Este documento constitui um instrumento de documentação e não vincula as instituições

►B

REGULAMENTO (CE) N.º 273/2008 DA COMISSÃO

de 5 de Março de 2008

que estabelece normas de execução do Regulamento (CE) n.º 1255/1999 do Conselho no que respeita aos métodos a utilizar para a análise e a avaliação da qualidade do leite e dos produtos lácteos

(JO L 88 de 29.3.2008, p. 1)

Alterado por:

		Jornal Oficial		
		n.°	página	data
►M1	Regulamento de Execução (UE) n.º 565/2013 da Comissão de 18 de junho de 2013	L 167	26	19.6.2013

▼B

REGULAMENTO (CE) N.º 273/2008 DA COMISSÃO

de 5 de Março de 2008

que estabelece normas de execução do Regulamento (CE) n.º 1255/1999 do Conselho no que respeita aos métodos a utilizar para a análise e a avaliação da qualidade do leite e dos produtos lácteos

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CE) n.º 1255/1999 do Conselho, de 17 de Maio de 1999, que estabelece a organização comum de mercado no sector do leite e dos produtos lácteos ([1]), nomeadamente os artigos 10.º e 15.º, o n.º 3 do artigo 26.º, o n.º 1 do artigo 29.º e o n.º 4 do artigo 31.º,

Considerando o seguinte:

(1) O Regulamento (CE) n.º 213/2001 da Comissão ([2]) estabelece as normas de execução do Regulamento (CE) n.º 1255/1999 do Conselho no que respeita aos métodos a utilizar para a análise e a avaliação da qualidade do leite e dos produtos lácteos. À luz da evolução técnica no domínio das metodologias de análise, é necessário proceder a novas alterações substanciais. Por motivos de clareza e de eficácia e tendo em conta o elevado número e a natureza técnica dessas alterações, o Regulamento (CE) n.º 213/2001 deve ser revogado e ser substituído por um novo regulamento.

(2) As características de composição e de qualidade do leite e dos produtos lácteos fixadas no âmbito dos regimes previstos pelo Regulamento (CE) n.º 1255/1999 devem ser verificadas, de modo a garantir o seu cumprimento estrito.

(3) Os métodos de referência a utilizar nas referidas verificações são, muitas vezes, métodos publicados por organismos internacionais, como o Comité Europeu de Normalização (CEN), a Federação Internacional dos Lacticínos (FIL), a Organização Internacional de Normalização (ISO) e a AOAC International (associação científica dedicada à excelência analítica), e regularmente actualizados pelos organismos em causa. Em certos casos, encontra-se estabelecido um método de referência comunitário; noutros casos, a regulamentação comunitária não especifica qualquer método de referência. A fim de garantir uma aplicação uniforme dos métodos de referência, deve ser estabelecida uma lista de métodos de referência, prevendo a possibilidade de a Comissão proceder às adaptações dessa lista que venham a revelar-se necessárias.

(4) Não deve ser excluída a possibilidade de utilização de métodos de rotina, pelo que interessa especificar as condições mínimas para a sua utilização.

(5) Para uma prática uniforme na avaliação dos resultados analíticos, há que estabelecer também procedimentos comuns, o mesmo sucedendo em relação ao exame organoléptico dos produtos em causa e ao reexame dos resultados que sejam objecto de contestação.

([1]) JO L 160 de 26.6.1999, p. 48. Regulamento com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 1152/2007 (JO L 258 de 4.10.2007, p. 3). O Regulamento (CE) n.º 1255/1999 será substituído pelo Regulamento (CE) n.º 1234/2007 (JO L 299 de 16.11.2007, p. 1) a partir de 1 de Julho de 2008.

([2]) JO L 37 de 7.2.2001, p. 1.

▼B

(6) No que respeita a determinadas análises, não existem actualmente métodos de referência validados de aceitação internacional, pelo que não se encontram disponíveis quaisquer informações sobre variações interlaboratoriais de resultados analíticos. Assim, afigura-se oportuno fixar métodos a nível comunitário, validados em conformidade com normas estabelecidas internacionalmente e que possam ser aplicados como métodos de referência.

(7) O Regulamento (CE) n.º 1898/2005 da Comissão ([1]) estabelece normas de execução do Regulamento (CE) n.º 1255/1999 do Conselho no que respeita a medidas com vista ao escoamento de nata, manteiga e manteiga concentrada no mercado comunitário e prevê a marcação da nata, da manteiga e da manteiga concentrada em certas circunstâncias, de modo a garantir a correcta utilização final desses produtos. A marcação é importante para um funcionamento adequado do regime. A fim de garantir a igualdade de tratamento de todos os operadores participantes, devem ser estabelecidos métodos comuns para a determinação de alguns desses marcadores.

(8) Nos termos do artigo 9.º do Regulamento (CE) n.º 1255/1999, pode ser concedida uma ajuda à armazenagem privada dos queijos à base de leite de ovelha. O artigo 31.º do referido regulamento estipula que os mesmos produtos podem beneficiar de uma restituição especial. Está prevista a importação para a Comunidade em condições preferenciais, a partir de determinados países terceiros, de queijos à base de leite de ovelha, de leite de cabra e de leite de búfala ou de misturas de leites de ovelha, cabra e búfala. Em virtude das disposições supracitadas, é necessário verificar, mediante inspecções adequadas, que não foi incorporado leite de vaca nos produtos em causa. Consequentemente, deve estabelecer-se um método de referência comunitário para a detecção de leite de vaca, sem prejuízo da aplicação de métodos de rotina, desde que conformes a determinados critérios.

(9) Nos termos do Regulamento (CEE) n.º 2921/90 da Comissão, de 10 de Outubro de 1990, relativo à concessão de ajudas ao leite desnatado com vista ao fabrico de caseína e de caseinatos ([2]), deve comprovar-se a ausência de coliformes. O método de referência internacionalmente aceite para a detecção de coliformes no leite e nos produtos lácteos é a norma ISO 4831. Com base nessa norma, foi estabelecido um método de referência comunitário para a detecção dos coliformes.

(10) O Regulamento (CEE) n.º 2658/87 do Conselho, de 23 de Julho de 1987, relativo à nomenclatura pautal e estatística e à pauta aduaneira comum ([3]) diferencia as taxas dos direitos aduaneiros aplicáveis aos alimentos compostos para animais abrangidos pela posição pautal 2309, em função do teor de produtos lácteos. A fim de garantir a aplicação uniforme das disposições em causa, há que estabelecer um método de determinação do teor de lactose que mereça aceitação geral e cuja utilização seja obrigatória em todos os Estados-Membros.

([1]) JO L 308 de 25.11.2005, p. 1. Regulamento com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 1546/2007 (JO L 337 de 21.12.2007, p. 68).

([2]) JO L 279 de 11.10.1990, p. 22. Regulamento com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 1487/2006 (JO L 278 de 10.10.2006, p. 8).

([3]) JO L 256 de 7.9.1987, p. 1. Regulamento com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 1352/2007 da Comissão (JO L 303 de 21.11.2007, p. 3).

▼B

(11) O Regulamento (CE) n.º 1255/1999 estipula que a manteiga e o leite em pó desnatado destinados a intervenção e o leite em pó desnatado destinado à alimentação animal devem respeitar determinadas exigências de qualidade. É, pois, oportuno fixar métodos de referência para a verificação do cumprimento das referidas exigências.

(12) Alguns métodos são estabelecidos pela primeira vez no presente regulamento. Deve ser previsto um prazo suficiente, a partir da data de entrada em vigor do presente regulamento, para que os laboratórios possam introduzir e começar a aplicar correctamente esses métodos. Sempre que um método de referência constante do anexo I seja revisto e publicado pela Organização de Desenvolvimento e Normas, deve ser concedido aos laboratórios um prazo de seis meses para actualizarem os seus procedimentos analíticos, de modo a cumprirem as novas normas.

(13) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Gestão do Leite e dos Produtos Lácteos,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

CAPÍTULO I

DISPOSIÇÕES GERAIS

Artigo 1.º

Objecto e domínio de aplicação

1. O presente regulamento fixa determinados métodos de referência para a análise química, física e microbiológica e para o exame organoléptico do leite e dos produtos lácteos no âmbito dos regimes previstos pela organização comum de mercado no sector do leite e dos produtos lácteos, estabelecida pelo Regulamento (CE) n.º 1255/1999, bem como as regras de aplicação desses métodos.

2. A lista dos métodos de referência aplicáveis às análises referidas no n.º 1 é estabelecida no anexo I do presente regulamento.

3. A Comissão actualiza a lista em conformidade com o procedimento estabelecido no artigo 42.º do Regulamento (CE) n.º 1255/1999.

Artigo 2.º

Métodos de rotina

Podem ser utilizados métodos de rotina nas análises previstas pela legislação comunitária, na condição de serem devidamente calibrados e regularmente aferidos em relação ao método de referência. Os resultados são comparados tendo em conta os erros sistemáticos, a repetibilidade e a reprodutibilidade.

Em caso de litígio, os resultados obtidos pelo método de referência serão determinantes.

Os Estados-Membros informam a Comissão da utilização de métodos de rotina nas análises referidas no artigo 1.º

▼B

CAPÍTUILO II

MÉTODOS DE ANÁLISE

Artigo 3.º

Avaliação da conformidade de uma remessa com os limites legais

Com excepção da análise dos marcadores, o cumprimento das exigências legais de composição é avaliado com base no anexo II do presente regulamento.

Artigo 4.º

Exame organoléptico

1. No que respeita ao leite e aos produtos lácteos, com excepção da manteiga destinada à armazenagem pública, os Estados-Membros utilizam como método de referência para o exame organoléptico a norma IDF 99C:1997 ou outros métodos comparáveis, que comunicam à Comissão.

Para avaliar o desempenho dos provadores e a fiabilidade dos resultados dos exames organolépticos, aplicam-se os procedimentos descritos no anexo III.

2. No que respeita à manteiga destinada à armazenagem pública, aplicam-se os procedimentos descritos no anexo III para avaliar o desempenho dos provadores e a fiabilidade dos resultados dos exames organolépticos.

O método descrito no anexo IV é aplicado como método de referência para o exame organoléptico.

Artigo 5.º

Marcadores

1. O método de análise descrito no anexo V é utilizado como método de referência para a determinação do teor de triglicéridos do ácido enântico na manteiga, no *butteroil* e na nata.

2. O método de análise descrito no anexo VI é utilizado como método de referência para a determinação da vanilina na manteiga concentrada, na manteiga e na nata.

3. O método de análise descrito no anexo VII é utilizado como método de referência para a determinação do teor de éster etílico do ácido β-apo-8'-caroténico da manteiga concentrada e da manteiga.

