

371L0393

20. 12. 71

Jornal Oficial das Comunidades Europeias

Nº L 279/7

SEGUNDA DIRECTIVA DA COMISSÃO**de 18 de Novembro de 1971****que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais**

(71/393/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 comunitários, para o controlo oficial dos alimentos para animais ⁽¹⁾ e, nomeadamente, o seu artigo 2º,

Considerando que a Directiva acima referida prevê que, para verificar se são respeitadas as condições prescritas por força das disposições legislativas, regulamentares ou administrativas respeitantes à qualidade e composição dos alimentos para animais, os controlos oficiais dos elementos para animais sejam efectuados segundo os modos de colheita de amostras e os métodos de análise comunitários;

Considerando que a Directiva nº 71/250/CEE de Comissão, de 15 de Junho de 1971 ⁽²⁾, fixou já um certo número de métodos de análise comunitários; que, tendo em conta o avanço dos trabalhos efectuados desde então, convém adoptar uma segunda série de métodos;

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

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

Os Estados-membros determinam que as análises para os controlos oficiais dos alimentos para animais no que diz respeito aos respectivos conteúdos de humidade, bases azotadas voláteis, fósforo total e matérias gordas brutas, sejam efectuadas segundo os métodos descritos no anexo da presente directiva.

As disposições gerais constantes da Parte I do anexo (Introdução) 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 da presente directiva.

Artigo 2º

Os Estados-membros porão em vigor, em 1 de Janeiro 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 3º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 18 de Novembro de 1971.

*Pelo Comissão**O Presidente*

Franco M. Malfatti

⁽¹⁾ JO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

⁽²⁾ JO nº L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.

ANEXO

1. DOSAGEM DE HUMIDADE

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar o teor de humidade dos alimentos para animais. Não diz respeito à análise dos produtos lácteos enquanto alimentos simples para animais, à análise das substâncias minerais e das misturas essencialmente compostas de substâncias minerais, assim como à análise das sementes e frutos oleaginosos definidos no Regulamento (CEE) n.º 136/66 do Conselho, de 22 de Setembro de 1966, que estabelece uma organização comum de mercado no sector das matérias gordas ⁽¹⁾.

A determinação do teor de humidade das sementes e frutos oleaginosos é descrita no Anexo II do Regulamento (CEE) n.º 1470/68 da Comissão, de 23 de Setembro de 1968, relativo à toma e redução das amostras, assim como à determinação do teor de óleo, de impurezas e de humidade das sementes oleaginosas ⁽²⁾.

2. Princípio

A amostra é dessecada em condições definidas que variam em função da natureza do alimento. A perda de massa é determinada por pesagem. É necessário proceder a uma pré-dessecação sempre que se trate de alimentos sólidos com um elevado teor de humidade.

3. Instrumentos

- 3.1. Triturador construído num material que não absorva a humidade, fácil de limpar e que permita uma trituração rápida e uniforme sem provocar aquecimento sensível, que evite o mais possível o contacto com o ar exterior, e que satisfaça as exigências indicadas em (4.1.1.) e 4.1.2.) (por exemplo, microtritadores de martelos ou com arrefecimento por água, moinhos de cones desmontáveis, trituradores de movimento lento ou de discos dentados).
- 3.2. Balança analítica, com uma precisão de 0,5 mg.
- 3.3. Recipientes secos de metal inoxidável ou de vidro, munidos de uma tampa hermética; superfície útil que permita obter uma repartição da amostra da ordem de 0,5 g por cm².
- 3.4. Estufa isotérmica (± 1 °C) de aquecimento eléctrico, com uma regulação rápida da temperatura e convenientemente ventilada ⁽³⁾.
- 3.5. Estufa a vácuo, com aquecimento eléctrico regulável, munida de uma bomba de óleo e, quer de um dispositivo de introdução de ar quente desidratado, quer de um desidratante por ex., óxido de cálcio).

Exsicador com placa de metal ou de porcelana espessa, perfurada, contendo um desidratante eficaz.

4. Modo operativo

NB: As operações descritas neste capítulo devem ser efectuadas imediatamente após a abertura das embalagens que contêm as amostras.

As análises devem ser efectuadas pelo menos em duplicado.

