Este documento constitui um instrumento de documentação e não vincula as instituições

►**B**

SÉTIMA DIRECTIVA DA COMISSÃO

de 1 de Março de 1976

que fica os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais

(76/372/CEE)

(JO L 102 de 15.4.1976, p. 8)

Alterada por:

		Jornal Oficial		
		n.º	página	data
►**M1**	Directiva 81/680/CEE da Comissão de 30 de Julho de 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Directiva 92/95/CEE da Comissão de 9 de Novembro de 1992	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Directiva 94/14/CE da Comissão de 29 de Março de 1994	L 94	30	13.4.1994

▼B

SÉTIMA DIRECTIVA DA COMISSÃO

de 1 de Março de 1976

que fica os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais

(76/372/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva do Conselho de 20 de Julho de 1970, relativa à introdução dos modos de recolha 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 [2] e, nomeadamente, o seu artigo 2.º,

Considerando que a referida directiva prevê que os controlos oficiais dos alimentos para animais destinados a verificar o respeito pelas condições exigidas por disposições legislativas, regulamentares ou administrativas relativas à qualidade e composição dos alimentos para animais sejam efectuadas mediante modos de recolha de amostras e métodos de análise comunitários;

Considerando que as Directivas 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/ /CEE, 73/46/CEE, 74/203/CEE e 75/84/CEE da Comissão, respectivamente de 15 de Junho de 1971 [3], 18 de Novembro de 1971 [4], 27 de Abril de 1972 [5], 5 de Dezembro de 1972 [6], 25 de Março de 1974 [7], e 20 de Dezembro de 1974 [8], ficaram já um certo número de métodos de análise comunitários; que, tendo em conta o estado de adiantamento dos trabalhos desde então efectuados importa adoptar uma sétima série de métodos;

Considerando que as medidas previstas na presente diretiva estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Alimentos para Animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1.º

Os Estados-membros deverão estipular que as análises destinadas ao controlo oficial dos alimentos para animais sejam, no que diz respeito ao teor de aflatoxina B_1, efectuadas em conformidade com os métodos descritos no Anexo à presente directiva.

▼M1

▼B

Artigo 2.º

Os Estados-membros parão em vigor antes de 1 de Outubro de 1976 as disposições da presente directiva. Deste facto informarão imediatamente a Comissão.

Artigo 3.º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

---

[1] JO n.º L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.
[2] JO n.º L 73 de 27. 3. 1972, p. 14.
[3] JO n.º L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.
[4] JO n.º L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.
[5] JO n.º L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.
[6] JO n.º L 83 de 30. 3. 1973, p. 21.
[7] JO n.º L 108 de 22. 4. 1974, p. 7.
[8] JO n.º L 32 de 5. 2. 1975, p. 26.

▼B

ANEXO

ELEMENTO DA AFLATOXINA B_1

A. MÉTODO POR CROMATOGRAFIA MONODIMENSIONAL EM CAMADA FINA

▼M2

1. **Objectivo e campo de aplicação**

O método permite determinar o teor de aflatoxina B_1 das matérias--primas e dos alimentos simples, no entanto, não se aplica a polpa de citrinos. O limite inferior de determinação é de 0,01 mg/kg (10 ppb).

Na presença de substâncias de interferência que dificultem as determinações, é necessário recomeçar a análise em conformidade com o método descrito na parte B, «Determinação de aflatoxina B_1, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)».

▼B

2. **Princípio**

Submete-se a amostra à extracção por clorofórmio. Filtra-se o extracto e recolhe-se uma parte alíquota que em seguida se purifica por cromatografia numa coluna de gel de sílica. Evapora-se o líquido assim eluído e recolhe-se o seu resíduo com um volume determinado de clorofórmio ou mistura de benzeno e acetonitrilo. Submete-se uma parte alíquota desta solução a cromatografia em camada fina, e determina-se por irradiação UV a quantidade de aflatocina B_1 do cromatograma, visualmente ou por fluorometria densitométrica, comparando com quantidades conhecidas de aflatocina B_1-padrão. Deverá confirmar-se a detecção de aflatoxina B_1 extraída do alimento pelos processos adiante indicados.

3. **Reagentes**

NB: Na ausência de indicações especiais quanto à qualidade dos reagentes, deverão utilizar-se reagentes da qualidade «para análise».

3.1. Acetona.

3.2. Clorofórmio, estabilizado com 0,5 a 1,0 % de etanol a 96 % (v/v).

3.3. n-Hexano.

3.4. Metanol.

3.5. Éter dietílico anido, isento de peróxidos

3.6. Mistura de benzeno e de acetonitrilo: 98/2 (v/v).

3.7. Mistura de clorofórmio (3.2.) e Metanol (3.4.): 97/3 (v/v).

3.8. Gel de sílice, para cromatografia em coluna, com granulometria de 0,05 a 0,20 mm.

3.9. Algodão hidrófilo, préviamente desengordurado com clorofórmio ou lã de vidro.

3.10. Sulfato de sódio anidro, granulado.

3.11. Gás inerte, por exemplo: azoto.

3.12. Ácido clorídrico 1 N.

3.13. Ácido sulfúrico a 50 % (v/v).

3.14. Terra de infusórios (Hiflosupercel) lavada con ácido.

3.15. Gel de sílica G-HR ou equivalente, por cromatografia em camada fina.

3.16. Solução-padrão, de clorofórmio (3.2.) e cerca de 0,1 µg de aflatoxina B_1 por milímetro da mistura de benzeno e acetonitrilo (3.6.), preparada e verificada como se indica no ponto 7, contendo a mesma quantidade de aflatoxina B 1.

3.17. Solução-padrão qualitativa, com cerca de 0,1 µg de aflatoxina B_1, e B_2 por ml, em el clorofórmo (3.2.) ou mistura de benzeno e aceto-

▼B

nitrilo (3.6.). Estas concentrações são dadas a título indicativo, devendo ser corrigidas de modo que se obtenha a mesma intensidade de fluorescência com ambas as aflatoxinas.

