REGULAMENTO (CEE) Nº 3711/86 DA COMISSÃO

de 4 de Dezembro de 1986

que altera o Regulamento (CEE) nº 625/78 relativo às regras de aplicação da armazenagem pública de leite em pó desnatado

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

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

Tendo em conta o Regulamento (CEE) nº 804/68 do Conselho, de 27 de Junho de 1968, que estabelece a organização comum de mercado no sector do leite e dos produtos lácteos (1), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 1335/86 (2), e, nomeadamente, o nº 5 do seu artigo 7º,

Considerando que o Regulamento (CEE) nº 1014/68 do Conselho, de 20 de Julho de 1968, que estabelece as regras gerais por que se rege a armazenagem pública do leite em pó desnatado (3), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 1272/79 (4), dispõe no seu artigo 3º que o preço de intervenção se aplica ao leite em pó desnatado entregue num entreposto situado a uma distância máxima, a determinar, do local onde estava armazenado; que, se o entreposto onde o leite em pó desnatado é entregue estiver situado a uma distância superior a esta distância máxima, as despesas suplementares de transporte, a determinar com carácter fixo são suportadas pelo organismo de intervenção;

Considerando que o Regulamento (CEE) nº 625/78 da Comissão (5), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 2256/86 (6), fixou em 100 quilómetros a distância máxima em questão; que a experiência adquirida mostrou que esta distância máxima era insuficiente para permitir aos organismos e intervenção gerir, nas melhores condições possíveis, o acesso aos entrepostos públicos; que, por conseguinte, é conveniente elevar esta distância a 350 quilómetros;

Considerando que o Anexo I do Regulamento (CEE) nº 625/78, relativo à qualidade do leite em pó desnatado, prevê no nº 2 os métodos de controlo utilizados para a análise de determinados produtos; que se revela oportuno prever a referência às normas internacionais para a colheita de amostras;

Considerando que o Anexo IV do Regulamento (CEE) nº 625/78 prevê o método de doseamento do ácido siálico livre para determinação do soro de leite no leite em pó desnatado destinado à armazenagem pública; que este método era utilizado a título temporário até 31 de Março de 1986; que por conseguinte, é conveniente revogar o citado anexo;

Considerando que o Comité de Gestão do Leite e dos Produtos Lácteos não emitiu parecer no prazo fixado pelo seu presidente,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1º

O Regulamento (CEE) nº 625/78 é alterado do seguinte modo:

1. No nº 1 do artigo 5º, o termo « 100 quilómetros » é substituído pelo termo « 350 quilómetros ».

2. No nº 2, alínea a), do Anexo I, todos os termos « norma ISO » são substituídos pelo termo « norma internacional ISO ».

3. No nº 2 alínea b), do Anexo I, o segundo travessão passa a ter a seguinte redacção:

« — soro de leite:

doseamento dos glicomacropéptidos pela cromatografia líquida de alto rendimento (3) ».

4. Ao nº 2 do Anexo I, é aditada a alínea c) seguinte:

« c) A colheita das amostras será efectuada de acordo com o procedimento previsto pela norma internacional ISO 707; contudo, os Estados-membros podem utilizar um outro método de amostragem desde que conforme aos princípios da citada norma. »

5. No Anexo I, é suprimida a nota de pé-de-página (4).

6. É suprimido o Anexo IV.

7. O Anexo V passa a ter a redacção do anexo do presente regulamento.

Artigo 2º

O presente regulamento entra em vigor na data da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias.*

O disposto nos nºs 4 e 7 do presente regulamento é aplicável a partir de 2 de Fevereiro de 1987.

(1) JO nº L 148 de 28. 6. 1968, . 13.
(2) JO nº L 119 de 8. 5. 1986, p. 19.
(3) JO nº L 173 de 22. 7. 1968, p. 4.
(4) JO nº L 161 de 29. 6. 1979, p. 11.
(5) JO nº L 84 de 31. 3. 1978, p. 19.
(6) JO nº L 196 de 18. 7. 1986, p. 41.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e directamente aplicável em todos os Estados-membros.

Feito em Bruxelas, em 4 de Dezembro de 1986.

Pela Comissão

Frans ANDRIESSEN

Vice-Presidente

ANEXO

« ANEXO V

PESQUISA DE LACTOSSORO NO LEITE EM PÓ DESNATADO DESTINADO AO ARMAZENAMENTO PÚBLICO POR DOSEAMENTO DOS GLICOMACROPÉPTIDOS ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAR)

1. **Objectivo e campo de aplicação**

Este método permite colocar em evidência a presença de lactossoro no leite em pó desnatado destinado ao armazenamento público através do doseamento dos glicomacropéptidos.

