

MAPA ANEXO
Instituto Politécnico da Guarda
Escola Superior de Educação

Número de lugares	Categoria	Vencimento
8 24 (b)	Professor-coordenador Professor-adjunto	(a)

(a) De acordo com a escala salarial fixada pelos Decretos-Leis n.ºs 408/89, de 18 de Novembro, e 76/96, de 18 de Junho.

(b) O provimento de lugares fica sujeito à existência de cabimento de verba.

MINISTÉRIOS DOS NEGÓCIOS ESTRANGEIROS E DAS FINANÇAS

Portaria n.º 15/97
de 4 de Janeiro

Manda o Governo, pelos Ministros dos Negócios Estrangeiros e das Finanças, nos termos § 1.º do artigo 158.º do Regulamento do Ministério dos Negócios Estrangeiros, com a nova redacção dada pelo Decreto n.º 433/72, de 3 de Novembro, e do artigo 37.º do Decreto-Lei n.º 296-A/95, de 17 de Novembro, que no mapa do pessoal assalariado da Embaixada em Sófia seja criado um lugar de secretário de 3.ª classe.

Ministérios dos Negócios Estrangeiros e das Finanças.

Assinada em 18 de Novembro de 1996.

O Ministro dos Negócios Estrangeiros, *Jaime José Matos da Gama*. — Pelo Ministro das Finanças, *Maria Manuela de Brito Arcanjo Marques da Costa*, Secretária de Estado do Orçamento.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO DESENVOLVIMENTO RURAL E DAS PESCAS

Portaria n.º 16/97
de 4 de Janeiro

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

Considerando que é necessário, dada a evolução dos conhecimentos científicos e técnicos, dispor de um método que permita controlar os teores muito reduzidos de aflatoxina B₁, fixados pela Portaria n.º 1107/89, de 27 de Dezembro, e posteriormente alterados pela Portaria n.º 1208/91, de 19 de Dezembro;

Considerando a necessidade de harmonizar a Directiva n.º 76/372/CEE, da Comissão, de 1 de Março, com as alterações que lhe foram introduzidas pelas Directivas n.ºs 92/95/CEE e 94/14/CE, da Comissão, de 9 de Novembro e de 29 de Março, relativas ao método de análise comunitário para o doseamento de aflatoxina B₁;

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

Manda o Governo, pelo Ministro da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, ao abrigo do disposto no n.º 7 do artigo 5.º do Regulamento Relativo às Substâncias e Produtos Indesejáveis nos Alimentos Simples, Matérias-Primas e Alimentos Compostos Destinados à Alimentação Animal, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 442/89, de 27 de Dezembro, que seja aprovado o método oficial de análise a utilizar para a determinação do teor de aflatoxina B₁ nos alimentos para animais, constante do anexo ao presente diploma e que dele faz parte integrante.

Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Assinada em 15 de Novembro de 1996.

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

ANEXO

Determinação do teor de aflatoxina B₁ em alimentos para animais

A — Método por cromatografia monodimensional em camada fina

1 — Objectivo e campo de aplicação. — O método permite determinar o teor de aflatoxina B₁ das matérias-primas e dos alimentos simples; no entanto, não se aplica à polpa de citrinos. O limite inferior de determinação é de 0,01 mg/kg (10 ppb).

Na presença de substâncias de interferência que dificultem as determinações, é necessário recomeçar a análise em conformidade com o método descrito na parte B, «Determinação de aflatoxina B₁ por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)».

2 — Resumo do processo. — A amostra é submetida à extracção com clorofórmio. O extracto é filtrado e uma alíquota é tratada e purificada por cromatografia em coluna de sílica gel. O eluído é evaporado e retomado num volume determinado de clorofórmio ou de uma mistura de benzeno e acetonitrilo. Uma alíquota desta solução é submetida a cromatografia em camada fina. A quantidade de aflatoxina B₁ é determinada no cromatograma, sob irradiação UV, quer visualmente quer por fluorodensitometria, por comparação com as quantidades conhecidas de padrão de aflatoxina B₁. A identidade de aflatoxina B₁ do extracto do alimento deve ser confirmada pelos processos indicados.

Notas

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

2 — Dada a sensibilidade da aflatoxina B₁ à luz, os ensaios devem realizar-se ao abrigo da luz natural ou da luz branca artificial.

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

Assim, todo o material de vidro para contacto com soluções aquosas de aflatoxinas deve ser previamente imerso em ácido (por exemplo, ácido sulfúrico, c=2 mol/l) durante algumas horas e, posteriormente,

bem lavado com água destilada, de modo a remover quaisquer vestígios de ácido (por exemplo, três vezes, verificando com papel indicador). Na prática, este tratamento torna-se necessário para o balão de fundo redondo (4.4), balões volumétricos, provetas, frascos ou tubos utilizados para as soluções de calibração e para os extractos finais (particularmente os frascos de auto-amostragem), bem como as pipetas Pasteur eventualmente usadas para a transferência das soluções de calibração ou dos extractos.

