376L0372

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 introduçâo 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 2º,

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 1º

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.

São aplicáveis aos métodos descritos no anexo à presente directiva as disposições gerais constantes da Parte I (Introdução) do Anexo à primeira Directiva 71/250/CEE da Comissão, de 15 de Junho de 1971, à excepção da parte que diz respeito à preparação da amostra a analisar.

Artigo 2º

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

Artigo 3º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 1 de Março de 1976.

Pela Comissão

P. J. LARDINOIS

Membro da Comissão

(1) JO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.
(2) JO nº L 73 de 27. 3. 1972, p. 14.
(3) JO nº L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.
(4) JO nº L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.
(5) JO nº L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.
(6) JO nº L 83 de 30. 3. 1973, p. 21.
(7) JO nº L 108 de 22. 4. 1974, p. 7.
(8) JO nº L 32 de 5. 2. 1975, p. 26.

ANEXO

ELEMENTO DA AFLATOXINA B_1

A. MÉTODO POR CROMATOGRAFIA MONODIMENSIONAL EM CAMADA FINA

1. **Finalidade e objecto de aplicação**

Esta técnica permite determinar o teor de aflatoxina B_1 nos seguintes alimentos: bagaços de amendoim, copra, linhaça, soja, gergelim, babaçu e de gérmenes de milho, além de cereais e produtos cerealíferos, farinha de ervilhas, e polpa e fécula de batata. O limite mínimo do doseamento é de 0,01 mg/kg (10 ppb).

Na presença de substâncias perturbadoras que dificultam as determinações é conveniente recomeçar a análise utilizando o processo B (cromatografia bidimensional em camada fina).

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 acetonitrilo (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 nº 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 ° 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 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 °C, 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 fluorometriadensitométrica

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 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.

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 4° C, esta solução mantém-se estável durante duas semanas.

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.

B. MÉTODO DA CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL EM CAMADA FINA

1. **Finalidade e objecto de aplicação**

Esta técnica permite determinar o teor de aflatoxina B_1, em alimentos para animais aos quais não se aplique o método A. O limite de doseamento mínimo é de 0,91 mg/kg (10 p.p.b). Esta técnica não se aplica aos alimentos que contenham polpa de citrinos.

2. **Princípio**

Submete-se à amostra à extracção por clorofórmio. Filtra-se o extracto e recolhe-se dele uma parte alíquota, que se purifica por cromatografia em coluna de gel de sílica. Evapora-se o líquido eluído e põe-se o resíduo em contacto com um volume determinado de clorofórmio ou mistura de benzeno e acetonitrilo. Submete-se uma parte alíquota desta solução à cromatografia bidimensional sobre camada fina. Determina-se a quantidade de aflatoxina B_1, por irradiação UV, visualmente ou por fluorodensitometria, por comparação com quantidades conhecidas da aflatoxina B_1-padrão. A detecção da aflatoxina B_1 extraída do alimento deve ser confirmada pelo processo indicado para o efeito.

3. **Reagentes**

NB: Caso não sejam dadas indicações especiais, deverão utilizar-se reagentes de 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 sílica, para cromatografia em coluna com granulometria de 0,05 a 0,20 mm.

3.9. Algodço hidrófilo, previamente desengordurado com clorofórmio ou lã de vidro.

3.10. Sulfato de sódio, anídro, granulado.

3.11. Gás inerte, por exemplo: ázoto.

3.12. Ácido clorídrico 1 N.

3.13. Terra de infusórios (hiflosupercel), lavada com ácido.

3.14. Gel de sílico G-HR ou equivalente, para cromatografia em camada fina.

3.15. Diluentes de revelação.

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

3.15.2. Clorofórmio (3.2.)/acetona (3.1.): 9/1 (v/v) tina não saturada

3.16. Solução-padrão com aproximadamente 0,1 µg de aflatoxina B_1 por milímerto de clorofórmio (3.2.) ou mistura de benzeno e acetonitrilo (3.6.), preparado e verificado como se indica no ponto 7 do método A.

4. **Material**

Ver ponto 4 do método A.