3.18. Diluentes para revelação:

3.18.1. Clorofórmo (3.2.)/acetona (3.1.): 9/1 (v/v), tina não saturada;

3.18.2. Éter dietílico (3.5.)/metanol (3.4.)/água: 96/3/1 (v/v/v), tina não saturada;

3.18.3. Éter dietílico (3.5.)/metanol (3.4.)/água: 94/4,5/1,5 (v/v/v), tina saturada;

3.18.4. Clorofórmio (3.2.)/metanol (3.4.): 94/6 (v/v), tina saturada;

3.18.5 Clorofórmio (3.2.)/metanol (3.4.): 97/3 (v/v), tina saturada.

4. **Material**

4.1. Triturador — misturador

4.2. Aparalho para agitar ou agitador magnético.

4.3. Filtros franzidos Schleicher e Schül n.º 588, ou equivalente com 24 cm de diâmetro.

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

4.5. Aparelho para evaporação no vácuo, por rotação com balão de 500 ml de base circular.

4.6. Frascos cónicos de 500 ml, com tampa esmerilada.

4.7. Instrumentos para cromatografia em camada fina.

4.8. Placas de vidro para cromatografia em camada fina, com 200 × 200 mm, preparadas da seguinte maneira (as quantidades indicadas são suficientes para cobrir cinco placas): introduzir 30 g de gel de sílica G-HR (3.15.) num frasco cónico, juntar 60 ml de água, tapar e agitar durante um minuto. Espalhar a suspensão sobre as placas de forma a obter uma camada uniforme de 0,25 mm de espessura. deixar secar ao ar e conservar em seguida num secador com gel de sílica. No momento da utilização, activar as placas mantendo-as durante uma hora em estufa a 110 º C.

Só deverão utilizar-se placas já preparadas na medida em que com elas se obtenham resultados semelhantes aos das placas preparadas como acima se indica.

4.9. Lámpada UV de ondas longas (360 nm), com uma intensidade de irradiação que permita identificar com nitidez, a uma distância de 10 cm da lâmpada, uma mancha de 1,0 ng de aflatoxina B_1 sobre a placa de cromatografia em camada fina.

4.10. Tubos de 10 ml, graduados, e com tampa de polietileno con tapones de polietileno.

4.11. Espectrofotómetro UV

4.12. Fluordensitómetro (eventualmente).

5. **Método**

5.1. *Preparação da amostra (ver «observações», parte C, ponto 1)*

Triturar a amostra de modo a passar integralmente através de uma peneira com malha de 1 mm (de harmonia com a recomendação ISO R 565).

5.2. *Extracção*

Introduzir 50,0 g da amostra moída e homogeneizada num frasco cónico de 500 ml (4.6.). Juntar 25 g de terra de infusórios (3.14.), 25 ml de água e 250 ml de clorofórmio (3.2.). Tapar o frasco, sacudir ou agitar durante 30 minutos no aparelho (4.2.) e filtrar no filtro franzido (4.3.). Deitar fora os 10 primeiros ml do filtrado e recolher em seguida 50 ml.

5.3. *Purificação en coluna*

Colocar na extremidade inferior de um tubo para cromatografia (4.4.) um tampão de algodão ou lã de vidro (3.9.), encher dois

▼B

terços do tubo com clorofórmio (3.2.) e juntar 5 g de sulfato de sódio (3.10.).

Verificar se a superfície superior da camada de sulfato de sódio se aoresenta plana e, seguidamente, juntar 10 g de gel de sílica, por pequenas fracções (3.8.) Mexer com cuidado, após cada adição fracções (3.8.). Mexer com cuidado, após cada adição, para eliminar as bolhas de ar.

Deixar depositar, durante 15 minutos, e em seguida juntar com precaução, 15 g de sulfato de sódio (3.10.). Deixar descer o líquido até quase à superfície superior da camada de sulfato de sódio.

Misturar os 50 ml de extracto recolhido em (5.2.) com 100 ml de n--hexano (3.3.) e passar quantitativamente a mistura para a coluna. Deixar descer o líquido até à superfície superior da camada de sulfato de sódio. Retirar o líquido e juntar em seguida 100 ml de éter dietílico (3.5.) deixando de novo descer o líquido até à superfície superior da camada de sulfato de sódio. Durante estas operações controlar o débito de líquido para que seja de 8 a 12 ml por minuto e não deixar que a coluna fique em seco. Deitar fora os líquidos vasados. Seguidamente, eluir com 150 ml da mistura de clorofórmio e metanol (3.7.) e recolher a totalidade do líquido eluído.

Proceder à evaporação do líquido eluído, practicamente a seco, sob corrente de gaz inerte (3.11.) e a uma temperatura que não ultrapasse os 50 ºC, por meio do aparelho de evaporação por rotação no vácuo (4.5.). Com clorofórmio (3.2.) ou mistura de benzeno e acetonitrilo (3.6.), passar quantitativamente o resíduo para um tubo de 10 ml (4.10.). Concentrar a solução sob corrente de gás inerte (3.11.) e completar em seguida o volume, com clorofórmio (3.2.) ou mistura de benzeno e acetonitrilo (3.6.), até obter 2,0 ml.

5.4. *Cromatografia em camada fina*

Colocar pontualmente sobre a placa para cromatografia em camada fina (4.8.), a 2 cm de bordo inferior e com intervalos de 2 cm, os volumes abaixo indicados de solução-padrão e de extracto:

— 10, 15, 20, 30 e 40 µl de solução-padrão de aflatoxina B_1 (3.16.);

— 10 µl do extracto obtido em 5.3. e, sobrepostos nos mesmos pontos, 20 µl de solução-padrão (3.16.);

— 10 y 20 µl do extracto obtido em 5.3.

Elaborar o cromatograma ao abrigo da luz, com um dos diluentes indicados para o efeito (3.18.). A escolha do diluente, que deverá ter sido feita previamente, faz-se colocando sobre a placa 12 µl da solução-padrão qualitativa (3.17.) e verificando em seguida se as aflatoxinas B_1 e B_2 ficam completamente separadas durante a operação.

Deixar evaporar os diluentes ao abrigo da luz e fazer em seguida a irradiação com a lâmpada UV, colocando a placa a 10 cm da distância da mesma (4.9.). A fluorescência das manchas da aflatoxina B_1 é de cor azul.

5.5. *Determinaçoes quantitativas*

Proceder às determinações, visualmente ou por fluorometriadensitométrica, como adiante se indica:

5.5.1. Medição visual

Determinar a quantidade de aflatoxina B, existente no extracto comparando a intensidade de fluorescência das respectivas manchas com a das manchas da solução-padrão, se necessário por interpolação-padrão deverá ser superior à dos 10 µl de extracto e dela deverá apenas resultar uma mancha. Se a intensidade da fluorescência dos 10 µl de extracto for superior à dos 40 µl da solução padrão, diluir o extracto 10 ou 100 vezes antes de submeter a nova cromatografia sobre camada fina, em clorofórmio (3.2.) ou na mistura de benzeno e acetonitrilo (3.6.).

