DIRECTIVA 1999/76/CE DA COMISSÃO

de 23 de Julho de 1999

que estabelece métodos de análise comunitários para a determinação da lasalocido de sódio em alimentos para animais

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 70/373/CEE do Conselho, de 20 de Julho de 1970, relativa à introdução de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais [1], com a última redacção que lhe foi dada pelo Acto de Adesão da Áustria, da Finlândia e da Suécia, e, nomeadamente, o seu artigo 2.º,

(1) Considerando que a Directiva 70/373/CEE prevê que os controlos oficiais dos alimentos para animais, destinados a verificar a observância das condições estabelecidas em conformidade com as disposições legislativas, regulamentares ou administrativas no que respeita à qualidade e composição dos alimentos para animais, sejam efectuados de acordo com métodos comunitários de recolha de amostras de análise;

(2) Considerando que a Directiva 70/524/CEE do Conselho, de 23 de Novembro de 1970, relativa aos aditivos na alimentação para animais [2], com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 866/1999 da Comissão [3], estabelece a indicação obrigatória na rotulagem do teor de lasalocido de sódio, sempre que a referida substância seja incorporada em pré-misturas ou alimentos para animais;

(3) Considerando que devem estabelecer-se métodos de análise comunitários para a determinação das referidas substâncias;

(4) Considerando que as medidas previstas na presente directiva são conformes ao parecer do Comité Permanente dos Alimentos para Animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1.º

Os Estados-Membros zelarão por que as análises efectuadas com vista ao controlo oficial do teor de lasalocido de sódio nos alimentos para animais e pré-misturas o sejam por aplicação dos métodos descritos no anexo da presente directiva.

Artigo 2.º

Os Estados-Membros porão em vigor, o mais tardar em 31 de Janeiro de 2000, as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Os Estados-Membros aplicarão essas disposições a partir de 1 de Fevereiro de 2000.

Quando os Estados-Membros adoptarem tais disposições, estas devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência serão adoptadas pelos Estados-Membros.

Artigo 3.º

A presente directiva entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

Artigo 4.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 23 de Julho de 1999.

Pela Comissão

Franz FISCHLER

Membro da Comissão

[1] JO L 170 de 3.8.1970, p. 2.
[2] JO L 270 de 14.12.1970, p. 1.
[3] JO L 108 de 27.4.1999, p. 20.

ANEXO

DETERMINAÇÃO DA LASALOCIDO DE SÓDIO

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

1. **Objectivo e domínio de aplicação**

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

2. **Princípio**

A lasalocido de sódio é extraída da amostra com metanol acidificado e determinada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de fase reversa, com um detector espectrofluorimétrico.

3. **Reagentes**

3.1. Di-hidrogenofosfato potássico (KH_2P0_4)

3.2. Ácido ortofosfórico, w = 85 %

3.3. Solução de ácido ortofosfórico, σ = 20 %

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, p_{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 10,0 ml de 6-metil-2-heptilamina (3.4). Ajustar o pH para 4,0 com solução de ácido ortofosfórico (3.3) e diluir para 1 000 ml com água (3.11).

3.8. Metanol acidificado

Transferir 5,0 ml de ácido clorídrico (3.6) para um balão graduado de 1 000 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 fosfatos (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 um ácido monocarboxílico poli-eterificado produzido por *Streptomyces lasaliensis*), E763.

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

Num 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 10,0 ml da solução-padrão 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 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 e 10,0 ml da solução-padrão intermédia (3.10.2) para uma série de balões aferidos de 50 ml. Completar o volume com metanol acidificado (3.8) até ao traço e homogeneizar. As soluções obtidas contêm 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 e 10,0 µg de lasalocido de sódio por ml, respectivamente, 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 injecção com capacidade de injecção 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. Espectrofluorímetro 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 detectada 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 10,0 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 10 minutos, misturando de novo várias vezes antes de proceder à extracção (5.2).

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

5.2. Extracção

5.2.1. Alimentos para animais

Num *erlenmeyer* de 250 ml, pesar, com uma aproximação de 0,01 g, 5 a 10 g de amostra e adicionar, com uma pipeta, 100,0 ml de metanol acidificado (3.8). Tapar o *erlenmeyer*, homogeneizar e colocar no banho de ultra-sons (4.1) a cerca de 40 °C, durante 20 minutos. Retirar o *erlenmeyer* do banho e arrefecer à temperatura ambiente. Deixar repousar durante cerca de 1 h, 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 100,0 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 20 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 1 h, 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 líquida (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 mm
— Emissão	419 mm
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 µg/ml.

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 injecção da solução da amostra (5.3.3), determinar a concentração de lasalocido de sódio em µg/ml com base na curva de calibração.

6.1. Alimentos para animais

O teor de lasalocido de sódio, w, da amostra, expresso em mg/kg, é dado pela seguinte fórmula:

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

em que:

ß = concentração de lasalocido de sódio, em µg/ml, do extracto da amostra (5.2.1)

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

m = massa, em g, da toma analisada.

6.2. Pré-misturas

O teor de lasalocido de sódio, w, da amostra, expresso em mg/kg, é dado pela seguinte fórmula:

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

em que:

ß = concentração de lasalocido de sódio, em µg/ml, do extracto da amostra (5.2.2)

V_2 = volume, em ml, 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 g, da toma analisada.

7. **Validação dos resultados**

7.1. Identidade

Os métodos baseados na espectrofluorimetria 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 da lasalocido de sódio, contabilizadas a quantidade adicionada e a diluição do extracto. A largura do pico a meia altura não poderá diferir mais de 10 % da largura inicial do pico da 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 compreendidos entre 30 mg/kg e 100 mg/kg: 15 % do maior dos valores,

— para teores de lasalocido de sódio compreendidos 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
s_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+

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, %.
* teor declarado pelo fabricante.
+ alimento preparado no laboratório.