4. O método de análise descrito no anexo VIII é utilizado como método de referência para a determinação do teor de β-sitosterol e de estigmasterol da manteiga e da manteiga concentrada.

5. Considera-se que a manteiga concentrada, a manteiga e a nata foram marcadas em conformidade com as regras comunitárias aplicáveis se os resultados obtidos corresponderem às especificações dos pontos 10 e 11 do anexo V e do ponto 8 dos anexos VI, VII e VIII.

Artigo 6.º

Detecção de caseína de leite de vaca

1. O método de análise de referência descrito no anexo IX é utilizado para garantir que o queijo que deve ser produzido exclusivamente com leite de ovelha, leite de cabra ou leite de búfala, ou com misturas de leites de ovelha, cabra e búfala, não contenha caseína de leite de vaca.

▼B

Considera-se que se encontra presente caseína de leite de vaca se o teor de caseína de leite de vaca da amostra analisada for igual ou superior ao teor da amostra de referência com 1 % de leite de vaca, conforme é descrito no anexo IX.

2. Os métodos de rotina para a detecção de caseína de leite de vaca nos queijos referidos no n.º 1 podem ser utilizados nas seguintes condições:

a) o limite de detecção é, no máximo, 0,5 % e

b) não podem observar-se falsos resultados positivos e

c) a caseína de leite de vaca é detectável com a sensibilidade requerida, mesmo após longos períodos de cura, como pode acontecer nas condições habituais de comercialização.

Caso alguma das condições acima referidas não seja satisfeita, devem ser usados os métodos de referência descritos no anexo IX.

Artigo 7.º

Detecção de coliformes

Para a detecção de coliformes na manteiga, no leite em pó desnatado, na caseína e nos caseinatos, utiliza-se o método de referência descrito no anexo X.

Artigo 8.º

Determinação do teor de lactose

O teor de lactose dos produtos incluídos na posição NC 2309 é determinado pelo método de referência descrito no anexo XI.

Artigo 9.º

Detecção de soro de coagulação

1. Para a detecção de soro de coagulação no leite em pó desnatado destinado à armazenagem pública, utiliza-se o método de referência descrito no anexo XII.

2. Para a detecção de soro de coagulação no leite em pó desnatado e misturas destinados à alimentação animal, utiliza-se o método de referência descrito no anexo XII. Caso seja detectada a presença de soro de coagulação, deve aplicar-se o anexo XIII.

Artigo 10.º

Detecção de leitelho

Para a detecção de leitelho no leite em pó desnatado, utiliza-se o método de referência descrito no anexo XIV.

Artigo 11.º

Detecção de resíduos de substâncias antimicrobianas

Para a detecção de resíduos de substâncias antimicrobianas no leite em pó desnatado, utiliza-se o método de referência descrito no anexo XV.

▼B

Artigo 12.º

Determinação do teor de leite em pó desnatado

Para a determinação do teor de leite em pó desnatado nos alimentos compostos para animais, utiliza-se o método de referência descrito no anexo XVI.

Artigo 13.º

Detecção de amido

Para a detecção de amido no leite em pó desnatado, no leite em pó desnaturado e nos alimentos compostos para animais utiliza-se o método de referência descrito no anexo XVII.

Artigo 14.º

Determinação do teor de humidade da nata desidratada

Para a determinação do teor de humidade da nata desidratada utiliza-se o método de referência descrito no anexo XVIII.

Artigo 15.º

Determinação do teor de humidade do leitelho ácido em pó

Para a determinação do teor de humidade do leitelho ácido em pó destinado a ser incorporado em alimentos para animais, utiliza-se o método de referência descrito no anexo XIX.

Artigo 16.º

Determinação do grau de pureza da matéria gorda láctea

Para a determinação do grau de pureza da matéria gorda láctea, utiliza-se o método de referência descrito no anexo XX.

CAPÍTULO III

DISPOSIÇÕES GERAIS E FINAIS

Artigo 17.º

Garantia da qualidade

As análises são realizadas por laboratórios que disponham de um sistema de garantia da qualidade analítica, incluindo procedimentos internos de controlo da qualidade. Os laboratórios não-acreditados participam em processos de avaliação da proficiência pelo menos uma vez por ano, não devendo os respectivos resultados divergir mais de $2\sigma_R$ (desvio-padrão da reprodutibilidade do método de referência) do valor consensual. Deve encontrar-se disponível para consulta, no laboratório, uma descrição pormenorizada dos sistemas utilizados.

Os laboratórios acreditados em conformidade com as normas referidas no artigo 12.º do Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo aos controlos

▼B

oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais [1] ficam isentos da obrigação de participar nessas avaliações da proficiência.

Artigo 18.º

Amostragem e contestação dos resultados das análises

1. A amostragem é efectuada em conformidade com a regulamentação relevante para o produto em causa. Caso não existam disposições específicas relativas à amostragem, aplicam-se as disposições da norma ISO 707IDF 50, Leite e produtos lácteos — Orientações para a amostragem.

2. Os relatórios laboratoriais dos resultados analíticos devem incluir elementos suficientes para a avaliação dos resultados em conformidade com os anexos II e XXI.

3. Para a realização das análises previstas pela legislação comunitária, devem colher-se amostras em duplicado.

4. Se um operador não aceitar determinados resultados analíticos, aplica-se o procedimento descrito no anexo XXI.

5. Se o fabricante conseguir provar, nos cinco dias úteis seguintes à colheita das amostras, que esta não foi efectuada correctamente, procede-se a nova colheita da amostra, na medida do possível. Caso não seja possível colher novas amostras, a remessa deve ser aceite.

▼M1

———————

Artigo 19.º-A

Notificações

As notificações a que se refere o artigo 2.º, o artigo 4.º, n.º 1, e o anexo III, ponto C, são efetuadas em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 792/2009 da Comissão [2].

▼B

Artigo 20.º

Revogações

É revogado o Regulamento (CE) n.º 213/2001.

As referências ao regulamento revogado entendem-se como feitas ao presente regulamento, segundo o quadro de correspondência do anexo XXII.

Artigo 21.º

Entrada em vigor

O presente regulamento entra em vigor no terceiro dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

É aplicável a partir de 31 de Março de 2008.

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

[1] JO L 165 de 30.4.2004, p. 1.
[2] JO L 228 de 1.9.2009, p. 3.

▼B

ANEXO I

(Artigo 1.º)

LISTA DOS MÉTODOS DE REFERÊNCIA

Índice Mín. = Mínimo, Máx. = Máximo, Anexo = Anexo do regulamento em causa, RSIMG = Resíduo seco isento de matéria gorda, IP = Índice de peróxidos, A = Aspecto, S = Sabor, C = Consistência, CTB = Contagem total de bactérias, Term = Contagem de bactérias termófilas, EM = Estado-Membro, IDF = Federação Internacional dos Lacticínos (FIL), ISO = Organização Internacional de Normalização, IUPAC = União Internacional de Química Pura e Aplicada, ADPI = Instituto Americano dos Lacticínios, LCA = Leite condensado açucarado, LNE = Leite ou nata evaporados.

PARTE A

Regulamento da Comissão	Produto	Parâmetro	Limite [1]	Método de referência	Observações
Regulamento (CE) n.º 2771/1999 — Armazenagem pública	Manteiga sem sal	Matéria gorda	Mín. 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Água	Até 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		RSIMG	Até 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Acidez da matéria gorda	1,2 mmole/100g de matéria gorda	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		IP (máx.)	0,3 mequiv. oxigénio/ /1 000 g de matéria gorda	ISO 3976:2006IDF 74:2006	Nota 1
		Coliformes	Não-detectáveis em 1 g	Anexo X	Nota 3
		Matérias gordas não-lácteas	Não-detectáveis na análise de triglicéridos	Anexo XX	
		Esteróis marcadores	Não-detectáveis, β-sitosterol ≤ 40 mg/kg	Anexo VIII	
		Outros marcadores			
		— vanilina	Não-detectável	Anexo VI	
		— éster etílico do ácido caroténico	≤ 6 mg/kg	Anexo VII	
		— triglicéridos do ácido enântico	Não-detectável	Anexo V	
		Características organolépticas	Pelo menos 4 pontos em 5 para A, S e C	Anexo IV	
		Dispersão da água	Pelo menos 4 pontos	ISO 7586:1985IDF 112A:1989	
Regulamento (CE) n.º 2771/ /1999 – Armazenagem privada	Manteiga sem sal	Matéria gorda	Mín. 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Água	Até 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	

▼B

Regulamento da Comissão	Produto	Parâmetro	Limite (1)	Método de referência	Observações
		RSIMG	Até 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
Regulamento (CE) n.º 2771/1999 — Armazenagem privada	Manteiga com sal	Matéria gorda	Mín. 80 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Água	Até 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		RSIMG (excluindo o sal)	Até 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Sal	Até 2 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
Regulamento (CE) n.º 1898/2005, capítulo II	Manteiga sem sal	Matéria gorda	Mín. 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Matérias gordas não-lácteas		Anexo XX	
		Água	Até 16 % m/m	ISO 3727-1 2001IDF 80-1:2001	
		RSIMG	Até 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Marcadores:			
		— esteróis	Ver o anexo VIII	Anexo VIII	
		— vanilina	Ver o anexo VI	Anexo VI	
		— éster etílico do ácido caroténico	Ver o anexo VII	Anexo VII	
		— triglicéridos do ácido enântico	Ver o anexo V	Anexo V	
Regulamento (CE) n.º 1898/2005, capítulo II	Manteiga com sal	Matéria gorda	Mín. 80 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Matérias gordas não-lácteas		Anexo XX	
		Água	Até 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		RSIMG (excluindo o sal)	Até 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Sal	Até 2 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Marcadores:			
		— esteróis	Ver o anexo VIII	Anexo VIII	
		— vanilina	Ver o anexo VI	Anexo VI	
		— éster etílico do ácido caroténico	Ver o anexo VII	Anexo VII	
		— triglicéridos do ácido enântico	Ver o anexo V	Anexo V	
Regulamento (CE) n.º 1898/2005, capítulo II	Manteiga concentrada	Matéria gorda	Mín. 99,8 % m/m	IDF 24:1964	

