

4.1. Meio de conservação da estirpe (*)

Glicose	1 g
Peptona triptica	10 g
Extracto de carne	1,5 g

(*) Estirpe isolada pela LUFA, em Kiel.

(*) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e conduzindo aos mesmos resultados.

Extracto de levedura	3 g
Ágar-ágar, conforme a qualidade	10 a 20 g
Água destilada para	1 000 ml
Ajustar o pH a 6,5 no momento da utilização.	

4.2. Meio de base de doseamento (*)

Meio (4.1.) ajustado a pH 8,8

4.3. Soro fisiológico esterilizado

4.4. Etanol a 20 % (v/v)

4.5. Metanol puro

4.6. Solução de tris (hidroximetil) aminometano p.a. a 5 % (p/v)

4.7. Solução de extracção

Metanol puro	50 ml
Água destilada	50 ml
Tris (hidroximetil) aminometano p.a.	0,5 g

4.8. Substância-padrão: oleandomicina de actividade conhecida.

5. Solução-padrão

Dissolver a substância-padrão (4.8) em 5 ml de metanol (4.5) e diluir com a solução (4.6.) para se obter uma concentração em oleandomicina de 100 µg/ml.

A partir desta solução-mãe preparar, diluindo com a solução (4.6.), uma solução-padrão de trabalho S_1 contendo 0,1 µg de oleandomicina por ml. Preparar em seguida, por diluições sucessivas (1 + 1) com a solução (4.6.), as seguintes soluções:

S_1	0,05 µg/ml
S_2	0,025 µg/ml
S_3	0,0125 µg/ml

6. Extracção

Recolher, conforme a concentração esperada de oleandomicina da amostra, uma toma de ensaio de 2 a 10 g, adicionar 100 ml da solução (4.7.) e agitar durante 30 minutos na mesa vibratória.

Centrifugar, recolher uma alíquota do extracto e diluir com a solução (4.6.) para obter uma concentração teórica de oleandomicina de 0,1 µg/ml (= U_1). Preparar em seguida as concentrações U_1 , U_2 e U_3 por diluições sucessivas (1 + 1) com a solução (4.6.).

7. Método de doseamento

7.1. Inoculação do meio de cultura

Inocular a 60 °C o meio de base do doseamento (4.2.) com a suspensão de esporos (3.2.).

7.2. Preparação das placas

A difusão em ágar-ágar é efectuada em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S_1 , S_2 , S_3) e as 4 concentrações do extracto (U_1 , U_2 , U_3). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de forma a que se possam fazer, no meio de ágar-ágar, pelo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade do meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 2 mm, aproximadamente de espessura. É preferível utilizar placas de Petri munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica perfeitamente plano de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com uma pipeta nas cavidades quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico, compreendidas entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer pelo menos 4 repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

7.3. Incubação

Incubar as caixas durante cerca de 18 h a 28-30 °C.

8. Avaliação

Medir o diâmetro das zonas de inibição de preferência por projecção. Inscrever os valores de medições em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - S_1 - S_2 - S_3 - S_4) \cdot 0,602}{U_1 + U_2 + S_1 + S_2 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Actividade real = actividade esperada × actividade relativa.

9. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

DOSEAMENTO DA TILOSINA

— por difusão em ágar-ágar —

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosar a tilosina em alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior do doseamento é de 2 ppm.

2. Princípio

A amostra é tratada por uma solução de tampão fosfato a pH 8, previamente aquecida a 80 °C, e submetida em seguida a extracção pelo metanol. Após centrifugação, o extracto é diluído e a sua actividade antibiótica determinada pela medição da difusão da tilosina num meio de ágar-ágar, inoculado com *Sarcina lutea*. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença do microrganismo. O diâmetro dessas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

3. Microrganismo *Sarcina lutea* ATCC n.º 9341

3.1. Conservação da estirpe

Inocular *Sarcina lutea* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1), com o pH ajustado a 7,0. Incubar durante uma noite a cerca de 35 °C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar todos os meses para ágar-ágar inclinado.

3.2. Preparação da suspensão de bactérias

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1) de preparação recente, com 2 a 3 ml de soro fisiológico (4.4). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 250 ml do meio de cultura (4.1), com o pH ajustado a 7,0. Incubar durante 24 horas a 35 °C, recolher as bactérias com 25 ml de soro fisiológico (4.4). Homogeneizar e diluir esta suspensão para obter uma transmissão luminosa de cerca de 75 % a 650 nm.

Conservada no frigorífico, esta suspensão é utilizável durante uma semana.

Por ensaios preliminares em placas com o meio de base de doseamento (4.1), determinar a quantidade de inóculo que permite obter, para as diferentes concentrações de tilosina utilizada, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que estejam ainda limitadas. A inoculação do meio de cultura é feita a 48—30 °C.

4. Meios de cultura e reagentes

4.1. Meio de base do doseamento (*)

Glicose	1 g
Peptonas tripsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levedura	3 g
Ágar-ágar, conforme a qualidade	10 a 20 g
Água destilada para	1 000 ml

Ajustar no momento da utilização a pH 7,0 para a conservação da estirpe e a preparação da suspensão de bactérias e a pH 2,0 para o doseamento.

4.2. Tampão fosfato pH 8

Fosfato monopotássico KH ₂ PO ₄	0,523 g
Fosfato bipotássico K ₂ HPO ₄ , p.a.	16,730 g
Água destilada para	1 000 ml

4.3. Tampão fosfato, pH 7

Fosfato monopotássico KH ₂ PO ₄ , p.a.	5,5 g
Fosfato bipotássico K ₂ HPO ₄ , p.a.	13,6 g
Água destilada para	1 000 ml

4.4. Soro fisiológico esterilizado

4.5. Metanol puro

4.6. Metanol a 10 % (v/v)

4.7. Mistura tampão fosfato (4.2)/metanol puro: 60/40, em volume.

4.8. Substância-padrão: tilosina de actividade conhecida.

5. Soluções padrão

Secar a substância-padrão (4.8) durante 3 h a 60 °C numa estufa de vácuo (5 mm de mercúrio). Pesar 10 a 50 mg num balão aferido, dissolvê-los em 5 ml de metanol (4.5) e diluir a solução com o tampão fosfato, pH 7 (4.3) para obter uma concentração de tilosina-base de 1 000 µg/ml.

A partir desta solução-mãe, preparar, diluindo com a mistura (4.7), uma solução-padrão de trabalho S₁ contendo 2 µg de tilosina-base por ml.

Preparar em seguida, por meio de diluições sucessivas (1 + 1), com a mistura (4.7), as seguintes concentrações:

S ₁	1 µg/ml
S ₂	0,5 µg/ml
S ₃	0,25 µg/ml

6. Extração

Recolher, para os concentrados, uma toma de ensaio de 10 g; para as pré-misturas e alimentos, uma toma de ensaio de 20 g. Adicionar 60 ml de tampão fosfato, pH 8 (4.2), previamente aquecido a 80 °C, e homogeneizar durante 2 minutos (electrodoméstico, Ultra-turrax, etc.).

Em seguida, deixar repousar 10 minutos, adicionar 40 ml de metanol (4.5) e homogeneizar durante 5 minutos. Centrifugar, recolher uma alíquota do extracto e diluir com a mistura (4.7) para obter uma concentração teórica de tilosina de 2 µg/ml (= U₁). Preparar em seguida as concentrações U₁, U₂ e U₃, por meio de diluições sucessivas (1 + 1) com a mistura (4.7).

Para os teores inferiores a 10 ppm, fazer evaporar o extracto a seco num evaporador rotativo a 35 °C e ressuspender o resíduo em metanol a 40 % (4.6).

7. Método de doseamento

7.1. Inoculação do meio de cultura

Inocular a 48—30 °C o meio de base do doseamento (4.1), ajustado a pH 8,0 pela suspensão de bactérias (3.2).

7.2. Preparação das placas

A difusão em ágar-ágar efectua-se em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S₁, S₂, S₃) e as 4 concentrações do extracto (U₁, U₂, U₃). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de tal forma que se possam fazer, no meio de ágar-ágar, pelo menos, 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade do meio de cultura inoculado (7.1) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 2 mm de espessura. É preferível utilizar placas de Petri munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica perfeitamente plana de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com uma pipeta nas cavidades, quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico compreendida entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer, pelo menos, quatro repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

7.3. Incubação

Incubar as placas durante uma noite a 35—37 °C.

8. Avaliação

Medir o diâmetro das zonas de inibição, de preferência, por projecção. Inscrever as medidas em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - S_1 - S_2 - S_3 - S_4) \cdot 0,602}{U_1 + U_2 + S_1 + S_2 - U_3 - U_4 - S_3 - S_4}$$

Actividade real = actividade esperada × actividade relativa.

9. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

DOSEAMENTO DAS BASES AZOTADAS VOLÁTEIS

A. POR MICRODIFUSÃO

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite determinar o teor de bases azotadas voláteis, expressas em amoníaco, dos alimentos para animais.

2. Princípio

A amostra é extraída com água e a solução é clarificada e filtrada. As bases azotadas voláteis são extraídas por microdifusão, por meio de uma solução de carbonato de potássio, recolhidas numa solução de ácido bórico e tituladas com ácido sulfúrico.

