REGULAMENTO (CEE) Nº 2435/86 DA COMISSÃO

de 29 de Julho de 1986

que altera o Regulamento (CEE) nº 1470/68 relativo à colheita e redução das amostras bem como à determinação do teor em óleo, em impurezas e em humidade das sementes oleaginosas

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

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

Tendo em conta o Regulamento nº 136/66/CEE do Conselho, de 22 de Setembro de 1966, que estabelece a organização comum de mercado no sector das matérias gordas (1), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 1454/86 (2), e, nomeadamente, o seu artigo 24º A,

Considerando que, devido às alterações sucessivas do Regulamento (CEE) nº 1470/68 da Comissão (3), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 3519/84 (4), o título do referido regulamento só parcialmente corresponde ao seu conteúdo; que é conveniente, por consequência, adaptar-lhe o título;

Considerando que a denominação « duplo zero » para as sementes de colza e de nabita depende do seu teor em glucosinolatos; que, para determinar esse teor, é conveniente prever um método adequado;

Considerando que, em aplicação do Regulamento (CEE) nº 282/67/CEE da Comissão, de 11 de Julho de 1967, relativo às modalidades de intervenção para as sementes oleaginosas (5), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 2436/86 (6), bem como do Regulamento (CEE) nº 2681/83 da Comissão, de 21 de Setembro de 1983, que estabelece modalidades de aplicação do regime de ajudas para as sementes oleaginosas (7), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 2434/86 (8), é necessário definir o método único comunitário de determinação do teor em glucosinolatos;

Considerando que as medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Gestão das Matérias Gordas,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1º

O Regulamento (CEE) nº 1470/68 é alterado do seguinte modo:

1. O título passa a ter a seguinte redacção:

   « Relativo à colheita e redução das amostras bem como aos métodos de análise das sementes oleaginosas ».

2. É aditado o artigo 2º C:

   « *Artigo 2º C*

   A determinação do teor em glucosinolatos referida no artigo 4º do Regulamento (CEE) nº 282/67/CEE e no artigo 32º do Regulamento (CEE) nº 2681/83 é efectuada de acordo com o método definido no Anexo VIII, sem prejuízo das disposições transitórias previstas nos referidos artigos. »

3. É aditado o anexo do presente regulamento como Anexo VIII.

Artigo 2º

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

Produz efeitos a partir de 1 de Julho de 1986.

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

Feito em Bruxelas, em 29 de Julho de 1986.

Pela Comissão

Frans ANDRIESSEN

Vice-Presidente

(1) JO nº 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.
(2) JO nº L 133 de 21. 5. 1986, p. 8.
(3) JO nº L 239 de 28. 9. 1968, p. 2.
(4) JO nº L 328 de 15. 12. 1984, p. 12.
(5) JO nº 151 de 13. 7. 1967, p. 1.
(6) Ver página 61 de presente Jornal Oficial.
(7) JO nº L 266 de 28. 9. 1983, p. 1.
(8) Ver página 51 do presente Jornal Oficial.

ANEXO

« ANEXO VIII

COLZA E NABITA

Determinação do teor de glucosinolatos

1. OBJECTO

O presente método foi concebido para determinação da composição e do teor dos principais glucosinolatos da colza e da nabita.

2. PRINCÍPIO

2.1. Medição dos derivados trimetilsilil dos glucosinolatos dessulfatados enzimaticamente, por cromatografia em fase gasosa com programação das temperaturas e utilização da sinigrina como padrão interno.

2.2. O método permite determinar quantitativamente, em micromoles por grama de semente seca ao ar, seis glucosinolatos importantes contidos na colza e na nabita e dois glucosinolatos contidos nas sementes de mostarda, os quais podem ser impurezas nas sementes oleaginosas.

3. PRINCIPAIS REAGENTES

3.1. DEAE Sephadex A-25.

3.2. SP Sephadex C-25.

3.3. Sulfatase tipo H-1.

3.4. Glucosinolato de alilo (Sinigrina).

3.5. Acetato de bário.

3.6. Acetato de chumbo.

3.7. Piridina (grau sililação).

3.8. N-metil-N-trimetilsililleptafluorobutiramida (MSHFBA).

3.9. Trimetilclorosilano.

3.10. 1-Metilimidazole.

