372L0199

Nº L 123/6 Jornal Oficial das Comunidades Europeias 29. 5. 72

TERCEIRA DIRECTIVA DA COMISSÃO

de 27 de Abril de 1972

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

(72/199/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 de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitárias para o controlo oficial de alimentos para animais (1) e, nomeadamente, o seu artigo 2º,

Considerando que a directiva atrás referida prevê que os controlos oficiais dos alimentos para animais, para verificar se as condições prescritas em virtudes de disposições legislativas, regulamentares ou administrativas referentes à qualidade e composição de alimentos para animais, são respeitados e efectuados segundo modos de colheita de amostra e métodos de análise comunitários;

Considerando que as Directivas nºs 71/250/CEE e 71/393/CEE da Comissão, de 15 de Junho de 1971 (2) e de 18 de Novembro de 1971 (3), fixaram já um certo número de métodos de análise comunitários; que, tendo em conta o estado de evolução dos trabalhos efectuados desde então, é conveniente adoptar uma terceira série de métodos;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão conformes com o parecer do Comité Permanente dos Alimentos para Animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

Os Estados-membros determinaram que as análises para os controlos oficiais de alimentos para animais, no que respeita ao teor de amido, proteínas brutas solubilizáveis pela pepsina e pelo ácido clorídrico e de gossipol livre e total, assim como à actividade da pepsina, sejam efectuadas segundo os métodos descritos no Anexo I da presente directiva.

As disposições gerais, que constam da Parte I (Introdução) do Anexo da primeira directiva nº 71/250/CEE da Comissão, de 15 de Junho de 1971, que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais, são aplicáveis aos métodos descritos no Anexo I da presente directiva.

Artigo 2º

Os Estados-membros determinarão que as análises para os controlos oficiais dos alimentos para animais com vista à detecção e identificação dos antibióticos do grupo das tetraciclinas, assim como o que respeita ao teor de clorotetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, oleandomicina, tilosina, virginiamicina, sejam efectuadas segundo os métodos descritos no Anexo II da presente directiva.

Artigo 3º

Os Estados-membros porão em vigor em 1 de Julho de 1973, o mais tardar, as disposições legislativas, regulamentares ou administrativas necessárias para darem cumprimento às disposições da presente directiva. Deste facto informarão imediatamente a Comissão.

Artigo 4º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 27 de Abril de 1972.

Pela Comissão

O Presidente

S. L. MANSHOLT

(1) JO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.
(2) JO nº L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.
(3) JO nº L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.

ANEXO I

1. DOSEAMENTO DO AMIDO

— Método polarimétrico —

1. **Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite determinar o teor de amido e de produtos de degradação deste, de alto peso molecular dos alimentos para animais, com excepção dos que contenham tiras, polpa, folhas ou colos secos de beterraba, polpa de batata, leveduras desidratadas, produtos ricos em inulina (por exemplo, tiras e farinhas de tupinambos) ou de torresmos.

2. **Princípio**

O método inclui uma dupla determinação. Na primeira, a amostra é tratada a quente por ácido clorídrico diluído. Depois da clarificação e filtração, mede-se por polarimetria o poder rotatório da solução.

Na segunda, a amostra é extraída por etanol a 40 %. Depois da acidificação do filtrado pelo ácido clorídrico, da clarificação e filtração, mede-se o poder rotatório nas mesmas condições da primeira determinação.

A diferença entre as duas, multiplicada por um factor conhecido dá o teor de amido da amostra.

3. **Reagentes**

3.1. Ácido clorídrico a 25 % (p/p), d : 1,126.

3.2. Ácido clorídrico a 1,128 % (p/v).

A concentração deve ser verificada por titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N em presença de vermelho de metilo a 0,1 % (p/v) em etanol a 94 % (v/v). 10 ml = 30,94 ml de NaOh 0,1 N.

3.3. Solução de Carrez I: dissolver em água 21,9 g de acetato de zinco Zn $(CH_3COO)_2 .2H_2O$ e 3 g de ácido acético glacial. Completar até 100 ml com áqua.

3.4. Solução de Carrez II: dissolver em água 10,6 g de ferrocianeto de potássio $K_4 [Fe(CN)_6] . 3H_2O$. Completar até 100 ml com água.

3.5. Etanol a 40 % (v/v), d : 0,948 a 20 °C.

4. **Instrumentos**

4.1. Erlenmeyer de 250 ml de colo esmerilado normalizado com refrigerador de refluxo.

4.2. Polarímetro ou sacarímetro.

5. **Modo operatório**

5.1. *Preparação da amostra*

Triturar a amostra de maneira a passar a totalidade através de um crivo de malha redonda de 0,5 mm de diâmetro.

5.2. *Determinação do poder rotatório total (P ou S) (v. obervação 7.1.)*

Pesar com a aproximação de 1 mg, 5 g de amostra triturada e introduzir num balão aferido de 100 ml. Adicionar 25 ml de ácido clorídrico (3.2.), agitar para obter uma boa repartição da amostra e adicionar novamente 25 ml de ácido clorídrico. Introduzir o balão num banho-maria em ebulição e, durante três minutos, agitar enérgica e regularmente para evitar a formação de aglomerados. A quantidade de água do banho deve ser suficiente para permitir mantê-lo em ebulição quando o balão é introduzido. Este não pode ser retirado do banho durante a agitação. Exactamente quinze minutos depois, retirar o balão do banho, juntar-lhe 30 ml de água fria e arrefecer imediatamente a 20 °C.

Adicionar 5 ml de solução de Carrez I (3.3.) e agitar durante um minuto. Adicionar em seguida 5 ml de solução de Carrez II (3.4.) e agitar de novo durante um minuto. Completar o volume com água, homogeneizar e filtrar. Se o filtrado não ficar perfeitamente límpido (o que é pouco frequente) recomeçar a análise utilizando uma quantidade maior das soluções de Carrez I e II, por exemplo, 10 ml.

Medir em seguida o poder rotatório da solução num tubo de 200 mm no polarímetro ou no sacarímetro.

5.3. *Determinação do poder rotatório (P' ou S') de substâncias solúveis em etanol a 40 %*

Introduzir num balão aferido de 100 ml 5 g de amostra, pesada com a aproximação de 1 mg e adicionar cerca de 80 ml de etanol (3.5.) (v. observação 7.2.). Deixar o balão à temperatura ambiente durante 1 hora; durante esse lapso de tempo, agitar energicamente 6 vezes, de maneira a que a amostra fique bem misturada com o etanol. Completar até 100 ml com etanol (3.5.), homogeneizar e filtrar.

Introduzir com uma pipeta 50 ml de filtrado (= 2,5 g de amostra) num erlenmeyer de 250 ml, adicionar 2,1 ml de ácido clorídrico (3.1.) e agitar energicamente. Aplicar um refrigerador de refluxo ao erlenmeyer e mergulhar este num banho-maria em ebulição. Exactamente 15 minutos depois, retirar o erlenmeyer do banho, despejar o seu conteúdo num balão aferido de 100 ml, passando por um pouco de água fria e arrefecer a 20 °C. Clarificar em seguida com as soluções de Carrez I (3.3.) e II (3.4.), completar o volume com água, homogeneizar, filtrar e medir o poder rotatório como indicado em (5.2.), 2º e 3º parágrafos.

6. Cálculo dos resultados

O teor de amido, em percentagem de amostra, é calculado como se segue:

6.1. *Medições efectuadas no polarímetro*

$$\text{percentagem de amido} = \frac{2000\,(P - P')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

P = poder rotatório em graus de arco

P' = poder rotatório em graus de arco dados pelas substâncias solúveis em etanol a 40 %

$[\alpha]_D^{20°}$ = poder rotatório específico do amido puro. Os valores convencionalmente admitidos para este factor são os seguintes:

+ 185,9 °: amido de arroz
+ 185,4 °: amido de batata
+ 184,6 °: amido de milho
+ 182,7 °: amido de trigo
+ 181,5 °: amido de cevada
+ 181,3 °: amido de aveia
+ 184,0 °: outros tipos de amidos, assim como misturas de amidos de alimentos compostos

6.2. *Medidas efectuadas no sacarímetro*

$$\text{percentagem de amido} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20°}} \cdot \frac{(2\,N \cdot 0{,}665)\,(S - S')}{100} = \frac{26{,}6\,N\,(S - S')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

S = poder rotatório total em graus sacarimétricos

S' = poder rotatório em graus sacarimétricos, dados pelas substâncias solúveis em etanol a 40 %.

N = peso em gramas de sacarose, em 100 ml de água que, através de uma espessura de 200 mm, dê um poder rotatório de 100 ° sacarimétricos.

16,29 g para os sacarímetros franceses

26,00 g para os sacarímetros alemães

20,00 g para os sacarímetros mistos

$[\alpha]_D^{20°}$ = Poder rotatório específico do amido puro (ver 6.1).

6.3. *Reprodutibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 0,4, em valor absoluto, para os teores de amido inferiores a 40 %, e 1,1 % em valor relativo para os teores de amido iguais ou superiores a 40 %.

7. **Observações**

7.1. Sempre que a amostra contenha mais de 6 % de carbonatos, calculados em carbonato de cálcio, estes devem ser destruídos por um tratamento com a quantidade apropriada de ácido sulfúrico diluído, antes da determinação do poder rotatório total.

7.2. No caso de produtos com forte teor de lactose, tais como soro de leite em pó ou de nata de leite em pó, proceder como se segue, depois da adição de 80 ml de etanol (3.5.). Aplicar ao balão um refrigerador de refluxo, mergulhar o balão durante 30 minutos num banho de água a 50 °C. Em seguida, deixar arrefecer e prosseguir a análise como indicado em (5.3.).