⁽¹⁾ JO n.º 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.

⁽²⁾ JO n.º L 239 de 28. 9. 1968, p. 2.

⁽³⁾ Para dessecação dos cereais, assim como das farinhas e sêmolos grossas e finas, a estufa deve ter uma capacidade calorífica tal que, regulada previamente à temperatura de 131 °C, possa atingir de novo esta temperatura menos de 45 minutos após a colocação do número máximo de amostras a secar simultaneamente. A estufa deverá ainda ter uma ventilação tal que, secando durante 2 horas todas as amostras de trigo mole que pode conter, os resultados apresentem uma diferença inferior a 0,15 % relativamente aos resultados obtidos após quatro horas de dessecação.

4.1. Preparação

4.1.1. Alimentos com excepção dos mencionados em (4.1.2.) e (4.1.3.)

Recolher pelo menos 50 g da amostra. Se for necessário, triturar ou dividir de maneira apropriada para evitar qualquer variação do teor de humidade (ver 6).

4.1.2. Cereais e sêmolas grossas

Recolher pelo menos 50 g da amostra. Moer em partículas, das quais pelo menos 50 % passem por uma peneira de malhas de 0,5 mm e não deixem mais de 10 % de resíduos sobre outro crivo de malhas redondas de 1 mm.

4.1.3. Alimentos líquidos ou pastosos, alimentos constituídos essencialmente de matérias gordas

Recolher e pesar, com uma aproximação de 10 mg, cerca de 25 g da amostra, adicionar-lhe uma quantidade apropriada de areia anidra, com uma aproximação de 10 mg misturar até à obtenção de um produto homogêneo.

4.2. Dessecação

4.2.1. Alimentos com excepção dos mencionados em (4.2.2.) e (4.2.3.)

Tarar, com uma aproximação de 0,5 g, um recipiente (3.3.) com a tampa. Pesar dentro dele, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g da amostra, repartindo-a uniformemente. Colocar o recipiente na estufa previamente aquecida a 103 °C, com a tampa tirada. Para evitar que a temperatura da estufa baixe muito, introduzir o recipiente num tempo mínimo. Deixar secar durante quatro horas, a partir do momento em que a estufa tiver atingido de novo a temperatura de 103 °C. Colocar a tampa sobre o recipiente, retirar este da estufa, deixar arrefecer durante 30 a 45 minutos no exsiccador (3.6.) e pesar com uma aproximação de 1 mg. No caso de alimentos constituídos essencialmente de matérias gordas, efectuar uma dessecação suplementar de 30 minutos na estufa a 103 °C. A diferença entre as duas pesagens não deve exceder 0,1 % de humidade.

4.2.2. Cereais, farinhas sêmolas grossas

Tarar, com uma aproximação de 0,5 g, um recipiente (3.3.) com a tampa. Pesar dentro dele, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g da amostra, repartindo-a uniformemente. Colocar o recipiente na estufa previamente aquecida a 130 °C, com a tampa tirada. Para evitar que a temperatura da estufa desça demais introduzir o recipiente num tempo mínimo. Deixar secar durante duas horas, a partir do momento em que a estufa tiver atingido de novo a temperatura de 130 °C. Colocar a tampa no recipiente, retirar este da estufa, deixar arrefecer 30 a 45 minutos no exsiccador (3.6.) e pesar com uma aproximação de 1 mg.

4.2.3. Alimentos compostos contendo mais de 4 % de sacarose ou de lactose: alimentos simples tais como alfarroba, produtos cereais hidrolisados, germes de malte, rodela de beterrabas, solutos de peixe e açúcares; alimentos compostos com mais de 25 % de sais minerais contendo água de cristalização

Tarar, com uma aproximação de 0,5 g, um recipiente (3.3.) com a tampa. Pesar dentro dele, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g da amostra repartindo-a uniformemente. Colocar o recipiente na estufa de vácuo (3.5.) previamente aquecida à temperatura de 80 a 85 °C, com a tampa tirada. Para evitar que a temperatura da estufa não desça demais, introduzir o recipiente num tempo mínimo.