▼B

Regulamento da Comissão	Produto	Parâmetro	Limite (1)	Método de referência	Observações
		Água e RSIMG	Até 0,2 % m/m	ISO 5536:2002IDF 23:2002 (humidade) IDF 24:1964 (RSIMG)	
		Acidez da matéria gorda	1,2 mmole/100g de matéria gorda	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		IP (máx.)	0,5 mequiv. oxigénio/ /1 000 g de matéria gorda	ISO 3976:2006IDF 74:2006	Nota 1
		Matérias gordas não-lácteas	Ausência	Anexo XX	
		Sabor	Característico		
		Odor	Ausência de odores estranhos		
		Outros	Ausência de agentes neutralizantes, antioxidantes e conservantes		
		Marcadores:			
		— esteróis	Ver o anexo VIII	Anexo VIII	
		— vanilina	Ver o anexo VI	Anexo VI	
		— éster etílico do ácido caroténico	Ver o anexo VII	Anexo VII	
		— triglicéridos do ácido enântico	Ver o anexo V	Anexo V	
Regulamento (CE) n.º 1898/2005, capítulo II	Nata	Matéria gorda	Mín. 35 % m/m	ISO 2450:1999IDF 16 C:1987	
		Matérias gordas não-lácteas		Anexo XX	
		Marcadores:			
		— esteróis	Ver o anexo VIII		Nota 2
		— vanilina	Ver o anexo VI	Anexo VI	
		— éster etílico do ácido caroténico	Ver o anexo VII		Nota 2
		— triglicéridos do ácido enântico	Ver o anexo V	Anexo V	
Regulamento (CE) n.º 1898/2005, capítulo III	Manteiga concentrada	Matéria gorda	Mín. 96 % m/m		Nota 2
		Matérias gordas não-lácteas		Anexo XX	
		RSIMG	Até 2 % m/m		Nota 2

▼B

Regulamento da Comissão	Produto	Parâmetro	Limite (1)	Método de referência	Observações
		Marcadores:			
		— estigmasterol (95 % m/m)	15 g/100 kg de manteiga concentrada	Anexo VIII	
		— estigmasterol (85 % m/m)	17 g/100 kg de manteiga concentrada	Anexo VIII	
		— triglicéridos do ácido enântico	10,34 kg/t de manteiga concentrada	Anexo V	
		— éster etílico do ácido butírico e estigmasterol		— éster etílico do ácido butírico — estigmasterol: Anexo VIII	Nota 2
		— éster etílico do ácido butírico e triglicéridos do ácido enântico		— éster etílico do ácido butírico — triglicéridos do ácido enântico Anexo V	Nota 2
		lecitina (E 322)	Até 0,5 % m/m		Nota 2
		NaC1	Até 0,75 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	
		Acidez da matéria gorda	1,2 mmole/100g de matéria gorda	ISO 1740:2004IDF 6:2004	
		IP (máx.)	Até 0,5 mequiv. oxigénio/1 000 g de matéria gorda	ISO 3976:2006IDF 74:2006	Nota 1
		Sabor	Característico		
		Odor	Ausência de odores estranhos		
		Outros	Ausência de agentes neutralizantes, antioxidantes e conservantes		
Regulamento (CE) n.º 1898/2005, capítulo IV	Manteiga sem sal	Matéria gorda	Mín. 82 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Água	Até 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		RSIMG	Até 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
Regulamento (CE) n.º 1898/2005, capítulo IV	Manteiga com sal	Matéria gorda	Mín. 80 % m/m	ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Água	Até 16 % m/m	ISO 3727-1:2001IDF 80-1:2001	
		RSIMG (excluindo o sal)	Até 2 % m/m	ISO 3727-2:2001IDF 80-2:2001	
		Sal	Até 2 % m/m	ISO 15648:2004IDF 179:2004	

▼B

Regulamento da Comissão	Produto	Parâmetro	Limite (1)	Método de referência	Observações
Artigo 9.º e título II do Regulamento (CE) n.º 1255/1999	Queijo de leite de ovelha e/ou de leite de cabra	Leite de vaca	< 1 % m/m	Anexo IX	
Regulamento (CE) n.º 2921/90	Anexo I — Caseína ácida	Água	Até 12,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Matéria gorda	Até 1,75 % m/m	ISO 5543:2004IDF127:2004	
		Acidez livre	Até 0,30 ml de solução 0,1 N NaOH/g	ISO 5547:1978IDF 91:1979	
Regulamento (CE) n.º 2921/90	Anexo I — Caseína-coalho	Água	Até 12,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Matéria gorda	Até 1,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Cinzas	Mín. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978 IDF 90:1979	
Regulamento (CE) n.º 2921/90	Anexo I — Caseinatos	Água	Até 6,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Proteínas lácteas	Mín. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Matéria gorda e cinzas	Até 6,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Cinzas fixadas		ISO 5544:1978IDF 89:1979	
		Cinzas		ISO 5545:1978IDF 90:1979	
Regulamento (CE) n.º 2921/90	Anexo II — Caseína ácida	Água	Até 10,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Matéria gorda	Até 1,50 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Acidez livre	Até 0,20 ml de solução 0,1 N de NaOH/g	ISO 5547:1978IDF 91:1979	
		CTB (máx.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Ausência em 0,1 g	Anexo X	Nota 3
		Term. (máx.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Notas 3 e 4
Regulamento (CE) n.º 2921/90	Anexo II — Coalho — caseína	Água	Até 8,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Matéria gorda	Até 1,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Cinzas	Mín. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		CTB (máx.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Ausência em 0,1 g	Anexo X	Nota 3
		Term. (máx.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Notas 3 e 4

▼B

Regulamento da Comissão	Produto	Parâmetro	Limite (1)	Método de referência	Observações
Regulamento (CE) n.º 2921/90	Anexo II — Caseinatos	Água	Até 6,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Proteínas lácteas	Mín. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Matéria gorda e cinzas	Até 6,00 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004 ISO 5544:1978IDF 89:1979 ou ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		CTB (máx.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Ausência em 0,1 g	Anexo X	Nota 3
		Term. (máx.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Notas 3 e 4
Regulamento (CE) n.º 2921/90	Anexo III — Caseinatos	Água	Até 6,00 % m/m	ISO 5550:2006IDF 78:2006	
		Proteínas lácteas	Mín. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978IDF 92:1979	
		Matéria gorda	Até 1,50 % m/m	ISO 5543:2004IDF 127:2004	
		Lactose	Até 1,00 % m/m	ISO 5548:2004IDF 106:2004	
		Cinzas	Até 6,50 % m/m	ISO 5544:1978IDF 89:1979 ou ISO 5545:1978IDF 90:1979	
		CTB (máx.)	30 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Ausência em 0,1 g	Anexo X	Nota 3
		Term. (máx.)	5 000/ g	ISO 4833:2003	Notas 3 e 4
Regulamento (CE) n.º 2799/1999	Alimentos compostos para animais e leite em pó desnatado (LPD) (para incorporação em alimentos para animais)	Água (leitelho ácido em pó)	Até 5 % m/m	Anexo XIX	
		Proteínas	31,4 % m/m, no mínimo, do resíduo seco isento de matéria gorda	ISO 8968-123:2001IDF 20-123:2001	
		Água (LPD)	Até 5 % m/m	ISO 5537:2004IDF 26:2004	
		Matéria gorda (LPD)	Até 11 % m/m	ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
		Soro de coagulação (LPD)	Ausência	Anexo XIII	Nota 6
		Amido (LPD)	Ausência	Anexo XVII	
		Água (misturas)	Até 5 % m/m da matéria não-gorda	ISO 5537:2004IDF 26:2004	

▼B

Regulamento da Comissão	Produto	Parâmetro	Limite (1)	Método de referência	Observações
		Matéria gorda (misturas)		Directiva 84/4/CEE da Comissão (JO L 15 de 18.1.1984, p. 29)	
		Soro de coagulação (misturas)	Ausência	Anexo XIII	
		Teor de LPD (do produto final)	Mín. 50 % m/m	Anexo XVI	
		Matéria gorda (no produto final)	Mín. 2.5 % m/m ou 5 % m/m	Directiva 84/4/CEE da Comissão (JO L 15 de 18.1.1984, p. 29)	Nota 7
		Amido (no produto final)	Mín. 2 % m/m	Anexo XVII	Nota 8
		Cobre (no produto final)	25 ppm	Directiva 78/633/CEE da Comissão (JO L 206 de 26.7.1987, p. 43)	
Regulamento (CE) n.º 214/2001	LPD (processo *spray*)	Matéria gorda	Até 1,0 % m/m	ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
		Proteínas	31,4 % (2)m/m, no mínimo, do resíduo seco isento de matéria gorda	ISO 8968-1/2:2001IDF 20-1/2:2001	
		Água	Até 3,5 % m/m	ISO 5537:2004IDF 26:2004	
		Acidez	Até 19,5 ml de NaOH 0,1 N por 10 g de resíduo seco isentos de matéria gorda	ISO 6091:1980IDF 86:1981	
		Lactatos	Até 150 mg/100 g de resíduo seco isento de matéria gorda	ISO 8069:2005IDF 69:2005	
		Fosfatase	Negativo	ISO 11816-1:2006IDF 155-1:2006	
		Índice de insolubilidade	Até 0,5 ml a 24 °C	ISO 8156:2005IDF 129:2005	
		Partículas queimadas	Disco A ou B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		CTB	40 000/ g	ISO 4833:2003	Nota 3
		Coliformes	Negativo/0,1 g	Anexo X	Nota 3
		Leitelho	Negativo	Anexo XIV	
		Soro de coagulação	Negativo	Anexo XII	
		Soro ácido	Negativo		Nota 2
		Agentes anti-microbianos		Anexo XV	

(1) Sem prejuízo das exigências previstas no regulamento específico.
(2) Até 1 de Setembro de 2009, o teor mínimo de proteínas deve atingir os 34 %.

▼B

PARTE B

Os métodos de referência incluídos na parte B podem ser utilizados para a análise de produtos abrangidos por qualquer dos regulamentos indicados na primeira coluna.