3. Reagentes

3.1. Solução a 20 % (p/v) de ácido tricloroacético.

3.2. Indicador: dissolver 33 mg de verde de bromocresol e 65 mg de vermelho de metilo em 100 ml de etanol a 95-96 % (v/v).

3.3. Solução de ácido bórico: num balão aferido de 1 litro, dissolver 10 g de ácido bórico p.a. em 200 ml de etanol a 95-96 % (v/v) e 700 ml de água. Juntar 10 ml de indicador (3.2.). Misturar e, se necessário, ajustar a coloração da solução a vermelho claro, por adição de uma solução de hidróxido de sódio. 1 ml desta solução permite fixar, no máximo, 300 µg de NH₃.

3.4. Solução saturada de carbonato de potássio: dissolver 100 g de carbonato de potássio p.a. em 100 ml de água em ebulição. Deixar arrefecer e filtrar.

3.5. Ácido sulfúrico 0,02 N.

4. Instrumentos

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

4.2. Células de Conway (v. esquema) e de vidro ou matéria plástica.

4.3. Microburetas, graduadas em 1/100 ml.

5. Modo operativo

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 10 g de amostra e introduzir num balão aferido de 200 ml com 100 ml de água. Misturar durante 30 minutos no misturador basculante. Adicionar 50 ml de solução de ácido tricloroacético (3.1.), completar o volume com água, agitar vigorosamente e filtrar num filtro de pregas.

Introduzir com a pipeta, na parte central da célula de Conway, 1 ml de solução de ácido bórico (3.3.) e na parte periférica, 1 ml do filtrado da amostra. Cobrir parcialmente com a tampa com silicone. Introduzir rapidamente na parte periférica 1 ml de solução saturada de carbonato de potássio (3.4.) e fechar hermeticamente a tampa. Agitar suavemente a célula dando-lhe um movimento de rotação num plano horizontal, para misturar os dois reagentes. Deixar incubar durante quatro horas, pelo menos, à temperatura ambiente, ou, então, durante 1 hora a 40 °C.

Titular as bases voláteis na solução de ácido bórico por meio de ácido sulfúrico 0,02 N (3.5.), utilizando uma microbureta (4.3.).

Efectuar um ensaio em branco utilizando o mesmo método na ausência de amostra a analisar.

6. Cálculo dos resultados

1 ml de H₂SO₄ 0,02 N corresponde a 0,34 mg de amoníaco.

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra, não deve ultrapassar:

10 % em valor relativo, para os teores de amoníaco inferiores a 1,0 %;

0,1 em valor absoluto para os teores de amoníaco iguais ou superiores a 1,0 %.

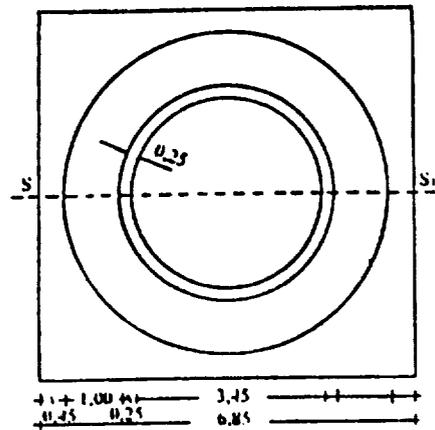
7. Observações

Se o teor de amoníaco da amostra for superior a 0,6 %, diluir o filtrado inicial.

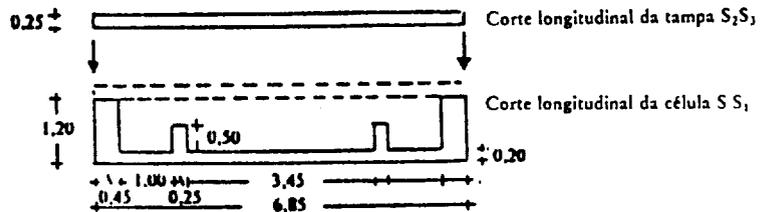
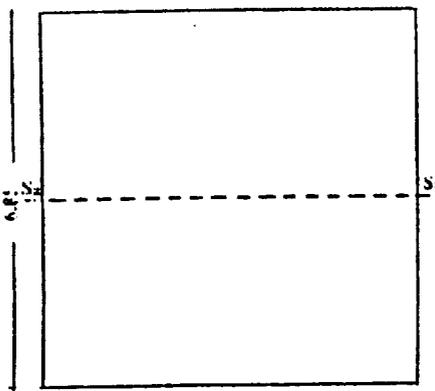
(*) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial, de composição análoga e conduzindo aos mesmos resultados.

CÉLULA DE CONWAY

Escala 1/1



Corte transversal de célula

Corte longitudinal da tampa S₂S₃Corte longitudinal da célula S₁

Corte transversal da tampa de vidro esmerilado

B. POR DESTILAÇÃO

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar o teor de bases azotadas voláteis expressas em amoníaco das farinhas de peixe que praticamente não contém ureia. Só pode ser utilizado para os teores de amoníaco inferiores a 0,25 %.

2. Princípio

A amostra é extraída com água, a solução é clarificada e filtrada. As bases azotadas voláteis extraídas, em ebulição, por adição de óxido de magnésio e recolhidas numa quantidade de determinada de ácido sulfúrico cujo excesso é titulado por meio de uma solução de hidróxido de sódio.

3. Reagentes

- 3.1. Solução a 20 % (p/v) de ácido tricloroacético.
- 3.2. Óxido de magnésio p.a.
- 3.3. Emulsão de antiespuma (silicone por ex.).
- 3.4. Ácido sulfúrico 0,1 N.
- 3.5. Solução de hidróxido de sódio 0,1 N.
- 3.6. Solução a 0,3 % (p/v) de vermelho de metilo em etanol a 95-96 % (v/v).

4. Instrumentos

- 4.1. Misturador basculante: cerca de 35 a 40 rotações por minuto.
- 4.2. Aparelho de destilação do tipo Kjeldahl.

5. Método

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 10 g da amostra e introduzir, com 100 ml de água, num balão aferido de 200 ml. Misturar durante 30 minutos no misturador basculante. Adicionar 30 ml de solução de ácido tricloroacético (3.1), completar o volume com água, agitar vigorosamente e filtrar num filtro de pregas.

Recolher uma quantidade do filtrado limpo em função da concentração iónica de bases azotadas voláteis (geralmente 100 ml). Diluir para 200 ml e adicionar 2 g de óxido de magnésio (3.2) e algumas gotas de emulsão anti-espuma (3.3). O pH da solução deve ser alcalino quando verificado com papel tornesol; se não o for, adicionar mais óxido de magnésio (3.2). Destilar cerca de 150 ml da solução num aparelho do tipo Kjeldahl, e recolher o destilado num erlenmeyer contendo um volume, exactamente médio (25 a 30 ml), de ácido sulfúrico 0,1 N (3.4). Durante a destilação evitar um sobreaquecimento das paredes. Deixar ferver a solução sulfúrica durante dois minutos, arrefecer, e titular o excesso de ácido sulfúrico por meio de uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N (3.5), em presença do indicador vermelho de metilo (3.6).

Efectuar um ensaio em branco aplicando o mesmo método, na ausência de amostra a analisar.

6. Cálculo dos resultados

1 ml de H₂SO₄ 0,1 N corresponde a 1,7 mg de amoníaco.

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar, em valor relativo, 10 % de amoníaco.

2. DOSEAMENTO DO ÁCIDO CIANDRICO

1. Finalidade e objecto de aplicação

Esta técnica permite determinar o teor de ácido cianídrico, livre e combinado sob a forma de glicosídeos, em alimentos para animais, sobretudo produtos à base de sementes de linho, farinha de mandioca e certas espécies de feijão.

2. Princípio

Suspende-se a amostra em água. Libera-se o ácido cianídrico pela acção de fermentos, faz-se o respectivo transporte por destilação em vapor de água, e recolhe-se seguidamente para um volume determinado de solução de nitrato de prata acidificado. A separação do cianeto de prata faz-se por filtração, sendo a titulação do excesso de nitrato de prata feita mediante uma solução de tiocianeto de amónio.

3. Reagentes

- 3.1. Suspensão de amêndoas doces: moer 20 amêndoas doces, descascadas, em 100 ml de água de 37 a 40 °C. Verificar a ausência de ácido cianídrico, em 10 ml da suspensão, com papel ficro-sodado ou efectuando um ensaio em branco tal como se indica no último parágrafo do ponto 5;
- 3.2. Solução a 10 % (p/v) de acetato de sódio, que não reaja à fenilfalina;
- 3.3. Emulsão não espumificante (silica, por ex.);
- 3.4. Ácido nítrico, d: 1,40;
- 3.5. Solução de nitrato de prata: 0,02 N;
- 3.6. Solução de tiocianeto de amónio: 0,02 N;
- 3.7. Solução saturada de fosfatos de amónio férrico;
- 3.8. Amoníaco, d: 0,938.

4. Material

- 4.1. Estufa com termostato, regulado para 38 °C;
- 4.2. Aparelho de destilação por arrastamento em vapor de água, com tubo de refrigeração curvo.

- 4.3. Matrizes de fundo, chato e obturador esmerilhado, de 1 000 ml;
- 4.4. Banho de óleo;
- 4.5. Bureta graduada a 1/20 ml.