Elevar a pressão a 100 Torr e deixar secar a esta pressão durante quatro horas, quer sob uma corrente de ar seco e quente, quer por meio de um desidratante (cerca de 300 g para 20 amostras). Neste último caso, cortar a ligação com a bomba de vácuo quando se atingir a pressão prescrita. Contar a duração da secagem a partir do momento em que a estufa tiver atingido de novo a temperatura de 80 a 85 °C. Levar em seguida com precaução a estufa até à pressão atmosférica. Abrir a estufa, cobrir imediatamente o recipiente com a tampa, retirá-lo da estufa, deixar arrefecer durante 30 a 45 minutos no exsiccador (3.6.) e pesar com uma aproximação de 1 mg. Proceder a uma secagem complementar de 30 minutos na estufa a vácuo à temperatura de 80 a 85 °C e pesar novamente. A diferença entre as duas pesagens não deve exceder 0,1 % de humidade.

4.3. Pré-dessecação

4.3.1. Alimentos, com excepção dos mencionados em (4.3.2.)

Os alimentos sólidos cujo teor de humidade é elevado e torna a trituração difícil, devem ser pré-dessecados como se segue:

Pesar, com uma aproximação de 10 mg, 50 g de amostra não triturada (pode efectuar-se uma divisão grosseira, se necessário, no caso dos alimentos comprimidos ou aglomerados) num recipiente apropriado (por exemplo, numa placa de alumínio de 20 × 12 cm com um bordo de 0,5 cm). Deixar secar numa estufa à temperatura de 60 a 70 °C até que o teor de humidade seja baixado até um valor entre 8 e 12 %. Retirar da estufa, deixar arrefecer a descoberto no laboratório durante 1 hora, e pesar com uma aproximação de 10 mg. Triturar imediatamente, como indicado em (4.1.1.) e efectuar a dessecação como indicado em (4.2.1.) ou (4.2.3.) segundo a natureza do alimento.

4.3.2. Cereais

As sementes com uma taxa de humidade superior a 17 % devem ser pré-dessecadas como se segue:

Pesar, com uma aproximação de 10 mg, 50 g de sementes não moídas num recipiente apropriado (por exemplo, numa placa de alumínio de 20 × 12 cm com bordo de 0,5 cm). Deixar secar numa estufa durante 5 a 7 minutos, à temperatura de 130 °C. Retirar da estufa, deixar arrefecer a descoberto no laboratório durante duas horas e pesar, com uma aproximação de 10 mg. Moer imediatamente, como indicado em (4.1.2.) e efectuar a dessecação, como indicado em (4.2.2.).

5. Cálculo dos resultados

O teor de humidade, em percentagem da amostra, é dado pelas seguintes fórmulas:

5.1. Dessecação sem pré-dessecação

$$(E - m) \cdot \frac{100}{E}$$

em que:

E = massa inicial da amostra, em gramas,

m = massa da amostra dessecada em gramas.

5.2. Dessecação com pré-dessecação

$$\left[\frac{(M' - m) M}{M'} + E - M \right] \cdot \frac{100}{E} = 100 \left(1 - \frac{Mm}{EM'} \right)$$

em que:

E = massa inicial da amostra, em gramas,

M = massa da amostra, depois da pré-dessecação, em gramas,

M' = massa da amostra depois da trituração ou moedura, em gramas,

m = massa da amostra seca, em gramas.

5.3. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 0,2 % de humidade.

6. Observações

Se for necessário uma trituração e dela resultar uma variação do teor de humidade do produto, os resultados da análise que dizem respeito aos componentes do alimento devem ser convertidos de acordo com o teor de humidade da amostra inicial.

2. DOSEAMENTO DAS BASES AZOTADAS VOLÁTEIS

A. POR MICRODIFUSÃO

1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite determinar o teor de bases azotadas voláteis, expressas em amoníaco, dos alimentos para animais.

2. Princípio

A amostra é extraída com água e a solução é clarificada e filtrada. As bases azotadas voláteis são extraídas por microdifusão, por meio de uma solução de carbonato de potássio, recolhidas numa solução de ácido bórico e tituladas com ácido sulfúrico.

3. Reagentes

3.1. Solução a 20 % (p/v) de ácido tricloroacético.

3.2. Indicador: dissolver 33 mg de verde de bromocresol e 65 mg de vermelho de metilo em 100 ml de etanol a 95-96 % (v/v).