Regulamento da Comissão	Produto	Código NC	Parâmetro	Limite	Método de referência	Observações
Regulamento (CEE) n.º 2658/87 Regulamento (CE) n.º 2535/2001 Regulamento (CE) n.º 1282/2006	Leite e nata, não concentrados nem adicionados de açúcar ou de outros edulcorantes	0401	Matéria gorda (≤ 6 % m/m)	Os limites são os referidos na descrição da posição NC do produto em causa, com as especificações adicionais, quando aplicáveis, que constam do Regulamento (CEE) n.º 3846/87 da Comissão (JO L 366 de 24.12.1987, p. 1), Parte 9 da nomenclatura dos produtos para exportação, ou do Regulamento (CE) n.º 2535/2001 (JO L 341 de 22.12.2001, p. 29)	ISO 1211:2001IDF 1D:1996	
			Matéria gorda (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999IDF 16C:1987	
	Leite e nata, concentrados ou adicionados de açúcar ou de outros edulcorantes	0402	Matéria gorda (forma líquida)		ISO 1737:1999IDF 13C:1987	
			Matéria gorda (forma sólida)		ISO 1736:2000IDF 9C:1987	
			Proteínas		ISO 8968-123:2001IDF 20-123:2001	
			Sacarose (teor normal)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sacarose (teor reduzido)			Nota 2
			Resíduo seco (LCA)		ISO 6734:1989IDF 15B:1991	
			Resíduo seco (LNE)		ISO 6731:1989IDF 21B:1987	
			Água (leite em pó)		ISO 5537:2004IDF 26:2004	
			Água (nata em pó)		Anexo XVIII	

▼B

Regulamento da Comissão	Produto	Código NC	Parâmetro	Limite	Método de referência	Observações
	Leitelho, leite e nata fermentados ou acidificados, mesmo concentrados, adicionados de açúcar ou de outros edulcorantes	0403	Matéria gorda		ISO 1211:2001IDF 1D:1996 ISO 1736:2000IDF 9C:1987 ISO 2450:1999IDF 16 C:1987 ISO 7208:1999IDF 22B:1987 ISO 8262-3:2005IDF 124-3:2005	
			Proteínas		ISO 8968-123:2001IDF 20-123:2001	
			Sacarose (teor normal)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sacarose (teor reduzido)			Nota 2
			Água (leitelho ácido em pó)		Anexo XIX	
			Água (leitelho doce em pó)		ISO 5537:2004IDF 26:2004	
			Resíduo seco (outros produtos)		Métodos aprovados pela autoridade competente	
	Soro de leite, mesmo concentrado ou adicionado de açúcar ou de outros edulcorantes; produtos constituídos por componentes naturais do leite	0404	Matéria gorda		ISO 1736:2000IDF 9C:1987 ISO 2450:1999IDF 16C:1987 ISO 7208:1999IDF 22B:1987	
			Proteínas		ISO 8968-123:2001IDF 20-123:2001	
			Sacarose (teor normal)		ISO 2911:2004IDF 35:2004	
			Sacarose (teor reduzido)			Nota 2
		0404 90	Proteínas		ISO 8968 1/2 2001IDF 20-1/2:2001	
			Água		IDF 21B:1987	
			Resíduo seco		ISO 6734:1989IDF 15B:1991	

▼B

Regulamento da Comissão	Produto	Código NC	Parâmetro	Limite	Método de referência	Observações
			(Produtos concentrados)		ISO 6731:1989IDF 21B:1987	
	Manteiga e outras matérias gordas provenientes do leite; pastas de barrar de produtos provenientes do leite	0405	Matéria gorda (se ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003IDF 194:2003	
		Manteiga	Água		ISO 3727-1:2001IDF 80--1:2001	
			RSIMG		ISO 3727-2:2001IDF 80--2:2001	
			NaCl		ISO 15648:2004IDF 179:2004	
			Matéria gorda (se > 99 % m/m)		IDF 24:1964	
	Butteroil		Água (se a matéria gorda < 99 % m/m)		ISO 5536:2002IDF 23:2002	
	Queijos e requeijão	0406	Matéria gorda		ISO 1735:2004IDF 5:2004	
			Resíduo seco		ISO 5534:2004IDF 4:2004	
			Resíduo seco (*Ricotta*)		ISO 2920:2004IDF 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006IDF 88:2006	
			Lactose		ISO 5765-1/2:2002IDF 79-1/2:2002	
Regulamento (CEE) n.º 2658/87	Alimentos compostos para animais	2309	Lactose		Anexo XI	

Notas à lista de métodos de referência da União Europeia:

Nota 1: Isolamento da matéria gorda láctea conforme descrito na norma ISO 1740:1991 (proteção da luz).

Nota 2: Não foi estabelecido qualquer método de referência. Métodos aprovados pela autoridade competente.

Nota 3: Amostras a preparar em conformidade com a norma ISO 8261:2001IDF 122:2001.

Nota 4: Incubação durante 48h à temperatura de 55 °C, deve ter-se o cuidado de evitar a secagem do meio de cultura.

Nota 5: % m/m RSIMG = % m/m resíduo seco — % m/m matéria gorda.

Nota 6: Directiva 84/4/CEE da Comissão.

Nota 7: Regulamento (CE) n.º 2799/1999 da Comissão (JO L 340 de 31.12.1999, p. 3-27).

Nota 8: Directiva 78/633/CEE da Comissão.

▼B

ANEXO II

(Artigo 3.º)

AVALIAÇÃO DA CONFORMIDADE DE UMA REMESSA COM OS LIMITES LEGAIS

1. PRINCÍPIO

Nos casos em que a legislação relevante especifica procedimentos de amostragem, esses procedimentos devem ser seguidos. Nos restantes casos, utiliza-se uma amostra com pelo menos três unidades de amostragem, retiradas de forma aleatória da remessa submetida a controlo. Pode ser preparada uma amostra composta. O resultado obtido é comparado com os limites legais através do cálculo de um intervalo de confiança a 95 %, equivalente ao dobro do desvio-padrão, em que o desvio-padrão em causa dependerá: 1) de o método ter sido validado através de cooperação internacional, tendo sido estabelecidos valores para σr e σ_R, ou 2) caso o método de validação tenha sido desenvolvido internamente, de reprodutibilidade interna calculada. Esse intervalo de confiança corresponde então à incerteza do resultado decorrente do processo de medição.

2. MÉTODO VALIDADO ATRAVÉS DE COOPERAÇÃO INTERNACIONAL

Neste caso, terão sido estabelecidos o desvio-padrão da repetibilidade, σr, e o desvio-padrão da reprodutibilidade, σ_R, e o laboratório poderá demonstrar a conformidade com as características de desempenho do método validado.

Calcular a média aritmética $\bar{x}$ das *n* medições repetidas.

Calcular a incerteza expandida, (k = 2), de $\bar{x}$ através da seguinte fórmula:

$$U = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n}\sigma_r^2}$$

Se o resultado final da medição, *x*, for calculado utilizando uma fórmula com a forma $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ ou $x = y_1 / y_2$, devem seguir-se os procedimentos habituais para a combinação dos desvios-padrão nesses casos.

A remessa será considerada não-conforme com o limite legal máximo, *UL*, quando:

$\bar{x} - U > UL$

Caso contrário, será considerada em conformidade com o *UL*.

A remessa será considerada não-conforme com o limite legal mínimo, *LL*, quando:

$\bar{x} + U < LL$

Caso contrário, será considerada em conformidade com o *LL*.

3. VALIDAÇÃO INTERNA E CÁLCULO DO DESVIO-PADRÃO DA REPRODUTIBILIDADE INTERNA

Se forem utilizados métodos diferentes dos especificados no presente regulamento cujo grau de precisão não tenha sido medido, será necessário proceder a uma validação interna. O desvio-padrão da repetibilidade interna, s_{ir}, e o desvio-padrão da reprodutibilidade interna, s_{iR}, serão então utilizados em vez de σ_r e de σ_R, respectivamente, nas fórmulas de cálculo da incerteza expandida, *U*.

As regras de decisão são as que constam do ponto 1. Contudo, se uma remessa for considerada não-conforme com o limite legal, as medições terão de ser repetidas, utilizando o método especificado no presente regulamento, tomando-se em seguida uma decisão em conformidade com o ponto 1.

▼B

ANEXO III

(Artigo 4.º)

AVALIAÇÃO DOS PROVADORES E FIABILIDADE DOS RESULTADOS DOS EXAMES ORGANOLÉPTICOS

Indicam-se a seguir os procedimentos aplicáveis caso se utilizem métodos de pontuação (IDF — norma 99C:1997).

A. DETERMINAÇÃO DO «ÍNDICE DE REPETIBILIDADE»

Num período de 12 meses, devem ser analisadas em duplicado por um provador, em teste cego, pelo menos dez amostras. Normalmente, a análise será feita em várias sessões. Os resultados respeitantes a cada característica do produto são avaliados utilizando a seguinte fórmula:

$$w_1 = 1 + \left(\left(\sum \left(x_{i1} - x_{i2}\right)^2\right)/n\right)$$

em que:

w_I: :índice de repetibilidade

x_{i1}: pontuação da primeira avaliação da amostra x_i

x_{i2}: pontuação da segunda avaliação da amostra x_i

n: número de amostras.

As amostras a avaliar devem ser representativas dos diferentes níveis de qualidade. O valor w_I não deve ser superior a 1,5 (numa escala de 5 pontos).

B. DETERMINAÇÃO DO «ÍNDICE DE DESVIO»

Este índice deve ser utilizado para verificar se um provador utiliza a mesma escala de avaliação da qualidade que um grupo de provadores experientes. As pontuações atribuídas pelo provador são comparadas com a média das pontuações atribuídas pelo grupo de provadores.

Os resultados são avaliados de acordo com a seguinte fórmula:

$$D_1 = 1 + \left(\sum \left[\left(x_{i1} - \overline{x}_{i1}\right)^2 + \left(x_{i2} - \overline{x}_{i2}\right)^2\right]\right)/\left(2n\right)$$

em que:

x_{i1}; x_{i2}: ver o ponto A)

$\overline{x}_{i1}$; $\overline{x}_{i2}$: pontuação média atribuída pelo grupo de provadores na primeira e segunda avaliações, respectivamente, da amostra x_i

n: número de amostras (pelo menos 10 amostras em cada 12 meses)

As amostras a avaliar devem ser representativas dos diferentes níveis de qualidade. O valor D_1 não deve ser superior a 1,5 (numa escala de 5 pontos).

Os Estados-Membros devem comunicar as dificuldades surgidas na aplicação deste procedimento.

Nos casos em que se verifique que um determinado provador excedeu o limite de 1,5 estabelecido para os índices de desvio ou de repetibilidade, o(s) perito(s) da autoridade oficial devem efectuar uma ou várias verificações do desempenho do mesmo, a amostras classificadas por esse provador nas semanas imediatas, ou acompanhar esse provador num ou mais exmaes por ele efectuados. É necessária uma supervisão aprofundada, que permita decidir se devem ou não continuar a utilizar-se os serviços do provador em questão. As constatações desses procedimentos devem ser documentadas e conservadas como elemento de prova para qualquer acção de seguimento.

▼B

C. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM DIFERENTES REGIÕES DO MESMO ESTADO-MEMBRO E EM DIFERENTES ESTADOS-MEMBROS

Pelo menos uma vez por ano será organizado um ensaio que permita comparar os resultados obtidos pelos provadores de diferentes regiões, se for o caso. Se forem detectadas diferenças significativas, devem ser tomadas as medidas necessárias para identificar as razões dessas diferenças e para conseguir resultados comparáveis.