2. **Referência**

Norma Internacional ISO 707 — Leite e produtos lácteos — Métodos de amostragem, conformes às indicações contidas no nº 2, alínea c), último parágrafo, do Anexo I.

3. **Definição**

Teor em glicomacropeptidos no leite em pó desnatado : teor em substâncias determinado de acordo com o método a seguir descrito e expresso em percentagem em massa.

4. **Princípio**

— reconstituição do leite em pó desnatado, eliminação das gorduras e proteínas com ácido tricloroacético e centrifugação,

— determinação da quantidade de glicomacropéptidos (GMP) presentes no sobrenadante por cromatografia líquida de alta resolução (CLAR),

— avaliação dos resultados obtidos nas amostras por comparação com amostras padrão constituídas por leite em pó desnatado com ou sem adição de uma percentagem conhecida de lactossoro em pó.

5. **Reagentes**

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica reconhecida. A água utilizada deve ser destilada ou água de pureza pelo menos equivalente.

5.1. *Solução de ácido tricloroacético*

Dissolver 240 g de ácido tricloroacético (Cl_3CCOOH) em água e completar até perfazer 1 000 ml.

5.2. *Solução eluente, pH 6,0*

Dissolver 1,74 g de fosfato dipotássico (K_2HPO_4), 12,37 g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) e 21,41 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) em aproximadamente 700 ml de água. Se necessário, ajustar o pH a 6,0 utilizando uma solução de ácido fosfórico ou hidróxido de potássio.

Completar com água até fazer 1 000 ml e homogeneizar.

Filtrar a solução eluente antes de a utilizar, através de uma membrana filtrante de porosidade 0,45 µm.

5.3. *Solução de lavagem e conservação das colunas*

Misturar um volume de acetonitrilo (CH_3CN) com nove volumes de água. Filtrar a mistura antes de a utilizar, através de uma membrana filtrante de porosidade 0,45 µm.

Nota : Pode ser utilizada qualquer outra solução de lavagem que tenha um efeito bactericida e que não altere o poder de resolução das colunas.

5.4. *Amostras padrão*

5.4.1. Leite em pó desnatado que satisfaz as exigências do Regulamento (CEE) nº 625/78, seja [0].

5.4.2. Idêntico leite em pó desnatado adulterado com 5 % (m/m) de lactossoro e pó de tipo coalhado e composição padrão, seja [5].

6. **Aparelhos**

6.1. Balança analítica.

6.2. Centrífuga susceptível de atingir uma força centrífuga de 2 200 g e dotada de tubos de centrífuga rolhados, com uma capacidade aproximada de 25 ml.

6.3. Agitador mecânico.

6.4. Agitador magnético.

6.5. Funis de vidro com cerca de 7 cm de diâmetro.

6.6. Papéis de filtro, filtração média, diâmetro aproximado de 12,5 cm.

6.7. Dispositivo de filtração em vidro, dotado de uma membrana filtrante de porosidade 0,45 µm.

6.8. Pipeta graduada que permite deitar 10 ml, em conformidade com a ISO 648, classe A ou ISO/R 835.

6.9. Banho de água com um termóstato regulado a 25 ± 0,5 °C.

6.10. Equipamento CLAR incluindo :

6.10.1. Bomba.

6.10.2. Injector manual ou automático, com uma capacidade de 15 a 30 µl.

6.10.3. Duas colunas em série TSK 2 000 SW (comprimento 30 cm, diâmetro interior 0,75 cm) ou colunas de eficácia equivalente e uma precoluna anterior (3 cm × 0,3 cm) provida de I 125 ou um material de eficácia equivalente.

6.10.4. Estufa com coluna, com um termóstato regulado a 35 ± 1 °C.

6.10.5. Detector de UV de comprimento de onda variável, permitindo efectuar medições a 205 nm com uma sensibilidade de 0,008 Å.

6.10.6. Integrador susceptível de integrar de vale a vale.

Nota : É possível com colunas mantidas à temperatura ambiente, mas o seu poder de resolução é ligeiramente inferior. Neste caso, as variações de temperatura ao longo de uma mesma série de análises, devem ser inferiores a ± 5 °C.

7. **Amostragem**

7.1. Norma Internacional ISO 707 — Leite e produtos lácteos — Métodos de amostragem, conforme às indicações contidas no nº 2, alínea c), último parágrafo, do Anexo I.