3.3. Solução de ácido bórico: num balão aferido de 1 litro, dissolver 10 g de ácido bórico p.a. em 200 ml de etanol a 95-96 % (v/v) e 700 ml de água. Juntar 10 ml de indicador (3.2.). Misturar e, se necessário, ajustar a coloração da solução a vermelho claro, por adição de uma solução de hidróxido de sódio. 1 ml desta solução permite fixar, no máximo, 300 µg de NH₃.

3.4. Solução saturada de carbonato de potássio: dissolver 100 g de carbonato de potássio p.a. em 100 ml de água em ebulição. Deixar arrefecer e filtrar.

3.5. Ácido sulfúrico 0,02 N.

4. Instrumentos

4.1. Misturador basculante: cerca de 35 a 40 rotações por minuto.

4.2. Células de Conway (v. esquema) e de vidro ou matéria plástica.

4.3. Microburetas, graduadas em 1/100 ml.

5. Modo operatório

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 10 g de amostra e introduzir num balão aferido de 200 ml com 100 ml de água. Misturar durante 30 minutos no misturador basculante. Adicionar 50 ml de solução de ácido tricloroacético (3.1.), completar o volume com água, agitar vigorosamente e filtrar num filtro de pregas.

Introduzir com a pipeta, na parte central da célula de Conway, 1 ml de solução de ácido bórico (3.3.) e na parte periférica, 1 ml do filtrado da amostra. Cobrir parcialmente com a tampa com silicone. Introduzir rapidamente na parte periférica 1 ml de solução saturada de carbonato de potássio (3.4.) e fechar hermeticamente a tampa. Agitar suavemente a célula dando-lhe um movimento de rotação num plano horizontal, para misturar os dois reagentes. Deixar incubar durante quatro horas, pelo menos, à temperatura ambiente, ou, então, durante 1 hora a 40 °C.

Titular as bases voláteis na solução de ácido bórico por meio de ácido sulfúrico 0,02 N (3.5.), utilizando uma microbureta (4.3.).

Efectuar um *ensaio em branco* utilizando o mesmo método na ausência de amostra a analisar.

6. Cálculo dos resultados

1 ml de H_2SO_4 0,02 N corresponde a 0,34 mg de amoníaco.

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

Reprodutibilidade

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

10 % em valor relativo, para os teores de amoníaco inferiores a 1,0 %;

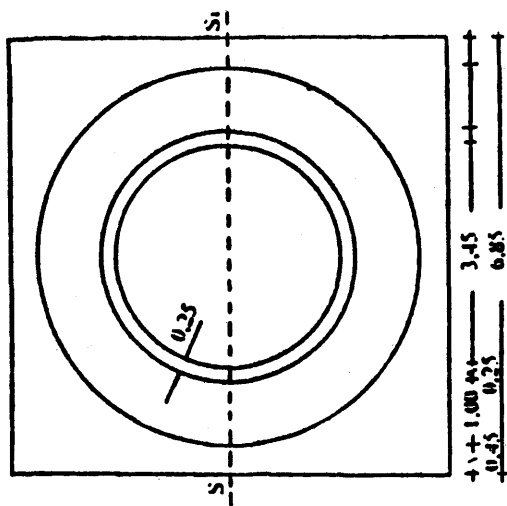
0,1 em valor absoluto para os teores de amoníaco iguais ou superiores a 1,0 %.

7. Observações

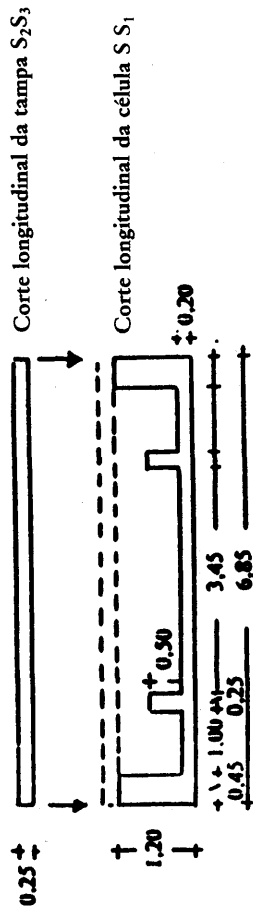
Se o teor de amoníaco da amostra for superior a 0,6 %, diluir o filtrado inicial.

