MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO DESENVOLVIMENTO RURAL E DAS PESCAS

Decreto-Lei n.º 243/2000

de 27 de Setembro

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

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

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

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

Artigo único

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

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

Promulgado em 6 de Setembro de 2000.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.

Referendado em 4 de Setembro de 2000.

O Primeiro-Ministro, *António Manuel de Oliveira Guterres*.

ANEXO

Determinação do lasalocido de sódio

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

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

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

3 — Reagentes:

3.1 — Di-hidrogenofosfato potássico (KH_2PO_4).

3.2 — Ácido ortofosfórico, $w=85\%$.

3.3 — Solução de ácido ortofosfórico, $\sigma=205$:

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

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

3.5 — Metanol para HPLC.

3.6 — Ácido clorídrico, $\rho_{20}=1,19$ g/ml.

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

Dissolver 1,36 g de KH_2PO_4 (3.1) em 500 ml de água (3.11); adicionar 3,5 ml de ácido ortofosfórico (3.2) e 10 ml de 6-metil-2-heptilamina (3.4). Ajustar o pH para 4 com solução de ácido ortofosfórico (3.3) e diluir para 1000 ml com água (3.11).

3.8 — Metanol acidificado:

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

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

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

3.10 — Lasalocido de sódio-padrão de pureza garantida ($C_{34}H_{53}O_8Na$, sal sódico de ácido monocarboxílico poli-eterificado produzido por *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1 — Solução-padrão de reserva, 500 µg/ml, de lasalocido de sódio:

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

3.10.2 — Solução-padrão intermédia, 50 µg/ml, de lasalocido de sódio:

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

3.10.3 — Soluções de calibração:

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

3.11 — Água para HPLC.

4 — Equipamento:

4.1 — Banho ultra-sons.

4.2 — Filtros de membrana de 0,45 µm.

4.3 — Equipamento de *HPLC* com sistema de injeção com capacidade de injeção de volumes de 20 µl.

4.3.1 — Coluna para cromatografia líquida com 125 mm × 4 mm e enchimento de fase reversa C18 com granulometria de 5 µm, ou equivalente.

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

5 — Procedimento:

5.1 — Generalidades:

5.1.1 — Alimento para animais branco:

Na determinação da recuperação (5.1.2), analisa-se um alimento para animais branco, para comprovar a ausência de lasalocido de sódio e de substâncias interferentes. O alimento para animais branco deve ser de tipo similar ao da amostra e não deve ser detectado lasalocido de sódio ou substâncias interferentes.

5.1.2 — Determinação da recuperação:

Para determinar a recuperação, procede-se à análise de um alimento para animais branco ao qual terá sido adicionada uma quantidade de lasalocido de sódio semelhante à presente na amostra. Para obter uma concentração de 100 mg/kg no branco, transferir 10 ml da solução-padrão de reserva (3.10.1) para um *erlenmeyer* de 250 ml e concentrar por evaporação até cerca de 0,5 ml. Adicionar 50 g do alimento para animais branco, misturar bem e deixar em repouso durante dez minutos, misturando de novo várias vezes antes de proceder à extracção (5.2).

Caso não se disponha de um alimento para animais branco de tipo similar ao da amostra (ver 5.1.1.), pode determinar-se a recuperação pelo método da adição de padrão. Nesse caso, adiciona-se à amostra a analisar uma quantidade de lasalocido de sódio semelhante à que já se encontra presente e analisa-se a amostra assim obtida juntamente com a amostra sem adição. A recuperação é calculada por subtração.

5.2 — Extracção:

5.2.1 — Alimentos para animais:

Em *erlenmeyer* de 250 ml, pesar com uma aproximação de 0,01 g, 5 g a 10 g de amostra e adicionar, com uma pipeta, 100 ml de metanol acidificado (3.8). Tapar o *erlenmeyer*, agitar e colocar no banho de ultra-sons (4.1) a cerca de 40°C, durante vinte minutos. Retirar o *erlenmeyer* do banho e arrefecer à temperatura ambiente. Deixar repousar durante cerca de uma hora, até à deposição das matérias em suspensão, e filtrar uma alíquota com um filtro de membrana de 0,45 µm (4.2) para um recipiente adequado. Efectuar em seguida a determinação por *HPLC* (5.3).