7.2. Conservar a amostra de modo a que não possa ocorrer qualquer deterioração ou alteração da mesma.

8. **Metodologia**

8.1. *Preparação da amostra para análise*

Transvasar o leite em pó para um recipiente de capacidade aproximadamente dupla da do volume do pó, munido de uma tampa impermeável ao ar. Fechar imediatamente o recipiente. Misturar bem o leite em pó, invertendo sucessivas vezes o recipiente.

8.2. *Tomada da amostra para a análise*

Pesar 2,000 ± 0,001 g da amostra para análise, para um tubo de centrífuga (6.2).

8.3. *Eliminação das gorduras e proteínas*

8.3.1. Adicionar 20,0 g de água tépida (50 °C) à tomada para análise. Dissolver o pó agitando durante cinco minutos com o auxílio de um agitador (6.3). Arrefecer o tubo até 25 °C.

8.3.2. Adicionar em dois minutos, 10,0 ml da solução de ácido tricoloracético (5.1), ao mesmo tempo que a solução é agitada pelo agitador magnético (6.4). Colocar o tubo no banho de água (6.9), onde deve permanecer durante 60 minutos.

8.3.3. Centrifugar (6.2) durante 10 minutos a 2 200 g, ou filtrar através de papel (6.6), rejeitando os 5 primeiros ml de filtrado.

8.4. *Determinação cromatográfica*

8.4.1. Injectar de 15 a 30 µl medidos com exactidão, de sobrenadante ou de filtrado (8.3.3) no aparelho CLAR (6.10) com um caudal de 1,0 ml de solução eluente por minuto.

Notas:

1. Manter a solução eluente (5.2) a 85 °C durante toda a análise cromatográfica a fim de conservar o eluente desgaseificado e evitar qualquer proliferação bacteriana. Pode ser utilizada qualquer precaução tendo um efeito semelhante.
2. A cada interrupação, passar as colunas por água. Nunca deixar solução eluente nas colunas (5.2).

Antes de qualquer interrupção superior a 24 horas, passar as colunas por água e em seguida, lavá-las com a solução (5.3) durante pelo menos 3 horas, com um caudal de 0,2 ml por minuto.

8.4.2. Os resultados de análise cromatográfica da amostra a testar [E] são obtidos sob a forma de um cromatograma onde cada pico é identificado pelo respectivo tempo de retenção TR, ou seja:

pico II: segundo pico do cromatograma cujo TR é de 12,5 minutos aproximadamente,

pico III: terceiro pico do cromatograma, que corresponde ao GMP cujo TR é de 15,5 ± 1,0 minuto,

pico IV: quarto pico do cromatograma cujo TR é de aproximadamente 17,5 minutos.

A quantidade das colunas pode influenciar o tempo de retenção dos diferentes picos.

O integrador (6.10.6) calcula automaticamente a superfície A de cada pico, ou seja:

A_{II}: superfície do pico II;

A_{III}: superfície do pico III;

A_{IV}: superfície do pico IV.

Para detectar as eventuais anomalias devidas quer a um funcionamento deficiente do aparelho ou das colunas, quer à natureza da amostra analisada, é necessário observar o aspecto de cada cromatograma antes de qualquer interpretação quantitativa.

Em caso de dúvida, repetir a análise.

8.5. *Calibração*

8.5.1. Aplicar exactamente às amostras padrões (5.4) a metodologia descrita da alínea 8.2 à alínea 8.4.2.

Utilizar soluções recentemente preparadas pois os G.M.P. degradam-se em meio tricloroacético a 8 %. Com efeito o seu teor baixa aproximadamente 0,2 % por hora a 30 °C.

8.5.2. Antes de proceder a qualquer determinação cromatográfica das amostras, condicionar as colunas mediante injecções sucessivas de solução (8.5.1) da amostra padrão (5.4.2) até que a superfície e o tempo de retenção do pico correspondentes ao GMP sejam constantes.

8.5.3. Determinar os coeficientes de resposta R injectando um volume de filtrados (8.5.1) idêntico ao que foi utilizado nas amostras.

9. Expressão dos resultados

9.1. *Processo de cálculo e fórmulas*

9.1.1. Cálculo dos coeficientes de resposta R:

pico II: $R_{II} = \frac{100}{A_{II}\,[0]}$

pico IV: $R_{IV} = \frac{100}{A_{IV}\,[0]}$

em que:

R_{II} e R_{IV} = coeficientes de resposta dos picos II e IV respectivamente,

A_{II} [0] e A_{IV} [0] = superfícies dos picos II e IV respectivamente da amostra padrão [0], obtidas na alínea 8.5.3

pico III: $R_{III} = \frac{W}{A_{III}\,[5] - A_{III}\,[0]}$

em que:

R_{III} = coeficiente de resposta do pico III,

A_{III} [0] e A_{III} [5] = superfícies do pico III nas amostras padrão [0] e [5] respectivamente, obtidas na alínea 8.5.3,

W = quantidade de lactossoro presente na amostra padrão [5], ou seja, 5.