CÉLULA DE CONWAY

Escala 1/1



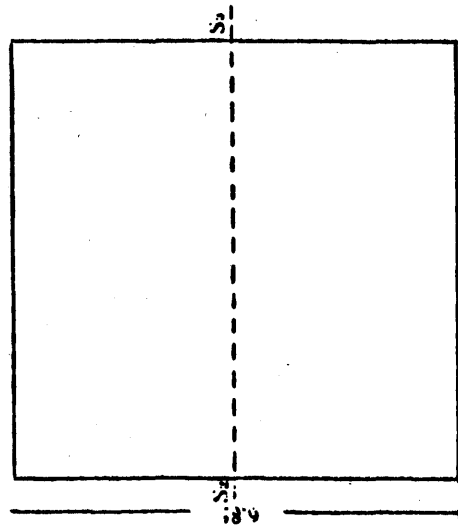
Corte transversal de célula



Corte longitudinal da tampa S_2S_3

Corte longitudinal da célula S_1

Corte transversal da tampa de vidro esmerilado



B. POR DESTILAÇÃO

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar o teor de bases azotadas voláteis expressas em amoníaco das farinhas de peixe que praticamente não contêm ureia. Só pode ser utilizado para os teores de amoníaco inferiores a 0,25 %.

2. Princípio

A amostra é extraída com água, a solução é clarificada e filtrada. As bases azotadas voláteis extraídas, em ebulição, por adição de óxido de magnésio e recolhidas numa quantidade de determinada de ácido sulfúrico cujo excesso é titulado por meio de uma solução de hidróxido de sódio.

3. Reagentes

- 3.1. Solução a 20 % (p/v) de ácido tricloroacético.
- 3.2. Óxido de magnésio p.a.
- 3.3. Emulsão de antiespuma (silicone por ex.).
- 3.4. Ácido sulfúrico 0,1 N.
- 3.5. Solução de hidróxido de sodio 0,1 N.
- 3.6. Solução a 0,3 % (p/v) de vermelho de metilo em etanol a 95-96 % (v/v).

4. Instrumentos

- 4.1. Misturador basculante: cerca de 35 a 40 rotações por minuto.
- 4.2. Aparelho de destilação do tipo Kjeldahl.

5. Método

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 10 g da amostra e introduzir, com 100 ml de água, num balão aferido de 200 ml. Misturar durante 30 minutos no misturador basculante. Adicionar 50 ml de solução de ácido tricloroacético (3.1), completar o volume com água, agitar vigorosamente e filtrar num filtro de pregas.

Recolher uma quantidade do filtrado límpido em função da concentração teórica de bases azotadas voláteis (geralmente 100 ml). Diluir para 200 ml e adicionar 2 g de óxido de magnésio (3.2.) e algumas gotas de emulsão anti-espuma (3.3.). O PH da solução deve ser alcalino quando verificado com papel tornesol; se não o for, adicionar mais óxido de magnésio (3.2.). Destilar cerca de 150 ml da solução num aparelho do tipo Kjeldahl, e recolher o destilado num erlenmeyer contendo um volume, exactamente medio (25 a 50 ml), de ácido sulfúrico 0,1 N (3.4.). Durante a destilação evitar um sobreaquecimento das paredes. Deixar ferver a solução sulfúrica durante dois minutos, arrefecer, e titular o excesso de ácido sulfúrico por meio de uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N (3.5.), em presença do indicador vermelho de metilo (3.6.).

Efectuar um *ensaio em branco* aplicando o mesmo método, na ausência de amostra a analisar.

6. Cálculo dos resultados

1 ml de H₂SO₄ 0,1 N corresponde a 1,7 mg de amoníaco.

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

Reprodutibilidade

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

3. DOSEAMENTO DO FÓSFORO TOTAL

Método fotométrico

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar o teor de fósforo total dos alimentos para animais. É particularmente indicado para a análise de produtos pobres em fósforo. Nalguns casos (produtos ricos em fósforo), pode ser aplicado um método gravimétrico.