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

3.1 — Acetona.

3.2 — Acetonitrilo.

3.3 — Benzeno.

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

3.5 — n-hexano.

3.6 — Metanol.

3.7 — Éter dietílico, anidro e isento de peróxidos.

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

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

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

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

3.12 — Sulfato de sódio, anidro, granulado.

3.13 — Gás inerte, por exemplo, azoto.

3.14 — Ácido clorídrico 1 N.

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

3.16 — Terra de diatomáceas, tratada com ácido.

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

3.18 — Solução-padrão de aflatoxina B₁ a cerca de 0,1 µg/ml em clorofórmio (3.4) ou na mistura de benzeno e de acetonitrilo (3.8), preparada e controlada como indicado no ponto 7.

3.19 — Solução-padrão qualitativa de cerca de 0,1 µg de aflatoxina B₁ e B₂ por mililitro em clorofórmio (3.4) ou na mistura de benzeno e de acetonitrilo (3.8). As concentrações são dadas a título indicativo; devem ser ajustadas de modo a obter a mesma intensidade de fluorescência para as duas aflatoxinas.

3.20 — Solventes para o desenvolvimento:

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

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

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

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

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

4 — Aparelhos e utensílios:

4.1 — Triturador/misturador.

4.2 — Agitador mecânico ou magnético.

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

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

4.5 — Evaporador rotativo, actuando sob vazio, com balão de fundo redondo de 500 ml.

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

4.7 — Equipamento para cromatografia em camada fina.

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

4.9 — Lâmpada UV de comprimento de onda de 360 nm. — A intensidade de radiação deve permitir a distinção nítida de uma mancha de 1,0 ng de aflatoxina B₁ sobre uma placa para cromatografia em camada fina a uma distância de 10 cm da lâmpada.

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

4.11 — Espectrómetro, que permita medições no ultravioleta.

4.12 — Fluorodensitómetro (facultativo).

5 — Técnica:

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

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

5.2 — Extração:

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

5.3 — Purificação em coluna:

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

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

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

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

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

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

5.4 — Cromatografia em camada fina:

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

- 10 µl, 15 µl, 20 µl, 30 µl e 40 µl da solução-padrão de aflatoxina B₁ (3.18);
- 10 µl do extracto obtido em 5.3 e, em sobreposição, 20 µl da solução-padrão de aflatoxina B₁ (3.18);
- 10 µl e 20 µl do extracto obtido em 5.3.

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

A escolha do solvente deve ser estabelecida previamente, aplicando sobre a placa 25 µl da solução-padrão qualitativa (3.19), assegurando-se que, no fim do desenvolvimento, as aflatoxinas B₁ e B₂ estão completamente separadas.

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

As manchas das aflatoxinas B₁ e B₂ dão uma fluorescência azul.

5.5 — Determinações quantitativas:

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

5.5.1 — Avaliação visual:

Determina-se a quantidade de aflatoxina B₁ do extracto, comparando a intensidade de fluorescência das manchas do extracto com as das manchas da solução-padrão. Interpola-se, se necessário. A fluorescência obtida por sobreposição do extracto e do padrão deve ser mais forte que a correspondente à dos 10 µl de extracto e deve dar lugar apenas à percepção de uma única mancha. Se a intensidade de fluorescência revelada pelos 10 µl de extracto for mais forte que a dos 40 µl de solução-padrão, dilui-se o extracto de 10 a 100 vezes com clorofórmio (3.4) ou mistura de benzeno e de acetonitrilo (3.8) antes de o submeter a uma nova cromatografia em camada fina.

5.5.2 — Avaliação por fluorodensitometria:

Mede-se a intensidade de fluorescência das manchas de aflatoxina B₁ no fluorodensitómetro (4.12), utilizando um comprimento de onda de excitação de 365 nm e um comprimento de onda de emissão de 433 nm.

Determina-se a quantidade de aflatoxina B₁ do extracto aplicado, comparando as intensidades de fluorescência das manchas do extracto e da solução-padrão.

5.6 — Confirmação de identidade da aflatoxina B₁:

A identidade da substância a avaliar pode ser confirmada por:

5.6.1 — Ensaio de pesquisa com ácido sulfúrico:

Pulveriza-se o cromatograma obtido em 5.4 com ácido sulfúrico (3.15). A fluorescência das manchas de afla-

toxina B₁ deve virar de azul a amarelo sob irradiação UV.