9.1.2. Cálculo da superfície relativa dos picos da amostra [E]

S_{II} [E] = $R_{II} \times A_{II}$ [E]

S_{III} [E] = $R_{III} \times A_{III}$ [E]

S_{IV} [E] = $R_{IV} \times A_{IV}$ [E]

em que:

S_{II} [E], S_{III} [E], S_{IV} [E] = superfícies relativas dos picos II, III e IV respectivamente da amostra [E],

A_{II} [E], A_{III} [E], A_{IV} [E] = superfícies dos picos II, III e IV da amostra [E], obtidas na alínea 8.4.2,

R_{II}, R_{III}, R_{IV} = coeficientes de resposta calculados na alínea 9.1.1.

9.1.3. Cálculo do tempo de retenção relativo ao pico III da amostra [E]:

$$TRR_{III}\ [E] = \frac{TR_{III}\ [E]}{TR_{III}\ [5]}$$

em que:

TRR_{III} [E] = tempo de retenção relativo do pico III da amostra [E],

TR_{III} [E] = tempo de retenção do pico III da amostra [E] obtido na alínea 8.4.2,

TR_{III} [5] = tempo de retenção do pico III da amostra padrão [5] obtido na alínea 8.5.3.

9.1.4. Foi experimentalmente demonstrado que existe uma relação linear entre o tempo de retenção relativo do pico III, ou seja TRR_{III} [E], e a percentagem de soro em pó adicionada até 10 %:

— o TRR_{III} [E] é $< 1\,000$ quando o teor em soro é > 5 %,

— o TRR_{III} [E] é $\geq 1\,000$ quando o teor em soro é ≤ 5 %.

O grau de incerteza admissível relativamente aos valores do TRR_{III} é de $\pm$ 0,002.

Normalmente, o valor de TRR_{III} [0] difere pouco de 1,034. Consoante o estado das colunas, este valor pode aproximar-se de 1,000, mas deve ser sempre superior.

9.2. *Cálculo da percentagem do lactossoro em pó presente na amostra, ou seja:*

$$W = S_{III}\ [E] - [1{,}3 + (S_{III}\ [0] - 0{,}9)]$$

em que:

W = percentagem m/m de lactossoro presente na amostra [E],

S_{III} [E] = superfície relativa do pico III da amostra a testar [E] obtido na alínea 9.1.2,

1,3 = superfície relativa média do pico III, expressa em g por cada 100 g de lactossoro determinada nos leites em pó desnatados não adulterados, de origens diversas. Este valor foi obtido experimentalmente,

S_{III} [0] = superfície relativa do pico III, que é igual a $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Estes valores são obtidos respectivamente nas alíneas 9.1.1 e 8.5.3,

(S_{III} [0] — 0,9) = correcção a introduzir na superfície relativa média 1,3 quando o valor S_{III} [0] se afasta de 0,9. Experimentalmente, a superfície relativa media do pico III da amostra padrão [0] é de 0,9.

9.3. *Precisão do método*

9.3.1. Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas simultaneamente ou num certo espaço de tempo, pelo mesmo analista utilizando o mesmo aparelho, na mesma amostra para análise não deve ultrapassar 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproductibilidade

A diferença entre dois resultados individuais e independentes obtidos em dois laboratórios diferentes, na mesma amostra para análise, não deve ultrapassar 0,4 % m/m.

9.4. *Interpretação*

9.4.1. Concluir que não há presença de soro se a superfície relativa ao pico III, S_{III} [E], expressa em gramas de soro coalhado por 100 g de produto, for $\leq 2{,}0 + (S_{III}[0] - 0{,}9)$,

em que

2,0 é o valor máximo admitido para a superfície relativa do pico III, que tem em conta a superfície relativa do pico III, i.e. 1,3, a incerteza devida às variações de composição dos leites desnatados em pó e a reprodutividade do método (9.3.2),

$(S_{III}[0] - 0{,}9)$ é a correcção a utilizar quando a superfície $S_{III}[0]$ for diferente de 0,9 (ver ponto 9.2).

9.4.2. Se a superfície relativa do pico III, S_{III} [E] for $> 2{,}0 + (S_{III}[0] - 0{,}9)$ e a superfície relativa do pico II, S_{II} [E] ≤ 160, calcular o teor em lactossoro presente do modo indicado no ponto 9.2.