2. Princípio

A amostra é mineralizada, quer por via seca (para os alimentos argânicos) quer por via húmida (para os compostos minerais e os alimentos líquidos) e posta em solução ácida. A solução é tratada pelo reagente vanadomolibdico. A densidade óptica da solução amarela assim formada é medida em espectrofotómetro a 430 nm.

3. Reagentes

- 3.1. Carbonato de cálcio p.a.
- 3.2. Ácido clorídrico p.a., d: 1,1 (cerca de 6 N).
- 3.3. Ácido azótico p.a., d: 1,045.
- 3.4. Ácido azótico p.a., d: 1,38 a 1,42.
- 3.5. Ácido sulfúrico p.a., d: 1,84.
- 3.6. Reagente vanadomolibdico: misturar 200 ml de solução de heptamolibdato de amónio (3.6.1.), 200 ml de solução de monovanadato de amónio (3.6.2.) e 134 ml de ácido azótico (3.4.) num balão aferido de 1 litro. Completar o volume com água.
 - 3.6.1. Solução de heptamolibdato de amónio: dissolver em água quente 100 g de heptamolibdato de amónio p.a. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Intar 10 ml de amoníaco (d: 0,91) e completar para 1 l com água.
 - 3.6.2. Solução de monovanadato de amonio: dissolver em 400 ml de água quente, 2,35 g de monovanadato de amónio p.a. NH_4VO_3 . Adicionar lentamente, e agitando sempre, 20 ml de ácido azótico diluído (7 ml de HNO_3 (3.4.) + 13 ml de H_2O) e completar a 1 l com água.
- 3.7. Solução-padrão a 1 mg/ml de fósforo: dissolver em água 4,387 g de fósforo de potássio didrogenado p.a. KH_2PO_4 . Completar para 1 l com água.

4. Instrumentos

- 4.1. Cadinhos de incineração de quartzo ou porcelana.
- 4.2. Mufla eléctrica com termostato regulado a 550 °C.
- 4.3. Retorta de Kjeldahl, 250 ml.
- 4.4. Balões aferidos e pipetas de precisão.
- 4.5. Espectrofotómetro.
- 4.6. Tubos de ensaio, diâmetro: cerca de 16 mm, de rosca normalizada 14,5; capacidade: 25 a 30 ml.

5. Modo operativo

5.1. Preparação da solução

Consoante a natureza da amostra, preparar uma solução tal como indicado em (5.1.1. ou 5.1.2.).

5.1.1. *Caso geral*

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 1 g de amostra. Introduzir a amostra numa retorta de Kjeldahl, adicionar 20 ml de ácido sulfúrico (3.5.) agitar para impregnar completamente a matéria de ácido e evitar que adira às paredes do balão, aquecer e manter em ebulição durante 10 minutos. Deixar arrefecer ligeiramente, adicionar 2 ml de ácido azótico (3.4.), aquecer lentamente, deixar arrefecer ligeiramente, juntar de novo um pouco de ácido azótico (3.4.) e fazer ferver. Repetir estas operações até à obtenção de uma solução incolor. Arrefecer, juntar um pouco de água, transvasar o líquido num balão aferido de 500 ml, passando a retorta por água quente. Deixar arrefecer, completar o volume com água, homogeneizar e filtrar.

5.1.2. *Amostras contendo matérias orgânicas e isentas de didrogenofosfatos de cálcio e de magnésio*

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 2,5 g de amostra num cadinho de incineração. Misturar intimamente a amostra a 1 g de carbonato de cálcio (3.1.). Calcinar na mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à obtenção de cinzas brancas ou cinzentas (uma pequena quantidade de carvão não prejudica).

Transvasar as cinzas num copo de precipitação de 250 ml. Juntar 20 ml de água e de ácido clorídrico (3.2.) até que cesse a efervescência. Juntar em seguida 10 ml de ácido clorídrico (3.2.) em excesso. Colocar o copo num banho de areia e evaporar a seco para insolubilizar o silício. Retomar o resíduo por meio de 10 ml de ácido azótico (3.3.) e fazer ferver, durante 5 minutos num banho de areia, sem evaporar a seco. Transvasar o líquido num balão aferido de 500 ml lavando o copo de precipitação várias vezes a água quente. Deixar arrefecer, completar o volume com água, homogeneizar e filtrar.