5. Método

Pesar com uma precisão de 5 mg aproximadamente 20 g de amostra, introduzi-la num matrãz de 1 l com fundo chato plano e adicionar 50 ml de água e 10 ml de suspensão de amêndoas doce (3.1). Rolhar o matrãz e mantê-lo durante dezasseis horas em estufa, a 38 °C. Deixar arrefecer em seguida, até ficar à temperatura ambiente, e adicionar 80 ml de água, 10 ml de solução de acetato de sódio (3.2) e uma gota de emulsão anti-espumificante (3.3).

Ligar o matrãz ao aparelho de destilação a vapor e colocá-lo num banho de óleo previamente aquecido até uma temperatura ligeiramente superior a 100 °C. Destilar 200 a 300 ml de líquido, fazendo passar no matrãz uma forte corrente de vapor e aquecendo lentamente o banho de óleo. Recolher o destilado para um erlenmeyer colocado ao abrigo da luz e contendo exactamente 50 ml da solução de nitrato de prata 0,02 N (3.5) e 1 ml de ácido nítrico (3.4) certificar-se de que o tubo de refrigeração mergulha na solução de nitrato de prata.

Passar o conteúdo do erlenmeyer para um balão graduado de 500 ml, completar o volume com água, agitar e filtrar. Recolher 250 ml de filtrado, adicionar cerca de 1 ml de solução de sulfato férrico de amónio (3.7) e voltar a titular o excesso do nitrato de prata, para o efeito nele deixando a solução de tiosulfato de amónio 0,02 N (3.6) com a bureta graduada.

Efectuar eventualmente um ensaio, em branco utilizando o mesmo método com 10 ml de suspensão de amêndoas doce (3.1) sem a amostra.

6. Cálculo dos resultados

Se o ensaio em branco revelar que houve consumo de solução do nitrato de prata 0,02 N, haverá que subtrair este valor ao volume gasto pelo destilado de amostra.

Um ml de solução AgNO_3 0,02 N corresponde a 0,54 mg de HCN. Expressar o resultado em percentagem relativa à amostra.

7. Observação

Se a amostra contiver uma quantidade considerável de sulfuretos (feito, por ex.) formar-se-á um precipitado negro de sulfureto de prata que ficará contido no depósito de cianeto de prata após a filtração. A formação deste precipitado implica uma perda da solução de nitrato de prata 0,02 N, cujo volume deverá ser subtraído do volume considerado para o cálculo do teor de HCN. Para esse efeito, proceder do seguinte modo:

Tratar o depósito retido no filtro com 50 ml de amoníaco (3.8) para dissolver o cianeto de prata. Lavar o resíduo com amoníaco diluído e determinar o teor de prata. Converter o valor obtido em ml de solução de nitrato de prata 0,02 N.

O teor de HCL da amostra poderá igualmente ser determinada por titulação do filtrado amoniacal acidificado com ácido nítrico.

4. DOSEAMENTO DOS CARBONATOS

1. Finalidade e objecto de aplicação

Esta técnica permite dosar os carbonatos, convencionalmente expressos sob a forma de carbonato de cálcio, na maior parte dos alimentos para animais. No entanto, para certos casos, (carbonato de ferro, por exemplo) é necessário utilizar uma técnica especial.

2. Princípio

Decompõe-se os carbonatos com ácido clorídrico e recolhe-se o anidrido carbónico que se liberta da reacção para um tubo graduado, comparando-se o seu volume com o do anidrido carbónico que se libertar, nas mesmas condições, a partir de uma quantidade conhecida de carbonato de cálcio p.a.

3. Reagentes

- 3.1. Ácido clorídrico, d: 1,10;
- 3.2. Carbonato de cálcio p.a.;
- 3.3. Ácido sulfúrico cerca de 0,1 N, corado com vermelho de metil.

4. Material

Aparelho de Scheibler-Dietrich (v. esquema) ou aparelho equivalente.

5. Método

Segundo o teor de carbonatos da amostra, pesar uma pequena quantidade para ensaio como a seguir se indica:

- 0,5 g para os produtos com 50 a 100 % de carbonatos, expressos sob a forma de carbonato de cálcio;
- 1 g para os produtos com 10 a 50 % de carbonatos, expressos sob a forma de carbonato de cálcio;
- 2 g a 3 g para os outros produtos.

Introduzir a amostra de ensaio num frasco especial (4) equipado com um pequeno tubo de matéria inquebrável, contendo 10 ml de ácido clorídrico (3.1), e ligar o frasco ao aparelho. Rodar a torneira de três vias (5) de maneira a que o tubo (1) comunique com o exterior. Com o tubo móvel (2) cheio de ácido sulfúrico corado (3.3) e ligado ao tubo graduado (1), aceitar o nível de líquido para a graduação zero. Rodar a torneira (5) de maneira a estabelecer a comunicação entre os tubos (1) e (2) e certificar-se de que o nível está em zero.

Deixar cair lentamente o ácido clorídrico (3.1) sobre a amostra de ensaio, inclinando o frasco (4). Nivelar a pressão, baixando o tubo (2). Agitar o frasco (4) até à cessação completa da libertação de anidrido carbónico.

Tornar a nivelar a pressão colocando o líquido ao mesmo nível em ambos os tubos (1) e (2). Esperar alguns minutos que o volume do gás se estabilize, fazendo então a leitura.

Efectuar nas mesmas condições um ensaio comparativo com 0,5 g de carbonato de cálcio (3.2).

6. Cálculo dos resultados

O teor de carbonatos, expresso em g de carbonato de cálcio por cada 100 g de amostra, é-nos dado pela seguinte fracção:

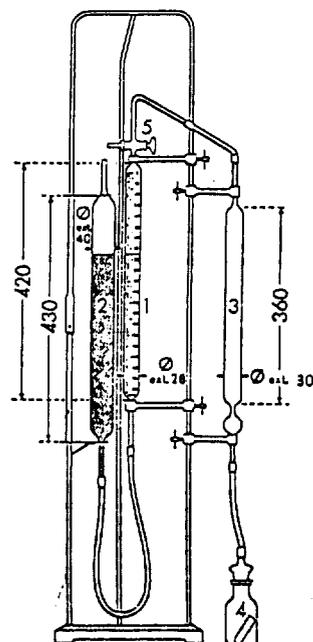
$$\frac{V \times 100}{T \times 2 P}$$

em que:

- V = ml de CO_2 libertados pela amostra de ensaio.
- T = ml de CO_2 libertados por 0,5 g de CaCO_3 p.a.
- P = peso, em gramas, da amostra de ensaio.

7. Observações

- 7.1. Sempre que a amostra de ensaio pesar mais de 2 g, introduzir 15 ml de água destilada no frasco (4) e misturar, previamente ao ensaio. Utilizar o mesmo volume de água para o ensaio comparativo.
- 7.2. Caso o aparelho utilizado trabalhe com volumes diferentes dos de Scheibler-Dietrich, será necessário modificar em função dos mesmos a quantidade de amostra de ensaio e substância de comparação, assim como o cálculo dos resultados.

APARELHO DE SCHEIBLER-DIETRICH PARA DOSEAMENTO DO CO_2 

Escala: 1/8

(Medidas em mm)

8. DOSEAMENTO DA ESSÊNCIA DE MOSTARDA

1. Finalidade e objecto de aplicação

Esta técnica permite determinar o teor de essência de mostarda, arrastável por vapor de água e expresso em isotiocianato de alilo, em bagaços das espécies Brassica e Sinapis e em alimentos compostos que os contenham.

2. Princípio

Suspende-se a mostarda em água. Libertam-se as essências de amostra sob a acção de fermentos que se arrastam por destilação em presença do etanol e recolhem em amoníaco diluído. Trata-se a solução a quente com um dado volume de solução de nitrato de prata, arrefecido e filtrado e titula-se o excesso de nitrato de prata com uma solução de tiosulfato de amónio.

3. Reagentes

- 3.1. Mostarda branca «alba sinapis».
- 3.2. Etanol, 95 a 96 % (v/v).
- 3.3. Emulsão anti-espumificante (silica, por ex.).
- 3.4. Amoníaco, d: 0,958.
- 3.5. Solução de nitrato de prata 0,1 N.
- 3.6. Solução de tiosulfato de amónio 0,1 N.
- 3.7. Ácido nítrico, d: 1,40.
- 3.8. Solução saturada de sulfato férrico de amónio.

4. Material

- 4.1. Matrizes de 500 ml, de fundo chato e obturador esmerilhado.
- 4.2. Aparelho de destilação com refrigerador e dispositivo que impeça o arrastamento de gotículas.

5. Método

Pesar, com uma precisão de ± 1 mg, 10 g de amostra, introduzi-la num matrãz de fundo chato de 500 ml e juntar 2 g de mostarda branca, finamente triturada (que fornece os fermentos) (3.1) e 200 ml de água a 20 °C. Tapar o balão e mantê-lo durante cerca de duas horas a 20 °C, agitando frequentemente. Juntar em seguida 40 ml de etanol (3.2) e uma gota de emulsão anti-espumificante (3.3). Destilar cerca de 150 ml e recolher o destilado para um balão graduado de 250 ml contendo 20 ml de amoníaco (3.4), fazendo com que a extremidade do refrigerador mergulhe no líquido. Juntar à solução amoniacal 50 ml de solução de nitrato de prata 0,1 N (3.5) ou mais, se necessário, colocar um pequeno funil no balão e aquecer a mistura durante uma hora em banho-maria a ferver. Deixar arrefecer, completar o volume com água, agitar e filtrar. Retirar 100 ml de filtrado limpo, juntar 5 ml de ácido nítrico (3.7) e cerca de 5 ml de solução de sulfato férrico de amónio (3.8). Retitular o excesso de nitrato de prata com solução de tiosulfato de amónio 0,1 N (3.6).