5.6.2 — Ensaio por cromatografia bidimensional, implicando a formação de aflatoxina B₁-hemiacetal (aflatoxina B_{2a}).

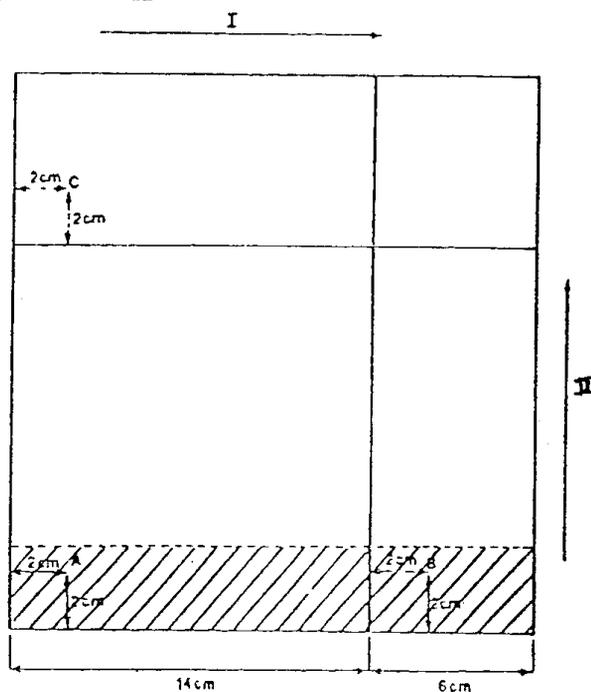


Figura 1 — Cromatografia de confirmação

Nota. — As operações a seguir descritas devem ser efectuadas segundo o esquema apresentado na figura 1.

5.6.2.1 — Aplicação das soluções:

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

No ponto A: um volume de extracto purificado da amostra obtido em 5.3, contendo cerca de 2,5 ng de aflatoxina B₁;

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

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

5.6.2.2 — Desenvolvimento:

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

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

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

5.6.2.3 — Interpretação do cromatograma:

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

- Aparecimento de uma mancha fluorescente azul de aflatoxina B₁, proveniente da solução-padrão depositada em C (migração na direcção I);
- Aparecimento de uma mancha fluorescente azul de aflatoxina B₁ (não tendo reagido com o ácido clorídrico) e de uma mancha fluorescente azul, mais intensa de aflatoxina B₁-hemicetal, proveniente da solução-padrão, depositado em B (migração na direcção II);
- Aparecimento de manchas semelhantes às indicadas na alínea b), provenientes do extracto da amostra, depositado em A. A localização destas manchas está definida pela distância da migração da aflatoxina B₁ a partir do ponto A, na direcção I (a mesma distância percorrida pelo extracto-padrão, depositado em C), seguida das distâncias de migração, percorridas na direcção II, pela aflatoxina B₁ (não tendo reagido com o ácido clorídrico) e pela aflatoxina B₁-hemicetal (as mesmas distâncias que as percorridas pelo extracto-padrão depositado em B). As intensidades de fluorescência das manchas do hemicetal provenientes do extracto da amostra e da solução-padrão depositado em B deverão corresponder.

6 — Cálculo dos resultados:

6.1 — A partir da avaliação visual, o teor em microgramas de aflatoxina B₁ por quilograma de amostra (ppb) é dado pela fórmula:

$$\frac{S \times Y \times V}{m \times X}$$

na qual:

- Y e X — são, respectivamente, os volumes em microlitros da solução-padrão de aflatoxina B₁ (3.18) e do extracto da amostra, tendo uma intensidade de fluorescência semelhante;
- S — concentração, em microgramas de aflatoxina B₁ por mililitro, da solução-padrão (3.18);
- V — volume final do extracto da amostra, em microlitros, tendo em conta eventuais diluições;
- m — massa, em gramas, da toma da amostra, correspondente ao volume do extracto submetido à purificação por coluna.

6.2 — A partir da avaliação fluorodensitométrica, o teor em microgramas de aflatoxina B₁ por quilograma de amostra (ppb) é dado pela fórmula:

$$\frac{S \times V}{m \times Y}$$

na qual:

- Y — volume, em microlitros, de extracto depositado na placa (10 µl ou 20 µl);
- S — quantidade em nanogramas de aflatoxina B₁ do extracto depositado (tendo em conta o volume Y);
- V — volume final do extracto, em microlitros, tendo em conta as eventuais diluições;
- m — peso, em gramas, da toma da amostra, correspondente ao volume de extracto submetido à purificação por coluna.