5.2. *Desenvolvimento da coloração e medição da densidade óptica.*

Diluir uma alíquota do filtrado obtido em (5.1.1.) ou (5.1.2.) para obter uma concentração em fósforo não superior a $40\text{ }\mu\text{g/ml}$. Introduzir 10 ml desta solução num tubo de ensaio (4.6.) e adicionar 10 ml do reagente vanadomolibdico (3.6.). Homogeneizar e deixar repousar 10 minutos, pelo menos à temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Medir a densidade óptica em espectrofotómetro a 430 nm por comparação com uma solução obtida por adição de 10 ml do reagente vanadomolibdico (3.6.) a 10 ml de água.

5.3. *Curva-padrão*

Preparar a partir da solução-padrão (3.7.) soluções contendo respectivamente 5, 10, 20, 30 e $40\text{ }\mu\text{g}$ de fósforo por ml. Recolher 10 ml de cada uma destas soluções e juntar-lhes 10 ml do reagente vanadomolibdico (3.6.). Homogeneizar e deixar repousar 10 minutos, pelo menos, à temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Medir as densidades ópticas nas condições indicadas em (5.2.).

Traçar a curva-padrão marcando em ordenadas os valores da densidade óptica e, em abcissas, as quantidades correspondentes de fósforo. A curva é linear para as concentrações compreendidas entre 0 e $40\text{ }\mu\text{g/ml}$.

6. *Cálculo dos resultados*

Determinar a quantidade de fósforo da amostra por referência à curva-padrão.

Expressar o resultado em percentagem da amostra.

Reprodutibilidade

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

3 % em valor relativo para os teores de fósforo inferiores a 5 %;

0,15 em valor absoluto para os teores de fósforo iguais ou superiores a 5 %.

4. DOSEAMENTO DAS MATÉRIAS GORDAS BRUTAS

1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar o teor de matérias gordas brutas de alimentos para animais. Não se refere à análise das sementes e frutos oleaginosos definidos no Regulamento 136/66/CEE do Conselho, de 22 de Setembro de 1966. A determinação do teor de óleo desses produtos é objecto do Anexo V do Regulamento (CEE) n° 1470/68 da Comissão, de 23 de Setembro de 1968.

Dois técnicas estão previstas em função da natureza do alimento.

1.1. *Método A (extração pelo éter)*: aplicado a todos os alimentos, salvo aos mencionados em (1.2.).

1.2. *Método B*: aplicado aos alimentos cujas matérias gordas não podem ser totalmente extraídas por éter dietílico sem hidrólise prévia, aos alimentos de origem animal, glúten, polpas secas de batata, resíduos secos das indústrias de cerveja e de destilaria, leveduras secas, desperdícios de bolachas, pães e alimentos cozidos, produtos lácteos e alimentos contendo uma forte proporção dos mesmos (pelo menos 40 %), e aos alimentos compostos enriquecidos em gorduras.

2. Princípio

2.1. *Método A*: as matérias gordas são extraídas pelo éter dietílico. O solvente é eliminado e o resíduo é seco e pesado.

2.2. *Método B*: a amostra é hidrolisada a quente pelo ácido clorídrico. A solução é arrefecida e filtrada. O resíduo, lavado e seco, é submetido à extração pelo éter dietílico segundo o Método A.

3. Reagentes

3.1. Éter dietílico, anidro, d: 0,720, p.e.: 34,5 °C, praticamente isento de peróxidos.

3.2. Sulfato de sódio p.a., anidro.

3.3. Ácido clorídrico 3 N.

3.4. Adjuvante de filtração, por ex. terra de diatomáceas, Hyflo-supercel.

3.5. Tetracloreto de carbono p.a.

4. Instrumentos

4.1. Extractor segundo Soxhlet ou aparelho equivalente.

4.2. Aparelho de aquecimento com temperatura regulável antideflagrante.

4.3. Estufa de dessecação por vácuo (menos de 100 Torr).

5. Modo operatório

5.1. *Método A* (ver observação 7.1.)