Os Estados-Membros podem organizar ensaios comparativos dos resultados obtidos pelos seus provadores e por provadores de Estados-Membros vizinhos. Caso sejam detectadas diferenças significativas, deve ser efectuado um estudo aprofundado, tendo em vista à obtenção de resultados comparáveis.

Os Estados-Membros devem comunicar à Comissão os resultados desses ensaios comparativos.

▼B

ANEXO IV

(Artigo 4.º)

EXAME ORGANOLÉPTICO DA MANTEIGA

1. OBJECTO

O presente método descreve um procedimento uniforme para o exame organoléptico da manteiga, aplicável em todos os Estados-Membros.

Para mais informações, consultar a versão actual da norma internacional IDF para o leite e produtos lácteos, IDF 99 — Partes 1, 2 e 3, relativas aos exames organolépticos.

2. DEFINIÇÕES

Entende-se por: «Exame organoléptico» (avaliação), a apreciação das características de um produto pelos órgãos dos sentidos.

«Júri», um grupo de provadores seleccionados que trabalha, durante a avaliação, sem comunicar e sem exercer quaisquer influências entre si.

«Provador», uma pessoa escolhida pela sua capacidade para a realização de exames organolépticos. O provador poderá ser uma pessoa sem muita experiência.

«Perito provador», uma pessoa com um elevado grau de percepção sensorial e com uma grande experiência em termos de metodologias de avaliação organoléptica, capaz de avaliar de forma coerente e fiável as características organolépticas de diversos produtos. Este tipo de provador terá de dispor de uma boa memória sensorial a longo prazo.

«Pontuação», a avaliação organoléptica pelo júri, utilizando uma escala numérica. Deve ser utilizada uma nomenclatura de defeitos.

«Classificação», uma avaliação qualitativa realizada com base na pontuação.

«Documento de controlo», um documento utilizado para registar as pontuações individuais respeitantes a cada atributo e a classificação final do produto. (Este documento pode ser também utilizado para registar a composição química.)

3. SALA DE PROVA

Para mais informações, consultar as normas ISO 8589 e ISO/DIS 22935-2 IDF 99-2, ponto 7.

Devem ser tomadas precauções para que os provadores na sala de prova não sejam influenciados por factores externos.

A sala de prova deve estar isenta de cheiros estranhos e ser de fácil limpeza. As paredes devem ser de cor clara e não devem produzir reflexos.

A sala de prova e a sua iluminação devem ser tais que as propriedades dos produtos a classificar não sejam afectadas.

A sala deve estar equipada com um dispositivo adequado de controlo termostático, de modo a garantir uma temperatura constante da manteiga. Para a classificação, a manteiga deve encontrar-se a uma temperatura de 12 °C (±2 °C).

4. SELECÇÃO DOS PROVADORES

O provador deve estar familiarizado com as várias manteigas e ter competência para efectuar a classificação organoléptica. Essa competência deve ser avaliada regularmente (pelo menos uma vez por ano) pela autoridade competente.

4.1. Para mais informações sobre as exigências gerais e sobre os ensaios de avaliação que poderão ser efectuados antes da entrada oficial em funções de um novo provador, consultar a norma ISO/DIS 22935-1 IDF 99-1, pontos 4 (recrutamento) e 5.1

É fundamental uma formação contínua e que sejam regularmente organizadas sessões de carácter geral. Para mais informações sobre a formação dos membros do júri, consultar a norma ISO 8586-1.

▼B

4.2. A formação inicial deve abranger os seguintes domínios:

— Teoria geral e importância prática do exame organoléptico;

— Métodos, escalas e descrição das impressões sensoriais;

— Detecção e reconhecimento de atributos sensoriais e termos específicos da análise sensorial;

— Formação de base sobre o fabrico de manteiga;

— Referências e amostras validadas que possam ajudar o provador a identificar sabores específicos e intensidades de sabor de produtos.

5. EXIGÊNCIAS RELATIVAS AO JÚRI

O número de provadores do júri deve ser ímpar, não podendo ser inferior a três. Os provadores devem ser, na sua maioria, funcionários da autoridade competente ou pessoas autorizadas que não trabalhem para a indústria dos laticínios.

O presidente do júri será responsável por todo o procedimento e poderá integrar o júri.

Antes do exame organoléptico, deve atender-se a diversos factores, de modo a optimizar o desempenho dos provadores:

— Os provadores não devem sofrer de nenhuma doença que possa afectar o seu desempenho. Se for esse o caso, o provador em questão deverá ser substituído por outro no júri;

— Os provadores devem apresentar-se com pontualidade para participar no exame organoléptico e certificar-se de que dispõem de tempo suficiente para efectuar o exame;

— Os provadores não poderão utilizar produtos fortemente odoríferos, tais como perfumes, loções para depois do barbear, desodorizantes, etc., e devem evitar alimentos fortemente aromatizados (nomeadamente muito temperados), etc.;

— Os provadores não podem fumar ou comer, nem beber qualquer líquido, com excepção de água, na meia-hora que preceder a avaliação.

6. DESEMPENHO

Todos os provadores devem participar regularmente em júris de exames organolépticos, a fim de conservarem as suas competências. A frequência dessa participação dependerá da quantidade e da produção de manteiga e será, quando possível, pelo menos mensal.

Os provadores mais experientes também devem participar todos os anos em alguns júris, se possível pelo menos uma vez por trimestre.

7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

É essencial que a identidade das amostras não seja divulgada durante a avaliação, de forma a evitar qualquer eventual influência. As amostras devem ser codificadas.

A codificação deve ser organizada antes da avaliação. Deve ser imposta uma exigência de conservação da manteiga a uma determinada temperatura (6 °C ± 2 °C) durante o transporte para a sala de prova.

Quando o exame organoléptico for efectuado num armazém frigorífico, a amostra deve ser colhida utilizando uma sonda para manteiga. Se o exame organoléptico for efectuado noutro local que não um armazém frigorífico, devem ser colhidos pelo menos 500 g de amostra. Durante o exame, a manteiga deve ser conservada a uma temperatura de 12 °C (± 2 °C) (referência: no caso da norma ISO/DIS 22935-2 IDF 99-2, a temperatura de exame da manteiga é de 14 °C ± 2 °C). É fundamental evitar grandes desvios.

8. AVALIAÇÃO DO VALOR DE CADA ATRIBUTO

8.1. O exame organoléptico deve incidir nos três atributos seguintes: aspecto, consistência e sabor

O «aspecto» abrange as seguintes características: cor, pureza aparente, ausência de contaminação física, ausência de crescimento de fungos e uniformidade da dispersão aquosa. A dispersão aquosa é verificada pela norma ISO 112A/1989.

▼B

A «consistência» abrange as seguintes características: corpo, textura e firmeza. A aptidão para barrar da manteiga pode ser verificada através de meios físicos, caso um determinado Estado-Membro o entenda necessário para satisfazer as exigências dos seus consumidores. A Comissão poderá vir a adoptar uma metodologia harmonizada.

O «corpo» é um termo relacionado com o grau de coesão do produto, à medida que vai sendo consumido. É normalmente associado à firmeza e à aptidão para barrar e deve ser uniforme em todo o produto. Está estreitamente relacionado com a textura e corresponde à capacidade do produto em termos de conservação da sua forma sob a acção da gravidade. Uma indicação do corpo é a resistência ao corte; pode ser medido mecanicamente ou através de compressão na boca ou entre os dedos.

O «sabor» é a característica sentida na boca, fundamentalmente pelas papilas gustativas da língua.

O «aroma» é a característica sentida pelo nariz e pelo sentido do olfato.

Um desvio significativo da temperatura recomendada impossibilita uma avaliação fiável da consistência e do sabor. Por conseguinte, a temperatura tem uma importância capital.

A classificação da manteiga deve ser adiada se a temperatura se encontrar fora do intervalo recomendado.

8.2. Cada atributo deve ser examinado organolepticamente de forma separada. A pontuação é atribuída de acordo com o quadro 1.

8.3. Pode ser desejável que, antes de iniciarem o exame, os provadores pontuem em conjunto o aspecto, consistência e sabor de uma ou mais amostras de referência, de modo a obter-se uniformidade.

8.4. A pontuação para a aceitação é a seguinte:

No que respeita à atribuição das pontuações, consultar a parte 7 — Nomenclatura e descrição dos critérios de pontuação.

	Máxima	Exigida
Aspecto	5	4
Consistência	5	4
Sabor/aroma	5	4

— Quando não for obtida a pontuação necessária, devem descrever-se os defeitos verificados.

— A pontuação atribuída por cada provador a cada atributo deve ser registada no documento de controlo.

— O produto é aceite ou rejeitado com base numa decisão adoptada por maioria.

— Não devem ocorrer frequentemente (não mais do que uma vez em cada vinte amostras) casos em que as diferenças entre as pontuações individuais de cada atributo sejam superiores a um ponto. Se tal suceder, o presidente do júri deve verificar a competência do mesmo.

9. SUPERVISÃO

O presidente do júri, que deve ser um funcionário da autoridade competente e poderá integrar o júri, ficará genericamente responsável por todo o procedimento. Compete-lhe registar as pontuações individuais de cada atributo no documento de controlo e certificar a aceitação ou rejeição do produto.

10. NOMENCLATURA

Ver o quadro 2 anexo.