5. **Método**

5.1. *Preparação da amostra*

5.2. *Extracção em coluna*

5.3. *Purificação em coluna*

} Ver pontos (5.1.), (5.2.) e (5.3.) do método A

5.4. *Cromatografia bidimensional em camada fina.*

5.4.1. Aplicação das soluções (seguir o esquema apresentado na figura 1)

Sobre uma placa (4.8.) traçar duas rectas, paralelas respectivamente a dois lados contíguos da placa uma a 5 e outra a 6 cm do lado a que é paralela, as quais se destinam a demarcar o movimento dos bordos dos diluentes. com pipetas capilares ou microseringas colocar na planta as soluções adiante indicadas:

— *no ponto A,* 20 µl do extracto de amostra abtido em (5.3.) purificado.

— *no ponto B,* 20 µl de solução-padrão (3.16.),

— *no ponto C,* 10 µl de solução-padrão (3.16.),

— *no ponto D,* 20 µl de solução-padrão (3.16.),

— *no ponto E,* 40 µl de solução-padrão (3.16.).

Secar por corrente de ar de fraca intensidade ou gás inerte (3.11.). As manchas obtidfas devem ser de cerca de 5 mm de diâmetro.

5.4.2. Revelação (seguir o esquema apresentado na figura 1).

Elaborar o cromatograma na direcção I com diluente de revelação, (3.15.1.) [camada de 1 cm em tina saturada] ao abrigo da luz, até que o bordo do diluente atinja a linha de demarcação. Retirar a placa da tina e deixá-la secar durante pelo menos 15 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

Elaborar em seguida o cromatograma na direcção II com diluente de revelação (3.15.2.) [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 deixá-la secar ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

5.4.3. Leitura do cromatograma (seguir o esquema apresentado na figura 2).

Submeter o cromatograma à irradiação da lâmpada UV, colocando a placa a 10 cm da distância desta última (4.9.). Localizar as manchas de fluorescência azul, B, C, D, e E, correspondentes à aflatoxina B_1 proveniente da solução-padrão e traçar duas rectas imaginárias, perpendiculares às direcações I e II, que passem por essas manchas. O ponto de intersecção P destas rectas será o ponto onde deverá aparecer a mancha de aflatoxina B_1 proveniente do extracto da amostra utilizado em A (figura 1). No entanto, o ponto real do aparecimento da manche poderá situar-se no ponto Q, correspondente à intersecção e duas outras rectas imaginárias, formando entre si um ângulo de cerca de 100 °C, que passem respectivamente pelas manchas B e C. Determinar como se indica em (5.5.) a quantidade de aflatoxina B_1 existente no extracto de amostra.

5.4.4. Cromatografia complementar

Traçar, sobre outra placa (4.8.), duas rectas paralelas respectivamente a dois lados contíguos da placa, como se indica no no esquema da figura 1, e colocar no ponto A (ver figuara 1) 20 µl do extracto de amostra obtido em (5.3.), purificado, sobrepondo-lhe 20 µl de solução-padrão (3.16.). Revelar como se indica em (5.4.2.) Irradiar o cromatograma com a lâmpada UV (4.9.) e verificar se:

— as manchas de aflatoxina B_1 do extracto e da solução-padrão coincidem,

— a fluorescência da mancha da solução-padrão é mais intensa que a da mancha de aflatoxina B_1 revelada no ponto Q da primeira placa.

5.5. *Determinações quantitativas*

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

5.5.1. Medições visuais

Calcular a quantidade de aflatocina B_1 existente no extracto comparando a intensidade da fluorescência da respectiva mancha com a das manchas C, D, e E da solução-padrão. Interpolar, se necessário. Se a fluorescência dos 20 µl de extracto for superior, em intensidade, à

dos 40 µl de solução-padrão, diluir o extracto 10 a 100 vezes com clorofórmio (3.2.) ou mistura de benzeno/acetonitrilo (3.6.) antes de o submeter a nova cromatrografia em camada fina.