Efectuar «um ensaio em branco» sem amostra, seguindo o mesmo método com 2 g de mostarda branca finamente triturada.

6. Cálculo dos resultados

Subtraia o volume da solução de nitrato de prata 0,1 N gasto no ensaio em branco, ao volume de solução de nitrato de prata 0,1 N gasto no ensaio feito com a amostra. O valor obtido corresponderá aos ml de solução de nitrato de prata 0,1 N gastos pela essência de mostarda contida na amostra. A 1 ml de AgNO_3 0,1 N corresponderão 4,956 mg de isotiocianato de alilo. Expressar o resultado em percentagem relativa à amostra.



10. DOSEAMENTO DO POTÁSSIO

1. Finalidade e objecto de aplicação

Esta técnica permite determinar o teor de potássio em alimentos para animais.

2. Princípio

Incinerar-se e dissolvem-se as cinzas em ácido clorídrico. Determina-se o teor de potássio da solução por fotometria de chama na presença de cloreto de cézio e nitrato de alumínio. A adição destas substâncias elimina, em larga medida, a interferência de elementos perturbadores.

3. Reagentes

- 3.1. Ácido clorídrico p.a., d. 1,12.
- 3.2. Cloreto de cézio, p.a.
- 3.3. Nitrato de alumínio $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, quimicamente puro.
- 3.4. Cloreto de potássio p.a. anidro.
- 3.5. Solução-tampão: dissolver em água, 1,907 g de cloreto de potássio (3.4), juntando 5 ml de ácido clorídrico (3.1), completar o volume com água até obter 1 l e homogeneizar. Conservar em frascos de plástico.
- 3.6. Solução-padrão de potássio: dissolver em água, 1,907 g de cloreto de potássio (3.4), juntando 5 ml de ácido clorídrico (3.1), completar o volume com água até 1 l, e homogeneizar. Conservar em frascos de plástico. Cada ml desta solução contém 1,00 mg de potássio.

4. Material

- 4.1. Cadinhos para incineração de platina, quartzo ou porcelana, eventualmente com tampa.
- 4.2. Mufla eléctrica com termostato.
- 4.3. Fotómetro de chama.

5. Método

5.1. Análise da amostra

Em regra, pesar 10 g de amostra, com uma precisão de ± 10 mg, num cadinho para incineração e incinerá-la a 450 °C durante três horas. Após o arrefecimento, passar quantitativamente o resíduo de incineração com 250 a 300 ml de água seguida de 50 ml de ácido clorídrico (3.1) para balão graduado de 500 ml. Quando cessar a eventual libertação do anidrido carbónico, aquecer a solução e mantê-la durante duas horas a uma temperatura próxima dos 90 °C, agitando de vez em quando. Deixar arrefecer até à temperatura ambiente, acrescentar água até atingir a marca do balão, agitar e filtrar. Introduzir num balão graduado de 100 ml uma parte alíquota do filtrado contendo no máximo 1,0 mg de potássio, juntar 10,0 ml de solução-tampão (3.5), acrescentar água até atingir a marca e homogeneizar. Na presença de teores de potássio superiores, diluir, nas devidas proporções, a solução a analisar antes da adição da solução-tampão. A tabela seguinte fornece, a título indicativo, os valores correspondentes a uma amostra de ensaio de cerca de 10 g.

Teor teórico de potássio (% K) da amostra	Factor da diluição	Parte alíquota em ml de solução
Até a 0,1	—	50
0,1 a 0,5	—	10
0,5 a 1,0	—	5
1,0 a 5,0	1 : 10	10
5,0 a 10,0	1 : 10	5
10,0 a 20,0	1 : 20	5

Efectuar a medição por fotometria de chama, ao comprimento de onda de 768 nm.

Calcular o resultado utilizando o gráfico padrão.

5.2. Gráfico Padrão

Introduzir 10 ml exactos de solução-padrão (3.6) num balão graduado de 250 ml acrescentar água até à marca e homogeneizar. Introduzir respectivamente 5, 10, 15, 20 e 25 ml da solução, que correspondem a 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg de potássio, em balões graduados. Completar a série com um balão de referência, sem solução-padrão. Deixar em cada balão 10,0 ml de solução-tampão (3.5), acrescentar água até à marca e homogeneizar. Efectuar as medições como indicado em (5.1). O gráfico-padrão mantém-se em geral linear até uma concentração de potássio de 1 mg em 100 ml de solução.

6. Cálculo dos resultados

Exprimir os resultados em percentagens relativas à amostra.

7. Observações

Nem sempre é necessária a adição de solução-tampão (3.5) para impedir a interferência de elementos perturbadores.

DOSEAMENTO DO SÓDIO

1. Finalidade e objecto de aplicação

Esta técnica permite determinar o teor de sódio dos alimentos para animais.

2. Princípio

Incinerar-se a amostra e dissolvem-se as cinzas em ácido clorídrico. Determina-se o teor de sódio da solução por fotometria de chama na presença de cloreto de cézio e nitrato de alumínio. A adição destas substâncias elimina em larga medida a interferência de elementos perturbadores.

3. Reagentes

- 3.1. Ácido clorídrico p.a., d. 1,12.
- 3.2. Cloreto de cézio, p.a.
- 3.3. Nitrato de alumínio $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, quimicamente puro.
- 3.4. Cloreto de sódio p.a. anidro.
- 3.5. Solução-tampão: dissolver em água 50 g de cloreto de cézio (3.2) e 250 g de nitrato de alumínio (3.3), completar o volume até 1 l, com água e homogeneizar. Conservar em frascos de plástico.
- 3.6. Solução-padrão de sódio: dissolver em água 2,542 g de cloreto de sódio (3.4) juntado-lhe 5 ml de ácido clorídrico (3.1), completar o volume até a 1 l, com água e homogeneizar. Conservar em frascos de plástico. Cada ml desta solução contém 1,00 mg de sódio.

4. Material

- 4.1. Cadinhos para incineração, de platina, quartzo ou porcelana, eventualmente com tampa.
- 4.2. Mufla eléctrica com termostato.
- 4.3. Fotómetro de chama.

5. Método

5.1. Análise da amostra

Em regra, pesar 10 g de amostra com uma precisão de ± 10 mg num cadinho para incineração e incinerar a 450 °C durante três horas. Evitar o sobreaquecimento (inflamação). Uma vez arrefecido, passar quantitativamente o resíduo da incineração, com 250 a 300 ml de água e em seguida 50 ml de ácido clorídrico (3.1) para um balão graduado de 500 ml. Quando cessar a eventual libertação de anidrido carbónico, aquecer a solução e mantê-la durante duas horas a uma temperatura próxima dos 90 °C, agitando de vez em quando. Deixar arrefecer até à temperatura ambiente, juntar água até à marca, agitar e filtrar. Introduzir num balão graduado de 100 ml uma parte alíquota de filtrado contendo no máximo 1,0 mg de sódio, juntar-lhe 10,0 ml de solução-tampão (3.5), juntar água até à marca e homogeneizar. Na presença de fortes teores de sódio, diluir nas devidas proporções a solução a analisar, antes de lhe adicionar a solução-tampão. A tabela seguinte fornece valores, a título indicativo, para uma amostra de ensaio de cerca de 10 g.

Teor teórico de Sódio (% Na) na amostra	Factor de diluição	Parte alíquota em ml de solução
Até a 0,1	—	50
0,1 a 0,5	—	10
0,5 a 1,0	—	5
1,0 a 5,0	1 : 10	10
5,0 a 10,0	1 : 10	5
10,0 a 20,0	1 : 20	5

Efectuar a medição por fotometria de chama ao comprimento de onda de 589 nm.

Calcular o resultado com o gráfico-padrão.

5.2. Gráfico-padrão

Introduzir 10 ml exactos de solução-padrão (3.6) num balão graduado com água e homogeneizar. Introduzir respectivamente, 5, 10, 15, 20 e 25 ml exactos desta solução, que correspondem a quantidades de sódio de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg em balões graduados. Completar a série com um balão de referência sem solução-padrão. Deixar em cada balão 10,0 ml de solução-tampão (3.5), juntar água até à marca e homogeneizar. Efectuar as medições como indicado em (5.1). O gráfico-padrão mantém-se em geral linear até uma concentração de sódio de 1 mg para 100 ml de solução.

6. Cálculo dos resultados

Exprimir o resultado em percentagens relativas à amostra.

7. Observações

- 7.1. Para os produtos cujo teor de sódio seja superior a 4 % é preferível incinerar a amostra durante duas horas num cadinho com tampa. Deixar arrefecer, juntar água, suspender o resíduo utilizando um fio de platina, secar e tornar a incinerar duas horas com o cadinho tapado.
- 7.2. Se a amostra for constituída unicamente por substâncias minerais, proceder à dissolução sem incineração prévia.

13. DOSEAMENTO DA TEOBROMINA

1. Finalidade e objecto de aplicação

Esta técnica permite determinar o teor de teobromina dos subprodutos resultantes da transformação da amêndoa de cacau.

2. Princípio

Extrai-se a teobromina com clorofórmio. Evapora-se o extrato a seco, dissolve-se em água e trata-se com um dado volume de solução de nitrato de prata.