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

7.1 — Determinação da concentração em aflatoxina B₁:

Prepara-se uma solução-padrão de aflatoxina B₁ em clorofórmio (3.4) ou na mistura benzeno e acetonitrilo (3.8), cuja concentração esteja entre 8 µg e 10 µg por mililitro. Determina-se o espectro de absorvência entre 330 nm e 370 nm, com o auxílio do espectrómetro (4.11).

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

Calcula-se a concentração em microgramas de aflatoxina B₁ por mililitro da solução, a partir das seguintes fórmulas:

$$\frac{312 \times A \times 1000}{22\ 300}, \text{ para a solução clorofórmica;}$$

$$\frac{312 \times A \times 1000}{19\ 800}, \text{ para a solução na mistura de benzeno e de acetonitrilo.}$$

Efectuam-se, ao abrigo da luz, as diluições convenientes para obter uma solução-padrão de trabalho, cuja concentração de aflatoxina B₁ seja de 0,1 µg/ml. Esta solução mantém-se estável durante duas semanas quando conservada em frigorífico, a 4°C.

7.2 — Controlo da pureza cromatográfica:

Depositam-se sobre uma placa (4.8) 5 µl da solução-padrão cuja concentração é entre 8 µg-10 µg de aflatoxina B₁ por mililitro (7.1). Desenvolve-se um cromatograma como o indicado em 5.4.

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

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

- 25 % do resultado mais elevado para os teores em aflatoxina B₁ de 10 µg/kg a 20 µg/kg;
- 5 µg, em valor absoluto, para os teores de 20 µg/kg a 50 µg/kg;
- 10 % do resultado mais elevado para os teores superiores a 50 µg/kg.

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

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

1 — Objectivo e campo de aplicação. — O método permite determinar o teor de aflatoxina B₁ em alimentos para animais, incluindo os que contenham polpa de citrinos. O limite inferior de determinação é de 0,001 mg/kg (1 ppb).

2 — Resumo do processo. — O método é baseado na separação por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com detecção de fluorescência. A amostra é extraída com clorofórmio, sendo o extracto sujeito a filtração. Purifica-se uma alíquota, por cartucho de Florisil seguido de um outro de C₁₈. Para a separação final e doseamento recorre-se a uma coluna de HPLC de fase reversa, derivatização pós-coluna com uma solução aquosa de iodo e detecção por fluorescência.

Notas

1 — As micotoxinas são substâncias extremamente tóxicas, pelo que a sua manipulação deve ser efectuada em *hottes*. Devem ser toma-

das precauções especiais quando as micotoxinas se apresentam sob forma liofilizada porque, pela sua natureza electrostática, tem tendência para dispersão nas áreas de trabalho.

2 — Dada a sensibilidade da aflatoxina B₁ à luz, os ensaios devem realizar-se ao abrigo da luz natural ou da luz branca artificial.

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

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

3 — Reagentes e auxiliares:

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

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

3.3 — Acetona.

3.4 — Acetonitrilo, para HPLC.

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

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

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

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

3.6 — Fase móvel para HPLC:

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

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

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

3.8 — Celite 545 ou equivalente, tratada com ácido.

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

3.10 — Cartucho de C₁₈ (Waters SEP-PAK), ou equivalente.

3.11 — Gás inerte, por exemplo, azoto.

3.12 — Solução-padrão de aflatoxina B₁, em clorofórmio, de concentração 10 µg/ml. Verifica-se a concentração da solução do seguinte modo: traça-se o espectro de absorção da solução entre 300 nm e 370 nm, por meio de um espectrómetro (4.23). Mede-se a absorvência (A) a um máximo de 363 nm. Calcula-se a concentração de aflatoxina B₁, expressa em microgramas por mililitro da solução, através da fórmula:

$$\text{Concentração (}\mu\text{g/ml)} = \frac{312 \times A \times 1000}{22 \times 300} = 13,991 \times A$$

3.12.1 — Solução-mãe da solução-padrão de aflatoxina B₁, em clorofórmio:

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

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

3.13 — Soluções de calibração de aflatoxina B₁, para HPLC.

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

3.13.1 — Solução de calibração de 4 ng/ml:

Deixa-se estabilizar, à temperatura ambiente, o balão que contém a solução-mãe (3.12.1), envolvido na folha de alumínio, durante algumas horas. Transferem-se 400 µl da solução-mãe (200 ng de aflatoxina B₁) para balão volumétrico de 50 ml, e evapora-se à secura sob corrente de gás inerte (3.11). Dissolve-se o resíduo obtido com cerca de 20 ml da mistura de água e de acetona (3.5.3), completando-se o volume até ao traço de referência com a mesma solução. Homogeneiza-se.