2. DOSEAMENTO DE PROTEÍNAS BRUTAS

1. **Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite determinar convencionalmente o teor de proteínas brutas de alimentos para animais, a partir do teor de azoto, doseado segundo Kjeldahl.

2. **Princípio**

A amostra é mineralizada por via húmida. A solução ácida é alcalinizada por uma solução de hidróxido de sódio. O amoníaco libertado é preparado por destilação e recolhido numa quantidade determinada de ácido sulfúrico cujo excesso é titulado por uma solução de hidóxido de sódio.

3. **Reagentes**

3.1. Sulfato de potássio p.a.

3.2. Catalisador: óxido cúprico CuO p.a., o sulfato cúprico cristalizado $CuSO_4 . 5H_2O$ p.a., o mercúrio, u óxido mercúrico HgO p.a.

3.3. Zinco p.a., granulado

3.4. Ácido sulfúrico p.a., d: 1,84

3.5. Ácido sulfúrico 0,1 N.

3.6. Ácido sulfúrico 0,5 N.

3.7. Indicador vermelho de metilo: dissolver 300 mg de vermelho de metilo em 100 ml de etanol a 95-96 % (v/v).

3.8. Solução a 40 % (p/v) de hidróxido de sódio.

3.9. Solução de hidróxido de sódio 0,1 N

3.10. Solução de hidróxido de sódio 0,25 N

3.11. Solução saturada de sulfureto de sódio p.a.

3.12. Solução a 8 % (p/v) de tiosulfto de sódio, $Na_2S_2O_3 . H_2O$ p.a.

3.13. Pedra pomes granulada, lavada com ácido clorídrico e calcinada

4. **Instrumentos**

Aparelhos de mineralização e destilação, segundo Kjeldahl (v. observação 7.1.).

5. Modo operatório

5.1. *Mineralização*

Introduzir 1 g de amostra, pesada com a aproximação de 1 mg no balão do aparelho de mineralização. Juntar 10 g de sulfato de potássio (3.1.), uma quantidade apropriada de catalizador (3.2.) (0,3 a 0,4 g de óxido cúprico ou 0,9 a 1,2 g de sulfato de cobre ou uma gota de mercúrio, ou 0,6 a 0,7 g de óxido de mercúrio), 25 ml de ácido sulfúrico (3.4.) e alguns grânolus de pedra pomes (3.13.). Homogeneizar. Aquecer o balão, primeiro com moderação e agitando de tempos a tempos até à carbonização de massa e desaparecimento da espuma; em seguida, mais intensamente, até à ebulição regular do líquido. Evitar o sobreaquecimento das paredes e a aderência de partículas orgânicas. Quando a solução apreçer límpida e incolor (verde claro em presença do catalizador à base de cobre), manter a ebulicão ainda durante 1 hora. Em seguida, deixar arrefecer.

5.2. *Destilação*

Adicionar 250 a 350 ml de água, com precaução, agitando sempre para dissolver completamente os sulfatos; deixar arrefecer.

Adicionar em seguida alguns grânulos de zinco (3.3.)

Introduzir no frasco colector do aparelho de destilação 25 ml, exactamente medidos, de ácido sulfúrico 0,1 N (3.5.) ou 0,5 N (3.6.) conforme a concentração teórica de azoto (v. observação 7.2.) e algumas gotas do indicador vermelho de metilo (3.7.).

Ligar o balão ao refrigerador do aparelho de destilação e mergulhar a extremidade deste último no líquido do frasco colector pelo menos 1 cm (ver observação 7.3.). Introduzir lentamente no balão através do funil com torneira, 100 ml de solução a 40 % de hidróxido de sódio (3.8.). Se se tiver utilizado um catalizador à base de mercúrio, introduzir, além disso, no balão quer 10 ml de solução de sulfureto de sódio (3.11.), quer 25 ml de solução de tiosulfato de sódio (3.12.).

Aquecer o balão de forma a destilar cerca de 150 ml de líquido em 30 minutos. Depois desse lapso de tempo, verificar o carácter neutro do líquido destilado por meio de papel tornesol. Se a reacção for alcalina, prosseguir a destilação. Pará-la, quando o líquido destilado aparecer neutro no papel tornesol. Durante a destilação, agitar de tempos a tempos o conteúdo do frasco colector e vigiar a sua coloração. Se esta virar para amarelo, juntar imediatamente um volume, exactamente medido, de ácido sulfúrico 0,1 N (3.5.) ou 0,5 N (3.6.).

5.3. *Titulação*

Titular no frasco colector o excesso de ácido sulfúrico com a solução de hidróxido de sódio 0,1 N (3.9.) ou 0,25 N (3.10.), conforme a normalidade do ácido sulfúrico utilizado, até à virança de coloração para amarelo claro.

5.4. *Controlo do método*

Para verificar se os reagentes estão isentos de azoto, efectuar um ensaio em branco (destilação e titulação) na ausência da amostra a analisar. Para controlar a exactidão do método, efectuar a análise (mineralização, destilação e titulação) em 1,5 a 2,0 g de acetanilida p.a. (P.F. 114 °C; % N: 10,36) na presença de 1 g de sacarose, livre de azoto; 1 g acetanilida consome 14,80 ml de ácido sulfúrico 0,5 N.

6. Cálculo dos resultados

Determinar o volume de ácido sulfúrico consumido, correspondendo 1 ml de ácido sulfúrico 0,1 N a 1,4 mg de azoto. Multiplicar a quantidade de azoto pelo factor 6,25. Expressar o resultado em percentagem de amostra.

Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar:

— 0,2 em valor absoluto, para os teores de proteínas brutas inferiores a 20 %,

— 1,0 % em valor relativo, para os teores compreendidos entre 20 e 40 %,

— 0,4 em valor absoluto, para os teores superiores a 40 %.

7. **Observações**

7.1. Podem ser utilizados certos aparelhos que exigem um transvasamento entre a mineralização e a destilação. Neste caso, o transvasamento deve ser efectuado sem perdas.

7.2. Em relação aos produtos pobres em matérias azotadas, o volume de ácido sulfúrico 0,1 N a introduzir no frasco colector pode ser reduzido, se necessário, a 10 ou 15 ml, e completado com água até 25 ml.

7.3. Se o balão do destilador não tiver um funil com torneira, juntar a solução de hidróxido de sódio imediatamente antes de ligar o balão ao refrigerador, deixando correr o líquido lentamente ao longo das paredes, de maneira a evitar que se misture à solução ácida.

3. DOSEAMENTO DE PROTEÍNAS BRUTAS SOLUBILIZADAS PELA PEPSINA E PELO ÁCIDO CLORÍDRICO

1. **Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite determinar a fracção de proteínas brutas solubilizadas pela pepsina e pelo ácido clorídrico em condições determinadas. O método é aplicável a todos os alimentos.

2. **Princípio**

A mostra é submetida a um tratamento por uma solução clorídrica de pepsina durante 48 h a 40 °C. A suspensão é filtrada e o teor de azoto do filtrado determinado segundo o método descrito para o doseamento das proteínas brutas.

3. **Reagentes**

3.1. Ácido clorídrico, d: 1,125

3.2. Ácido clorídrico: 0,075 N.

3.3. Pepsina a 2,0 U/mg; esta actividade está definida e deve ser controlada segundo o método referido na Parte 4 do presente Anexo.

3.4. Solução recém-preparada com cerca de 0,02 % (p/v) de pepsina em ácido clorídrico (3.2.); actividade: 400 U/1.

3.5. Emulsão de anti-espuma (silicone por exemplo)

3.6. Todos os reagentes indicados ao ponto 3 do método de doseamento das proteínas brutas

4. **Instrumentos**

4.1. Banho-maria ou estufa incubadora regulada a 40 °C ± 1 °C.

4.2. Aparalhos de mineralização e destilação segundo Kjeldahl.

5. **Modo operatório**

5.1. *Obtenção da solução* (ver observação 7.2.)

Introduzir 2 g de amostra pesada com a aproximação de 1 mg num balão aferido de 500 ml e adicionar 450 ml de solução clorídrica de pepsina (3.4.) previamente elevada a 40 °C. Agitar de forma a evitar a formação de aglomerados. Verificar que o pH da suspensão é inferior a 1,7. Colocar o balão no banho-maria ou na estufa incubadora (4.1.), durante 48 horas. Agitar decorridas 8, 24 e 32 h. Após 48 h, adicionar 15 ml de ácido clorídrico (3.1.), arrefecer a 20 °C, completar até 500 ml com água e filtrar.

5.2. *Mineralização*

Recolher 250 ml do filtrado e introduzi-los no balão do destilador (4.2.). Juntar os reagentes necessários à mineralização, como indicado no método de doseamento das proteínas brutas, no ponto (5.1.), 2ª frase.

Homogeneizar e aquecer até à ebulição. Se houver formação de espuma, juntar algumas gotas de emulsão anti-espuma (3.5.). Manter uma ebulição viva até à evaporação quase completa da água. Eliminar com precaução os últimos vestígios de água, reduzindo a intensidade do aquecimento. Quando a solução aparecer límpida e incolor (verde claro em presença do catalisador à base de cobre), prosseguir a ebulição durante mais 1 hora. Em seguida, deixar arrefecer.

5.3. *Destilação e titulação*

Proceder como indicado no método de doseamento de proteínas brutas, pontos (5.2.) e (5.3.).

5.4. *Ensaio em branco*

Efectuar um ensaio em branco, aplicando o modo operatório na ausência da amostra para analisar.

6. **Cálculo dos resultados**

Deduzir o volume do ácido sulfúrico consumido no ensaio em branco do que foi gasto pela amostra. 1 ml de ácido sulfúrico 0,1 N corresponde a 1,4 mg de azoto.