11. REFERÊNCIAS

FIL-IDF 99C:1997 Sensory evaluation of dairy products by scoring — Reference method

ISO/DIS 22935IDF 99 International Standard for Milk and Milk Products — Sensory analysis — Parts 1-3

▼B

ISO 8586-1 Sensory analysis — General guidance for selection, training and monitoring of assessors — Part 1

ISO 8589 sensory analysis — General guidance for the design of test rooms

FIL-IDF 112A:1989 Butter — Determination of water dispersion value

Quadro 1

Classificação da manteiga

Aspecto			Consistência			Sabor + aroma		
Pontos	N.º (1)	Observações	Pontos (classe qualitativa)	N.º (1)	Observações	Pontos (classe qualitativa)	N.º (1)	Observações
5		*Muito bom* Tipo ideal Qualidade superior (sem humidade visível)	5		*Muito boa* Tipo ideal Qualidade superior (fácil de barrar)	5		*Muito bom* Tipo ideal Qualidade superior (aroma absolutamente puro e perfeito)
4		*Bom* (2) Sem defeitos evidentes	4	17 18	*Boa* (2) Dura Mole	4		*Bom* (2) Sem defeitos evidentes
3	1 2 3 4 5 6 7 8	*Razoável (defeitos ligeiros)* Aquoso, gotas de água visíveis Não homogéneo, bicolor Raiado Marmoreado Manchado Separação de óleo Coloração demasiado intensa Presença de ar aparente (poroso)	3	14 15 16 17 18	*Razoável (defeitos ligeiros)* Friável, quebradiça, grumosa Pastosa, massuda, gordurosa Pegajosa Dura Mole	3	21 22 25 27 33 34 35	*Razoável (defeitos ligeiros)* Impuro Sabor estranho Ácido Sabor a cozinhado, sabor a queimado Sabor a forragem Acre, amargo Demasiado salgado
2	1 3 4 5 6 10 11 12	*Fraco (defeitos evidentes)* Aquoso, gotas de água visíveis Raiado Marmoreado Manchado Separação de óleo Matérias estranhas Bolorento Sal não-dissolvido	2	14 15 16 17 18	*Fraca (defeitos evidentes)* Friável, quebradiça, grumosa Pastosa, massuda, gordurosa Pegajosa Dura Mole	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	*Fraco (defeitos evidentes)* Impuro Sabor estranho Sabor a velho Ácido Sabor a oxidado, sabor metálico Sabor a forragem Acre, amargo Demasiado salgado Sabor a bolor, pútrido Sabor a produtos químicos
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	*Muito fraco (defeitos acentuados)* Aquoso, gotas de água visíveis Raiado Marmoreado Manchado Separação de óleo Coloração demasiado intensa Granuloso Matérias estranhas Bolorento Sal não-dissolvido	1	14 15 16 17 18	*Muito fraca (defeitos acentuados)* Friável, quebradiça, grumosa Pastosa, massuda, gordurosa Pegajosa Dura Mole	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 35 36 37 38	*Muito fraco (defeitos acentuados)* Sabor estranho Sabor a queijo, sabor a queijo ácido Ácido Fermentado Sabor a bolor Rançoso Oleoso, sabor a peixe Seboso Sabor a oxidado, sabor metálico Acre, amargo Demasiado salgado Sabor a bolor, pútrido Sabor a malte Sabor a produtos químicos

(1) Quadro 2.
(2) Os defeitos da categoria «Bom» correspondem apenas a desvios muito ligeiros do tipo ideal.

▼B

Quadro 2

Nomenclatura dos defeitos da manteiga

I.	Aspecto
1.	Aquoso, gotas de água visíveis
2.	Não homogéneo, bicolor
3.	Raiado
4.	Marmoreado
5.	Manchado
6.	Separação de óleo
7.	Coloração demasiado intensa
8.	Presença de ar aparente (poroso)
9.	Granuloso
10.	Matérias estranhas
11.	Bolorento
12.	Sal não-dissolvido
II.	Consistência
14.	Friável, quebradiça, grumosa
15.	Pastosa, massuda, gordurosa
16.	Pegajosa
17.	Dura
18.	Mole
III.	Sabor e aroma
20.	Falta de sabor
21.	Impuro ([1])
22.	Sabor estranho
23.	Sabor a velho
24.	Sabor a queijo, sabor a queijo ácido
25.	Ácido
26.	Fermentado
27. a)	Sabor a cozido
b)	Sabor a queimado
28.	Sabor a bolor
29.	Rançoso
30.	Oleoso, sabor a peixe
31.	Seboso
32. a)	Sabor a oxidado
b)	Sabor metálico
33.	Sabor a forragem
34.	Acre, amargo
35.	Demasiado salgado
36.	Sabor a bolor, pútrido
37.	Sabor a malte
38.	Sabor a produtos químicos

([1]) Esta designação só ocasionalmente deve ser utilizada, quando não seja possível uma descrição mais precisa do defeito.

▼B

ANEXO V

(Artigo 5.º)

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TRIGLICÉRIDOS DO ÁCIDO ENÂNTICO NA MANTEIGA, NO BUTTEROIL E NA NATA ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS TRIGLICÉRIDOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

1. OBJECTO

O presente método descreve um procedimento para a determinação do teor de triglicéridos do ácido enântico na manteiga, no *butteroil* e na nata.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

Teor de ácido enântico: teor de triglicéridos do ácido enântico, determinado pelo procedimento estabelecido no presente método.

Nota: O teor em ácido enântico é expresso em kg por tonelada de produto, no caso da manteiga e do *butteroil*, e em kg por tonelada de matéria gorda láctea, no caso da nata.

3. PRINCÍPIO

Extrai-se a matéria gorda láctea dos diferentes produtos, segundo a norma ISO 14156 IDF 172:2001. Determina-se quantitativamente o teor de triglicéridos do ácido enântico na matéria gorda extraída por cromatografia em fase gasosa (CG) em coluna capilar. Avalia-se o resultado obtido para a amostra utilizando triglicéridos do ácido capróico como padrão interno.

Nota: A tributirina também apresentou resultados satisfatórios como padrão interno.

4. REAGENTES

Utilizar apenas reagentes de grau analítico reconhecido.

4.1. *n*-Hexano

4.2. Padrão de triglicéridos do ácido capróico, com grau de pureza mínimo de 99 %

4.3. Padrão de triglicéridos do ácido enântico, com grau de pureza mínimo de 99 %

4.4. Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4)

5. EQUIPAMENTO

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

5.1. Balança analítica de precisão com a aproximação de 1 mg

5.2. Balões aferidos de 10 ml e de 20 ml

5.3. Tubos de centrífuga, com 30 ml

5.4. Evaporador rotativo

5.5. Forno capaz de manter uma temperatura constante de 50 ± 5 °C

5.6. Papel de filtro de porosidade média, com cerca de 15 cm de diâmetro

5.7. Equipamento de cromatografia em fase gasosa

5.7.1. Cromatógrafo em fase gasosa equipado com um injector com ou sem divisor da amostra ou com injecção na coluna e com um detector de ionização por chama (FID)

5.7.2. Coluna para CG, com uma fase estacionária (enchimento) que tenha sido utilizada com sucesso na separação de triglicéridos (100 % de dimetilpolissiloxano ou 5 % de fenilpolissiloxano — 95 % de metilpolissiloxano). Seleccionar a fase estacionária, o comprimento da coluna (entre 4 m e 15 m), o seu diâmetro interno (entre 0,22 mm e 0,5 mm) e a espessura do filme (0,12 μm ou mais) em função da experiência adquirida no laboratório e do sistema de injecção utilizado. A coluna escolhida deve permitir tanto a separação completa entre os picos do solvente e dos triglicéridos do ácido capróico como uma resolução suficiente, ao nível da linha de base, entre os picos dos triglicéridos dos ácidos capróico e enântico. Apresentam-se, em seguida, alguns exemplos das condições aplicáveis.

▼B

5.7.2.1. Exemplo de condições aplicáveis (utilização de um injector com divisor da amostra):

— Gás transportador: hélio

— Pressão à entrada da coluna: 100 kPa

— Coluna: coluna com enchimento de sílica fundida, 12 m de comprimento, 0,5 mm de diâmetro interno e 0,1 μm de espessura de filme

— Fase estacionária: 100 % de dimetilpolissiloxano ou 5 % de fenilpolissiloxano — 95 % de dimetilpolissiloxano (por exemplo: HT5)

— Temperatura na coluna: temperatura inicial de 130 °C, mantida durante 1 minuto, aumentada ao ritmo de 20 °C/min até 260 °C e depois ao ritmo de 30 °C/min até 360 °C; manter a 360 °C durante 10 minutos

— Temperatura do detector: 370 °C

— Temperatura do injector: 350 °C

— Rácio de divisão da amostra: 1:30

— Quantidade de amostra a injectar: 1 μl

5.7.2.2. Exemplo de condições aplicáveis (utilização de um injector na coluna):

— Gás transportador: hidrogénio (sistema de fluxo constante)

— Pressão à entrada da coluna: 89 kPa

— Coluna: coluna com enchimento de sílica fundida, 4 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme

— Fase estacionária: 5 % de fenilpolissiloxano — 95 % de dimetilpolissiloxano

— Temperatura na coluna: temperatura inicial de 60 °C, mantida durante 2 minutos, aumentada ao ritmo de 35 °C/min até 340 °C e mantida a essa temperatura durante 5 minutos

— Temperatura do detector: 350 °C

— Quantidade de amostra a injectar: 1 μl

5.8. Seringa para injecção, capacidade de 5 μl

6. AMOSTRAGEM

É importante que o laboratório receba uma amostra que seja verdadeiramente representativa e que não tenha sido danificada nem alterada durante o transporte ou armazenagem.

A amostragem não está contemplada no método descrito nesta norma internacional. A norma IDF: standard 50C:1995 ou ISO 707-1997 — Leite e produtos lácteos — Métodos de amostragem descreve um método de amostragem recomendado.

7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparação da amostra de ensaio e da toma para análise**

Aplicar os procedimentos da norma ISO 14156 IDF 172:2001.

7.1.1. *Butteroil, manteiga*

7.1.1.1. Derreter 50-100 g da amostra de ensaio no forno (5.5).

7.1.1.2. Colocar 0,5-1,0 g de sulfato de sódio anidro (5.4) num papel de filtro dobrado.

7.1.1.3. Filtrar a matéria gorda através do papel de filtro com sulfato de sódio anidro, recolhendo o filtrado num frasco conservado no forno (5.5). Durante a decantação da manteiga derretida para o papel de filtro, não pode haver transferências de soro.

7.1.2. *Nata*

7.1.2.1. Aquecer a amostra de ensaio até á temperatura de 20 ± 2 °C.

7.1.2.2. Misturar ou agitar bem a amostra.

7.1.2.3. Diluir uma quantidade adequada de amostra de ensaio de modo a obter 100 ml de toma para análise com uma fracção mássica de matéria gorda aproximadamente igual a 4 %.

▼B

7.1.2.4. Aplicar o mesmo procedimento utilizado para o leite crú e para o leite homogeneizado (ver a norma ISO 14156 IDF 172:2001, §8.3), a fim de extrair a matéria gorda da nata.

7.1.2.5. Pesar com uma aproximação de 1 mg, num balão aferido de 10 ml (5.2), 1 g da matéria gorda extraída. Juntar 1 ml da solução 7.2.2. Completar até 10 ml com *n*-hexano (4.1) e homogeneizar.

7.1.2.6. Colocar 1 ml da solução 7.1.1.2 num balão aferido de 10 ml (5.2) e completar até 10 ml com *n*-hexano (4.1).

7.2. **Preparação dos padrões de calibração**

7.2.1. Dissolver 100 mg de triglicéridos do ácido enântico (4.3) em 10 ml de *n*-hexano (4.1).

7.2.2. Dissolver 100 mg de triglicéridos do ácido capróico (4.2) em 10 ml de *n*-hexano (4.1).

7.2.3. Colocar 1 ml da solução 7.2.2 num balão aferido de 10 ml (5.2) e completar até 10 ml com *n*-hexano (4.1).

7.2.4. Colocar 1 ml da solução 7.2.1 e 1 ml da solução 7.2.2 num balão aferido de 10 ml (5.2) e completar até 10 ml com *n*-hexano (4.1).