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 5 g de amostra e misturá-la a 2 a 3 g (ou mais, se necessário) de sulfato de sódio anidro (3.2.). Introduzir a mistura num cone de extração isento de matérias gordas e cobrir com uma rolha de algodão desengordurado. (A mistura pode fazer-se eventualmente no cone.)

Colocar o cone num extractor (4.1.) e extrair durante seis horas pelo éter dietílico (3.1.). Se se utiliza um extractor segundo Soxhlet, regular o aquecimento para obter pelo menos 15 ciclos por hora. Recolher o extracto num balão seco com alguns fragmentos de pedra-pomes (1) e tarado.

(1) Substituir os fragmentos de pedra-pomes por pérolas de vidro sempre que a matéria gorda deva ser objecto de exames qualitativos posteriores.

Eliminar o éter por destilação e secar em seguida o resíduo de evaporação durante uma hora e meia na estufa de dessecação por vácuo (4.3.) à temperatura de 75 °C. Arrefecer num exsiccador e pesar. Efectuar uma segunda dessecação durante 30 minutos para ter a certeza de que o peso da matéria gorda se mantém constante (a perda de peso deve ser inferior a 1 mg).

5.2. Método B

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 2,5 g de amostra (ver observação 7.2.) e introduzir num copo de precipitação de 400 ml ou num erlenmeyer de 300 ml. Adicionar 100 ml de ácido clorídrico 3 N (3.3.) e alguns fragmentos de pedra-pomes. Cobrir o copo com um vidro de relógio ou munir o erlenmeyer de um refrigerador de refluxo. Deixar ferver suavemente uma hora, à chama fraca ou sobre uma placa de aquecimento. Evitar que o produto adira às paredes do recipiente.

Arrefecer e adicionar uma quantidade de adjuvante de filtração (3.4.) suficiente para evitar qualquer perda de matéria gorda na filtração. Filtrar num filtro de papel duplo molhado e isento de matérias gordas. Lavar o resíduo com água fria até ao desaparecimento da reacção ácida. Verificar que o filtrado não contém matérias gordas. A presença destas no filtrado indica que antes da hidrólise deve ser efectuada uma extracção da amostra por éter dietílico, segundo o método indicado em (5.1.).

Colocar o filtro contendo o resíduo num vidro de relógio, secar durante uma hora e meia na estufa a uma temperatura de 95 a 98 °C.

Introduzir o filtro e o resíduo seco num cone de extracção, extrair pelo éter dietílico, e prosseguir como indicado em (5.1.), segundo parágrafo.

6. Cálculo dos resultados

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 0,3 % de matéria gordas.

7. Observações

7.1. Para os produtos de elevado teor de matérias gordas, difíceis de triturar ou não adequados à coheitada de uma amostra reduzida e homogénea, proceder como se segue. Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 20 g de amostra e misturá-las com 10 g ou mais de sulfato de sódio anidro (3.2.). Proceder à extracção pelo éter dietílico (3.1.) como indicado em (5.1.). Completar o extracto obtido para 500 ml com tetracloreto de carbono (3.5.) e homogeneizar. Recolher 50 ml da solução num pequeno balão seco, com alguns fragmentos de pedra-pomes⁽¹⁾ e tarado. Eliminar o solvente por destilação, secar e prosseguir como indicado em (5.1.) último parágrafo. Eliminar o solvente do resíduo de extracção que se encontra no cone, e triturar o resíduo até um calibre de 1 mm. Colocar de novo o produto no cone de extracção (não adicionar sulfato de sódio) extrair pelo éter dietílico e prosseguir como indicado em (5.1.), segundo e terceiro parágrafos.

Calcular o resultado em percentagem da amostra, tendo em conta a alíquota utilizada aquando da primeira extracção, segundo a fórmula seguinte:

$$(10 a + b) \cdot 5$$

em que

a = extracto etéreo em gramas da alíquota, depois da primeira extracção,

b = extracto etéreo em gramas depois da segunda extracção.

7.2. A amostra de produtos pobres em matérias gordas pode ser elevado a 5 g.

⁽¹⁾ Substituir os fragmentos de pedra-pomes por pérolas de vidro sempre que a matéria gorda deva ser objecto de exames qualitativos posteriores.