3.13.2 — Solução de calibração de 3 ng/ml:

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

3.13.3 — Solução de calibração de 2 ng/ml:

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

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

3.13.4 — Solução de calibração de 1 ng/ml:

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

3.14 — Balão contendo uma mistura de aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂ de concentrações aproximadas de 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml e 0,5 µg/ml, respectivamente, em 1 ml de clorofórmio.

3.14.1 — Solução para ensaio cromatográfico:

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

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

3.15.1 — Solução aquosa saturada de NaCl.

3.15.2 — Sulfato de sódio anidro, granulado.

4 — Aparelhos e utensílios:

4.1 — Triturador misturador.

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

4.3 — Agitador mecânico.

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

4.5 — Aparelho para cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), equipado com injector apropriado para injeções de 250 µl.

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

4.6 — Coluna analítica para HPLC, com enchimento de C₁₈ de 3 µm-5 µm de partícula.

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

4.8 — Junta em T, em aço inoxidável ($1/16$ mm \times 0,75 mm) de volume morto nulo.

4.9 — Reactor em espiral de *teflon* ou aço inoxidável. As dimensões compreendidas entre 3000 mm \times 0,5 mm e de 5000 mm \times 0,5 mm têm-se revelado apropriadas para combinação com colunas de HPLC de partículas de 5 μ m ou 3 μ m.

4.10 — Banho de água equipado com controlo termostático, ajustado para 60°C, susceptível de regular a temperatura com precisão $\pm 0,1^\circ$ C.

4.11 — Detector de fluorescência susceptível de fornecer um comprimento de onda de excitação da ordem de 365 nm e um comprimento de onda de emissão da ordem de 435 nm (no caso de aparelhos com filtro, o comprimento de onda de emissão deverá ser superior a 400 nm).

Deverá permitir a detecção de quantidades de aflatoxina B₁ da ordem de 0,05 ng.

Com vista a eliminar eventuais bolhas de ar presentes na célula, poderá ser necessário utilizar uma certa contra-pressão (por exemplo, através da ligação de uma válvula ou espiral de *teflon* ou de aço inoxidável à saída do detector).

4.12 — Registador contínuo.

4.13 — Integrador electrónico (opcional).

4.14 — Papel de filtro plissado, diâmetro: 24 cm. Macherey-Nagel 617 $1/4$, ou equivalente.

4.15 — Filtro de membrana de porosidade 0,45 μ m, Millipore HAWP 04700 ou equivalente.

4.16 — Erlenmeyer de 500 ml, munido de rolha de vidro.

4.17 — Coluna de vidro (diâmetro interno aproximado: 1 cm; comprimento aproximado: 30 cm), equipado com uma ponta Luer.

4.18 — Torneira Luer de *nylon*, resistente ao clorofórmio (Bio-rad 7328017, Analytichem Al 6078, J. T. Baker 4514 ou equivalente).

4.19 — Seringa Luer de 10 ml, resistente ao ataque químico.

4.20 — Seringa apropriada para HPLC, para injeções de 250 μ l (ver 4.5).

4.21 — Microseringa de 100 μ l, para preparação das soluções de calibração (deve verificar-se, por pesagem, se a precisão é da ordem de 2%).

4.22 — Tubos de vidro de 10 ml, munidos de rolha.

4.23 — Espectrofotómetro apropriado para determinações na zona de UV.

4.24 — Equipamento para o ensaio de confirmação (6):

4.24.1 — Ampola de decantação de 100 ml, com torneira de *teflon*, lavada com ácido.

4.24.2 — Unidade de aquecimento 40°C-50°C.

5 — Técnica:

5.1 — Preparação de amostra para análise:

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

5.2 — Toma para análise:

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

5.3 — Extracção:

Adicionam-se 25 g de celite (3.8), 250 ml de clorofórmio (3.1) e 25 ml de água à amostra (5.2). Rolha-se o Erlenmeyer e agita-se durante trinta minutos com auxílio de um agitador mecânico (4.14), recolhendo-se 50 ml do filtrado. Se necessário, toma-se uma alíquota do filtrado e dilui-se para 50 ml em clorofórmio, de modo

que a concentração de aflatoxina B₁ não seja superior a 4 ng/ml.

5.4 — Purificação da amostra (as operações devem efectuar-se sem interrupções significativas).

Cuidados a ter:

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

- 1) Janelas com filtros de radiação UV em associação com luz difusa (evitando-se a luz solar directa);
- 2) Cortinas ou persianas em associação com luz artificial (os tubos de fluorescência são aceitáveis);

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

5.4.1 — Purificação por cartucho de Florisil.