5.5.2. Medição por fluorometriadensitómétrica

Medir a intensidade da fluorescência das manchas de aflatoxina B_1 com o fluorodensitómetro (4.12.), utilizando um comprimento de onda de excitação de 365 nm e um comprimento de onda de emissão de 443 nm. Determinar a quantidade de aflatoxina B_1 dos

▼B

depósitos contidos no extracto comparando as intensidades de fluorescência das manchas do extracto com as da solução-padrão.

5.6. *Confirmação da detecção de aflatoxina B_1*

Confirmar a detecção de aflatoxina B_1 existente no extracto pelos seguintes processos:

5.6.1. Tratamento por ácido sulfúrico

Pulverizar o cromatograma obtido em (5.4.) com ácido sulfúrico (3.13.). Com a irradiação UV, a fluorescência das manchas de aflatoxina B_1 deverá passar do azul ao amarelo.

5.6.2. Cromatografia bidimensional levando à formação de aflatoxina B_1 — hemiacetal (aflatoxina B_{2a})

NB: As operações adiante descritas deverão ser efectuadas segundo e esquema apresentado na figura 3.

5.6.2.1. Aplicação das soluãões

Traçar sobre uma placa de cromatografia (4.8.) duas rectas, paralelas respectivamente a dois lados contíguos da placa cada uma 6 cm de distância do lado a que é paralela. Estas rectas destinam-se a demarcar p movimento dos bordos dos diluentes. Com pipetas capilares ou microseringas colocar sobre uma placa as sequintes soluções:

— *no ponto A:* um volume de extracto purificado da amostra obtida em (5.3.) contendo aproximadamente 2,5 nanogramas de aflatoxina B_1;

— *nos pontos B e C:* 25 µl de solução-padrão (3.16.).

5.6.2.2. Revelação

Elaborar o cromatograma segundo a direcção I com diluente para revelação (3.18.1.) [uma camada de 1 cm em tina não saturada] ao abrigo da luz, até que o bordo do diluente atinja a linha de demarcação.

Retirar a placa da tina, deixando-a secar durante 5 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Pulverizá-la em seguida com ácido clorídrico (3.12.), mas apenas ao longo de uma faixa vem indicada a tracejado na figura 3, até ao seu escurecimento, devendo o resto da placa ter sido protegido com uma placa de vidro. Deixar reagir durante dez minutos na obscuridade e secar por corrente de ar à temperatura ambiente.

Elaborar em seguida o cromatograma segundo a direcção II com diluente de revelação (3.18.1.) [camada de 1 cm em tina não saturada], ao abrigo da luz, até que o bordo do diluente atinja a linha de demarcação. Retirar a placa da tina e deixar secar à temperatura ambiente.

5.6.2.3. Interpretação do cromatograma

Examinar o cromatograma à luz (UV (4.9.) e observar a existência ou não do seguinte:

a) Aparecimento de uma mancha fluorescente azul correspondente à aflatoxina B_1 proveniente da solução-padrão utilizada em C (movimento na direcção I).

b) Aparecimento de uma mancha fluorescente azul correspondente à aflatocina B_1 (que não reagiu ao ácido clorídrico) e de outra mancha fluorescente azul, mais intensa correspondente à aflatoxina B_1-hemiacetal proveniente da solução-padrão utilizada em B (movimento na direcção II).

c) Aparecimento de manchas semelhantes às indicadas na alínea b), provenientes do extracto da amostra utilizado em A. A posição dessas manchas define-se pela distância percorrida pela aflatoxina B_1, a partir do ponto A, na direcção I (igual à percorrida pela solução-padrão utilizada em C) seguida das distâncias percorridas na direcção II pela aflatocina B_1-hemiacetal (distâncias iguais às percorridas pela solução padrão utilizada em B). As intensidades de fluorescência das manchas de hemiacetal proveniente do extracto e da solução-padrão utilizada em B deverão coincidir.

▼B

6. **Cálculo dos resultados**

6.1. *A partir da medição visual*

Calcula-se o teor de aflatoxina B_1, em microgramas por quilograma de amostra (ppb), mediante a seguinte fórmula:

$$\frac{S \cdot Y \cdot V}{W \cdot X}$$

em que:

Y e X correspondem respectivamente aos volumes em microlitros de solução-padrão de aflatoxina B_1 (3.16.) e de extracto com fluorescências de intensidade semelhante;

S = concentração de aflatocina B_1, em microprogramas por ml de solução-padrão (3.16.);

V = volume final do extracto em microlitros, tendo em conta as eventuais dilui-ões;

W = peso, em gramas, da quantidade da amostra de ensaio correspondente ao colume de extracto submetido a purificação em coluna.

6.2. *A partir da fluorodensitometria*

Calcula-se o teor de aflatoxina B_1, em microgramas por quilograma de amostra (ppb) mediante a seguinte fórmula:

$$\frac{S \cdot V}{W \cdot Y}$$

em que:

Y = volume em microlitoros do extracto colocado na placa (10 ou 20 µl);

S = quantidade de aflatoxina B_1, em nanogramas (contida no extracto colocado sobre a placa proporcional a Y), obtida na mediçã0.

V = volume final do extracto em microlitros, cujo valor deverá ter em conta as diluições que tenha sido necessário fazer;

W = peso em gramas, da amostra de ensaio correspondente ao colume de extracto submetido a purificação em coluna.

7. **Preparação e verificação da solução-padrão (3.16.)**

7.1. *Determinação da concentração de aflatocina B_1*

Preparar uma solução de aflatoxina B_1 — padrão em clorofórmio (3.2.) ou mistura de benzeno e acetonitrilo (3.6.) a uma concentração de 8 a 10 µg por mililitro e, com o espectrofotómetro (4.11.), determinar o espectro de absorção entre 330 e 370 nm.

Medir a densidade óptica (a) 363 nm, caso tenha sido utilizada a solução clorofórmica ou a 348 nm cas tenha sido utilizada a mistura de benzeno e acetonitrilo.