7.2.5. Colocar 1 ml da solução 7.2.4 num balão aferido de 10 ml (5.2) e completar até 10 ml com *n*-hexano (4.1).

7.3. **Análise cromatográfica**

7.3.1. Injectar duas vezes 1 µl da solução-padrão 7.2.5.

7.3.2. Injectar 1 µl de cada solução de amostra em análise.

Nota: Caso seja adoptado o sistema de injecção na coluna, deve utilizar-se uma diluição maior, tanto para as amostras como para as soluções-padrão.

7.3.3. Repetir a operação 7.3.1 a cada 3 amostras, de modo a enquadrar as amostras entre duas injecções de padrão. Os resultados basear-se-ão na média dos factores de resposta dos cromatogramas dos padrões.

8. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Em cada cromatograma, integrar a área dos picos correspondentes aos triglicéridos dos ácidos enântico e capróico.

Proceder deste modo em relação a cada uma das sequências entre duas injecções de solução-padrão, ou seja, para cada série de amostras enquadradas, as duas injecções de solução-padrão imediatamente antes dessas amostras funcionarão como primeiro padrão (STD_1) e as duas injecções de solução-padrão injectadas imediatamente após as mesmas amostras funcionarão como segundo padrão (STD_2).

8.1. **Calibração**

8.1.1. Calcular o factor de resposta para cada duplicado de STD_1, $Rf_1(a)$ e $Rf_1(b)$:

Rf_1 (a) ou (b) = (Área do pico de triglicéridos do ácido capróico/Área do pico de triglicéridos do ácido enântico) × 100

Calcular a média dos factores de resposta, Rf_1:

$$Rf_1 = (Rf_1(a) + Rf_1(b)) / 2$$

8.1.2. Calcular, da mesma forma, a média dos factores de resposta de STD_2, Rf_2.

8.1.3. Calcular a média dos factores de resposta, Rf:

$$Rf = (Rf_1 + Rf_2) / 2$$

8.2. **Amostras de ensaio**

Para cada cromatograma das amostras compreendidas entre o STD_1 e o STD_2, calcular o teor de ácido enântico, C (kg/t):

C = (Área do pico de triglicéridos do ácido enântico × Rf × 100)/(Área do pico de triglicéridos do ácido capróico × Wt × 1 000)

em que:

— Wt = peso da toma de matéria gorda (g),

— 100 = volume de diluição da amostra,

— 1 000 = factor de conversão (de µg/g para kg/t)

▼B

No caso das amostras de manteiga, tomar em consideração o teor de matéria gorda e calcular um valor de concentração corrigido, $C_{manteiga}$ (kg/t de manteiga):

$$C_{manteiga} = C_{MG} \times F,$$

em que F teor de matéria gorda da manteiga.

9. PRECISÃO

Apresentam-se no ponto 12 mais informações pormenores sobre um ensaio de comparação interlaboratorial relativo à manteiga em conformidade com as normas ISO 5725-1 e ISO 5725-2, referentes à precisão.

Os valores dos limites de repetibilidade e de reprodutibilidade são expressos em relação ao nível de probabilidade de 95 %, podendo não ser aplicáveis a gamas de concentrações e a matrizes diferentes das referidas.

9.1. **Repetibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados de ensaio independentes, obtidos por aplicação do mesmo método a matérias em estudo idênticas, no mesmo laboratório e pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento num curto intervalo de tempo, não deve exceder em mais de 5 % dos casos 0,35 kg/t.

9.2. **Reprodutibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados de ensaio independentes, obtidos por aplicação do mesmo método a matérias em estudo idênticas, em laboratórios diferentes, por operadores diferentes, utilizando equipamentos diferentes, não deve exceder em mais de 5 % dos casos 0,66 kg/t.

10. LIMITES DE TOLERÂNCIA: LIMITES INFERIORES (QUANTIDADE INSUFICIENTE)

10.1. **Para verificar se o produto foi marcado de forma adequada, devem colher-se três amostras do produto marcado.**

10.2. **Manteiga e manteiga concentrada**

10.2.1. A taxa de incorporação é de 11 kg de triglicéridos do ácido enântico com grau de pureza mínimo de 95 % por tonelada de manteiga, ou seja, 10,45 kg/t.

10.2.2. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 9,51 kg/t (95 % da taxa mínima de incorporação de triglicéridos do ácido enântico com grau de pureza mínimo de 95 %, uma única determinação),

— 6,89 kg/t (70 % da taxa mínima de incorporação de triglicéridos do ácido enântico com grau de pureza mínimo de 95 %, uma única determinação),

— A concentração de marcador da amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 9,51 kg/t e 6,89 kg/t.

10.3. **Nata**

10.3.1. A taxa de incorporação é de 10 kg de triglicéridos do ácido enântico com grau de pureza mínimo de 95 % por tonelada de matéria gorda láctea, ou seja, 9,50 kg/tonelada de matéria gorda láctea marcada.

10.3.2. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 8,60 kg/t (95 % da taxa mínima de incorporação de triglicéridos do ácido enântico com grau de pureza mínimo de 95 %, uma única determinação),

— 6,23 kg/t (70 % da taxa mínima de incorporação de triglicéridos do ácido enântico com grau de pureza mínimo de 95 %, uma única determinação),

▼B

— A concentração do marcador na amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 8,60 kg/t e 6,23 kg/t.

11. LIMITES DE TOLERÂNCIA: LIMITES SUPERIORES (QUANTIDADE EXCEDIDA EM MAIS DE 20 %)

11.1. **Para verificar se o produto foi marcado de forma adequada, devem colher-se três amostras do produto marcado.**

11.2. **Manteiga e manteiga concentrada**

11.2.1. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo a média desses resultados comparada com o seguinte limite:

— Limite superior: 12,96 kg/t.

11.3. **Nata**

11.3.1. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo a média desses resultados comparada com o seguinte limite:

— Limite superior: 11,82 kg/t.

12. INFORMAÇÕES ADICIONAIS: ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE TRIENANTOATOS NA MATÉRIA GORDA BUTÍRICA, ATRAVÉS DE ANÁLISE DOS TRIGLICÉRIDOS

Foram efectuados quatro ensaios em colaboração para a determinação do teor de trienantoatos na manteiga marcada.

A primeira prova circular contou com a participação de nove laboratórios, não tendo sido especificado qualquer método analítico a utilizar.

A segunda prova circular contou com a participação de dez laboratórios, tendo sido utilizados quatro métodos diferentes:

— Determinação quantitativa do heptanoato de metilo utilizando *n*-nonano ou nonanoato de metilo como padrão interno;

— Determinação quantitativa dos trienantoatos utilizando tricaproatos como padrão interno;

— Determinação quantitativa do heptanoato de metilo utilizando uma amostra/mistura de calibração;

— Determinação quantitativa do heptanoato de metilo utilizando uma mistura de calibração.

Por outro lado, no caso das análises de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME), foram utilizados dois procedimentos diferentes de metilação (De Francesco e Christopherson & Glass).

Tendo em conta os resultados obtidos, seleccionaram-se dois métodos para a terceira prova circular:

— Determinação quantitativa do heptanoato de metilo utilizando *n*-nonano ou nonanoato de metilo como padrão interno;

— Determinação quantitativa dos trienantoatos utilizando tricaproatos como padrão interno.

Os resultados de sete laboratórios mostraram que o método FAME tem uma variabilidade mais elevada, pelo que foi decidido utilizar apenas a determinação dos trienantoatos na forma de triglicéridos, procedendo à determinação quantitativa dos trienantoatos utilizando tricaproatos como padrão interno. A análise dos triglicéridos é efectuada em coluna capilar.

Para a quarta prova circular, foram distribuídas quatro amostras (A, B, C e D), tendo apresentado resultados nove laboratórios (quadros 1-2).

▼B

Dois laboratórios (Alemanha e UE) analisaram as amostras pelo método FAME.

Dado o número reduzido de laboratórios, foram efectuados cálculos estatísticos tanto em relação ao conjunto completo de dados (figuras 1--2), incluindo os resultados obtidos pelo método FAME, como em relação aos dados provenientes da análise de triglicéridos.

Determinação de casos anómalos:

— Amostra A. Os testes de Dixon, de Cochran e de Grubbs aos níveis de 1 % e de 5 % evidenciaram um laboratório com resultados anómalos.

— Amostra B. O teste de Grubbs ao nível de 5 % evidenciou um laboratório com resultados anómalos.

— Amostra C. Os testes de Dixon e de Grubbs aos níveis de 1 % e de 5 % evidenciaram um laboratório com resultados anómalos.

— Amostra D. Os testes de Dixon e de Grubbs aos níveis de 1 % e de 5 % evidenciaram um laboratório com resultados anómalos.

O laboratório que apresentou resultados anómalos foi excluído dos cálculos.

Cabe aqui notar que os resultados obtidos pelo método FAME nunca foram considerados anómalos pelos testes efectuados.

Parâmetros de precisão

Os quadros 1 e 2 mostram os resultados de todos os laboratórios e os parâmetros de precisão calculados em relação a um número aceitável de laboratórios (8), mas que, infelizmente, não se referem sempre ao mesmo método analítico.

Os quadros 3 e 4 mostram os resultados obtidos apenas pelo método dos triglicéridos (TG) e os parâmetros de precisão correspondentes. A aceitação desses parâmetros está dependente da aceitação do reduzido número de laboratórios (6).

As figuras 2 e 3 mostram os desvios-padrão da repetibilidade, Sr, e os desvios-padrão da reprodutibilidade, SR, calculados para as quatro amostras, dos dois conjuntos de dados acima descritos.

O quadro 5 mostra os valores de Sr e de SR, juntamente com os correspondentes valores agregados e com os parâmetros r e R globais.

Finalmente, foram calculadas as diferenças críticas para um nível de probabilidade de 95 % (CrD95).