5.4.1.1 — Preparação do sistema coluna-cartucho:

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

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

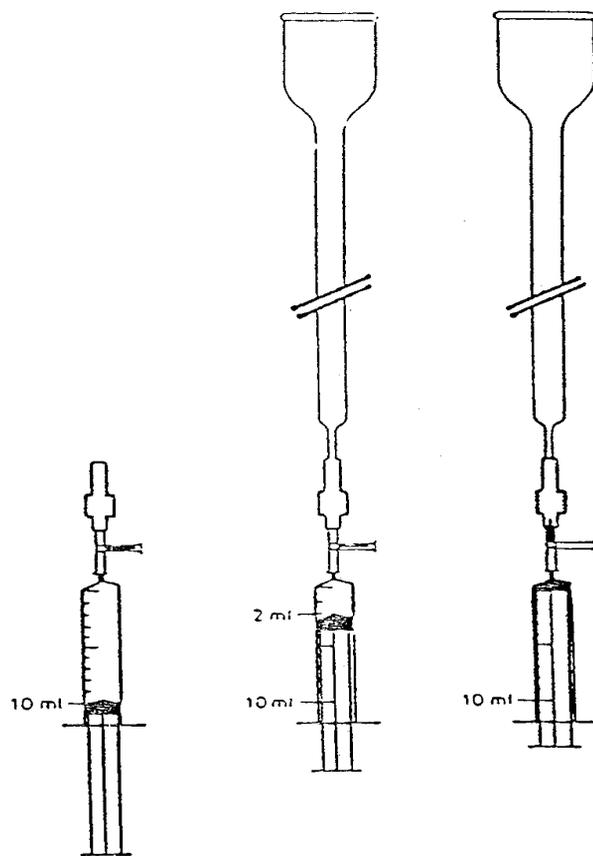


Figura 2 — Sistema coluna-cartucho

5.4.1.2 — Purificação:

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

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

Elui-se a aflatoxina B₁ com 40 ml de mistura de acetona e de água (3.5.1), recolhendo a totalidade do eluído no balão de fundo redondo do evaporador rotativo (4.4).

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

Nota. — Nesta fase deve permanecer no balão cerca de 0,5 ml de líquido. A experiência tem revelado que o prosseguimento da evaporação não prejudica o processo e que a quantidade de acetona presente em 0,5 ml de líquido não é significativa. Resíduos de acetona eventualmente presentes poderiam originar perdas de aflatoxina B₁ no cartucho de C₁₈.

Junta-se 1 ml de metanol (3.2), agita-se o balão, para facilitar a dissolução dos resíduos de aflatoxina B₁ presentes nas paredes, e adicionam-se 4 ml de água, agitando. Desliga-se e elimina-se o cartucho de Florisil.

Lava-se a coluna com água e guarda-se para o processo de purificação com o cartucho de C₁₈.

5.4.2 — Purificação por cartucho de C₁₈.

5.4.2.1 — Preparação do sistema coluna-cartucho:

Adapta-se uma torneira (4.18) à extremidade mais curta de um cartucho de C₁₈ (3.10) (ver figura 2). Com auxílio de uma seringa (4.19), remove-se o ar do cartucho, mediante a injeção rápida, pela torneira, de 10 ml de metanol (3.2) (as bolhas de ar no interior do invólucro são visíveis sob a forma de pontos luminosos num fundo acinzentado).

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

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

5.4.2.2 — Purificação:

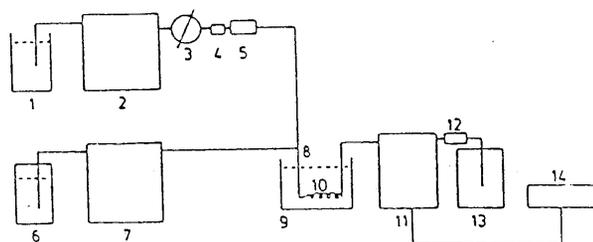
Transfere-se quantitativamente para a coluna (4.17) o extracto recolhido em 5.4.1.2 e lava-se o balão com duas porções de 5 ml de mistura de água e de metanol (3.5.2), deixando escoar por acção da gravidade. Durante a execução destas operações, evita-se a secagem do sistema coluna-cartucho (se ocorrer a formação de bolhas de ar no estreitamento próximo do cartucho deve-se interromper o fluxo e bate-se levemente no topo da coluna, de forma a eliminá-las, retomando em seguida as operações). Elui-se com 25 ml de mistura de água e de metanol (3.5.2), desprezando-se o eluído.