Calcular a concentração de aflatoxina B_1, em microgramas por mililitro de solução, a partir das fórmulas seguintes:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20\,600}$ (para a solução clorofórmica);

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19\,800}$ (para a solução com mistura de benzeno e acetonitrilo).

Efectuar, ao abrigo da luz, as diluições necessárias à obtenção de uma solução-padrão de trabalho cuja concentração de aflatoxina B_1, seja aprocimadamente de 0,1 µg por mililitro. Conservada no frigorífico a 4º C, esta solução mantém-se estável durante duas semanas.

▼B

7.2. *Verificação da pureza cromatográfica*

Colocar sobre uma placa (4.8.) 5 µl de solução-padrão com 8-10 µg de aflatoxina B_1 por mililitro (ver 7.1.). Elaborar o cromatograma como se indica em (5.4.). A luz UV, a fluorescência apenas deverá permitir a percepção de uma única mancha, não devendo observar-se qualquer fluorescência na zona em que se havia feito a primeira deposição.

8. **Possibilidade de repetição**

A diferença entre os resultados e duas determinações paralelas, efectuadas com a mesma amostra pelo mesmo analista não deverá ultrapassar:

— 25 % em relação aos máximos valores obtidos com teores entre 10 e 20 µg/kg de aflatoxina B_1,

— 5 µg, em valores absolutos, para teores entre 20 e 50 µg/kg,

— 10 % em relação aos mácimos valores obtidos com teores superiores a 50 µg/kg.

9. **Reprodutibilidade**

Ver «observações», parte C, ponto 2.

▼M2

B. DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA B_1 POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC)

1. **Objectivo e campo de aplicação**

O método permite determinar o teor de aflatoxina B_1 em alimentos para animais, incluindo aqueles 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 um cartucho de Florisil seguido de um outro de C_{18}. Para a separação final e doseamento recorre-se a uma coluna de HPLC de fase inversa, derivatização *post coluna* com uma solução aquosa de iodo e detecção por fluorescência.

Nota 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.

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: preparar um dia antes de utilização ou proceder à remoção do ar por meio de ultra-sons.

3.5.1. Mistura acetona (ponto 3.3) e água (98 + 2) (v + v).

3.5.2. Mistura água e metanol (ponto 3.2) (80 + 20) (v + v).

3.5.3. Mistura água e acetona (ponto 3.3) (85 + 15) (v + v).

3.6. Fase móvel para HPLC:

Mistura água, metanol (ponto 3.2) e acetonitrilo (ponto 3.4) (130 + 70 + 40) (v + v + v).

Nota A composição dos solventes a utilizar na fase móvel poderá requerer ajustamentos, de acordo com o tipo de coluna utilizada em HPLC.

▼M2

3.7. Solução aquosa saturada de iodo: adicionar 2 g de iodo a 400 ml de água. Dissolver sob agitação, durante pelo menos 90 minutos e filtrar com o auxílio de um filtro tipo Millipore (ponto 4.15). Proteger a solução da luz, de modo a evitar processos de fotodegradação.

3.8. Celite 545 lavada com ácido, ou equivalente.

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

3.10. Cartucho de C_{18} (Waters SEP-PAK), ou equivalente.

3.11. Gás inerte, por exemplo, azoto.

3.12. Solução-padrão de aflotoxina B_1, em clorofórmio, concentração 10 μg/ml. Verificar a concentração da solução do seguinte modo: traçar o espectro de absorção da solução entre 330 e 370 nm, por meio de um espectrofotómetro (ponto 4.23). Medir a absorvência (A) a um máximo de 363 nm. Calcular a concentração de aflatoxina B_1, expressa em microgramas por mililitro da solução, através da fórmula:

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

3.12.1. Solução-mãe da solução-padrão de aflotoxina B_1, em clorofórmio.

Transferir de um modo quantitativo, 2,5 ml da solução-padrão (ponto 3.12) para um balão volumétrico de 50 ml, perfazendo com clorofórmio (ponto 3.1), até ao traço de referência. Homogeneizar. Conservar o balão hermeticamente fechado, envolvido em folha de alumínio, em local fresco (4 ºC) e ao abrigo da luz.

3.13. Soluções de calibração de aflatoxina B_1 para HPLC.

Nota Na preparação das soluções utilizar material de vidro lavado com ácido (ver ponto 4, Equipamento).

3.13.1. Solução de calibração de 4 ng/ml.

Deixar estabilizar, à temperatura ambiente, o balão que contém a solução-mãe (ponto 3.12.1), envolvido na folha de alumínio, durante algumas horas. Transferir 400 μl da solução-mãe (200 ng de aflatoxina B_1) para um balão volumétrico de 50 ml, evaporando à secura sob uma corrente de gás inerte (ponto 3.11). Dissolver o resíduo obtido com cerca de 20 ml da mistura água/acetona (ponto 3.5.3), completando até ao traço de referência com a mesma solução. Homogeneizar.

3.13.2. Solução de calibração de 3 ng/ml.

Transferir quantitativamente 7,5 ml da solução de calibração (ponto 3.13.1) para um balão volumétrico de 10 ml e perfazer até ao traço de referência com a mistura água/acetona (ponto 3.5.3). Homogeneizar.

3.13.3. Solução de calibração, de 2 ng/ml.

Transferir quantitativamente 25 ml da solução da calibração (ponto 3.13.1) para um balão volumétrico de 50 ml e perfazer até ao traço de referência com a mistura água/acetona (ponto 3.5.3). Homogeneizar.

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

3.13.4. Solução de calibração de 1 ng/ml.

Transferir quantitativamente 2,5 ml da solução de calibração (ponto 3.13.1) para um balão volumétrico de 10 ml e perfazer até ao traço de referência com a mistura água/acetona (ponto 3.5.3). Homogeneizar.

3.14. Balão contendo uma mistura de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 de concentrações aproximadas 1, 0,5, 1 e 0,5 μg/ml, respectivamente, em 1 ml de clorofórmio.

3.14.1. Solução para ensaio cromotográfico.

Transferir o conteúdo do balão (ponto 3.14) para um tubo de ensaio de vidro munido de rolha, ou para um frasco pequeno com tampa de rosca. Transferir 40 μl desta solução para um tubo de vidro de

▼M2

10 ml, munido de rolha (lavado com ácido) (ponto 4.22). Evaporar o clorofórmio sob corrente de gás inerte (ponto 3.11) e dissolver de novo, em 10 ml de mistura de água/acetona (ponto 3.5.3). Poderá haver necessidade de guardar em local fresco e escuro, 6 a 8 horas, até dissolução completa.