4. PRINCIPAL EQUIPAMENTO

4.1. Tubos de extracção suecos de 70 mm, de aço inoxidável, com um diâmetro interior de 18 mm, rolamentos de esferas de 17 mm, tampas em borracha com fluorossilicone nº 3 e agitador horizontal (Troeng 1955), ou agitador equivalente com esferas de aço.

4.2. Moinho de café de rotação elevada.

4.3. Estufa com ar forçado.

4.4. Cromatógrafos em fase gasosa de temperatura programável e detector de ionização de chama.

4.5. Coluna de vidro para cromatografia em fase gasosa : cerca de 2 metros de comprimento, diâmetro interno de 2 mm, cheia com 2 % de OV-07 sobre diatomite com uma granulometria de 80 a 100 malhas.

5. PREPARAÇÃO

5.1. **Preparação do acetato de DEAE Sephadex A-25 e de acetato de piridina**

Pesar 10 g de DEAE Sephadex A-25 numa proveta de 250 ml, adicionar 150 ml de água e deixar o Sephadex inchar durante a noite. Verter o Sephadex para uma coluna de 20 × 400 mm.

Passar 500 ml de hidróxido de sódio 0,5 N (dissolver 10 g em água e perfazer até 500 ml) através da coluna. Lavar a coluna com 250 ml de água de modo a remover o excesso de hidróxido de sódio certificando-se de que o ph desceu até um valor neutro.

Retirar 1/10 do Sephadex a transformar em acetato ; diluí-lo em água e transvasá-lo para uma coluna de 15 mm × 20 mm. Passar 100 ml de ácido acético 0,5 M (2,9 ml de ácido acético glacial completados até 100 ml) através da coluna. Lavar com 250 ml de água. Tendo em vista o seu armazenamento, transferir o total para um frasco de 250 ml contendo água.

Deitar os restantes 9/10 de Sephadex numa coluna com água. Passar 400 ml de acetato de piridina a 0,5 M (19,8 ml de piridina, mais 15 ml de ácido acético glacial, perfazendo os 500 ml com água) através da coluna. Lavar com 250 ml de água. Tendo em vista o seu armazenamento, transferir o total para um frasco de 250 ml contendo água.

5.2. **Preparação da forma sódica do SP Sephadex C-25**

Pesar 1 g de SP Sephadex C-25 numa proveta de 100 ml, adicionar 75 ml de água e deixar o Sephadex inchar durante a noite. Verter o Sephadex para uma coluna de 15 mm × 20 mm e lavar com 250 ml de água. Verter o total para um frasco de 250 ml contendo água, tendo em vista o seu armazenamento.

5.3. **Purificação da sulfatase**

Pesar 70 mg de sulfatase do tipo H-1 para um tubo de ensaio de 16 mm × 150 mm. Adicionar 3 ml de água para dissolver a sulfatase e diluir com um volume igual de etanol. Centrifugar durante 10 minutos a 2 000 × g. Decantar o sobrenadante para um segundo tubo e rejeitar o precipitado. Adicionar 9 ml de etanol ao sobrenadante e centrifugar de novo durante 10 minutos a 2 000 × g. Rejeitar o sobrenadante e dissolver o precipitado em 2 ml de água.

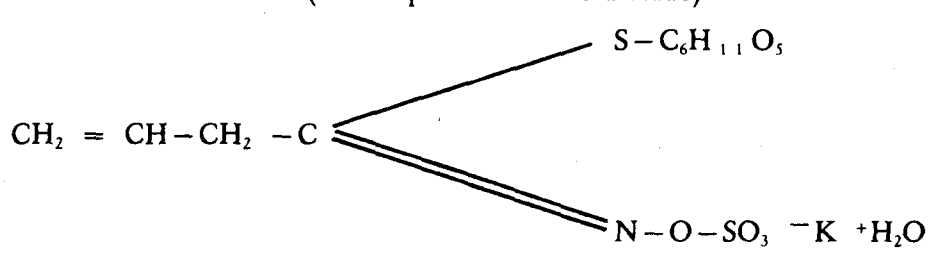
Introduzir um pequeno tampão de lã de vidro no topo de cada uma das duas pipetas. Adicionar a uma das pipetas 100 µl da camada aquosa sobrenadante sobre o acetato de DEAE Sephadex A-25. Acrescentar-lhe o mesmo volume de acetato de DEAE Sephadex A-25 de modo a obter uma coluna de 15 mm de altura equivalente a 20 mg de Sephadex seco.