Elui-se a aflatoxina B₁ com 50 ml de mistura de água e de acetona (3.5.3) e recolhe-se a totalidade do eluído num balão volumétrico de 50 ml. Completa-se até ao traço de referência com água e homogeneiza-se; a solução resultante é utilizada no ensaio cromatográfico (5.5).

Nota. — Em geral, não é necessário filtrar o extracto final antes do processo de HPLC. Se, contudo, se verificar a necessidade de tal operação, deve-se-á evitar o uso de filtros à base de celulose, susceptíveis de ocasionar perdas de aflatoxina B₁. Poder-se-ão utilizar filtros de *teflon*.

5.5 — Cromatografia líquida de alta resolução:

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



- 1 — Fase móvel
- 2 — Bomba
- 3 — Injetor
- 4 — Pré-coluna
- 5 — Coluna analítica para HPLC
- 6 — Solução saturada de iodo
- 7 — Bomba para o reagente pós-coluna
- 8 — Junta em T
- 9 — Banho com controlo termostático
- 10 — Reactor em espiral
- 11 — Detector de fluorescência
- 12 — Válvula reguladora de pressão
- 13 — Esgoto
- 14 — Registador/integrador

Figura 3 — Diagrama do sistema de cromatografia líquida, com derivatização pós-coluna

Notas

1 — Os valores indicados para os fluxos do solvente e do reagente pós-coluna são fornecidos a título meramente indicativo, podendo haver necessidade de ajustamentos, em função das características da coluna de HPLC.

2 — A eficiência da resposta do detector para as aflatoxinas depende da temperatura, razão pela qual se deve efectuar a compensação do desvio (ver figura 4) através da injeção de uma quantidade fixa de padrão de referência de aflatoxina B₁ (3.13.3), com intervalos regulares (por exemplo de três em três injeções). Os valores dos picos de aflatoxina B₁ entre estes padrões de referência podem ser corrigidos, usando o valor médio das respostas, desde que a diferença observada entre os valores dos picos das respostas consecutivas, correspondentes aos padrões de referência, seja baixa (<10%).

Por tal facto, devem-se efectuar as injeções ininterruptamente. Se for necessário proceder a uma interrupção, a última injeção anterior e a primeira injeção posterior a esta deverão ser de padrão de referência (3.13.3). Na medida em que a curva de calibração se apresenta sob a forma de uma recta que passa pela origem, a determinação das quantidades de aflatoxina B₁ nos extractos da amostra efectua-se directamente por referência aos padrões adjacentes.

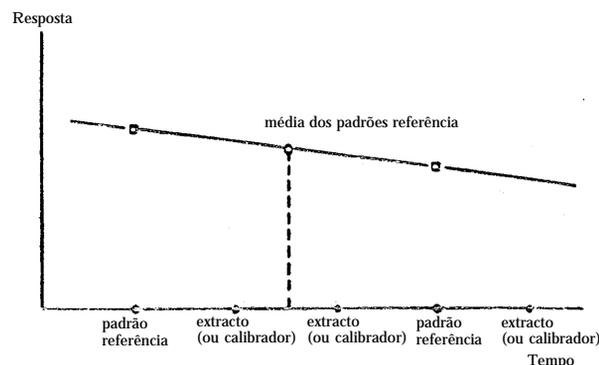


Figura 4 — Compensação do desvio relativo à resposta da aflatoxina B₁ por injeção do padrão de referência (3.13.3), a intervalos de tempo regulares

5.5.1 — Regulação da bomba de HPLC:

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

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

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

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

5.5.3 — Detector de fluorescência:

Regula-se o detector de fluorescência (4.11) para um comprimento de onda de excitação de 365 nm e um comprimento de onda de emissão de 435 nm (no caso de aparelhos com filtro superior a 400 nm). Ajusta-se a atenuação de modo a obter, para 1 ng de aflatoxina B₁, uma deflexão da caneta do registador de cerca de 80% da escala total.

5.5.4 — Injector:

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

5.5.5 — Verificação da separação cromatográfica:

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

5.5.6 — Verificação da estabilidade do sistema:

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

Nota. — Os picos produzidos pela aflatoxina B₁ não deverão apresentar, em injeções consecutivas, diferenças superiores a 6%.

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

5.5.7 — Verificação da linearidade:

Injectam-se as soluções de calibração de aflatoxina B₁ (3.13.1 a 3.13.4). Utiliza-se em cada terceira injeção a solução de calibração (3.13.3), para correcção do desvio das respostas.

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

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

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

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

5.5.8 — Injeção dos extractos da amostra:

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

6 — Ensaio de confirmação:

6.1 — Tratamento subsequente do extracto (5.4.2.2):

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

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

sulfato com alguns mililitros de clorofórmio, recolhendo na mesma proveta ou ampola.