5.5.2. Medição por fluorodensitometria

Medir a intensidade da fluorescência das manchas de aflatoxina B_1 com o fluorodensitómetro (4.12.) utilizando um comprimento de onda de excitação de 265 nm e um comprimento de onda de emissão de 443 nm.

Calcular a quantidade de aflatoxina B_1 existente no depósito do extracto comparando a intensidade de fluorescência da sua mancha com a das manchas C, D, e E da solução-padrão.

5.6. *Confirmação da detecção de aflatoxina B_1*

Ver ponto (5.6.) do método A.

6. **Cálculo dos resultados**

Ver ponto 6 do método A.

7. **Possibilidade de repetição**

Ver ponto B do método A.

8. **Reprodutibilidade**

Ver «observações», parte C, ponto 2.

C. OBSERVAÇOES RELATIVAS AOS MÉTODOS A E B

1. **Desengorduramento**

As amostras que contenham mais de 5 % de substâncias gordas devem ser desengorduradas com éter de petróleo (eb. 40-50 °C) após a preparação indicada em (5.1.). Nestes casos, os resultados da análise devem referir-se ao peso da amostra antes de ter sido desengordurada.

2. **Reprodutibilidade dos resultados**

La reprodutibilidade dos resultados, isto é, a variabilidade entre os resultados obtidos por dois ou mais laboratórios a partir de uma mesma amostra, foi avaliada em:

± 50 % média dos resultados obtidos com valores médios entre 10 e 20 µg/kg, de aflatoxina B_1/kg;