Multiplicar a quantidade do azoto pelo factor 6,25. Expressar o resultado em percentagem de amostra.

Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar:

— 0,4 em valor absoluto, para os teores inferiores a 20 %,

— 2,0 %, em valor relativo, para os teores compreendidos entre 20 e 40 %;

— 0,8 em valor absoluto, para os teores superiores a 40 %.

7. **Observações**

7.1. Os valores obtidos pelo presente método não têm ligação directa com a digestibilidade «in vivo».

7.2. Aos produtos cujo teor de matérias gordas ultrapasse 10 % deve ser extraída previamente a gordura com éter de petróleo (eb. 40-60 °C).

4. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA PEPSINA

1. **Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite controlar a actividade da pepsina utilizada para o doseamento de proteínas brutas solubilizadas pela pepsina e pelo ácido clorídrico.

2. **Princípio**

A hemoglobina é tratada, em condições definidas, pela pepsina em meio clorídrico. A fracção não hidrolizada das proteínas é precipitada pelo ácido tricloroacético. Ao filtrado é adicionado hidróxido de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu. A densidade óptica desta solução é medida a 750 nm e a quantidade de tirosina que lhe corresponde é lida numa curva-padrão.

Definição: A unidade de pepsina é definida como a quantidade desta enzima que liberta, por minuto, nas condições do método, uma quantidade de grupos hidroxiaril cuja coloração pelo reagente de Folin-Ciocalteu tem uma densidade óptica correspondente à de uma mole de tirosina, nas mesmas condições.

3. **Reagentes**

3.1. Ácido clorídrico 0,2 N.

3.2. Ácido clorídrico 0,06 N.

3.3. Ácido clorídrico 0,025 N.

3.4. Solução a 5 % (p/v) de ácido tricloroacético

3.5. Solução de hidróxido de sódio 0,5 N

3.6. Reagente de Folin-Ciocalteu. Introduzir 100 g de tungstato de sódio ($Na_2WO_4 . 2H_2O$), 25 g de molibdato de sódio ($Na_2MoO_4 . 2H_2O$) e 700 ml de água num balão de fundo redondo de 2 l de colo esmerilado normalizado. Juntar 50 ml de ácido fosfórico (d : 1,71) e 100 ml de ácido clorídrico concentrado (d : 1,19), ajustar ao balão um refrigerador de refluxo, aquecer até à ebulição e manter a solução em ebulição suave durante 10 h. Deixar arrefecer, desligar o refrigerador de refluxo. Adicionar 175 g de sulfato de lítio ($Li_2SO_4 . 2H_2O$), 50 ml de água e 1 ml de bromo. Ferver durante 15 minutos para eliminar o excesso de bromo.

Deixar arrefecer, transvasar a solução num balão aferido de 1 litro, completar o volume com água, homogeneizar e filtrar. Não poderá subsistir qualquer coloração esverdeada. Antes de utilizar, diluir um volume de reagente com dois volumes de água.

3.7. Solução de hemoglobina: Pesar uma quantidade de hemoglobina, substrato proteico de Anson (cerca de 2 g) correspondente a 354 mg de azoto (1) e introduzir num balão de 200 ml de colo esmerilado normalizado. Juntar alguns ml de ácido clorídrico (3.2.), ligar o balão à bomba de vácuo e agitar até à dissolução completa da hemoglobina. Desligar o vácuo e adicionar, agitando sempre, o ácido clorídrico (3.2.) para completar a 100 ml. *Preparar inmediatamente antes de utilizar.*

3.8. Solução-padrão de tirosina: dissolver 181,2 mg de tirosina em ácido clorídrico (3.1.) e completar para 1 litro com o mesmo ácido (soluçãomãe). Recolher 20,0 ml e diluir para 100 ml pelo ácido clorídrico (3.1.). 1 ml desta solução contém 0,2 mole de tirosina.

4. **Instrumentos**

4.1. Banho-maria, rgulado a 25 °C ± 0,1 °C por ultratermóstato.

4.2. Espectrofotómetro.

4.3. Cronómetro, precisão: 1 segundo.

4.4. Aparelho medidor de pH.

5. **Modo operatório**

5.1. *Preparação da solução* (v. observação 7.1)

Dissolver 150 mg de pepsina em 100 ml de ácido clorídrico (3.2.). Recolher com uma pipeta 2 ml da solução, introduzi-los num balão aferido de 50 ml e completar o volume com ácido clorídrico (3.3.). O pH, verificado no aparelho medidor de pH, deve ser de 1,6 ± 0,1. Mergulhar o balão no banho-maria (4.1.).

5.2. *Hidrólise*

Introduzir com a pipeta num tubo de ensaio 5,0 ml de solução de hemoglobina (3.7.), elevar a temperatura a 25 °C em banho-maria (4.1.), adicionar 1,0 ml da solução de pepsina obtida em (5.1.) e misturar, com uma haste de vidro engrossada numa extremidade, com cerca de 10 movimentos de vaivém. Manter o tubo de ensaio no banho a 25 °C durante 10 minutos, contados exactamente a partir da adição da solução de pepsina (a duração e a temperatura devem ser rigorosamente respeitadas). Em seguida, juntar 10,0 ml de solução de ácido tricloroacético (3.4.) a 25 °C, homogeneizar e filtrar num filtro seco.

5.3. *Desenvolvimento da coloração e medida da densidade óptica*

Recolher com uma pipeta 5,0 ml do filtrado, introduzi-los num erlenmeyer de 50 ml, adicionar 10,0 ml de solução de hidróxido de sódio (3.5.) e, agitanto sempre, 3,0 ml do reagente diluído de Folin-Ciocalteu (3.6.). Após 5 a 10 minutos, determinar a densidade óptica da solução em espectrofotómetro, a 750 nm em «cuvettes» de 1 cm de espessura, por comparação com a água.

(1) Determinar o teor de azoto por um semi-microkjeldahl (concentração teórica: 17,7 % de azoto).

5.4. *Ensaio em branco*

Para cada determinação, proceder a um ensaio em branco como se segue: Introduzir num tubo de ensaio com uma pipeta 5,0 ml de solução de hemoglobina (3.7.), elevar a temperatura a 25 °C num banho-maria (4.1.), adicionar 10,0 ml de solução de ácido tricloroacético (3.4.) a 25 °C, homogeneizar e adicionar em seguida, 1,0 ml da solução de pepsina obtida em (5.1.). Misturar com uma vareta de vidro e manter o tubo de ensaio exactamente 10 minutos no banho-maria (4.1.) a 25 °C. Homogeneizar e filtrar num filtro seco. Prosseguir como indicado em (5.3.).

5.5. *Curva-padrão*

Introduzir em erlenmeyer de 50 ml volumes de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ml de solução-padrão de tirosina (3.8.), correspondente, respectivamente, a quantidades de tirosina de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 moles. Completar a série por um testemunho sem tirosina. Completar os volumes para 5,0 ml com ácido clorídrico (3.1.). Adicionar 10,0 ml de solução de hidróxido de sódio (3.5.) e, agitando sempre 3,0 ml de reagente diluído de Folin-Ciocalteu (3.6.). Medir a densidade óptica como indicado em (5.3.), na última frase. Traçar a curva-podrão, correlacionando as densidades ópticas com as quantidades de tirosina.

6. **Cálculo dos resultados**

Ler na curva-padrão a quantidade de tirosina, em mole, correspondente à densidade óptica da solução corada, diminuída dos valores do ensaio em branco.

A actividade da pepsina, em mole de tirosina por mg e por minuto, a 25 °C, é dada pela fórmula:

$$\text{Unidades por mg (V/mg)} = \frac{0{,}32\ a}{p}$$

em que:

a — quantidade de tirosina, em µmole, lida na curva-padrão

p — peso em mg da quantidade de pepsina adicionada em 5.2.

7. **Observações**

7.1. A quantidade de pepsina a pôr em solução deve ser escolhida de maneira a obter, na medição fotométrica final, uma densidade óptica de 0,35 ± 0.035.

7.2. Duas unidades por mg obtidas pelo presente método correspondem a: 3,64 miliunidades Anson/mg (µmole de tirosina/mg min a 35,5 °C) ou 36.400 unidades comerciais/g (µmole de tirosina/ g em 10 min a 35,5 °C).

5. DOSEAMENTO DO GOSSIPOL LIVRE E TOTAL

1. **Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite dosear o gossipol livre, o gossipol total e as substâncias quimicamente aparentadas, nas sementes, farinhas e bagaços de algodão, assim como nos alimentos compostos que os contêm. O limite inferior do doseamento é de 20 ppm.

2. **Princípio**

O gossipol é extraído em presença de 3-amino-1-propanol, quer por uma mistura de isopropanol e de hexano para o doseamento do gossipol livre, quer pela dimetilformamida, para o doseamento do gossipol livre, quer pela dimetilformamida, para o doseamento do gossipol total. O gossipol é transformado por meio de anilina em gossipol-dianilina, cuja densidade óptica é medida em 440 nm.

3. **Reagentes**

3.1. Mistura de isopropanol-hexano: misturar 60 partes de isopraponol p.a. com 40 partes de volume de hexano normal, volume por volume.

3.2. Solvente A: Deitar num balão aferido de 1 l, cerca de 500 ml da mistura de isopropanol-hexano (3.1.), 2 ml de 3-amino-1-propanol, 8 ml de ácido acético glacial e 50 ml de água. Completar o volume com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Este reagente é estável durante uma semana.

3.3. Solvente B: Deitar, com uma pipeta, num balão aferido de 100 ml, 2 ml de 3-amino-1-propanol e 10 ml de ácido acético glacial. Deixar arrefecer até à tempertura ambiente e completar o volume com N,N-dimetilformamida. Este reagente é estável durante uma semana.