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

3.15.1. Solução aquosa saturada da NaCI.

3.15.2. Sulfato de sódio anidro, granulado.

4. **Aparelhos e utensílios**

Atenção: o uso de material de vidro que não tenha sido lavado previamente com ácido, para as soluções aquosas de aflatoxinas, pode ocasionar perdas. Deverão tomar-se cuidados especiais com o uso de material de vidro novo e material de vidro não reutilizável tal como frascos de auto-amostragem e pipetas Pasteur. Assim, todo o material de vidro que tenha contacto com soluções aquosas de aflatoxinas deve ser 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 tratado torna-se necessário para o balão de fundo redondo (ponto 4.4), balões volumétricos, provetas, frascos ou tubos utilizados para as soluções de calibração e para os extractos finais (particularmente os fracos de auto-amostragem), bem como as pipetas Pasteur eventualmente usadas para a transferência das soluções de calibração ou dos extractos.

4.1. Triturador/misturador.

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

4.3. Agitador mecânico.

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

4.5. Aparelho para cromatografia líquida de alta resolução, equipado com injector apropriado para injecções de 250 µl. Ver instruções do fabricante para enchimento total ou parcial do *loop*.

4.6. Coluna analítica para HPLC, com enchimento de C_{18} de 3 µm — 5 µm de partícula.

4.7. Bomba pneumática para o débito do reagente do iodo, *post coluna*.

4.8. Unta em T de volume morto nulo, em aço inoxidável (1/16″ × 0,75 mm).

4.9. Reactor em espiral de teflon ou aço inoxidável. As dimensões compreendidas entre 3 000 × 0,5 mm e 5 000 × 0,5 mm têm-se revelado apropriadas para combinação com colunas de HPLC de partículas de 5 µm ou 3 µm.

4.10. Banho equipado com controlo termostático, ajustado para 60 ºC, susceptível de regular a temperatura com uma precisão de ± 0,1 ºC.

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 ser possível a detecção de quantidades de aflatoxina B_1 da ordem de 0,05 ng.

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

4.12. Registador contínuo.

4.13. Integrador electrónico (opcional).

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

4.15. Filtro de membrana de porosidade 0,45 µm. Millipore HAWP 04700 ou equivalente.

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

▼M2

4.17. Coluna de vidro (diâmetro interno aproximado 1 cm, comprimento aproximado 30 cm), equipada com uma ponta Luer.

4.18. Torneira Luer de *nylon* resistente ao clorofórmio (Bio-rad 7328017, Analytichem A1 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 injecções de 250 µl (ver ponto 4.5).

4.21. Microsseringa de 100 µl, para preparação das soluções de calibração (verificar, por pesagem, que 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 do UV.

4.24. Equipamento para o ensaio de confirmação (ponto 6).

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

4.24.2. Unidade de aquecimento 40-50 ºC.

5. **Técnica**

5.1. *Preparação da amostra para análise*

Triturar a amostra de modo a que esta passe pelo crivo (ponto 4.2).

5.2. *Toma para análise*

Pesar para um Erlenmeyer (ponto 4.16) 50 g da amostra previamente preparada.

5.3. *Extracção*

Adicionar 25 g de Celite (ponto 3.8), 250 ml de clorofórmio (ponto 3.1) e 25 ml de água à amostra (ponto 5.2). Rolhar o Erlenmeyer e agitar durante 30 minutos com o auxílio de um agitador mecânico (ponto 4.3). Filtrar através de filtro plissado (ponto 4.14), recolhendo 50 ml de filtrado. Se necessário tomar uma alíquota do filtrado e diluir para 50 ml em clorofórmio, de modo a que a concentração de aflatoxina B_1 não seja superior a 4 ng/ml.

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

Cuidados a ter:

— proteger 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 (evitar luz solar directa);
2. Cortinas ou persianas em associação com luz artificial (os tubos de fluorescência são aceitáveis),

— proteger o mais possível da luz as soluções que contêm aflatoxinas (armazenar em local escuro e envolver em folha de alumínio).

5.4.1. Purificação por cartucho de Florisil.

5.4.1.1. Preparação do sistema coluna-cartucho.

Adaptar uma torneira (ponto 4.18) à extremidade mais curta do cartucho de Florisil (ponto 3.9) (ver figura 1). Lavar o cartucho: utilizando uma seringa de 10 ml (ponto 4.19), efectuar uma toma de 10 ml de clorofórmio (ponto 3.1) e proceder à remoção do ar, mediante a injecção pela torneira de 8 ml de clorofórmio, fazendo-o passar rapidamente através do cartucho. Ligar a extremidade mais longa do cartucho a uma coluna de vidro (ponto 4.17) e fazer passar os restantes 2 ml de clorofórmio para a coluna, através do cartucho. Fechar a torneira e remover a seringa.

5.4.1.2. Purificação.

Introduzir o filtrado recolhido no ponto 5.3 no conjunto coluna-cartucho de Florisil e fazer escoar por acção da gravidade. Lavar com 5 ml de clorofórmio (ponto 3.1), seguidos de 20 ml de metanol (ponto 3.2). Desprezar os eluídos. Durante a execução

▼M2

destas operações, assegurar que o sistema coluna-cartucho não seque.

Eluir a aflatoxina B_1 com 40 ml de mistura acetona/água (ponto 3.5.1), recolhendo a totalidade de eluído no balão de fundo redondo do evaporador rotativo (ponto 4.4). Concentrar o eluído no evaporador rotativo, a 40 º — 50 ºC, até terminar a destilação da acetona (*nota:* nesta altura, permanecem no balão cerca de 0,5 ml de líquido. A experiência tem revelado que o prosseguimento da evaporação não prejudica o processo e que a quantidade de acetona presente em 0,5 ml de líquido não é significativa. Resíduos de acetona eventualmente presentes poderiam originar perdas de aflatoxina B_1 no cartucho de C_{18}). Juntar 1 ml de metanol (ponto 3.2), agitar o balão, com vista a dissolver os resíduos de aflatoxina B_1, presentes nas paredes, e adicionar 4 ml de água, agitando. Desligar e eliminar o cartucho de Florisil. Lavar a coluna com água e guardá-la para o processo de purificação com C_{18}.