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

6.2 — Preparação do derivado e cromatografia em camada fina:

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

7 — Cálculo e resultados:

Calcula-se o teor de aflatoxina B₁ presente na amostra expresso em µg/kg, recorrendo à fórmula seguinte:

$$\text{Teor de aflatoxina B}_1 \text{ em } \mu\text{g/kg} = \frac{m \times V_{\text{ext}}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

na qual:

m = quantidade de aflatoxina B₁, expressa em ng, representada pelo pico B₁ da amostra, calculada do modo que se segue:

$$m = \frac{P_{(\text{amostra})}}{P_{(st_1)} + P_{(st_2)}} \times 2r_{(st)}$$

sendo:

*P*_(amostra) = área do pico correspondente à aflatoxina B₁ na amostra;

*P*_(st₁) = área do pico correspondente à aflatoxina B₁ no padrão de referência precedente (3.13.3);

*P*_(st₂) = área do pico correspondente à aflatoxina B₁ no padrão de referência seguinte (3.13.3);

*r*_(st) = quantidade de aflatoxina B₁ no padrão de referência (3.13.3) injectado, expressa em nanogramas;

*V*_{*m*} = volume do extracto da amostra injectado, expresso em mililitros;

*V*_{*ext*} = volume final do extracto de amostra, expresso em mililitros, tendo em atenção qualquer diluição que tenha sido efectuada (ver 5.3);

M = massa da amostra, expressa em gramas;

*V*_{*f*} = volume de filtrado transferido para o cartucho de Florisil (5.4.1.2), expresso em mililitros;

*V*_{*c*} = volume de clorofórmio utilizado para a extração da amostra, expresso em mililitros.

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

$$\text{Teor de aflatoxina B}_1 \text{ em } \mu\text{g/kg} = 20 \times m$$

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

8 — Repetibilidade. — Ver ponto 10.1.

9 — Reprodutibilidade. — Ver ponto 10.1.

10 — Observações:

10.1 — Precisão:

Um estudo interlaboratorial (Egmond, H. P. van, Heisterkamp, S. H., e Paulsch, W. E. 1991 — *Food Additives and Contaminants*, 8, 17-29), efectuado à escala internacional com alimentos compostos para animais, forneceu, no que respeita à repetibilidade e à reprodutibilidade, os resultados que se apresentam no quadro n.º 1. O termo repetibilidade (*r*) aqui utilizado define-se como a razão máxima que, com uma probabilidade de 95%, não é significativa na comparação de dois valores

obtidos para a mesma amostra, no mesmo laboratório e nas mesmas condições. O termo reprodutibilidade (R) é definido de um modo análogo, no que se refere à comparação de dois laboratórios diferentes.

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

QUADRO N.º 1

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

Nível (µg/kg)	r	R	CV _r (percentagem)	CV _R (percentagem)
8 & 14	1,4	1,7	11	18

CV = coeficiente de variação.

10.2 — Estabilidade do clorofórmio (3.1):

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

10.3 — Exactidão:

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

C — Observações relativas aos métodos A e B

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

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

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

- ± 50% da média obtida com os valores médios de aflatoxina B₁ entre 10 µg/kg e 20 µg/kg;
- ± 10 µg/kg em relação à média dos valores médios entre 20 µg/kg e 50 µg/kg;
- ± 20% da média dos valores médios superiores a 50 µg/kg.

QUADRO SINÓPTICO

Directiva n.º 94/14/CE	Projecto
Anexo, parte C: N.º 1. N.º 2.	Anexo, parte C: N.º 1. N.º 2.

QUADRO SINÓPTICO

Directiva n.º 76/372/CE	Projecto
Anexo, parte A: N.º 1. N.º 2. N.º 3. N.º 4. N.º 5. N.º 6. N.º 7. N.º 8. N.º 9.	Anexo, parte A: ... N.º 2. N.º 3. N.º 4. N.º 5. N.º 6. N.º 7. N.º 8. N.º 9.
Anexo, parte B: N.º 1. N.º 2. N.º 3. N.º 4. N.º 5. N.º 6. N.º 7. N.º 8.
Anexo, parte C: N.º 1. N.º 2.

QUADRO SINÓPTICO

Directiva n.º 92/95/CE	Projecto
Anexo, parte A: N.º 1.	Anexo, parte A: N.º 1.
Anexo, parte B: N.º 1. N.º 2. N.º 3. N.º 4. N.º 5. N.º 6. N.º 7. N.º 8. N.º 9. N.º 10.	Anexo, parte B: N.º 1. N.º 2. N.º 3. N.º 4. N.º 5. N.º 6. N.º 7. N.º 8. N.º 9. N.º 10.