3.4. Anilina p.a.: *se a densidade óptica do ensaio em branco exceder 0,022,* destilar a anilina em pó de zinco, eliminando as primeiras e últimas fracções de 10 % do líquido destilado. Em frasco bem rolhado de vidro escuro e no frigorífico este reagente conserva-se vários meses.

3.5. Solução-padrão A de gossipol: Deitar, num balão aferido de 250 ml, 27,9 mg de acetato de gossipol. Dissolver e completar o volume com o solvente A (3.2.). Introduzir com uma pipeta 50 ml desta solução num balão aferido de 250 ml e completar o volume com o solvente A. A concentração em gossipol desta solução é de 0,02 mg/ml. Deixar repousar durante 1 hora à temperatura ambiente, antes de utilizar.

3.6. Solução-padrão B de gossipol: Deitar, num balão aferido de 50 ml, 27,9 mg de acetato de gossipol. Dissolver e completar o volume com o solvente B (3.3.). A concentração em gossipol desta solução é de 0,5 mg/ml.

Conservados ao abrigo da luz, as soluções padrão A e B de gossipol são estáveis durante 24 horas.

4. **Instrumentos**

4.1. Misturador basculante: cerca de 35 rotações por minuto

4.2. Espectrofotómetro.

5. **Modo operatório**

5.1. *Toma de ensaio*

A toma de ensaio está relacionada com o que se calcula ser o teor de gossipol da amostra total. É preferível trabalhar com uma pequena toma de ensaio e com uma alíquota do filtrado relativamente importante, de maneira a obter uma quantidade de gossipol suficiente para efectuar uma medida fotométrica precisa. *Para o doseamento do gossipol livre* nas sementes, nas farinhas e nos bagaços de algodão, a toma de ensaio não deve exceder 1 g; para os alimentos compostos poderá atingir 5 g. Na maioria dos casos, uma alíquota de 10 ml do filtrado é conveniente: deverá conter 50 a 100 mg de gossipol. *Para o doseamento de gossipol* total, a toma de ensaio poderá variar de 0,5 a 5 g para que uma alíquota de 2 ml do filtrado contenha 40 a 200 µg de gossipol.

A análise deve ser feita a uma tempertura ambiente próxima de 20 °C.

5.2. *Doseamento do gossipol livre*

Introduzir a toma de ensaio num balão de colo esmerilado de 250 ml, com o fundo coberto de vidro moído. Adicionar com uma pipeta 50 ml de solvente A (3.2.), rolhar o balão e misturar durante uma hora no misturador-basculante. Filtrar num filtro seco e recolher o filtrado num pequeno balão de colo esmerilado. Durante a filtração, cobrir o funil com um vidro de relógio. Introduzir com uma pipeta em dois balões aferidos de 25 ml (A e B) alíquotas idênticas de filtrado contendo 50 a 100 µg de gossipol. Completar eventualmente o volume para 10 ml com o solvente A (3.2.). Completar em seguida para 25 ml o conteúdo do balão (A) com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Esta solução será utilizada como solução de referência para a medição da solução da amostra.

Introduzir com uma pipeta 10 ml do solvente A (3.2.) respectivamente em dois outros balões aferidos de 25 ml (C e D). Completar o conteúdo do balão (C) com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Esta solução do ensaio em branco.

Adicionar 2 ml de anilina (3.4.) em cada um dos balões (D) e (B). Aquecer durante 30 minutos num banho-maria em ebulição para fazer desenvolver a coloração. Arrefecer até à temperatura ambiente, completar para 25 ml com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.), homogeneizar e deixar repousar durante uma hora.

Determinar em espectrofotómetro a 440 nm, em cuvetes de vidro de 1 cm, a densidade óptica da solução do ensaio em branco (D), por comparação com a solução de referência (C) e a densidade óptica da solução da amostra (B) por comparação com a solução de referência (A).

Subtrair a densidade óptica da solução do ensaio em branco da densidade óptica da solução da amostra (= densidade óptica corrigida). Calcular, a partir deste valor, o teor de gossipol livre, com indicado em 6.

5.3. *Doseamento do gossipol total*

Introduzir uma amostra contendo de 1 a 5 mg de gossipol num balão aferido de 50 ml e adicionar 10 ml de solvente B (3.3.). Preparar simultaneamente um ensaio em branco, introduzindo 10 ml de solvente B (3.3.) noutro balão aferido de 50 ml. Aquecer os dois balões durante 30 minutos num banho-maria em ebulição. Arrefecer até à temperatura ambiente e completar o conteúdo de cada balão até ao volume de aferição com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Homogeneizar e deixar depositar durante 10 a 15 minutos, filtrar em seguida e recolher os filtrados em balões de colo esmerilado.

Deitar com uma pipeta 2 ml do filtrado da amostra em cada um de dois outros balões aferidos de 25 ml e 2 ml do filtrado do ensaio em branco em cada um de dois outros balões de 25 ml. Retirar um balão de cadà série e completar os conteúdos respectivos para 25 ml com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Estas soluções serão utilizadas como soluções de referência.

Adicionar 2 ml de anilina (3.4.), respectivamente, a cada um dos dois outros balões. Aquecer durante 30 minutos num banho de água a ferver para fazer desenvolver a coloração. Arrefecer até à temperatura ambiente, completar para 25 ml com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.), homogeneizar e deixar repousar durante uma hora.

Determinar a densidade óptica, como indicado em (5.2.) para o gossipol livre. Calcular, a partir deste valor, o teor do gossipol total, como indicado em 6.

6. **Cálculo dos resultados**

O cálculo dos resultados pode fazer-se, quer a partir da densidade óptica específica (6.1.), quer por referência a uma curva-padrão (6.2.).

6.1. *A partir da densidade óptica específica*

Nas condições descritas, as densidades ópticas específicas são as seguintes:

gossipol libre: $E\,{}^{1\,\%}_{1\,cm} = 625$

gossipol total: $E\,{}^{1\,\%}_{1\,cm} = 600$

O teor de gossipol livre ou total da amostra é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{gossipol } \% = \frac{E \cdot 1250}{E\,{}^{1\,\%}_{1\,cm} \cdot p \cdot a}$$

em que:

E = densidade óptica corrigida, determinada como indicado em (5.2.)

p = amostra em g,

a = alíquota do filtrado em ml.

6.2. *A partir de uma curva-padrão*

6.2.1. *Gossipol livre*

Preparar duas séries de 5 balões aferidos de 25 ml. Em cada série, introduzir com uma pipeta nos balões, respectivamente, 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 e 10,0 ml da solução-padrão A de gossipol (3.5). Completar os volumes para 10 ml com solvente A (3.2.) Completar cada série com um testemunho constituído por um balão aferido de 25 ml contendo unicamente 10 ml de solvente A (3.2.).

Completar para 25 ml o volume dos balões da primeira série (incluindo o testemunho) com a mistura isopropanol-hexano (3.1.) (série de referência).

Juntar 2 ml de anilina (3.4.) em cada balão da segunda série (incluindo o testemunho). Aquecer durante 30 minutos num banho-maria em ebulição para fazer desenvolver a coloração. Arrefecer até à temperatura ambiente, completar o volume com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.), homogeneizar e deixar repousar durante 1 hora (série-podrão).

Determinar, nas condições indicadas em (5.2.), a densidade óptica das soluções da série-padrão, por comparação com as soluções correspondentes da série de referência. Traçar graficamente a solução-padrão, inscrevendo as densidades ópticas em correlação com as quantidades de gossipol (em µg).

6.2.2. *Gossipol total*

Preparar 6 balões aferidos de 50 ml. Introduzir no primeiro balão 10 ml de solvente B (3.3.) e nos outros, respectivamente, 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 e 10,0 ml da solução-padrão B de gossipol (3.6.). Completar o conteúdo de cada balão para 10 ml com solvente B (3.3.). Aquecer durante 30 minutos num banho-maria em ebulição. Arrefecer até à temperatura ambiente, completar o volume com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.) e homogeneizar.

Introduzir 2, 0 ml destas soluções, respectivamente, em duas séries de 6 balões aferidos de 25 ml. Completar para 25 ml o conteúdo dos balões da primeira série com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.) (série de referência).

Adicionar 2 ml de anilina (3.4.) a cada balão da 2ª série. Aquecer durante 30 minutos num banho-maria em ebulição. Arefecer até à temperatura ambiente, completar o volume com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.), homogeneizar e deixar repousar durante 1 hora (série-padrão).

Determinar nas condições indicadas em (5.2.), a densidade óptica das soluções da série-padrão, por comparação com as soluções correspondentes da série de referência. Traçar graficamente a curva-padrão, inscrevendo as densidades ópticas em correlação com as quantidades de gossipol (em µg).

6.3. *Reprodutibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas, efectuadas na mesma amostra, não deve ultrapassar:

— 15 %, em valor relativo, para os teores de gossipol inferiores a 500 ppm,

— 75 ppm, em valor absoluto, para os teores compreendidos entre 500 e 750 ppm,

— 10 %, em valor relativo, para os teores superiores a 750 ppm.

ANEXO II

1. DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DO GRUPO DAS TETRACICLINAS

1. Objecto e domínio e aplicação

Este método permite revelar e identificar os antibióticos do grupo das tetraciclinas nos alimentos que contenham pelo menos em 0,1 ppm destes, nos concentrados e nas pré-misturas.