5.4.2. Purificação por cartucho de C_{18}

5.4.2.1. Preparação do sistema coluna-cartucho

Adaptar uma torneira (ponto 4.18) à extremidade mais curta de um cartucho de C_{18} (ponto 3.10) (ver figura 1). Com o auxílio de uma seringa (ponto 4.19), remover o ar do cartucho, mediante a injecção rápida pela torneira de 10 ml de metanol (ponto 3.2) (as bolhas de ar no interior do invólucro são visíveis sob a forma de pontos luminosos num fundo acinzentado). Proceder à toma de 10 ml de água numa outra seringa e fazer passar 8 ml através do cartucho (evitar a introdução de ar no mesmo, durante a mudança do metanol para a água). Adaptar a extremidade mais longa do cartucho à coluna de vidro (ponto 4.17) e fazer passar os restantes 2 ml para a coluna, através do cartucho. Fechar a torneira e remover a seringa.

5.4.2.2. Purificação

Transferir quantitativamente para a coluna (ponto 4.17) o extracto recolhido no ponto 5.4.1.2 e lavar o balão com duas porções de 5 ml de mistura água/metanol (ponto 3.5.2), deixando escoar por acção da gravidade. Durante a execução destas operações, evitar a secagem do sistema coluna-cartucho (se ocorrer a formação de bolhas de ar no estreitamento próximo do cartucho interromper o fluxo e bater levemente no topo da coluna, de forma a eliminá-las, retomando em seguida as operações). Eluir com 25 ml de mistura água/metanol (ponto 3.5.2), desprezando o eluído. Eluir a aflatoxina B_1 com 50 ml de mistura água/acetona (ponto 3.5.3) e recolher a totalidade do eluído num balão volumétrico de 50 ml. Completar até ao traço de referência com água e homogeneizar; a solução resultante é utilizada no ensaio cromatográfico (ponto 5.5).

Atenção: Em geral, não é necessário filtrar o extracto final antes do processo de HPLC. Se, contudo, se verificar a necessidade de tal operação, dever-se-á evitar o uso de filtros à base de celulose, susceptíveis de ocasionar perdas de aflatoxina B_1. Poder-se-ão utilizar filtros de teflão.

5.5. *Cromatografia líquida de alta resolução.*

(Ver a figura 2 para a montagem do equipamento). Prever o tempo suficiente para permitir o condicionamento e a estabilização dos aparelhos, antes do uso.

Nota 1

Os valores indicados para os fluxos do solvente e do reagente *post coluna* são fornecidos a título meramente indicativo, podendo necessitar de ajustamentos, em função das características da coluna, de HPLC.

Nota 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 3), através da injecção de uma quantidade fixa de padrão de referência de aflatoxina B_1 (ponto 3.13.3), com intervalos regulares (por exemplo, de três em três injecções). Os valores dos picos de aflatoxina B_1 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 reduzida (< 10 %). Por tal facto, devem-se efectuar as injecções ininterruptamente. Se for necessário proceder a uma interrupção, a última

▼M2

injecção anterior e a primeira injecção posterior a esta deverão ser de padrão de referência (ponto 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 B_1 nos extractos da amostra efectua-se directamente por referência aos padrões adjacentes.

5.5.1. Regulação da bomba de HPLC

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

5.5.2. Regulação da bomba para a reacção post coluna

Regular a bomba (ponto 4.7) de modo a obter um fluxo de 0,2--0,4 ml/min de solução aquosa saturada de iodo (ponto 3.7). A título indicativo: é aconselhável a utilização de fluxos da ordem de 0,4 ou 0,2 ml/min, associados a fluxos da fase móvel (ponto 3.6) de 0,5 ml/min e 0,3 ml/min, respectivamente.

5.5.3. Detector de fluorescência

Regular o detector de fluorescência (ponto 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). Ajustar o atenuador de modo a obter, para 1 ng de aflatoxina B_1, uma deflexão da caneta do registador de cerca de 80 % da escala total.

5.5.4. Injector

Injectar, para todas as soluções, quantidades da ordem de 250 µl, procedendo de acordo com as instruções do fabricante do injector.

5.5.5. Verificação da separação cromatográfica

Injectar a solução para ensaio cromatográfico (ponto 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 da cada série de análises, proceder à injecção repetida de padrão de referência (ponto 3.13.3), até obtenção de picos com áreas estáveis *(nota:* os picos produzidos pela aflatoxina B_1 não deverão apresentar, em injecções consecutivas, diferenças superiores a 6 %). Proceder de imediato à verificação da linearidade (ponto 5.5.7).

5.5.7. Verificação de linearidade

Injectar as soluções de calibração de aflatoxina B_1 (ponto 3.13.1 a 3.13.4). Utilizar em cada terceira injecção o padrão de referência (ponto 3.13.3), para correcção do desvio das respostas *(nota:* os picos relativos ao padrão de referência não deverão apresentar diferenças superiores a 10 % em 90 minutos). Corrigir o desvio de acordo com a fórmula indicada no ponto 7. O gráfico 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, prosseguir de imediato. No caso contrário, identificar e corrigir as causas do problema, antes de continuar o processo.

5.5.8. Injecção dos extractos da amostra

Injectar os extractos da amostra purificada (ponto 5.4.2.2). Após cada série de dois extractos da amostra, repetir a injecção do padrão de referência (ponto 3.13.3), de acordo com a ordem seguinte: padrão de referência, extracto, extracto, padrão de referência, extracto, extracto, padrão de referência, etc.

6. **Ensaio de confirmação**

6.1. *Tratamento subsequente do extracto (ponto 5.4.2.2)*

Juntar 5 ml de solução de NaCI (ponto 3.15.1) ao extracto final obtido no ponto 5.4.2.2. Extrair três vezes com 2 ml de clorofórmio ((ponto 3.1) durante um minuto, por recurso à ampola de decantação (ponto 4.24.1). Verter os extractos de clorofórmio recolhidos e combinados, numa proveta de 10 ml, através de cerca de 1 g de

▼M2

sulfato de sódio (ponto 3.15.2). Poder-se-á usar um funil de pequenas dimensões (diâmetro de 4 cm), colocando na parte inferior um pedaço de algodão coberto com cerca de 1 g de sulfato de sódio (ponto 3.15.2).

Lavar a camada de sulfato com alguns mililitros de clorofórmio, recolhendo na mesma proveta ou ampola. Evaporar à secura o extracto de clorofórmio na proveta, por recurso à unidade de aquecimento (ponto 4.24.2), redissolvendo-o em 1 ml de clorofórmio.