± 10 µg/kg relativamente à média obtido com valores médios entre 20 e 50 µg/kg,

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

ANEXO

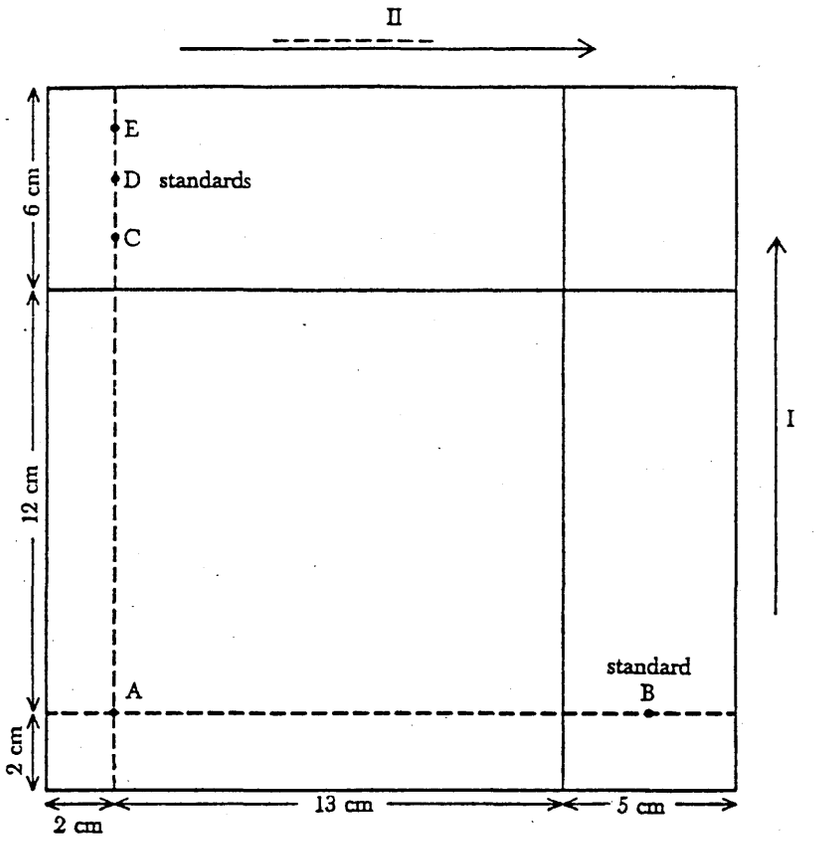

Figura 1

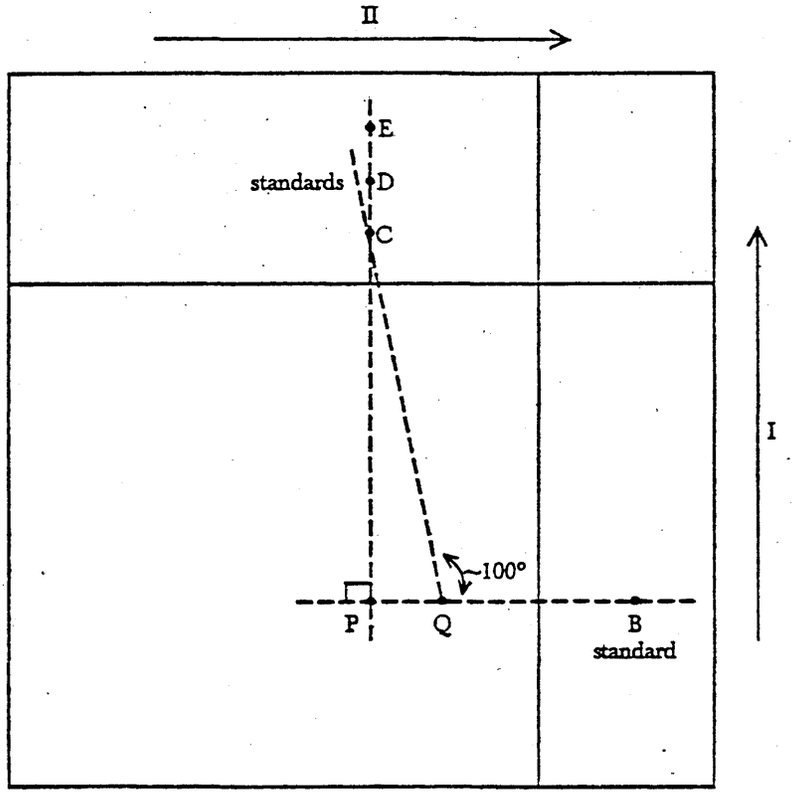

Figura 2

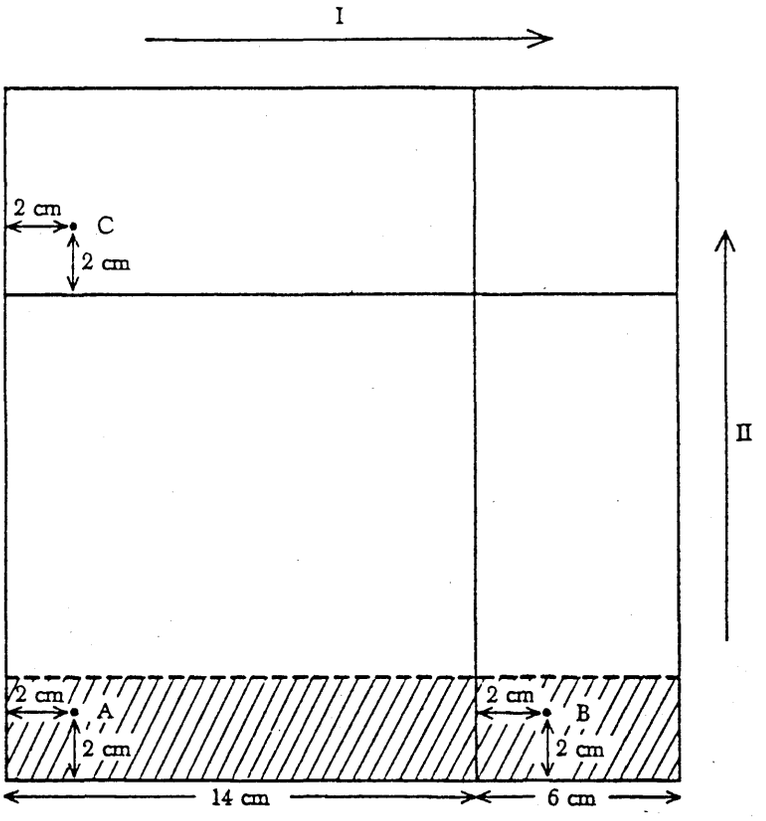

Figura 3