2. Princípio

A amostra é submetida a extracção por uma mistura de metanol e de ácido clorídrico. O extracto é cromatografado em papel, por via ascendente, em comparação com as soluções de referência. Os antibióticos são revelados e identificados por comparação dos seus valores Rf, com os das substâncias-padrão, quer por fluorescência aos UV (fortes concentrações de antibióticos), quer por bioautografia em meio de ágar-ágar, inoculado com B. cereus.

3. Reagentes e meio de cultura

3.1. *Tampão, pH 3,5*

Ácido cítrico monohidratado p.a.	10,256 g
Fosfato dissódico NA_2HPO_4 $2H_2O$ p.a.	7,45 g
Acetona p.a.	300 ml
Água destilada para	1 000 ml

3.2. *Tampão de fosfato, pH 5,5*

Fosfato monopotássico KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Fosfato dissódico $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ p.a.	6,947 g
Agua destilada para	1 000 ml

3.3. Eluente I: Mistura de nitrometano puro/clorofórmio puro/ α-dicloridrina: 20/10/1,5 em volume. Preparar no momento da utilização.

3.4. Eluente II: mistura de nitrometano puro/clorofórmio puro/α-picolino: 20/10/3 em volume. Preparar no momento da utilização.

3.5. Mistura de metanol puro/ácido clorídrico (d : 1,19): 98/2 em volume.

3.6. Ácido clorídrico 0,1 N.

3.7. Amoníaco, d: 0,91.

3.8. Substâncias-padrão: clorotetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina cuja actividade é expressa em cloridrato.

3.9. *Microorganismo: B. cereus ATCC nº* 11.778

Conservação da estirpe, preparação da suspensão de esporos e inoculação do meio de cultura: aplicar as prescrições 3.1 e 3.2 do método de doseamento da clorotetraciclina, da oxitetraciclina e da tetraciclina por difusão em ágar-ágar, constantes da Parte 2 do presente anexo.

3.10. *Meio de cultura* (1)

Glicosa	1 g
Peptona trípsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levedura	3 g
Ágar-ágar	20 g
Água destilada para	1 000 ml

Ajustar o pH a 5,8 no momento da utilização.

3.11. Solução a 0,1 % (p/v) de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e 5 % (p/v) de glicose.

4. Instrumentos

4.1. Aparelhagem de cromatografia ascendente em papel (altura do papel: 25 cm). Papel Schleicher e Schüll 2040 b ou 2043 b, ou equivalente.

4.2. Centrífugadora.

4.3. Estufa de incubadora, regulada a 30 °C.

4.4. Lâmpada UV para detecção da fluorescência.

4.5. Placas de vidro de cerca de 20 × 30 cm, permitindo a montagem de uma caixa achatada para a bioautografia.

5. Soluções-padrão

5.1. *Soluções-mãe*

Preparar, a partir das substâncias-padrão (3.8.) com ácido clorídrico (3.6.), soluções cuja concentração corresponda, respectivamente, a 500 µg de clorotetraciclina-HCl por ml e de tetraciclina-HCl por ml.

5.2. *Soluções de referência para a detecção aos UV*

Diluir as soluções (5.1.) com tampão fosfato (3.2.) para obter soluções cuja concentração corresponda a 100 µg de clorotetraciclina-HCl, de oxitetraciclina-HCl e de tetraciclina-HCl por ml.

5.3. *Soluções de referência para a detecção por bioautografia*

Diluir as soluções (5.1.) com tampão fosfato (3.2.) para obter soluções cuja concentracão corresponda a 5 µg de clorotetraciclina-HCl, de oxitetraciclina-HCl e de tetraciclina-HCl por ml.

6. Extracção

Sempre que se espera uma concentração de antibiótico inferior a 10 ppm, pode utilizar-se quer a amostra homogeneizada, quer a fracção mais fina separada através de uma peneira, dado que os antibióticos se encontram preferencialmente nesta fracção.

Ressuspender a amostra na mistura (3.5.) e centrifugar. Recolher o sobrenadante para utilizar tal como esteja, ou dilui-lo, se necessário com a mistura (3.5.), para obter concentrações de antibiótico de cerca de 100 µg (6.1.) e 5 µg (6.2.) por ml.

7. Detecção e identificação

7.1. *Cromatografia*

Mergulhar o papel na solução tampão pH 3,5 (3.1.). Eliminar o excesso de líquido comprimindo o papel entre folhas de papel de filtro seco. Em seguida, depositar no papel, volumes de 0,01 ml

(1) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que conduza aos mesmos resultados.

das soluções de referência (5.2. e 5.3.) e do extracto (6.1. e 6.2.). Para obter uma boa separação é muito importante, o teor apropriado de humidade do papel; deixar secar ligeiramente, se necessário.

Revelar por cromatografia ascendente. Utilizar o eluente I (3.3.) para a detecção por bioautografia, o eluente II (3.4.) para a detecção aos UV. Logo que a linha de frente do solvente atingir 15 a 20 cm de altura (cerca de 1 h 30 m), interromper a cromatografia e secar o papel.

7.2. *Detecção aos UV*

Logo que a concentração de antibiótico seja superior a 1 µg/cm², observam-se manchas fluorescentes douradas por irradiação com UV (4.4.), após tratamento do cromatograma por vapores amoniacais (3.7.).

7.3 *Detecção por bioautografia*

Deitar o meio de cultura (3.10.), previamente inoculado com B. cereus (3.9.), sobre placas de vidro (4.5.) e colocar o papel sobre o meio de cultura. Depois de 5 minutos de contacto, tirar o papel e colocá-lo sobre um outro ponto do meio de cultura, onde deve ser mantido durante o período de incubação. Incubar em seguida, durante uma noite, na estufa a 30 °C. A presença de um antibiótico do grupo das tetraciclinas reconhece-se por zonas de inibição claras no meio de cultura turvo.

Para fixar o cromatograma, vaporiza-se a solução (3.11.) sobre o papel, depois da incubação.

7.4. *Identificação*

Dão-se a seguir os valores Rf relativos dos antibióticos do grupo das tetraciclinas. Estes valores podem variar ligeiramente, conforme a qualidade do papel e o seu teor de humidade.

Clorotetraciclina (CTC)	0,60
Tetraciclina (TC)	0,40
Oxitetraciclina (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

Os compostos «epi» têm uma actividade antibiótica inferior à dos compostos normais.

2. DOSEAMENTO DA CLOROTETRACICLINA, DA OXITETRACICLINA E DA TETRACICLINA

A. POR DIFUSÃO EM ÁGAR-ÁGAR

1. **Objecto e domínio da aplicação**

Este método permite dosear a clorotetraciclina (CTC), a oxitetraciclina (OTC) e a tetraciclina (TC) nos alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior do doseamento é de 5 ppm. Os teores inferiores a 5 ppm podem ser estimados por extrapolação gráfica.

2. **Princípio**

Para os teores iguais ou inferiores a 50 ppm, a amostra é submetida a extracção pela formamida diluída. Para os teores superiores a 50 ppm, procede-se à extracção por uma mistura de acetona, água e ácido clorídrico para o doseamento da CTC, e por uma mistura de metanol e de ácido clorídrico para o doseamento da OTC e da TC.

Os extractos são em seguida diluídos e a sua actividade antibiótica é determinada pela medição da difusão da CTC, da OTC ou da TC, em meio de ágar-ágar, inoculado com B. cereus. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença de um microrganismo. O diâmetro dessas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

3. **Microrganismo: B. cereus ATCC nº 11.778**

3.1. *Conservação da estirpe*

Inocular *B cereus* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.) sem azul de metileno nem ácido bórico. Incubar durante uma noite a cerca de 30 °C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar, de 14 em 14 dias para ágar-ágar inclinado.

3.2. *Preparação da suspensão de esporos*

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.). com 2 a 3 ml de soro fisiológico (4.5.). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 300 ml do meio de cultura (4.1.), sem azul de metileno nem ácido bórico, com uma concentração de ágar-ágar de 3 a 4 %. Incubar 3 a 5 dias a 28-30 °C, recolher em seguida os esporos em 15 ml de etanol (4.6.), depois de ter verificado a esporulação ao microscópio, e homogeneizar. Esta suspensão pode ser conservada no frigorífico durante 5 meses, pelo menos.

Por ensaios preliminares em placas com o meio de base do doseamento (4.1.), determinar a quantidade de inóculo que permite obter, para as diferentes concentrações de antibiótico utilizadas, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que estejam ainda límpidas. Esta quantidade é geralmente de 0,2 a 0,3 ml/1 000 ml. A inoculação do meio de cultura faz-se entre 50 e 60 °C.

4. **Meios de cultura e reagentes**

4.1. *Meio de base do doseamento* (1)

Glicose	1 g
Peptona trípsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levedura	3 g
Ágar-ágar, segundo a quantidade	10 a 20 g
Tween 80	1 ml
Tampão fosfato, pH 5,5 (4.2)	10 ml
Solução de ácido bórico a 5 % (p/v)	15 ml
Solução etanólica de azul de metileno a 5 %	4 ml
Água destilada para	1 000 ml
Ajustar a pH 5,8 antes da utilização	

4.2. *Tampão fosfato, pH 5,5*

Fosfato monopotássico KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Fosfato disódico $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ p.a.	6,947 g
Água destilada para	1 000 ml

4.3. Tampão fosfato, pH 5,5 diluído a 1/10.

4.4 *Tampáo fosfato, pH 8*

Fosfato monopotássico KH_2PO_4 p.a.	1,407 g
Fosfato dissódico $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ p.a.	57,539 g
Água destilada para	1 000 ml

4.5. Soro fisiológico esterilizado

4.6. Etanol a 20 % (v/v).

4.7. Ácido clorídrico 0,1 N.

(1) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que conduza aos mesmos resultados.

4.8. Formamida a 70 % (v/v): preparar, de fresco, antes de utilizar e ajustar o pH 4,5 com ácido sulfúrico 2 N, aproximadamente.