6.2. *Preparação do derivado e cromatografia em camada fina*

Ver Directiva 76/372/CEE do Conselho, anexo, método A, ponto 5.6.2.

7. **Cálculo e resultados**

Calcular o teor de aflatoxina B_1 presente na amostra, expresso em µg/kg, por recurso à fórmula seguinte:

$$\text{Teor de aflatoxina } B_1 \text{ em èmg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

na qual:

m = quantidade de aflatoxina B_1, em expressa em ng, representada pelo pico B_1 da amostra, calculada do modo que se segue:

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

sendo:

P(amostra) = área do pico correspondente à aflatoxina B_1 na amostra.

$B(st_1)$ = área do pico correspondente à aflatoxina B_1 no padrão de referência precedente (ponto 3.13.3).

$P(st_2)$ = área do pico correspondente à aflatoxina B_1 no padrão de referência seguinte (ponto 3.13.3).

r(st) = quantidade de aflatoxina B_1, no padrão de referência (ponto 3.13.3) injectado, expressa em ng.

V_m = volume do extracto de amostra injectado, expresso em ml.

V_{ext} = volume final do extracto de amostra, expresso em mililitros, tendo em atenção qualquer diluição que tenha sido efectuada (ver ponto 5.3).

M = massa da amostra, expressa em gramas.

V_f = volume de filtrado transferido para o cartucho de Florisil (ponto 5.4.1.2), expresso em mililitros.

V_c = volume de clorofórmio utilizado para a extracção da amostra, expresso em mililitros.

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

teor de aflatoxina B_1, em µg/kg = 20 × m.

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

8. **Repetibilidade:**

ver ponto 10.1.

9. **Reprodutibilidade:**

ver ponto 10.1.

▼M2

10. **Observações**

10.1. *Precisão*

Um estudo interlaboratorial [1], 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 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 [2] e a Decisão 89/610/CEE da Comissão [3], os valores de r e R encontram-se também indicados no quadro 1 sob a forma de coeficientes de variação.

Quadro 1

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

(15 laboratórios)

Nível	r	R	CV_r (*)	CV_R
(µg/kg)			(%)	(%)
8 & 14	1,4	1,7	11	18

(*) CV = coeficiente de variação

10.2. *Estabilização do clorofórmio (ponto 3.1)*

As características de adsorção 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 %.

[1] Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). *Food Additives and Contaminants* 8, 17-29.
[2] ISO 3534-1977
[3] JO n.º L 351 van 2. 12. 1989, p. 39.

▼**M2**

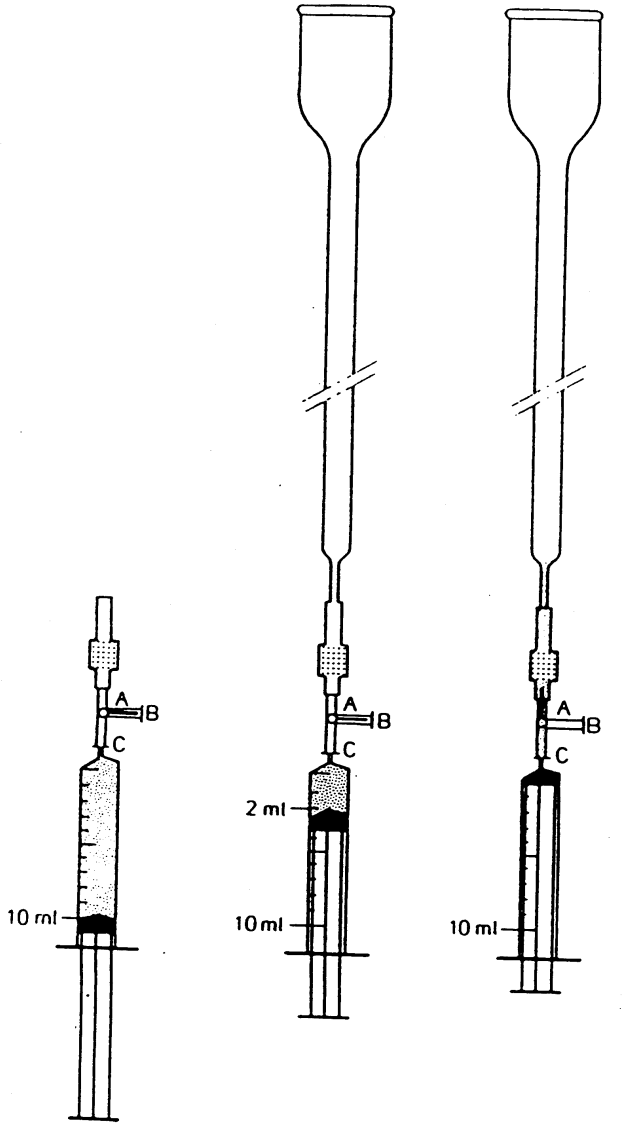
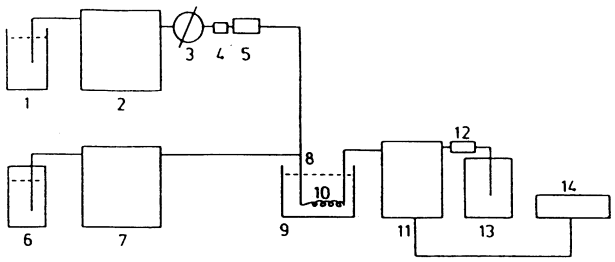


Figura 1: sistema coluna-cartucho



1. Fase móvel
2. Bamba
3. Injector
4. Pré-coluna
5. Coluna analítica par 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 2: diagrama do sistema de cromatografia líquida, com derivatização pós-coluna

▼**M2**

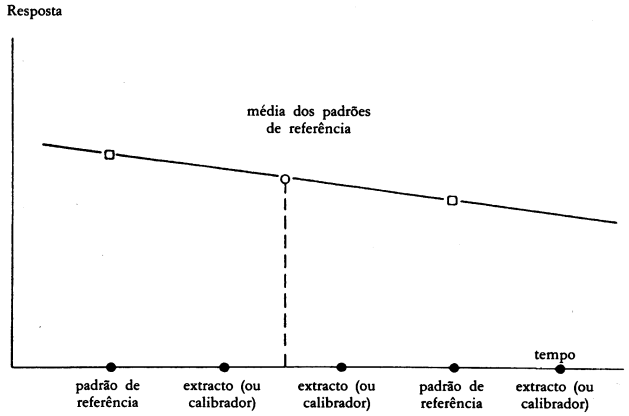


Figura 3: compensação do desvio relativo à resposta da aflatoxina B_1 por injecção do padrão de referência (ponto 3.13.3), a intervalos de tempo regulares

▼**M3**

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 a 60 ºC), após a preparação indicada no ponto 5.1.