Na outra pipeta, adicionar 100 µl da fase aquosa sobrenadante à forma sódica de SP Sephadex C-25. Acrescentar-lhe, em seguida, o mesmo volume da forma sódica de SP Sephadex C-25 de modo a obter uma coluna semelhante. Passar a solução enzimática aquosa primeiro através da coluna contendo o acetato de DEAE Sephadex A-25, em seguida através da coluna contendo a forma sódica de SP Sephadex C-25.

A solução de sulfatase é utilizada não diluída nas colunas formadas pelos tampões das pipetas. Armazenar o eluente a -20° e descongelá-lo imediatamente antes de o utilizar.

5.4. **Preparação do padrão interno**

Glucosinolato de alilo (sal de potássio monoidratado)



Pesos moleculares :

C	10	× 12,011	=	120,110
H	18	× 1,008	=	18,144
N	1	× 14,008	=	14,008
S	2	× 32,006	=	64,132
O	1	× 16,000	=	160,000
K	1	× 39,100	=	39,100
				415,494

Para preparar 1 micromole por ml de solução, pesar uma quantidade de 41,5 mg e perfazer com água até 100 ml.

5.5. **Preparação da coluna OV-7 para cromatografia em fase gasosa**

Começar por lavar a superfície interior de uma coluna de vidro (4′ × 0,25″ de diâmetro exterior e 2mm de diâmetro interior), ligando por meio de um tubo de borracha uma extremidade da coluna a uma trompa de água, de modo a obter uma fraca sucção. Aspirar, através da coluna, 100 ml de clorofórmio, 100 ml de acetona e, em seguida, 100 ml de éter de petróleo (ponto de ebulição : 30 a 60 °C). Aspirar ar através da coluna para a secar e, em seguida, secá-la numa estufa com ar forçado. Tapar uma extremidade com lã de vidro. Exercer uma sucção nesta extremidade da coluna, por meio de uma trompa de vácuo. Através de um pequeno funil fixado na outra extremidade da coluna por meio de um tubo em tygon, juntar o material de enchimento da coluna : 2 % OV-7 sobre diatomite CLQ com uma granulometria de 80 a 100 malhas. Dar pequenas pancadas na coluna para facilitar o deslizamento do material de enchimento em torno das serpentinas, até que a sua repartição seja completa e uniforme. Retirar o funil e o tubo em tygon. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur e uma bomba de borracha, expulsar uma quantidade de material suficiente, para que seja possível tapar a extremidade com a lã de vidro.

Adaptar a coluna à comporta de injecção do cromatógrafo de fase gasosa utilizando uma porca em aço inoxidável, uma argola de suporte montada atrás e, uma argola em grafite. Fazer passar o gás transportador (hélio) através da coluna e fazer subir a temperatura a partir de 100 °C, à razão de 1 °C por minuto até aos 290 °C e manter essa temperatura durante toda a noite. Arrefecer o forno e fixar a coluna ao detector, utilizando a porca de aço inoxidável, a argola posterior e a argola anterior em grafite.

Regular a temperatura do injector a 250 °C, a do detector a 300 °C e a da coluna a 200 °C. Regular o débito de gás hélio transportador a 40 ml por minuto, o débito de hidrogéneo e o débito de ar a respectivamente 50 e 500 ml por minuto (condições óptimas de funcionamento do detector), o intervalo a 1 e a atenuação a 64.

6. MODO OPERATÓRIO

6.1. Preparação das amostras

A colheita de amostras de sementes e a redução das amostras de laboratório a amostras de análise efectuam-se em conformidade com os procedimentos descritos respectivamente nos Anexos I e II do Regulamento (CEE) nº 1470/68.

Deve ser analisada uma amostra de sementes-tipo pelo menos uma vez por cada lote de amostras. Os dados das análises da amostra-tipo são úteis para controlar a precisão e a fiabilidade do método.