4.9. Mistura de acetona pura/água/ácido clorídrico (d : 1,19): 65/33/2, em volume.

4.10. Mistura de metanol puro/ácido clorídrico (d: 1,19): 98/2 em volume.

4.11. Substâncias-padrão: CTC, OTC, TC cuja actividade é expressa em cloridrato.

5. Soluções-padrão

5.1. *Clorotetraciclina*

Preparar, a partir da substância-padrão (4.11.) com ácido clorídrico (4.7.) uma solução-mãe cuja concentração corresponda a 500 µg de clorotetraciclina-HCl por ml. Esta solução conserva-se uma semana no frigorífico.

A partir desta solução-mãe, preparar uma solução-padrão de trabalho S_8 cuja concentração corresponda a 0,2 µg de clorotetraciclina-HCl por ml. A diluição é feita com tampão fosfato, pH 5,5, diluído 1/10 (4.3.), com 0,01 % de negro de amido (1).

Preparar em seguida, por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão (4.3.), as seguintes concentrações:

S_4 0,1 µg/ml
S_2 0,05 µg/ml
S_1 0,025 µg/ml

5.2. *Oxitetraciclina*

Procedendo como indicado em (5.1.), preparar, a partir de uma solução-mãe cuja concentração corresponda a 400 µg de oxitetraciclina-HCl por ml, uma solução-padrão de trabalho S_8 a 1,6 µg de oxitetraciclina-HCl por ml e as seguintes concentrações:

S_4 0,8 µg/ml
S_2 0,4 µg/ml
S_1 0,2 µg/ml

5.3. *Tetraciclina*

Procedendo com indicado em (5.1.), preparar, a partir de uma solução-mãe cuja concentração corresponda a 500 µg de tetraciclina-HCl por ml, uma solução-padrão de trabalho S_8 a 1,0 µg de tetraciclina-HCl por ml e as seguintes concentrações:

S_4 0,5 µg/ml
S_2 0,25 µg/ml
S_1 0,125 µg/ml

6. Extracção

6.1. *Teores iguais ou inferiores a 50 ppm*

Tratar a amostra pela formamida (4.8.), segundo as indicações dadas no quadro abaixo inserido. Agitar durante 30 minutos numa mesa vibratórioa. Diluir imediatamente a seguir com tampão fosfato (4.3.), segundo as indicações dadas no quadro abaixo inserido, para se obter a concentração U_8. A concentração de formamida desta solução não deve ultrapassar 40 %. Centrifugar ou deixar decantar de forma a obter uma solução límpida.

Preparar em seguida as concentrações U_4, U_2 e U_1, por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão fosfato (4.3.).

(1) O negro de amido serve para caracterizar as zonas de inibição das soluções-padrão (aneis azuis).

Antibiótico	CTC		OTC		TC	
Concentração esperada em ppm	10	50	10	50	10	50
Amostra em g	10	10	24	9,6	20	10
ml de formamida (4.8.)	100	100	80	100	80	100
ml de tampão fosfato (4.3.)	dil. 1 : 5 (a)	dil. 1 : 25 (b)	70	200	120	dil. 1 : 5 (a)
Concentração U_8 em µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(a) Recolher 20 ml de extracto e completar para 100 ml com o tampão num balão aferido.
(b) Recolher 4 ml de extracto e completar para 100 ml com o tampão num balão aferido.

6.2. *Teores superiores a 50 ppm*

6.2.1. *Clorotetraciclina*

Tratar, segundo a concentração esperada de antibiótico da amostra total ou a sua garantia de fabrico, uma toma de ensaio de 2 a 10 g por 20 vezes o seu volume de mistura (4.9.). Agitar durante 30 minutos em mesa vibratória. Verificar que o pH se mantém inferior a 3 no decorrer da extracção; se for necessário, ajustar a pH 3 (para os compostos minerais, com ácido acético a 10 %), Recolher uma alíquota do extracto e ajustar o pH a 5,5, com tampão fosfato, pH 8 (4.4.) em presença de verde de bromocresol (passagem do amarelo a azul). Diluir com o tampão fosfato, pH 5,5 diluído 1/10 (4.3.) para obter a concentração U_6 (ver 6.1.).

Preparar, em seguida, as concentrações U_4, U_2 e U_1 por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão fosfato (4.3.).

6.2.2. *Oxitetraciclina e tetraciclina*

Proceder como indicado em (6.2.1.), substituindo mistura (4.9.) pela mistura (4.10.).

7. **Método de doseamento**

7.1. *Inoculação do meio de cultura*

Inocular a 50-60 °C o meio de base do doseamento (4.1.) com a suspensão de esporos (3.2.).

7.2 *Preparação das placas*

A difusão em ágar-ágar efectua-se em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S_8, S_4, S_2, S_1) e as 4 concentrações do extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de tal forma que se possam fazer no meio de ágar-ágar, pelo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade de meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 2 mm de espessura, aproximadamente. É preferível utilizar placas de vidro munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica completamente liso de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com a pipeta nas cavidades quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico, compreendidas entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer pelo menos 4 repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

7.3. *Incubação*

Incubar as placas durante cerca de 18 horas a 28-30 °C.

8. **Avaliação**

Medir o diâmetro das zonas de inibição, de preferência por projecção. Inscrever as medidas em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas representativas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências, as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Actividade real = actividade esperada × actividade relativa

9. **Reprodutibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

B. POR TURBIDIMETRIA

1. **Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite dosear a clorotetraciclina (CTC), a oxitetraciclina (OTC) e a tetraciclina (TC) em concentrações superiores a 1 g/kg desde que nenhuma outra substância interfira dando lugar a extractos túrbidos. Este método é mais rápido do que o método de difusão em ágar-ágar.

2. **Princípio**

A amostra é submetida a extracção por uma mistura de acetona, água e ácido clorídrico para o doseamento de CTC, e por uma mistura de metanol e de ácido clorídrico para o doseamento de OTC e TC.

Os extractos são em seguida diluídos e o seu efeito antibiótico é determinado pela medição da transmissão luminosa de um meio de cultura inoculado com Staphylococcus aureus, com adição do antibiótico. A transmissão luminosa é função da concentração do antibiótico.

3. **Microrganismo: Staphilococcus aureus K 141** (1)

3.1. *Conservação da estirpe*

Inocular *S. aureus* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.), *com adição de 1,5 a 3 % de ágar-ágar* (conforme a qualidade). Incubar durante uma noite a 37 °C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar de 4 em 4 semanas para ágar-ágar inclinado. Preparar simultaneamente subculturas para uso de laboratório.

3.2. *Preparação do inóculo*

Repicar 24 horas antes da sua utilização, uma subcultura para ágar-ágar inclinada e incubar durante uma noite a 37 °C. Ressuspender a totalidade da cultura de um tubo de ágar-ágar em cerca de 2 ml do meio de base (4.1.) e transvasar em seguida a suspensão em condições de esterilidade em cerca de 100 ml, aproximadamente, do mesmo meio de base (4.1.). Incubar em banho-maria a 37 °C, até que o cresimento da estirpe entre na fase logarítmica (1 h 30 a 2 h).

(1) Esta estirpe, isolada pela LUFA en Kiel, apresenta um crescimento mais rápido do que *S. aureus ATCC 6538 P.*

4. **Meio de cultura e reagentes**

4.1. *Meio de base do doseamento* (1)

Peptona	5 g
Extracto de levedura	1,5 g
Extracto de carne	1,5 g
Cloreto de sódio	3,5 g
Glicose	1,0 g
Fosfato monopotássico KH_2PO_4 p.a.	1,32 g
Fosfato bipotássico K_2HPO_4 p.a.	3,68 g
Água destilada para	1 000 ml

pH depois da esterilização: 6,8 a 7,0

4.2. *Tampão fosfato, pH 4,5*

Fosfato monopotássico KH_2PO_4 p.a.	13,6 g
Agua destilada para	1 000 ml

4.3. Ácido clorídrico 0,1 N.

4.4. Mistura de acetona pura/água/ácido clorídrico (d: 1,19): 65/33/2 em volume.

4.5. Mistura de metanol puro/ácido clorídrico (d: 1,19): 98/2 em volume.

4.6. Solução de formaldeído a, aproximadamente, 10 % (p/v).

4.7. Substâncias-padrão: CTC, OTC, TC, cuja actividade é expressa em cloridrato.

5. **Solução-padrão**

Preparar, a partir da substância-padrão (4.7.) com ácido clorídrio (4.3.), uma solução-mãe cuja concentração corresponda a 400 a 500 µg de CTC-HCl, OTC-HCl ou TC-HCl por ml. Esta solução conserva-se uma semana no frigorífico.

6. **Extracção**

6.1. *Clorotetraciclina*

Introduzir num balão aferido de 200 ou 250 ml uma amostra de 1 a 2 g. Adicionar cerca de 100 ml da mistura (4.4.) e agitar durante 30 minutos sobre uma mesa vibratória. Completar o volume com tampão fosfato, pH 4,5 (4.2.). Homogeneizar e deixar depositar.

6.2. *Oxitetraciclina e tetraciclina*

Introduzir num balão aferido de 200 ou 250 ml uma amostra de 1 a 2 g. Adicionar 100 ml, aproximadamente, da mistura (4.5.) e agitar durante 30 minutos sobre a mesa vibratória. Completar, o volume com tampão fosfato, pH 4,5 (4.2.). Homogeneizar e deixar depositar.