Faz-se a titulação do ácido nítrico libertado com uma solução de hidróxido de sódio.

3. Reagentes

- 3.1. Clorofórmio p.a.
- 3.2. Amoníaco, d. 0,958.
- 3.3. Sulfato de sódio p.a., anidro.
- 3.4. Solução de hidróxido de sódio 0,1 N.
- 3.5. Solução de nitrato de prata 0,1 N.
- 3.6. Solução etanólica a 1 % (p/v) de vermelho de fenol.
- 3.7. Éter dietílico.

4. Material

Matrizes de 500 ml, de fundo chato e rolha esmerilhada.

5. Método

Pesar, com uma precisão de ± 1 mg, 10 g no máximo da amostra de ensaio, que não deverá conter mais de 80 mg de teobromina. Introduzir a amostra num matríz de 500 ml de fundo chato e tampa esmerilhada e juntar 270 ml de clorofórmio (3.1) e 10 ml de amoníaco (3.2). Tapar o matríz e agitar energeticamente durante cinco minutos. Juntar em seguida 12 g de sulfato de sódio anidro (3.3), agitar de novo e deixar repousar até ao dia seguinte. Filtrar num erlenmeyer de 500 ml. Lavar o resíduo com 100 ml de clorofórmio (3.1). Destilar para eliminar o dissolvente e fazer desaparecer os seus últimos resíduos em banho-maria a ferver. Recolher novamente o extrato com 50 ml de água e levar a ebulição.

Deixar arrefecer e neutralizar totalmente, com a solução de hidróxido de sódio (3.4), na presença de 0,5 ml de solução de vermelho de fenol (3.6). Juntar em seguida 20 ml de solução de nitrato de prata (3.5). Titular o ácido nítrico libertado pela solução de hidróxido de sódio (3.4) até à viragem do indicador (pH 7,4).

6. Cálculo dos resultados

Um ml de NaOH 0,1 N corresponde a 18 mg de teobromina.

Exprimir o resultado em percentagens relativamente à amostra.

7. Observação

Os produtos cujos teores e matérias gordas brutas ultrapassem 8 % deverão ser previamente desengordadas por extração com éter de petróleo (Eb. 40 °C) durante duas horas.

DOSEAMENTO DOS ALCALÓIDES NO TREMOÇO

1. Finalidade e objecto de aplicação

Esta técnica permite determinar o teor de alcalóides das sementes de tremoço.

2. Princípio

Dissolve-se os alcalóides numa mistura de éter dietílico e clorofórmio e faz-se a respectiva extração com ácido clorídrico. Precipitam-se com ácido silico-túngstico, incinera-se o precipitado e pesa-se o resíduo.

3. Reagentes

3.1. Éter dietílico.

3.2. Clorofórmio.

3.3. Solução de hidróxido de sódio 4 N.

3.4. Ácido clorídrico 0,3 N.

3.5. Cloreto de sódio p. a.

3.6. Solução a 10 % (p/v) de ácido silico-túngstico $\text{SiO}_2 \cdot 12 \text{WO}_3 \cdot 26 \text{H}_2\text{O}$.

4. Material

4.1. Misturador mecânico.

4.2. Cadinhos para incineração, de platina, quartzo ou porcelana.

4.3. Mufla eléctrica.

5. Método

Pesar, com uma precisão de ± 5 mg, 15 g de amostra e introduzi-la num recipiente de cerca de 200 ml com tampa esmerilhada (um vaso de decantação, por exemplo). Juntar 100 ml exactos de éter dietílico (3.1) e 50 ml exactos de clorofórmio (3.2) e em seguida, com uma bureta graduada, 10 ml de solução de hidróxido de sódio (3.3). Agitar vigorosamente para evitar a formação de aglomerados. Sacudir ainda várias vezes e deixar repousar até ao dia seguinte. Se o líquido sobrenadante não ficar absolutamente limpo, juntar algumas gotas de água. Filtrar a camada de éter-clorofórmio. Recolher 50 ml de filtrado num balão graduado de 50 ml e passá-lo quantitativamente com 50 ml de éter dietílico (3.1) para um vaso de decantação de 150 ml. Fazer três extracções sucessivas com 20 ml de ácido clorídrico (3.4), deixando decantar e recolhendo o extrato ácido após cada uma. Juntar os extractos ácidos num copo de precipitação de 250 ml e eliminar os últimos resíduos de éter e clorofórmio aquecendo ligeiramente. Juntar cerca de 1 g de cloreto de sódio (3.5), deixar arrefecer e precipitar os alcalóides com a solução de ácido silico-túngstico (3.6). Agitar no misturador durante trinta minutos.

Deixar repousar durante uma noite, filtrar com filtro sem cinzas e lavar o precipitado com ácido clorídrico (3.4), primeiro 2 vezes com 10 ml e depois 2 vezes com 5 ml.

Colocar o filtro com o precipitado num cadinho para incineração e incinerar a 900 °C. Deixar arrefecer e pesar.

6. Cálculo dos resultados

Para obter o teor de alcalóides da amostra de ensaio, multiplicar o peso das cinzas pelo factor 0,2.

Expressar o resultado em percentagem relativa à amostra.

DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE UREÁSICA NOS DERIVADOS DE SOJA

1. Finalidade e objecto de aplicação

Esta prova permite determinar a actividade da urease nos derivados de soja e revela a sua insuficiente cozedura.

2. Princípio

Determina-se a actividade ureásica através da quantidade de azoto amoniacal que 1 g de produto liberta por minuto em solução de ureia.

3. Reagentes

3.1. Ácido clorídrico 0,1 N.

3.2. Solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

3.3. Solução-tampão de fosfatos 0,05 M contendo, em 1 000 ml, 4,45 g de fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) e 3,40 g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4).

3.4. Solução tamporada de 30,0 g de ureia por 1 000 ml de solução-tampão (3.3) com pH 6,9-7,0, preparada de fresco.

4. Material

4.1. Aparelho de titulação potenciométrica (de medição do pH) de grande precisão (0,02 pH) com misturador magnético.

4.2. Tina de banho-maria com termostato regulado para exactamente 30 °C.

4.3. Tubos de ensaio de 150 x 18 mm, com tampa esmerilhada.

5. Método

Moer (num moedor de café, por exemplo) cerca de 10 g de amostra de maneira a que passe através de uma peneira com uma malha de 0,2 mm. Num tubo de ensaio de tampa esmerilhada pesar, com uma precisão de ± 1 mg, 0,2 g de amostra já moída e juntar 10 ml de solução-tampão de ureia (3.4). Fechar

imediatamente o tubo de agitar vigorosamente. Mergulhar o tubo durante exactamente 30 minutos em banho-maria, rigorosamente a 30 °C. Juntar imediatamente 10 ml de ácido clorídrico 0,1 N (3.1), arrefecer rapidamente até 20 °C e passar quantitativamente o conteúdo do tubo para o recipiente de titulação, lavando o por duas vezes com 15 ml de água. Titular imediatamente e rapidamente por electrometria com a solução de hidróxido de sódio 0,1 N (3.2), utilizando um electrodo de vidro, até pH 4,7.

Efectuar um ensaio em branco como se segue:

Introduzir rápida e sucessivamente num tubo de ensaio de rolha esmerilhada 0,2 g de amostra, pesados com uma precisão de ± 1 mg, 10 ml de ácido clorídrico 0,1 N (3.1) e 10 ml de solução tamporada de ureia (3.4). Arrefecer imediatamente o tubo mergulhando-o em água gelada e deixá-lo permanecer aí durante trinta minutos. Passar em seguida o conteúdo do tubo como atrás se indica para o recipiente de titulação, que se fará até ao pH 4,7, com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (3.2).

6. Cálculo dos resultados

A actividade ureásica calcula-se mediante a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{mg N}}{\text{g min.}} \pm 30 \text{ }^\circ\text{C} = \frac{1,4 (b - a)}{30 \cdot E}$$

em que: a = ml de solução de hidróxido de sódio 0,1 N gastos pela amostra de ensaio.

b = ml de solução de hidróxido de sódio 0,1 N gastos no ensaio em branco.

E = g de amostra de ensaio.

7. Observações

7.1. Aconselha-se este método para uma actividade ureásica a 30 °C não superior a 1 mg N/g min. Para produtos mais activos, o peso da amostra de ensaio poderá ser reduzido até um mínimo de 50 mg.

7.2. Os produtos cujo teor de matérias gordas brutas ultrapasse 10 % deverão ser previamente desengorduradas a frio.

MINISTÉRIO DAS OBRAS PÚBLICAS, TRANSPORTES E COMUNICAÇÕES

Decreto-Lei n.º 308/89

de 14 de Setembro

Os Decretos-Leis n.ºs 99/88 e 100/88, ambos de 23 de Março, vieram, respectivamente, criar o Conselho de Mercados de Obras Públicas e Particulares — CMOPP e regular o acesso e permanência na actividade de empreiteiro e fornecedor de obras públicas e de industrial da construção civil. Com esses diplomas procurou-se remodelar não só o sistema de inscrição e classificação das empresas em sector de tão grande relevância na economia como também, e sobretudo, dotá-lo de um organismo primordialmente coordenador e incentivador de diferentes actividades desenvolvidas nessa área.