Se a amostra de sementes se encontra húmida, secar 20 g numa estufa com ar forçado durante a noite, a uma temperatura de 45 °C, a fim de obter 7 % de humidade.

Moer 20 g de sementes secas num moinho de café.

Extrair o óleo de 3 g de sementes moídas com 40 ml de *éter de petróleo* (ponto de ebulição : 30 a 60 °C) ou com *n-hexano,* num tubo sueco contendo três esferas de aço e fechado com uma tampa com fluorossilicone. Agitar horizontalmente num agitador mecânico durante 45 minutos. Filtrar por aspiração através de um papel Whatman nº 1 num funil cónico e lavar por duas vezes com um solvente fresco. Secar a amostra de farinha ao ar numa chaminé durante a noite. Desfazer eventualmente qualquer grumo do produto seco por passagem através de um peneiro de 280 µm. Mais de 90 % da amostra deve passar no peneiro.

6.2. Inactivação da mirosinase e extração dos glucosinolatos

Pesar a farinha (100 mg) num tubo de ensaio. Aquecer o tubo e a amostra num banho de água a ferver (mais de 95 °C). Ao fim de dois minutos, adicionar água a ferver (1 ml). Ao fim de outros dois minutos, adicionar o padrão interno (glucosinolatos de alilo). A concentração do padrão interno é função do teor estimado da amostra em glucosinolatos, tal como é indicado no quadro seguinte. Continuar a aquecer a mais de 95 °C durante 15 minutos.

No segundo ensaio, não é adicionado o padrão interno de modo a ser possível determinar o teor da amostra inicial em glucosinolato de alilo.

Arrefer a solução e adicionar 100 µl de uma solução contendo 0,5 mol tanto de acetato de bário como de acetato de chumbo por litro de água e misturar. Centrifugar a 2 000 × g. Conservar a fase sobrenadante.

Teor em glucosinolatos (µmole/g sementes)	Concentração do padrão interno (µmole/ml)	Quantidade de extracto a aplicar ao Sephadex (ml)
menos de 15	1	1,0
15 - 40	2	0,5
mais de 40	3	0,2

6.3. Preparação das minicolunas DEAE — Sephadex A-25

Para preparar colunas adequadas, é possivel utilizar quer extremidades de pipetas de 1 ml em plástico, quer pipetas Pasteur encurtadas. Colocar um pequeno tampão de lã de vidro no fundo da « minicoluna » e lavar com água (1 ml). Adicionar uma suspensão de DEAE Sephadex A-25 (na forma de acetato de piridina) equivalente a 20 mg (peso seco) de Sephadex. O processo mais simples de o conseguir é adicionar um volume predeterminado de uma suspensão (bem misturada). Deixar decantar o gel e lavar com água.

Deitar para dentro da coluna o sobrenadante que resultou do tratamento com bário/chumbo. Deixar a coluna escoar-se e lavá-la com 1 ml de água, e em seguida com 1 ml de acetato de piridina (0,02µ). Deixar a coluna escoar-se, e, em seguida, adicionar-lhe 50 µl de uma solução de sulfatase purificada e depois deixar em reupouso à temperatura ambiente durante uma noite. Eluir os dessulfoglucosinolatos com água (3 × 0,5 ml).

6.4. Derivatização dos dessulfoglucosinolatos

Preparar o reagente sililador misturando o MSHFBA (100 µl), o TMCS (10µL) e o 1-metilimidazole diluido (50 µl). O 1-metilimidazole diluído é preparado a partir de 1-metilimidazole (50 µl) e acetona (950 µl).

Secar uma amostra de eluente de dessulfoglucosinolato num pequeno matrás que possa ser convenientemente rolhado. Podem ser secas pequenas quantidades (5 a 10 µl) por aquecimento a 120 °C durante 10 minutos. É igualmente possível proceder à secagem num exsicador vácuo com o auxílio de P_2O_5. Adicionar à amostra seca um volume igual de reagente sililador e rolhar o matrás. Aquecer este até 120 °C (durante cinco minutos) para que se verifique o processo de derivatização.

6.5. Separação dos dessulfoglucosinolatos derivados por cromatografia em fase gasosa

Injectar 2 µl na coluna OV-7, manter a temperatura a 200 °C durante 5 minutes, e elevá-la depois até 280 °C, programando a elevação de temperatura para 5 °C por minuto. Manter esta temperatura final durante 15 minutos.