7. **Método de doseamento**

7.1. *Preparação de séries-padrão e de extracto*

Diluir de forma apropriada com tampão fosfato, pH 4,5 (4.2.) a solução-padrão (5.) e extracto (6.) de forma a obter uma série de concentrações que permita estabelecer, para cada doseamento, uma curva-padrão e a interpolação, nesta curva, de pelo menos dois valores relativos ao extracto. As diluições devems er escolhidas em função das condições de crescimento da estirpe, que podem variar de um laboratório para outro. Procede-se geralmente, como se segue:

(1) Podo ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e conduzindo aos mesmos resultados.

7.1.1. *Clorotetraciclina*

Diluir a solução-padrão (5.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma solução-padrão de trabalho cuja concentração corresponda a 0,2 µg de CTC-HCl por ml. Preparar seguidamente com tampão fosfato (4.2) como indicado a seguir e em tubos destinados ao doseamento, 6 diluições, com uma repetição de cada diluição.

ml de solução-padrão de trabalho	ml de tampão fosfato (4.2.)	concentração de CTC-HCl (µg/ml)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Diluir o extracto (6.1.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma concentração esperada de CTC-HCl de 0,12 µg/l. Introduzir 1 ml desta solução em 2 tubos e 0,75 ml (= 0,09 µg) em outros 2 tubos. Completar o volume destes últimos para 1 ml com tampão fosfato (4.2.).

7.1.2. *Oxitetraciclina e tetraciclina*

Diluir a solução-padrão (5.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma solução uma solução-padrão de trabalho cuja concentração corresponda a 0,6 µg de OTC-HCl ou de TC-HCl por ml. Preparar em seguida com tampão fosfato (4.2.), como indicado a seguir, e nos tubos destinados ao doseamento, 7 diluições com uma repetição de cada diluição.

ml de solução-padrão de trabalho	ml de tampão fosfato (4.2.)	concentração em OTC-HCl ou CT-HCl (1µg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Diluir o extracto (6.2.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma concentração téorica de OTC-HCl ou TC-HCl de 0,48 µg/ml. Introduzir 1 ml desta solução em 2 tubos e 0,5 ml (= 0,24 µg) em outros 2 tubos. Completar o volume destes últimos para 1 ml com tampão de fosfato (4.2).

7.2. *Inoculação do meio de cultura*

Inocular o meio de base de doseamento (4.1.) com o inóculo (3.2.), de forma a obter no fotómetro em 590 nm, uma transmissão luminosa de 85 %, numa «cuvette» de 5 cm, ou 92 % numa «cuvette» de 2 cm, estando o aparelho regulado para 100 % de transmissão com o meio de base (4.1.) não inoculado.

7.3. *Inoculação*

Introduzir em cada tubo (7.1.1. ou 7.1.2.) 9 ml do meio de cultura inoculado (7.2.). O enchimento dos tubos deve fazer-se correctamente, mas não necessariamente em condições de esterilidade.

7.4. *Incubação*

A incubação deve fazer-se, obrigatoriamente, num banho-maria cuja temperatura seja mantida homogeneamente a 37 °C ± 0,1 °C, por agitação. O tempo de incubação deve ser escolhido de forma a poder traçar curvas de transmissão, cuja inclinação seja adequada a medições rigorosas (geralmente 2 h 30 a 3 h). Bloquear em seguida o crescimento, injectando rapidamente 1 ml de solução de formaldeído (4.6.) em cada tubo.

7.5. *Medição do crescimento*

Medir as transmissões no fotómetro a 590 nm, regulando o aparalho para 100 % de transmissão com a solução-padrão mais límpida (correspondente ao teor mais elevado de antibiótico). Em virtude das fracas diferenças de turbidez apresentadas por diferentes tubos, recomenda-se a utilização de cuvettes de 2 cm, pelo menos, e, de preferência, de 5 cm.

8. **Cálculo dos resultados**

Traçar graficamente a curva-padrão em papel milimétrico, marcando as transmissões fotométricas em correlação com as concentraçãoes de antibiótico. Interpolar na curva as transmissões relativas ao extracto. Calcular o teor de antibiótico da amostra.

9. **Reprodutibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

3. DOSEAMENTO DA OLEANDOMICINA

— por difusão em ágar-ágar —

1. **Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite dosear a oleandomicina em alimentos, concentrados e pré-misturas, mesmo em presença de tetraciclina. O limite inferior do doseamento é de 0,5 ppm.

2. **Princípio**

A amostra é submetida a extracção por uma solução metanólica diluída de tris (hidroximetil) aminometano. Depois da centrifugação, o extracto é diluído e a sua actividade antibiótica determinada pela medição da difusão da oleandomicina em meio de ágar-ágar inoculado com *B. cereus*. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença do microrganismo. O diâmetro destas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

3. **Microrganismo B. cereus K 205 TR** (1) (resistente às tetraciclinas)

3.1. *Conservação da estirpe*

Inocular *B. cereus* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.) com adição de 100 µg de oxitetraciclina por 5 ml. Incubar durante uma noite a cerca de 30 °C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar de 4 em 4 semanas em ágar-ágar inclinado.

3.2. *Preparação da suspensão de esporos*

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.) com cerca de 3 ml de soro fisiológico (4.3.). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 300 ml do meio de cultura (4.1.) *cuja concentração de ágar-ágar seja de 3 a 4 %.* Incubar 3 a 5 dias a 28-30 °C, recolher em seguida os esporos em 15 ml de etanol (4.4.), depois de ter verificado a esporulação ao microscópio e homogeneizar. Esta suspensão pode ser conservada no frigorífico durante 5 meses, pelo menos.

Por ensaios preliminares em placas com o meio de base de doseamento (4.2.), determinar a quantidade de inóculo, que permite obter, para as diferentes concentrações de oleandomicina utilizadas, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que sejam ainda límpidas. Esta quantidade é geralmente de 0,1 a 0,2 ml/1 000 ml. A inoculação do meio de cultura faz-se a 60 °C.

(1) Estirpe isolada pela LUFA, em Kiel.

4. **Meios de cultura e reagentes**

4.1. *Meio de conservação da estirpe* (1)

Glicose	1 g
Peptona trípsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levedura	3 g
Ágar-ágar, conforme a qualidade	10 a 20 g
Água destilada para	1 000 ml

Ajustar o pH a 6,5 no momento da utilização.

4.2. *Meio de base de doseamento* (1)

Meio (4.1.) ajustado a pH 8,8

4.3. Soro fisiológico esterilizado

4.4. Etanol a 20 % (v/v)

4.5. Metanol puro

4.6. Solução de tris (hidroximetil) aminometano p.a. a 5 % (p/v)

4.7. *Solução de extracção*

Metanol puro	50 ml
Água destilada	50 ml
Tris (hidroximetil) aminometano p.a.	0,5 g

4.8. Substância-padrão: oleandomicina de actividade conhecida.

5. **Solução-padrão**

Dissolver a substância-padrão (4.8.) em 5 ml de metanol (4.5.) e diluir com a solução (4.6.) para se obter uma concentração em oleandomicina de 100 µg/ml.

A partir desta solução-mãe preparar, diluindo com a solução (4.6.), uma solução-padrão de trabalho S_8 contendo 0,1 µg de oleandomicina por ml. Preparar em seguida, por diluições sucessivas (1 + 1) com a solução (4.6.), as seguintes soluções:

S_4	0,05	µg/ml
S_2	0,025	µg/ml
S_1	0,0125	µg/ml

6. **Extracção**

Recolher, conforme a concentração esperada de oleandomicina da amostra, uma toma de ensaio de 2 a 10 g, adicionar 100 ml da solução (4.7.) e agitar durante 30 minutos na mesa vibratória.

Centrifugar, recolher uma alíquota do extracto e diluir com a solução (4.6.) para obter uma concentração teórica de oleandomicina de 0,1 µg/ml (= U_8). Preparar em seguida as concentrações U_4, U_2 e U_1 por diluições sucessivas (1 + 1) com a solução (4.6.).

(1) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e conduzindo aos mesmos resultados.

7. **Método de doseamento**

7.1. *Inoculação do meio de cultura*

Inocular a 60 °C o meio de base do doseamento (4.2.) com a suspensão de esporos (3.2.).

7.2. *Preparação das placas*

A difusão em ágar-ágar é efectuada em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S_8, S_4, S_2, S_1) e as 4 concentrações do extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de forma a que se possam fazer, no meio de ágar-ágar, pelo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade do meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 2 mm, aproximadamente de espessura. É preferível utilizar placas de Petri munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica perfeitamente plano de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com uma pipeta nas cavidades quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico, compreendidas entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer pelo menos 4 repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

7.3. *Incubação*

Incubar as caixas durante cerca de 18 h a 28-30 °C.

8. **Avaliação**

Medir o diâmetro das zonas de inibição de preferência por projecção. Inscrever os valores de medições em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\frac{(U1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Actividade real = actividade esperada × actividade relativa.

9. **Reprodutibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

4. DOSEAMENTO DA TILOSINA

— por difusão em ágar-ágar —

1. **Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite dosear a tilosina em alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior do doseamento é de 2 ppm.

2. **Princípio**

A amostra é tratada por uma solução de tampão fosfato a pH 8, previamente aquecido a 80 °C, e submetida em seguida a extracção pelo metanol. Após centrifugação, o extracto é diluído e a sua actividade antibiótica determinada pela medição da difusão da tilosina num meio de ágar-ágar, inoculado com a *Sarcina lutea*. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença do microrganismo. O diâmetro destas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

3. **Microrganismo Sarcina lutea ATCC nº 9341**

3.1. *Conservação da estirpe*

Inocular *Sarcina lutea* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.), com o pH ajustado a 7,0. Incuabar durante uma noite a cerca de 35 °C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar todos os meses para ágar-ágar inclinado.