9.4.3. Se a superfície relativa do pico III, S_{III} [E] for $> 2{,}0 + (S_{III}[0] - 0{,}9)$ e a superfície relativa do pico II, S_{II} [E] ≤ 160, determinar o teor em matérias proteicas totais (P %); examinar seguidamente os gráficos 1 e 2.

9.4.3.1. Os dados obtidos após análise de amostras de leites desnatados em pó não adulterados, com um teor em matérias proteicas totais elevado, estão reunidos nos gráficos 1 e 2.

A recta representada a traço cheio representa a recta de regressão linear, cujos coeficientes são calculados pelo método dos mínimos quadrados.

A recta representada a tracejado fixa o limite superior da superfície relativa do pico III, com uma probabilidade de 90 % de não ser ultrapassado.

As equações das rectas a tracejado dos gráficos 1 e 2 são respectivamente iguais a:

$S_{III} = 0{,}376\ P\ \% - 10{,}7$ (gráfico 1)

$S_{III} = 0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93$ (gráfico 2),

em que

S_{III} é a superfície relativa do pico III calculada ou a partir do teor em matérias proteicas totais, ou a partir da superfície relativa do pico S_{II} [E],

P % é o teor em matérias proteicas totais expresso em percentagem do seu peso,

S_{II} [E] é a superfície relativa da amostra, calculada no ponto 9.1.2.

Estas equações são equivalentes ao valor 1,3 mencionado no ponto 9.2.

A diferença (T_1 e T_2) entre a superfície relativa S_{III} [E] calculada e a superfície relativa S_{III} é dada pelas expressões seguintes:

$T_1 = S_{III}[E] - [(0{,}376\ P\ \% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$

$T_2 = S_{III}[E] - [(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$.

9.4.3.2. Se T_1 e/ou T_2 forem inferiores ou iguais a zero, não se pode concluir que há presença de lactossoro.

Se T_1 e T_2 forem superiores a zero, conclui-se que há presença de lactossoro.

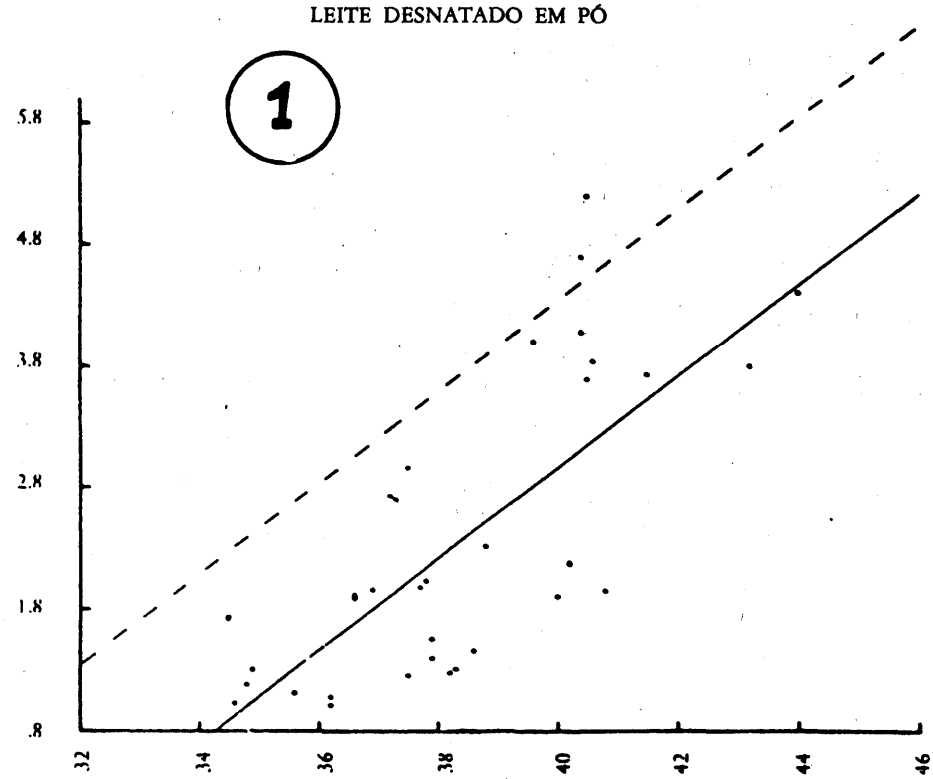
O teor em soro presente é calculado por meio da expressão seguinte:

$$W = T_2 + 0{,}91$$

em que

0,91 representa a diferença, medida no eixo vertical, entre as rectas, a cheio e a tracejado.

LEITE DESNATADO EM PÓ



LEITE DESNATADO EM PÓ