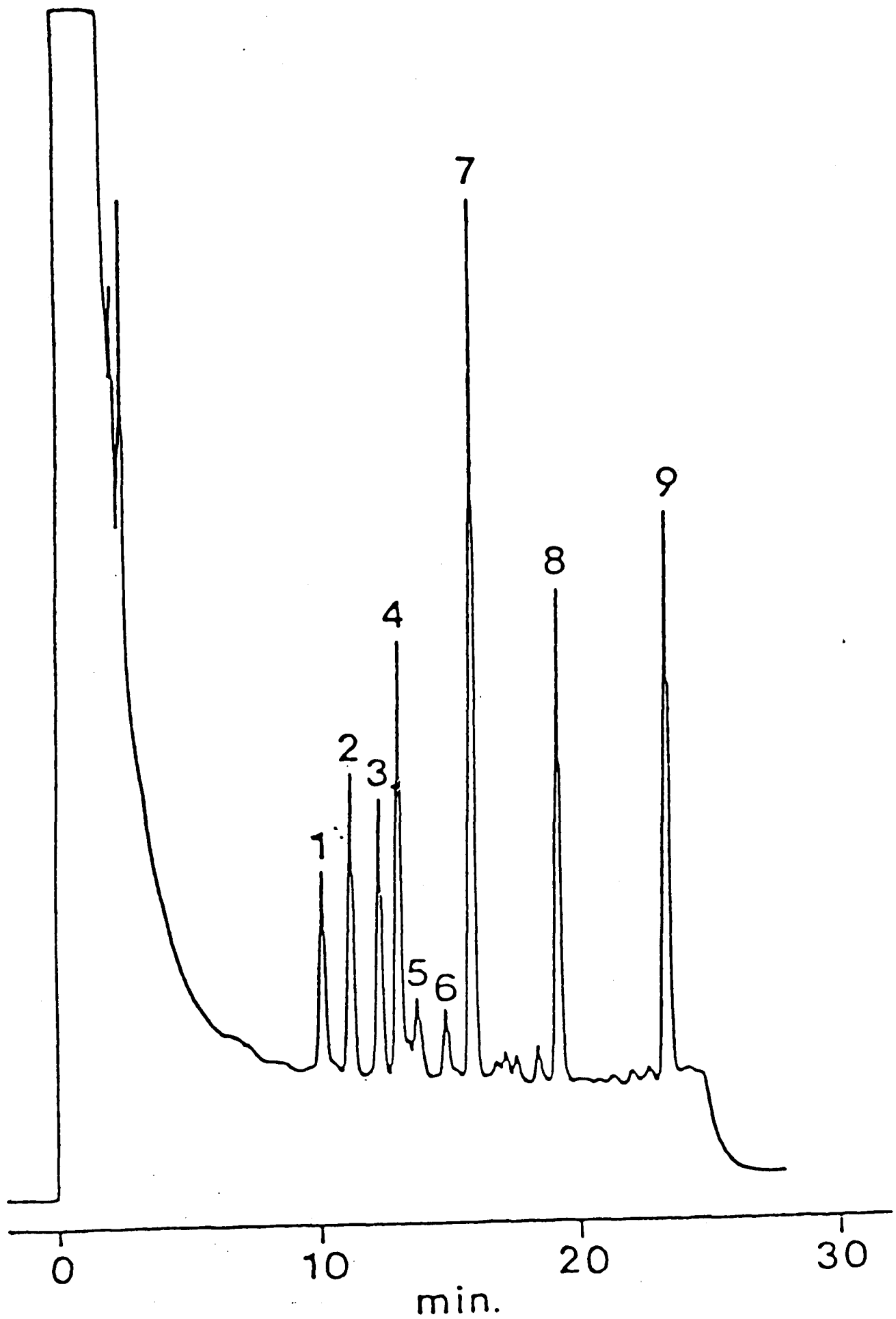
Anotar as áreas dos picos para os seguintes glucosinolatos :

glucosinolato de 3-butenilo, glucosinolato de 4-pentenilo, glucosinolato de 2-hidroxi-3-butenilo, glucosinolato de 2-hidroxi-4-pentenilo, glucosinolato de indolil-3-metilo, glucosinolato de 4-OH-indolil-3--metilo,

e, se for caso disso :

glucosinolato de alilo, glucosinolato de 4-hidroxibenzilo.