Tendo o CMOPP vindo a orientar nesse sentido a sua acção, tem-se tornado cada vez mais evidente a necessidade de proporcionar a este organismo um contacto mais directo com o exercício daquelas actividades, bem como assegurar-lhe a possibilidade de zelar pelo cumprimento, por parte dos executores de obras — nomeadamente donos de obra, empreiteiros e técnicos —, das normas reguladoras da segurança no trabalho de construção civil — Decreto n.º 41 821, de 11 de Agosto de 1958 — e das instalações provisórias (estaleiros) destinadas ao pessoal empregado nas obras — Decreto n.º 46 427, de 10 de Julho de 1965.

Com o presente diploma visa-se pôr cobro à existência de casos graves, eventualmente reveladores de falta de idoneidade das empresas e, como tal, determinantes da cassação dos respectivos alvarás, que, face à impossibilidade de conhecimento dos mesmos pelo CMOPP, continuam impunes e cujas consequências, quer ao nível da deterioração do tecido urbano, quer das próprias relações inter-regionais, põem em causa não apenas a segurança mas o próprio interesse público.

Assim:

Nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 201.º da Constituição, o Governo decreta o seguinte:

Artigo 1.º É atribuída ao Conselho de Mercados de Obras Públicas e Particulares — CMOPP, criado pelo Decreto-Lei n.º 99/88, de 23 de Março, competência para fiscalizar a protecção, organização, segurança e

sinalização de estaleiros de obras, a ocupação de vias públicas com entulhos, equipamento, materiais e execução de trabalhos para além da área delimitada do estaleiro, atento, ainda, o cumprimento do disposto nos Decretos n.ºs 41 821, de 11 de Agosto de 1958, e 46 427, de 10 de Julho de 1965, e no Decreto Regulamentar n.º 33/88, de 12 de Setembro, respeitantes, respectivamente, à segurança no trabalho da construção civil e das instalações provisórias destinadas ao pessoal empregado nas obras e à sinalização de trabalhos nas vias públicas, em qualquer área do País, sempre e quando o julgar oportuno, e independentemente da competência atribuída por lei a outras entidades.

Art. 2.º — 1 — A competência referida no artigo anterior é exercida por pessoas singulares ou colectivas a contratar em regime de prestação de serviço.

2 — O CMOPP determina qual o âmbito da acção a desenvolver e as entidades ou situações a fiscalizar.

3 — O CMOPP deve dotar o pessoal das entidades fiscalizadoras de uma credencial, contendo, obrigatoriamente, as respectivas fotografia e identificação.

4 — Sempre que a fiscalização abranja as condições de higiene e segurança no trabalho, a Inspeção-Geral do Trabalho deve integrar as equipas de inspecção, ficando-lhe cometida a instrução dos autos levantados e a aplicação das coimas relativamente às infracções verificadas.

Art. 3.º — 1 — O pessoal referido no artigo anterior, quando devidamente credenciado, tem poderes para:

- a) Ter acesso às obras ou a qualquer local de trabalho, sempre que o julgar necessário;
- b) Exigir quaisquer esclarecimentos ou documentos que se revelem necessários ao exercício da sua acção fiscalizadora;
- c) Notificar os infractores, no livro de obra ou através de documento próprio, da natureza da infracção e, quando possível, do prazo razoável para a regularização da situação.

2 — Os termos das notificações feitas e a situação existente após o decurso do prazo referido no número anterior devem constar dos relatórios finais a apresentar ao CMOPP, de acordo com o artigo 5.º

Art. 4.º A Direcção-Geral do Turismo pode solicitar ao CMOPP a fiscalização das situações previstas neste diploma que envolvam ou afectem empreendimentos turísticos.

Art. 5.º — 1 — As entidades contratadas enviarão ao secretário-geral do CMOPP os relatórios finais sobre a acção desenvolvida, deles devendo constar todos os elementos possíveis e necessários a uma apreciação imparcial e fundamentada de cada caso.

2 — Se da apreciação dos relatórios resultar a possibilidade de existência de infracção, o secretário-geral do CMOPP deve enviar o processo para a Comissão de Alvarás de Empresas de Obras Públicas e Particulares — CAEOPP.

3 — Quando entenda que a situação pode resultar do recurso a novas tecnologias, a CAEOPP deve enviar o respectivo processo ao Laboratório Nacional de Engenharia Civil (LNEC), para que este se pronuncie, no prazo de 30 dias, quanto ao seu enquadramento nos objectivos, nomeadamente de segurança, contidos nos regulamentos referidos no artigo 1.º do presente diploma.

Art. 6.º Sempre que conclua pela falta de cumprimento das normas constantes do presente diploma, a CAEOPP deve, nos termos do disposto no Decreto-Lei n.º 100/88, de 23 de Março, proceder e aplicar as seguintes sanções:

- a) Cassar os alvarás sempre que, em virtude do incumprimento, tenha ocorrido acidente de que tenha resultado incapacidade física permanente ou morte de pessoa estranha à obra ou de trabalhador da mesma;
- b) Cancelar a autorização em causa ou todas as autorizações contidas no alvará, se a infracção se mantiver passado o período de suspensão referido na alínea anterior, ou se do incumprimento tiver resultado ou puder resultar acidente não mortal ou outro perigo para a segurança pública ou do pessoal empregado na obra;
- c) Suspender a autorização ao abrigo da qual está a ser executada a obra ou todas as autorizações contidas no alvará, quando a gravidade da infracção não imponha o cancelamento das mesmas ou a cassação do alvará;
- d) Comunicar a existência e natureza da infracção, a identificação do infractor e a sanção aplicada ou a aplicar pela Comissão à entidade ou entidades que, por lei, tenham poderes de fiscalização sobre o mesmo caso.

Art. 7.º — 1 — Das decisões tomadas pelas pessoas referidas no n.º 1 do artigo 2.º, na sua acção de fiscalização ao serviço do CMOPP, pode reclamar-se para o próprio CMOPP, no prazo de quinze dias após a sua verificação.

2 — Das deliberações da CAEOPP pode reclamar-se nos termos do disposto no artigo 14.º do Decreto-Lei n.º 100/88, de 23 de Março.

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 8 de Junho de 1989. — *Aníbal António Cavaco Silva* — *Miguel José Ribeiro Cadilhe* — *Luís Francisco Valente de Oliveira* — *Joaquim Fernando Nogueira* — *João Maria Leitão de Oliveira Martins* — *Joaquim Martins Ferreira do Amaral*.

Promulgado em 3 de Setembro de 1989.

Publique-se.

O Presidente da República, MÁRIO SOARES.

Referendado em 6 de Setembro de 1989.

O Primeiro-Ministro, *Aníbal António Cavaco Silva*.

Portaria n.º 817/89

de 14 de Setembro

Manda o Governo, pelo Ministro das Obras Públicas, Transportes e Comunicações, que, ao abrigo das disposições do artigo 4.º do Decreto-Lei n.º 360/85, seja lançada em circulação, cumulativamente com as que estão em vigor, uma emissão de selos com tarja fosforescente alusiva aos «Peixes da Madeira», com as seguintes características:

Autor: José Projecto;
Dimensão: 40 mm × 30,6 mm;
Picotado: 12 × 12 1/2;
Impressor: INCM;

1.º dia de circulação: 20 de Setembro de 1989;
Taxas, motivos e quantidades:

- 29\$ — Pai-velho/*Argyrolepecus aculeatus* (Valenciennes) — 1 000 000;
60\$ — Peixe-cão/*Pseudolepidaplois scrofa* (Valenciennes) — 600 000;
87\$ — Peixe-rei/*Coris julis* (Linnaeus) — 600 000;

100\$ — Rocaz/*Scorpaena maderensis* (Valenciennes) — 600 000.

Ministério das Obras Públicas, Transportes e Comunicações.

Assinada em 4 de Setembro de 1989.

O Ministro das Obras Públicas, Transportes e Comunicações, *João Maria Leitão de Oliveira Martins*.

13.ª Delegação da Direcção-Geral da Contabilidade Pública

Declaração

De harmonia com o disposto na parte final do n.º 2 do artigo 6.º do Decreto-Lei n.º 46/84, de 4 de Fevereiro, se publicam as seguintes alterações orçamentais, autorizadas nos termos dos n.ºs 2 e 3 do artigo 5.º do mesmo diploma e cujos despachos de autorização constam dos respectivos processos:

Classificação						Rubricas	Em contos	
Orgânica			Funcional	Económica			Reforços ou inscrições	Anulações
Capítulo	Divisão	Sub-divisão		Código	Alínea			
01	01	01	01.00.00			Gabinetes dos membros do Governo		
			01.01.00			Gabinete do Ministro		
			01.01.06			Gabinete		
			8.01.0	A		Despesas com o pessoal:		
			8.01.0			Remunerações certas e permanentes:		
						Pessoal em qualquer outra situação:		
						Requisitado	-	4 382
						Representação	4 382	-
			02.00.00			Aquisição de bens e serviços correntes:		
			02.02.00			Bens não duradouros:		
			02.02.04			Alimentação:		
			8.01.0	B		Aquisição de refeições confeccionadas	1 100	-
			02.03.00			Aquisição de serviços:		
			8.01.0			Representação dos serviços	-	1 100
		02				Gabinete do Nú Ferrolviário do Porto		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.01.00			Remunerações certas e permanentes:		
			8.01.0			Pessoal dos quadros	-	31 612
			8.01.0			Pessoal em regime de tarefa ou de avença	15 000	-
			8.01.0			Pessoal em qualquer outra situação	16 474	-
			8.01.0			Gratificações	2 500	-
			8.01.0			Subsídios de férias e de Natal	-	2 780
			01.02.00			Abonos variáveis ou eventuais:		
			8.01.0			Horas extraordinárias	200	-
			01.03.00			Segurança Social:		
			8.01.0			Abono de família	80	-
			06.00.00			Outras despesas correntes:		
			8.01.0			Diversas	138	-
		03				Gabinete do Nú Ferrolviário de Lisboa		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.01.00			Remunerações certas e permanentes:		
			8.01.0			Pessoal dos quadros	-	18 295
			8.01.0			Pessoal em qualquer outra situação	18 295	690
			8.01.0			Participações e prémios	690	-