3.2. *Preparação da suspensão de bactérias*

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.) de preparação recente, com 2 a 3 ml de soro fisiológico (4.4.). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 250 ml do meio de cultura (4.1.), com o pH ajustado a 7,0. Incubar durante 24 horas a 35 °C, recolher as bactérias com 25 ml de soro fisiológico (4.4.). Homogeneizar e diluir esta suspensão para obter uma transmissão luminosa de cerca de 75 % a 650 nm.

Conservada no frigorífico, esta suspensão é utilizável durante uma semana.

Por ensaios preliminares em placas com o meio de base de doseamento (4.1.), determinar a quantidade de inóculo que permite obter, para as diferentes conoentrações de tilosina utilizada, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que estejam ainda límidas. A inoculação do meio de cultura é feita a 48—50 °C.

4. **Meios de cultura e reagentes**

4.1. *Meio de base do doseamento* (1)

Glicose	1 g
Peptona trípsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levedura	3 g
Ágar-ágar, conforme a qualidade	10 a 20 g
Água destilada para	1 000 ml

Ajustar no momento da utilização a pH 7,0 para a conservação da estirpe e a preparação da suspensão de bactérias e a pH 2,0 para o doseamento.

4.2. *Tampão fosfato pH 8*

Fosfato monopotássico KH_2PO_4	0,523 g
Fosfato bipotássico K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Água destilada para	1 000 ml

4.3. *Tampão fosfato, pH 7*

Fosfato monopotássico KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
Fosfato bipotássico K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Água destilada para	1 000 ml

4.4. Soro fisiológico esterilizado

4.5. Metanol puro

4.6. Metanol a 10 % (v/v)

4.7. Mistura tampão fosfato (4.2.)/metanol puro: 60/40, em volume.

4.8. Substância-padrão: tilosina de actividade conhecida.

(1) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial, de composição análoga e conduzindo aos mesmos resultados.

5. **Soluções padrão**

Secar a substância-padrão (4.8.) durante 3 h a 60 °C numa estufa de vácuo (5 mm de mercúrio). Pesar 10 a 50 mg num balão aferido, dissolvê-los em 5 ml de metanol (4.5.) e diluir a solução com o tampão fosfato, pH 7 (4.3.) para obter uma concentração de tilosina-base de 1 000 µg/ml.

A partir desta solução-mãe, preparar, diluindo com a mistura (4.7.), uma solução-padrão de trabalho S_8 contendo 2 µg de tilosina-base por ml.

Preparar em seguida, por meio de diluições sucessivas (1 + 1), com a mistura (4.7), as seguintes concentrações:

S_4	1	µg/ml
S_2	0,5	µg/ml
S_1	0,25	µg/ml

6. **Extracção**

Recolher, para os concentrados, uma toma de ensaio de 10 g; para as prémisturas e alimentos, uma toma de ensaio de 20 g. Adicionar 60 ml de tampão fosfato, pH 8 (4.2.), previamente aquecido a 80 °C, e homogeneizar durante 2 minutos (electrodoméstico, Ultra-turrax, etc.).

Em seguida, deixar repousar 10 minutos, adicionar 40 ml de metanol (4.5.) e homogeneizar durante 5 minutos. Centrifugar, recolher uma alíquota do extracto e diluir com a mistura (4.7.) para obter uma concentração teórica de tilosina de 2 µg/ml (= U_8). Preparar em seguida as concentrações U_4, U_2 e U_1, por meio de diluições sucessivas (1 + 1) com a mistura (4.7).

Para os teores inferiores a 10 ppm, fazer evaporar o extracto a seco num evaporador rotativo a 35 °C e ressuspender o resíduo em metanol a 40 % (4.6).

7. **Método de doseamento**

7.1. *Inoculação do meio de cultura*

Inocular a 48—50 °C o meio de base do doseamento (4.1.), ajustado a pH 8,0 pela suspensão de bactérias (3.2.).

7.2. *Preparação das placas*

A difusão em ágar-ágar efectua-se em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S_8, S_4, S_2, S_1) e as 4 concentrações do extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de tal forma que se possam fazer, no meio de ágar-ágar, pelo menos, 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade do meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 2 mm de espessura. É preferível utilizar placas de Petri munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica perfeitamente plana de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com uma pipeta nas cavidades, quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico compreendida entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer, pelo menos, quatro repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

7.3. *Incubação*

Incubar as placas durante uma noite a 35-37 °C.

8. **Avaliação**

Medir o diâmetro das zonas de inibição, de preferência, por projecção. Inscrever as medidas em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Actividade real = actividade esperada × actividade relativa.

9. **Reprodutibilidade**

A diferença entre os resultádos de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

5. DOSEAMENTO DA VIRGIANIMICINA

— por difusão em ágar-ágar —

1. **Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite dosear a virginiamicina em alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior do doseamento é de 2 ppm.

2. **Princípio**

A amostra é submetida a extracção por uma solução metanólica de Tween 80. Após centrifugação ou filtração, o extracto é diluído e a sua actividade antibiótica determinada pela medição da difusão da virginiamicina em meio de ágar-ágar inoculado com Sarcina lutea. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença do microrganismo. O diâmetro dessas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

3. **Microrganismo: Sarcina lutea ATCC nº 9341**

3.1. *Conservação da estirpe*

Inocular S. lutea em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.). Incubar durante uma noite a cerca de 35 °C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar de 14 em 14 dias em ágar-ágar inclinado.

3.2. *Preparação da suspensão de bactérias*

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.), de preparação recente, com 2 a 3 ml de soro fisiológico (4.3.). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 250 ml do meio de cultura (4.1.). Incubar durante 24 horas a 35 °C, recolher as bactérias com 25 ml de soro fisiológico (4.3.). Homogeneizar e diluir esta suspensão para obter uma transmissão luminosa de cerca de 75 % a 650 nm. Conservada no frigorífico, esta suspensão pode ser utilizada durante uma semana.

Por ensaios preliminares em placas com meio de base do doseamento (4.1.), determinar a quantidade de inóculo que permite obter, para as diferentes concentrações de virginiamicina utilizadas, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que estejam ainda límpidas. A inoculação do meio de cultura é feita a 48-50 °C.

4. **Meios de cultura e reagentes**

4.1. *Meio de base do doseamento* (1)

Glicose	1 g
Peptona trípsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levadura	3 g
Ágar-ágar, conforme a qualidade	10 a 20 g
Água destilada para	1 000 ml
Ajustar o pH a 6,5 antes da utilização	

(1) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que conduza aos mesmos resultados.

4.2. *Tampão de fosfato, pH 6*

Fosfato monopotássico KH_2PO_4 p.a.	8,0 g
Fosfato bipotássico K_2HPO_4 p.a.	2,0 g
Água destilada para	1 000 ml

4.3. Soro fisiológico esterilizado

4.4. Metanol puro

4.5. Mistura tampão fosfato (4.2.)/metanol puro: 80/20, em volume.

4.6. Solução metanólica de Tween 80 a 0,5 % (p/v).

4.7. Substância-padrão: virginiamicina de actividade conhecida.

5. **Solução-padrão**

Preparar uma solução metanólica de substância-padrão (4.7.) a 800 µg de virginiamicina por ml. A partir desta solução-mãe, preparar, diluindo com a mistura (4.5.) uma solução-padrão de trabalho S_8, contendo 1 µg de virginiamicina por ml. Preparar em seguida, por meio de diluições sucessivas (1 + 1) com a mistura (4.5.), as seguintes concentrações:

S_4	0,5 µg/ml
S_2	0,25 µg/ml
S_1	0,125 µg/ml

6. **Extracção**

6.1. *Produtos cujo teor em virginiamicina é igual ou inferior a 50 ppm*

Recolher uma amostra de 10 a 20 g, adicionar 100 ml da solução (4.6.) e agitar durante 30 minutos na mesa vibratória. Centrifugar ou filtrar, recolher 20 ml da solução límpida e evaporá-los a seco, num evaporador rotativo. Ressuspender o resíduo em 20 ml, ou mais da mistura (4.5.) para obter uma concentração teórica de virginiamicina de 1 µg/ml (= U_8). Preparar em seguida as concentrações U_4, U_2 e U_1 por meio de diluições sucessivas (1 + 1) com a mistura (4.5).

6.2. *Produtos com um teor de virginiamicina superior a 50 ppm*

Recolher uma amostra de 1 a 10, adicionar 100 ml da solução (4.6.) e agitar durante 30 minutos na mesa vibratória. Centrifugar ou filtrar e diluir em seguida com a mistura (4.5.) para obter uma concentração teórica de virginiamicina de 1 µg/ml (= U_8). Preparar em seguida as concentrações U_4, U_2 e U_1, como indicado em (6.1.).

7. **Método de doseamento**

7.1. *Inoculação do meio de cultura*

Inocular a 48-50 °C o meio de base do doseamento (4.1.) com a suspensão de bactérias (3.2).

7.2. *Preparação das placas*

A difusão em ágar-ágar efectua-se em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S_8, S_4, S_2, S_1) e as 4 concentrações do extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de maneira a que se possam fazer, no meio de ágar-ágar, pelo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade de meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 20 mm de espessura. É preferível utilizar placas de Petri munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica perfeitamente plano, de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com uma pipeta nas cavidades quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico compreendidas entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer pelo menos 4 repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição

7.3. *Incubação*

Incubar as placas durante cerca de 18 horas a 28-30 °C.

8. **Avaliação**

Medir o diâmetro das zonas de inibição, de preferência, por projecção. Inscrever as medidas em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências, as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0{,}602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Actividade real = actividade esperada × actividade relativa.

9. **Reprodutibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.