Nestes casos, 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 da aflatoxina B_1 entre 10 e 20 µgt/kg;

± 10 µg/kg em relação à média dos valores médios entre 20 e 50 µg/kg;

± 20 % da média dos valores médios superiores a 50 µg/kg.

▼B

ANEXO

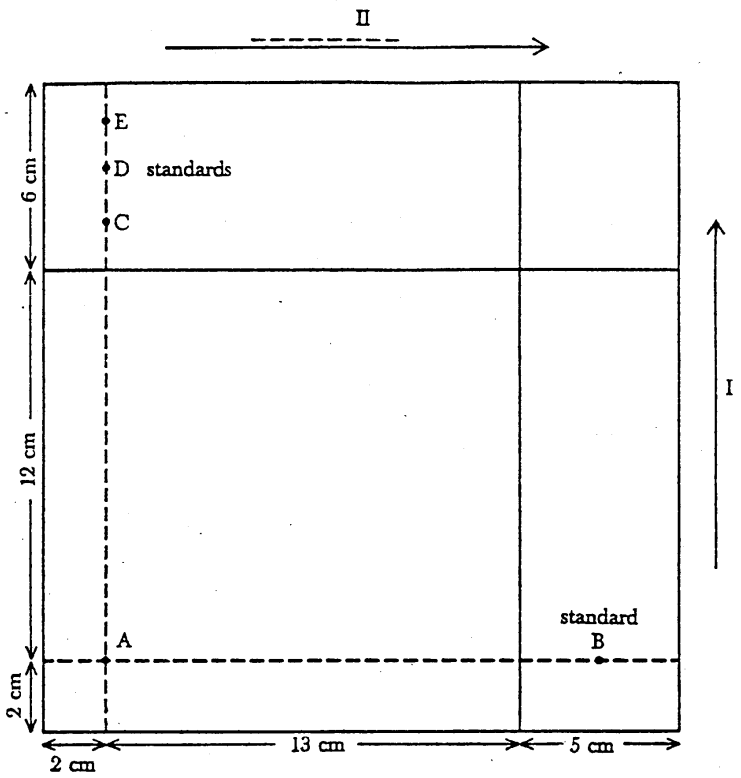


Figura 1

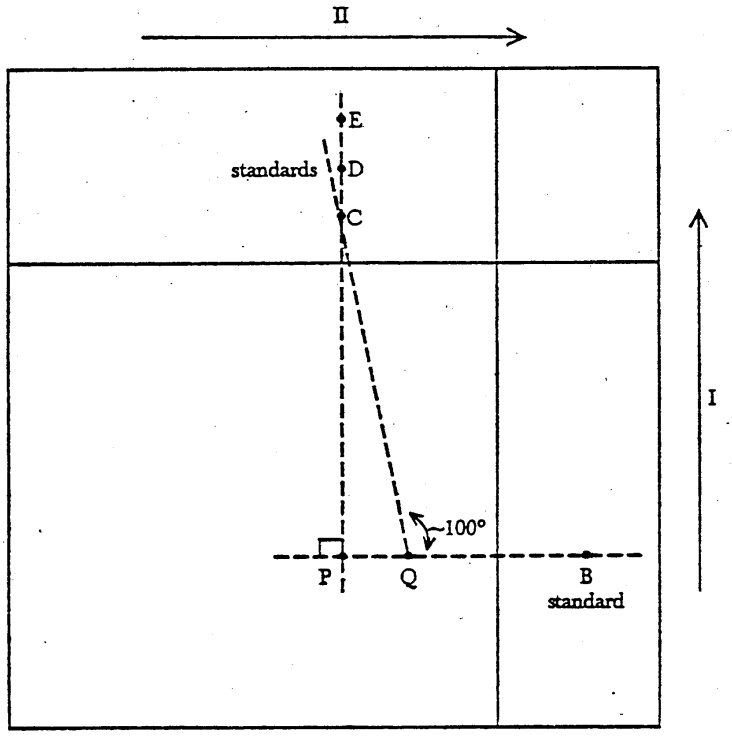


Figura 2

▼B

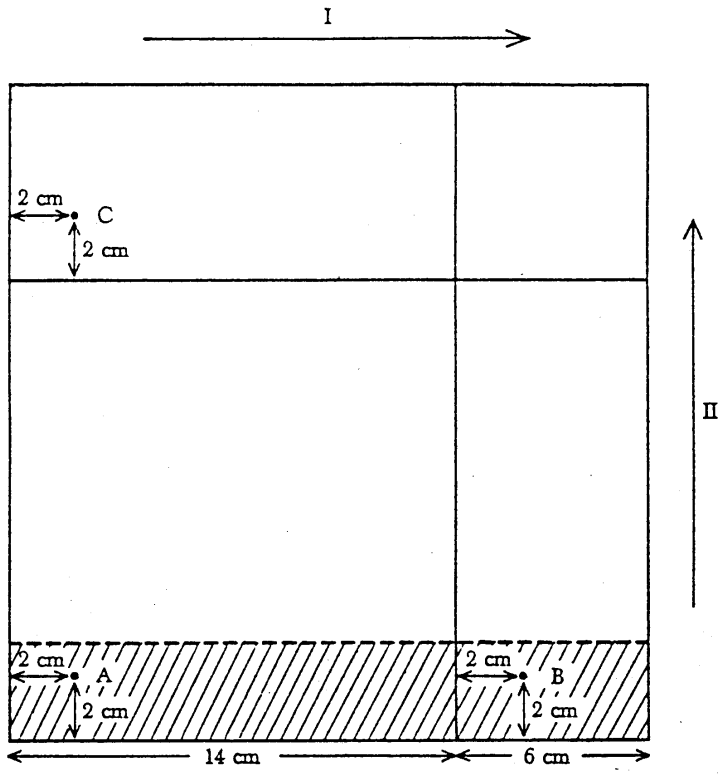


Figura 3