Classificação						Rubricas	Em contos	
Orgânica			Funcional	Económica			Reforços ou inscrições	Anulações
Capítulo	Divisão	Sub-divisão		Código	Alinea			
01	01	03		01.02.00		Abonos variáveis ou eventuais:		
			8.01.0	01.02.04		Ajudas de custo	-	1 500
				01.03.00		Segurança Social:		
			8.01.0	01.03.04		Contribuições para a Segurança Social	200	-
				02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:		
				02.01.00		Bens duradouros:		
			8.01.0	02.01.03		Material de secretaria	-	100
			8.01.0	02.01.04		Material de cultura	-	150
			8.01.0	02.01.05		Outros bens duradouros	-	150
				02.02.00		Bens não duradouros:		
			8.01.0	02.02.05		Roupas e calçado	-	200
			8.01.0	02.02.08		Outros bens não duradouros	-	500
				02.03.00		Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.07		Transportes	-	500
			8.01.0	02.03.08		Representação dos serviços	-	900
			8.01.0	02.03.09		Seguros	300	-
			8.01.0	02.03.10		Outros serviços	-	1 000
				07.00.00		Aquisição de bens de capital:		
				07.01.00		Investimentos:		
			8.01.0	07.01.06		Material de transporte	1 630	-
			8.01.0	07.01.07		Material de informática	2 870	-
	02					Gabinete do Secretário de Estado dos Transportes Interiores		
		01				Gabinete		
				01.00.00		Despesas com o pessoal:		
				01.01.00		Remunerações certas e permanentes:		
				01.01.06		Pessoal em qualquer outra situação:		
			8.01.0		A	Requisitado	-	600
			8.01.0	01.01.08		Representação	2 500	-
				01.02.00		Abonos variáveis ou eventuais:		
			8.01.0	01.02.02		Horas extraordinárias	600	-
				02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:		
				02.02.00		Bens não duradouros:		
				02.02.04		Alimentação:		
			8.01.0		B	Aquisição de refeições confeccionadas	1 100	-
				02.03.00		Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.02		Conservação de bens	-	600
			8.01.0	02.03.08		Representação dos serviços	-	500
	03					Gabinete do Secretário de Estado dos Transportes Exteriores e Comunicações		
		01				Gabinete		
				01.00.00		Despesas com o pessoal:		
				01.01.00		Remunerações certas e permanentes:		
				01.01.06		Pessoal em qualquer outra situação:		
			8.01.0		A	Requisitado	-	3 000
			8.01.0	01.01.08		Representação	3 438	-
			8.01.0	01.01.11		Subsídios de férias e de Natal	-	438
				02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:		
				02.02.00		Bens não duradouros:		
				02.02.04		Alimentação:		
			8.01.0		B	Aquisição de refeições confeccionadas	1 100	-

Classificação						Rubricas	Em contos	
Orgânica			Funcional	Económica			Reforços ou inscrições	Anulações
Capítulo	Divisão	Sub-divisão		Código	Alinea			
01	03	01		02.03.00		Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.07		Transportes	-	500
			8.01.0	02.03.10		Outros serviços	-	600
	04					Gabinete do Secretário de Estado das Vias de Comunicação		
		01				Gabinete		
				01.00.00		Despesas com o pessoal:		
				01.01.00		Remunerações certas e permanentes:		
				01.01.06		Pessoal em qualquer outra situação:		
			8.01.0		A	Requisitado	-	4 500
			8.01.0	01.01.08		Representação	3 647	-
			8.01.0	01.01.11		Subsídios de férias e de Natal	-	647
				01.02.00		Abonos variáveis ou eventuais:		
			8.01.0	01.02.05		Outros abonos em numerário ou espécie	1 500	-
				02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:		
				02.02.00		Bens não duradouros:		
				02.02.04		Alimentação:		
			8.01.0		B	Aquisição de refeições confeccionadas	1 100	-
				02.03.00		Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.07		Transportes	-	600
			8.01.0	02.03.10		Outros serviços	-	500
	05					Gabinete do Secretário de Estado da Construção e Habitação		
		01				Gabinete		
				01.00.00		Despesas com o pessoal:		
				01.01.00		Remunerações certas e permanentes:		
				01.01.06		Pessoal em qualquer outra situação:		
			8.01.0		A	Requisitado	-	5 500
			8.01.0	01.01.08		Representação	3 647	-
			8.01.0	01.01.11		Subsídios de férias e de Natal	-	647
				01.02.00		Abonos variáveis ou eventuais:		
			8.01.0	01.02.02		Horas extraordinárias	160	-
			8.01.0	01.02.03		Alimentação e alojamento	-	160
				02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:		
				02.02.00		Bens não duradouros:		
				02.02.04		Alimentação:		
			8.01.0		B	Aquisição de refeições confeccionadas	1 700	-
			8.01.0	02.02.07		Material de transporte — Peças	-	200
				02.03.00		Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.02		Conservação de bens	-	3 200
			8.01.0	02.03.05		Locação de outros bens	-	200
			8.01.0	02.03.06		Comunicações	-	400
			8.01.0	02.03.10		Outros serviços	2 300	-
				07.00.00		Aquisição de bens de capital:		
				07.01.00		Investimentos:		
			8.01.0	07.01.07		Material de informática	-	400
			8.01.0	07.01.08		Maquinaria e equipamento	400	-
						<i>Total do capítulo 01</i>	87 051	87 051

Classificação						Rubricas	Em contos	
Orgânica			Funcional	Económica			Reforços ou inscrições	Anulações
Capítulo	Divisão	Sub-divisão		Código	Alinea			
02						Serviços centrais, de Inspeção e Investigação		
	03					Comissão Sectorial do Transporte Aéreo		
		01				Serviços próprios		
				01.00.00		Despesas com o pessoal:		
				01.03.00		Segurança Social:		
			8.01.0	01.03.02		Abono de família	1	-
			8.01.0	01.03.03		Prestações complementares	-	1
				02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:		
				02.03.00		Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.07		Transportes	640	-
			8.01.0	02.03.10		Outros serviços	-	2 080
				07.00.00		Aquisição de bens de capital:		
				07.01.00		Investimentos:		
			8.01.0	07.01.08		Maquinaria e equipamento	1 440	-
	05					Gabinete para as Comunidades Europeias		
		01				Serviços próprios		
				01.00.00		Despesas com o pessoal:		
				01.01.00		Remunerações certas e permanentes:		
			8.01.0	01.01.07		Gratificações	105	-
				02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:		
				02.03.00		Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.03		Locação de edifícios	-	105
	06					Gabinete de Estudos e Planeamento do MOPTC		
		01				Serviços próprios		
				01.00.00		Despesas com o pessoal:		
				01.03.00		Segurança Social:		
			8.01.0	01.03.02		Abono de família	-	35
			8.01.0	01.03.03		Prestações complementares	35	-
				02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:		
				02.02.00		Bens não duradouros:		
			8.01.0	02.02.06		Consumos de secretaria	350	-
				02.03.00		Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.02		Conservação de bens	500	-
			8.01.0	02.03.03		Locação de edifícios	-	2 850
			8.01.0	02.03.06		Comunicações	1 000	-
			8.01.0	02.03.10		Outros serviços	1 000	-
				04.00.00		Transferências correntes:		
				04.02.00		Administrações privadas:		
			8.01.0	04.02.01		Instituições particulares	313	-
				04.04.00		Exterior:		
			8.01.0	04.04.02		Outras transferências para o exterior	-	313
				07.00.00		Aquisição de bens de capital:		
				07.01.00		Investimentos:		
			8.01.0	07.01.07		Material de informática	1 000	-
			8.01.0	07.01.08		Maquinaria e equipamento	-	1 000