5.2.2 — Pré-misturas:

Num *erlenmeyer* de 250 ml, pesar, com uma aproximação de 0,001 g, cerca de 2 g da pré-mistura e adicionar 100 ml de metanol acidificado (3.8), homogeneizando por agitação. Colocar o *erlenmeyer* no banho de ultra-sons (4.1) a cerca de

40°C, durante vinte minutos, retirar o *erlenmeyer* do banho e arrefecer à temperatura ambiente. Diluir até ao traço com metanol acidificado (3.8) e agitar. Deixar repousar durante cerca de uma hora, até à deposição das matérias em suspensão, e filtrar uma alíquota com um filtro de membrana de 0,45 µm (4.2). Diluir um volume adequado do filtrado com metanol acidificado (3.8), de modo a obter uma solução de ensaio com cerca de 4 µg/ml de lasalocido de sódio. Efectuar em seguida a determinação por *HPLC* (5.3).

5.3 — Determinação por *HPLC*:

5.3.1 — Parâmetros. — As condições a seguir especificadas são-no a título indicativo. Poderão escolher-se outras condições, desde que produzam resultados equivalentes.

Coluna para cromatografia (4.1.1): 125 mm × 4 mm e enchimento de fase reversa C18 com granulometria de 5 µm, ou equivalente;

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

Fluxo: 1,2 ml/minuto;

Comprimentos de onda de detecção:

Excitação — 310 nm;

Emissão — 419 nm;

Volume injectado — 20 µl.

Para verificar a estabilidade do sistema cromatográfico, injectar várias vezes a solução de calibração (3.10.3) com 4,0 µg/ml até se obterem alturas (ou áreas) de pico e tempos de retenção constantes.

5.3.2 — Curva de calibração:

Injectar várias vezes cada solução de calibração (3.10.3) e determinar a altura ou área média dos picos para cada concentração. Traçar uma curva de calibração, representando em ordenadas as alturas ou áreas médias dos picos das soluções de calibração e em abcissas as concentrações correspondentes em microgramas por mililitro.

5.3.3 — Solução da amostra:

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

6 — Cálculo dos resultados:

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

6.1 — Alimentos para animais:

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

$$w = \frac{\beta \cdot V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

em que:

β = concentração de lasalocido de sódio, em microgramas por mililitro, do extracto da amostra (5.2.1);

V_1 = volume, em mililitros, do extracto, de acordo com 5.2.1 (isto é, 100 ml);

m = massa, em gramas, da toma analisada.

6.2 — Pré-misturas:

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

$$w = \frac{\beta \cdot V_2 \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

em que:

β = concentração de lasalocido de sódio, em microgramas por mililitro, do extracto da amostra (5.2.2);

V_2 = volume, em mililitros, do extracto, de acordo com 5.2.2 (isto é, 250 ml);

f = factor de diluição, de acordo com 5.2.2;

m = massa, em gramas, da toma analisada.

7 — Validação dos resultados:

7.1 — Identidade:

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

7.1.1 — Co-cromatografia:

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

Daí deve resultar unicamente um aumento da altura do pico de lasalocido de sódio, contabi-

lizadas a quantidade adicionada e a diluição do extracto.

A largura do pico a meia altura não poderá diferir mais de 10% da largura inicial do pico do lasalocido de sódio do extracto da amostra sem adição.

7.2 — Repetibilidade:

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

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

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

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

7.3 — Recuperação:

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

8 — Resultados de um teste interlaboratorial:

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

⁽¹⁾ *Analyst* 1995, 120, 2175-2180.

	Amostra 1 — Pré-mistura para frangos	Amostra 2 — Pré-mistura para perus	Amostra 3 — Granulado para perus	Amostra 4 — Farelos para frangos	Amostra 5 — Alimento para perus	Amostra 6 — Alimento para aves de capoeira A	Amostra 7 — Alimento para aves de capoeira B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Média (mg/kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
S_r (mg/kg)	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r (%)	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
SR_R (mg/kg)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R (%)	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Teor nominal (mg/kg)	5 000 *	16 000 *	80 *	105 *	120 *	50 +	35 +

* Teor declarado pelo fabricante.

+ Alimento preparado no laboratório.

Em que:

L : número de laboratórios;

n : número de valores singelos;

S_r : desvio-padrão da repetibilidade;

SR_R : desvio-padrão da reprodutibilidade;

CV_r : coeficiente de variação da repetibilidade, %;

CV_R : coeficiente de variação da reprodutibilidade.