Quando se procede à análise das amostras contendo uma grande variedade de glucosinolatos ou quando se inicia a análise após várias horas de repouso, pode ser necessário repetir as injecções e amostra até que se obtenham resultados constantes.



Separação dos dessulfoglucosinolatos derivados por cromatografia em fase gasosa com temperaturas programadas.

(1) alilo,
(2) 3-butenilo,
(3) 4-pentenilo,
(4) 2-hidroxi-3-butenilo,
(5) 2-hidroxi-4-pentenilo,
(6) sucrose,
(7) benzilo,
(8) 4-hidroxibenzilo,
(9) 4-hidroxiindolil-3-metilo.

6.6. Cálculo dos resultados

A primeira coisa a fazer é determinar, se for caso disso, a área da zona do glucosinolato de alilo atribuível a uma eventual contaminação.

A área normalizada da zona correspondente aos glucosinolatos de alilo, obtida por análise sem adição de padrão interno, calcula-se a partir da área das zonas correspondentes ao glucosinolato de 2-hidroxi-3-butenilo resultante de duas análises, com e sem adição de padrão interno :

$$\text{Área da zona de glucosinolato de alilo TMS (sem padrão interno)} \times \frac{\text{Área da zona do glucosinolato de 2-HO-3-butenilo TMS (com padrão interno)}}{\text{Área da zona do glucosinolato de 2-HO-3-butenilo TMS (sem padrão interno)}} = \text{Área de zona de glucosinolato de alilo TMS resultante de uma contaminação}$$

Em segundo lugar, deve-se calcular a área da zona correspondente ao glucosinolato de alilo atribuível a um padrão interno. O resultado anterior é subtraído à área total da zona de glucosinolato de alilo obtido por análise com adição do padrão interno :

$$\text{Área da zona de glucosinolato de alilo TMS (com padrão interno)} - \text{Área da zona de glucosinolato de alilo TMS resultante de uma contaminação} = \text{Área da zona de glucosinolato de alilo TMS atribuível à adição do padrão interno}$$

As áreas das zonas dos vários derivados de glucosinolato TMS, obtidas na análise com adição de padrão interno, são sucessivamente divididas pela área da zona atribuível ao glucosinolato de alilo adicionado como padrão interno ; em seguida são multiplicadas pelos micromoles de glucosinolato de alilo adicionado por cada grama de farinha seca a que se retirou o óleo, o que dá os micromoles de glucosinolato por cada grama de farinha seca ao ar, a que se retirou o óleo :

$$\frac{\text{Área da zona de glucosinolato TMS}}{\text{Área da zona de glucosinolato de alilo TMS resultante da adição do padrão interno}} \times \frac{\text{Micromoles de glucosinolato de alilo}}{\text{gramas de farinha seca ao ar a que se retirou o óleo}} = \frac{\text{Micromoles de glucosinolato}}{\text{gramas de farinha seca ao ar a que se retirou o óleo}}$$

Para exprimir os resultados em relação às sementes secas ao ar :

$$\frac{\text{Micromoles de glucosinolato}}{\text{gramas de farinha seca ao ar a que se retirou o óleo}} \times \frac{100 - \%\ \text{óleo}}{100} = \frac{\text{Micromoles de glucosinolato}}{\text{gramas de sementes secas ao ar}}$$

7. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

As quantidades de glucosinolatos de 3-butenilo, 4-pentenilo, 2-hidroxi-3-butenilo, 2-hidroxi-4-pentenilo, indolil-3-metilo, 4-OH-indolil-3-metilo são adicionadas e referidas globalmente. Os glucosinolatos de alilo e de 4-hidroxibenzilo, eventualmente presentes, são referidos separadamente, a título de indicação de uma contaminação por sementes de mostarda ou de outras crucíferas.

Os resultados são apresentados em micromoles por grama de sementes secas ao ar, sendo as médias de determinações duplas, em relação às quais se indica o intervalo de variação R (R = maior valor menos o menor valor da determinação dupla).