Classificação						Rubricas	Em contos	
Orgânica			Funcional	Económica			Reforços ou inscrições	Anulações
Capítulo	Divisão	Sub-divisão		Código	Alínea			
02	07	01				Secretaria-Geral		
						Serviços próprios		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.01.00			Remunerações certas e permanentes:		
			8.01.0	01.01.05		Pessoal aguardando aposentação	-	720
			02.00.00			Aquisição de bens e serviços correntes:		
			02.02.00			Bens não duradouros:		
			02.02.04			Alimentação:		
			8.01.0		B	Aquisição de refeições confeccionadas	220	-
			02.03.00			Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.10		Outros serviços	500	-
	09	01				Conselho Superior de Obras Públicas e Transportes		
						Serviços próprios		
			02.00.00			Aquisição de bens e serviços correntes:		
			02.01.00			Bens duradouros:		
			8.01.0	02.01.03		Material de secretaria	-	28
			02.03.00			Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.05		Locação de outros bens	-	50
			8.01.0	02.03.08		Representação dos serviços	78	-
			07.00.00			Aquisição de bens de capital:		
			07.01.00			Investimentos:		
			8.01.0	07.01.07		Material de informática	187	-
			8.01.0	07.01.08		Maquinaria e equipamento	-	187
	10	01				Inspecção-Geral de Obras Públicas, Transportes e Comunicações		
						Serviços próprios		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.01.00			Remunerações certas e permanentes:		
			8.01.0	01.01.01		Pessoal dos quadros	-	6 328
			8.01.0	01.01.02		Pessoal além dos quadros	6 328	-
	11	03				Conselho de Mercados de Obras Públicas e Particulares		
						Serviços próprios		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.02.00			Abonos variáveis ou eventuais:		
			8.01.0	01.02.02		Horas extraordinárias	-	5 000
			8.01.0	01.02.04		Ajudas de custo	-	10 000
			02.00.00			Aquisição de bens e serviços correntes:		
			02.03.00			Aquisição de serviços:		
			8.01.0	02.03.02		Conservação de bens	3 000	-
			8.01.0	02.03.05		Locação de outros bens	2 000	-
			8.01.0	02.03.07		Transportes	-	2 000
			8.01.0	02.03.10		Outros serviços	12 000	-
	12	01				Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica		
						Serviços próprios		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.01.00			Remunerações certas e permanentes:		
			8.01.0	01.01.03		Pessoal contratado a prazo	2 966	-
			8.01.0	01.01.04		Pessoal em regime de tarefa ou de avença	-	966



Classificação						Rubricas	Em contos	
Orgânica			Funcional	Económica			Reforços ou inscrições	Anulações
Capítulo	Divisão	Sub-divisão		Código	Alinea			
02	12	01	01.02.00			Abonos variáveis ou eventuais:		
			8.01.0 01.02.05			Outros abonos em numerário ou espécie	-	1 500
			02.00.00			Aquisição de bens e serviços correntes:		
			02.03.00			Aquisição de serviços:		
			8.01.0 02.03.02			Conservação de bens	-	500
						<i>Total do capítulo 02</i>	33 663	33 663
02						Serviços de Transportes e Comunicações		
	03					Direcção-Geral da Aviação Civil		
		01				Serviços próprios		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.01.00			Remunerações certas e permanentes:		
			8.07.0 01.01.05			Pessoal aguardando aposentação	-	1 323
			8.07.0 01.01.07			Gratificações	1 323	-
	04					Direcção-Geral do Pessoal do Mar e Estudos Náuticos		
		01				Serviços próprios		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.01.00			Remunerações certas e permanentes:		
			8.07.0 01.01.01			Pessoal dos quadros	-	537
			8.07.0 01.01.05			Pessoal aguardando aposentação	537	-
			8.07.0 01.01.07			Gratificações	2	-
			01.02.00			Abonos variáveis ou eventuais:		
			8.07.0 01.02.05			Outros abonos em numerário ou espécie	-	55
			01.03.00			Segurança Social:		
			8.07.0 01.03.01			Encargos com a saúde	-	52
			8.07.0 01.03.02			Abono de família	24	-
			8.07.0 01.03.03			Prestações complementares	29	-
			8.07.0 01.03.07			Outras pensões	52	-
			02.00.00			Aquisição de bens e serviços correntes:		
			02.01.00			Bens duradouros:		
			8.07.0 02.01.04			Material de cultura	50	-
			02.02.00			Bens não duradouros:		
			02.02.04			Alimentação:		
			8.07.0	B		Aquisição de refeições confeccionadas	-	748
			02.03.00			Aquisição de serviços:		
			8.07.0 02.03.03			Locação de edifícios	98	-
			8.07.0 02.03.10			Outros serviços	600	-
		02				Escola de Meistrança e Marinhagem		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.01.00			Remunerações certas e permanentes:		
			8.07.0 01.01.01			Pessoal dos quadros	-	1 040
			8.07.0 01.01.06			Pessoal em qualquer outra situação	1 040	-
	06					Inspecção-Geral de Navios		
		01				Serviços próprios		
			01.00.00			Despesas com o pessoal:		
			01.01.00			Remunerações certas e permanentes:		
			8.07.0 01.01.01			Pessoal dos quadros	-	80
			8.07.0 01.01.06			Pessoal em qualquer outra situação	-	70
			8.07.0 01.01.07			Gratificações	150	-
						<i>Total do capítulo 03</i>	3 905	3 905

Classificação					Rubricas	Em contos		
Orgânica			Funcional	Económica		Reforços ou inscrições	Anulações	
Capítulo	Divisão	Sub-divisão		Código				Alinea
04	01				Direcção-Geral de Portos			
					Serviços próprios			
			01.00.00		Despesas com o pessoal:			
			01.01.00		Remunerações certas e permanentes:			
		8.06.0	01.01.05		Pessoal aguardando aposentação	-	47	
			01.02.00		Abonos variáveis ou eventuais:			
		8.06.0	01.02.01		Gratificações variáveis ou eventuais	47	-	
		8.06.0	01.02.04		Ajudas de custo	-	2 000	
			02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:			
			02.01.00		Bens duradouros:			
		8.06.0	02.01.03		Material de secretaria	-	1 000	
		8.06.0	02.01.04		Material de cultura	180	-	
			02.02.00		Bens não duradouros:			
		8.06.0	02.02.05		Roupas e calçado	70	-	
		8.06.0	02.02.06		Consumos de secretaria	-	250	
		8.06.0	02.02.08		Outros bens não duradouros	1 000	-	
			02.03.00		Aquisição de serviços:			
		8.06.0	02.03.07		Transportes	2 000	-	
		8.06.0	02.03.10		Outros serviços	-	2 000	
					<i>Total do capítulo 04</i>	4 297	4 297	
05	01				Direcção-Geral dos Edifícios e Monumentos Nacionais			
					Serviços próprios			
			02.00.00		Aquisição de bens e serviços correntes:			
			02.01.00		Bens duradouros:			
		8.03.3	02.01.03		Material de secretaria	-	300	
		8.03.3	02.01.03	A	Serviços próprios	300	-	
		1.01.0	02.01.05	B	Administração geral	528	-	
		7.01.0		C	Outros bens duradouros:			
					Serviços recreativos e culturais	22 000	-	
			02.02.00		Bens não duradouros:			
		8.03.1	02.02.07		Material de transporte — Peças	300	-	
		8.03.3	02.02.08		Outros bens não duradouros	-	330	
			02.03.00		Aquisição de serviços:			
			02.03.02		Conservação de bens:			
		8.03.3		A	Funcionamento de serviços	-	650	
		1.01.0		B	Administração geral	-	2 078	
		4.02.0		F	Hospitais e clínicas	-	1 340	
		7.01.0		H	Serviços recreativos e culturais	-	35 548	
		8.01.0		I	Serviços económicos — Administração geral	-	355	
		8.03.3		L	Indústrias de construção civil	-	400	
		8.03.0	02.03.10		Outros serviços	-	1 400	
		8.03.3		A	Serviços próprios	2 050	-	
		7.01.0		B	Serviços recreativos e culturais	13 548	-	
			04.00.00		Transferências correntes:			
			04.02.00		Administrações privadas:			
		8.03.3	04.02.01		Instituições particulares	30	-	
			04.03.00		Famílias:			
		8.03.3	04.03.01		Particulares	300	-	

Classificação						Rubricas	Em contos	
Orgânica			Funcional	Económica			Reforços ou inscrições	Anulações
Capítulo	Divisão	Sub-divisão		Código	Alinea			
04	01		07.00.00			Aquisição de bens de capital:		
			07.01.00			Investimentos:		
			1.01.0	07.01.03		Edifícios	-	20 000
			1.01.0		A	Administração geral	8 080	-
			4.02.0	07.01.03	B	Hospitais e clínicas	1 340	-
			8.01.0		C	Serviços económicos	255	-
			1.01.0	07.01.04		Construções diversas	6 278	-
			8.03.3	07.01.07		Material de informática	100	-
			8.03.3	07.01.08		Maquinaria e equipamento	-	4 500
			8.03.3		A	Serviços próprios	4 500	-
			1.01.0		B	Administração geral	7 192	-
						<i>Total do capítulo 05</i>	66 801	66 801
						<i>Total do Ministério</i>	195 717	195 717

13.ª Delegação da Direcção-Geral da Contabilidade Pública, 30 de Agosto de 1989. — O Director, *António dos Santos*.



DIÁRIO DA REPÚBLICA

Depósito legal n.º 8814/85

ISSN 0870-9963

IMPRESA NACIONAL-CASA DA MOEDA, E. P.

AVISO

Por ordem superior e para constar, comunica-se que não serão aceites quaisquer originais destinados ao *Diário da República* desde que não tragam aposta a competente ordem de publicação, assinada e autenticada com selo branco.



PORTE
PAGO

1 — Preço de página para venda avulso, 4\$50; preço por linha de anúncio, 93\$.

2 — Para os novos assinantes do *Diário da Assembleia da República*, o período da assinatura será compreendido de Janeiro a Dezembro de cada ano. Os números publicados em Novembro e Dezembro do ano anterior que completam a legislatura serão adquiridos ao preço de capa.

3 — Os prazos de reclamação de faltas do *Diário da República* para o continente e regiões autónomas e estrangeiro são, respectivamente, de 30 e 90 dias à data da sua publicação.

PREÇO DESTES NÚMERO 144\$00