Quadro 1

Resultados estatísticos dos métodos TG + FAME*

Amostra A		R_1	R_2	Média	Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	N.º de casos anómalos	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Casos anómalos	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Valor médio	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valor real	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Desvio-padrão da repetibilidade (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSDr %)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Repetibilidade r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Repetibilidade relativa r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Desvio-padrão da reprodutibilidade (SR)	0,23
					Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSDR %)	2,04
					Reprodutibilidade R (95 %)	0,84
					Reprodutibilidade relativa R %	5,71

▼B

Amostra B		R_1	R_2	Média	Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	N.º de casos anómalos	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Casos anómalos	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Valor médio	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valor real	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Desvio-padrão da repetibilidade (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Repetitibilidade relativa de sd (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Repetibilidade r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Repetibilidade relativa r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Desvio-padrão da reprodutibilidade (SR)	0,35
					Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSDR %)	2,61
					Reprodutibilidade R (95 %)	0,99
					Reprodutibilidade relativa R %	7,31

Quadro 2

Resultados estatísticos dos métodos TG + FAME*

Amostra C		R_1	R_2	Média	Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	N.º de casos anómalos	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Casos anómalos	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Valor médio	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valor real	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Desvio-padrão da repetibilidade (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Repetitibilidade relativa de sd (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Repetibilidade r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Repetibilidade relativa r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Desvio-padrão da reprodutibilidade (SR)	0,17
					Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSDR %)	1,82
					Reprodutibilidade R (95 %)	0,47
					Reprodutibilidade relativa R %	5,10
Amostra D		R_1	R_2	Média	Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	N.º de casos anómalos	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Casos anómalos	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Valor médio	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valor real	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Desvio-padrão da repetibilidade (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Desvio-padrão relativo da repetitibilidade (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Repetibilidade r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Repetibilidade relativa r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Desvio-padrão da reprodutibilidade (SR)	0,24
					Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSDR %)	11,43
					Reprodutibilidade R (95 %)	0,67
					Reprodutibilidade relativa R %	32,00

▼B

Quadro 3

Resultados estatísticos dos métodos TG + FAME*

Amostra A		R_1	R_2	Média	Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	N.º de casos anómalos	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Casos anómalos	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valor médio	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Valor real	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Desvio-padrão da repetibilidade (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Desvio-padrão relativo da repetitibilidade (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Repetibilidade r (95 %)	0,25
					Repetibilidade relativa r %	2,24
					Desvio-padrão da reprodutibilidade (SR)	0,13
					Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSDR %)	1,16
					Reprodutibilidade R (95 %)	0,36
					Reprodutibilidade relativa R %	3,25
Amostra B		R_1	R_2	Média	Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	N.º de casos anómalos	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Casos anómalos	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valor médio	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Valor real	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Desvio-padrão da repetibilidade (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Desvio-padrão relativo da repetitibilidade (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Repetibilidade r (95 %)	0,42
					Repetibilidade relativa r %	3,16
					Desvio-padrão da reprodutibilidade (SR)	0,33
					Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSDR %)	2,48
					Reprodutibilidade R (95 %)	0,93
					Reprodutibilidade relativa R %	6,94

Quadro 4

Resultados estatísticos do método TG

Amostra C		R_1	R_2	Média	Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	N.º de casos anómalos	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Casos anómalos	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valor médio	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Valor real	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Desvio-padrão da repetibilidade (Sr)	0,15
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Desvio-padrão relativo da repetitibilidade (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Repetibilidade r (95 %)	0,42
					Repetibilidade relativa r %	4,51
					Desvio-padrão da reprodutibilidade (SR)	0,19
					Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSDR %)	2,04
					Reprodutibilidade R (95 %)	0,53
					Reprodutibilidade relativa R %	5,71

▼B

Amostra D		R_1	R_2	Média	Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	N.º de casos anómalos	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Casos anómalos	DK
					Valor médio	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valor real	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Desvio-padrão da repetibilidade (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Repetibilidade r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Repetibilidade relativa	12,01
					Desvio-padrão da reprodutibilidade (SR)	0,25
					Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSDR %)	11,90
					Reprodutibilidade R (95 %)	0,69
					Reprodutibilidade relativa R %	33,32

Quadro 5

Repetibilidade e reprodutibilidade (com o método FAME)

	N.º de laboratórios anómalos	Casos anómalos	Repetibilidade Sr (95 %)	Reprodutibilidade SR (95 %)
Amostra A	8	1	0,09	0,23
Amostra B	8	1	0,14	0,35
Amostra C	8	1	0,14	0,17
Amostra D	8	1	0,08	0,24
Valor ponderado			0,116	0,256
			R	**R**
Valor agregado * 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40
Grau de pureza mínima estabelecido para os trienantoatos = 95 %
Limite mínimo estabelecido para os trienantoatos na matéria gorda butírica = 11 kg/t
Tomando em consideração a diferença crítica para um nível de probabilidade de 95 %, a média dos dois resultados não deve ser inferior a:

no caso de incorporação de trienantoatos com grau de pureza de 95 %, 10,05 kg/t.

Repetibilidade e reprodutibilidade (sem o método FAME)

	N.º de laboratórios	Casos anómalos	Repetibilidade Sr (95 %)	Reprodutibilidade SR (95 %)
Amostra A	6	1	0,09	0,13
Amostra B	6	1	0,15	0,33
Amostra C	6	1	0,15	0,19
Amostra D	6	1	0,09	0,25
Valor agregado			0,124	0,237
			r	**R**
Valor agregado * 2,8			**0,347**	**0,663**

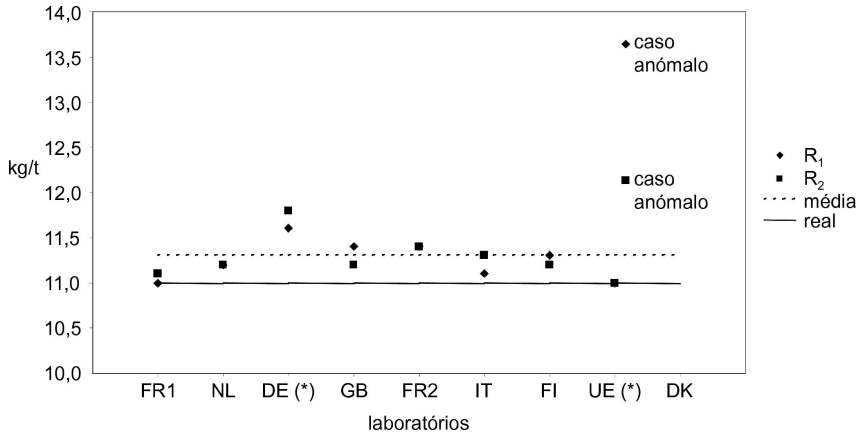
CrD95 = 0,36
Grau de pureza mínima estabelecido para os trienantoatos = 95 %
Limite mínimo estabelecido para os trienantoatos na matéria gorda butírica = 11 kg/t
Tomando em consideração a diferença crítica para um nível de probabilidade de 95 %, a média dos dois resultados não deve ser inferior a:

no caso de incorporação de trienantoatos com grau de pureza de 95 %, 10,09 kg/t.

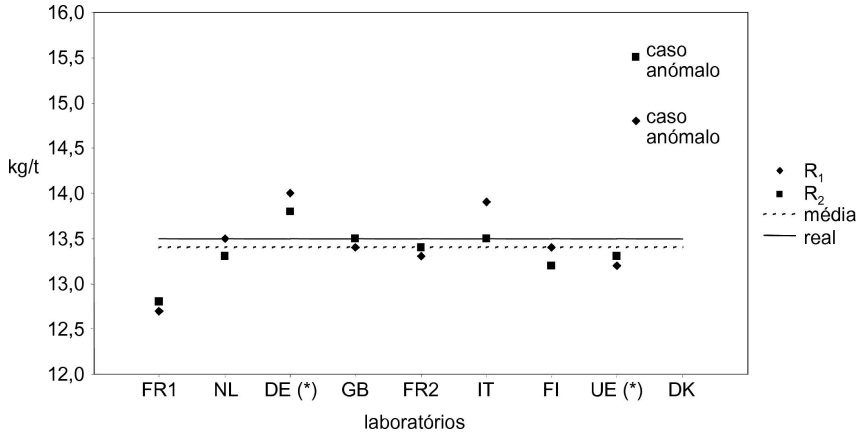
▼B

Figura 1 (*)

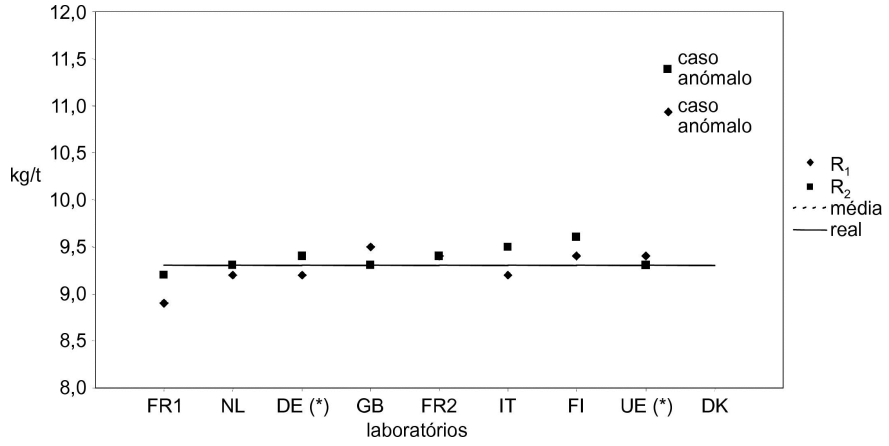
Resultados experimentais: Amostra A



Resultados experimentais: Amostra B



Resultados experimentais: Amostra C



(*) = Métdodo FAME.

▼B

Resultados experimentais: Amostra D

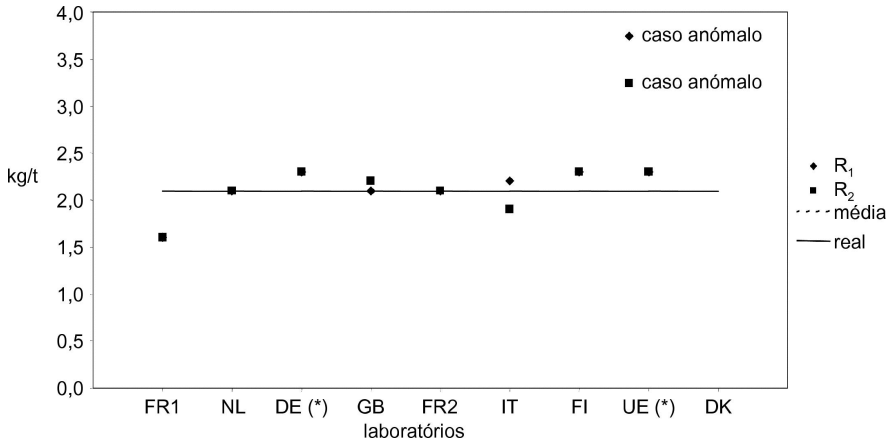


Figura 2

Desvio-padrão da repetibilidade e da reprodutivibilidade (TG+FAME)

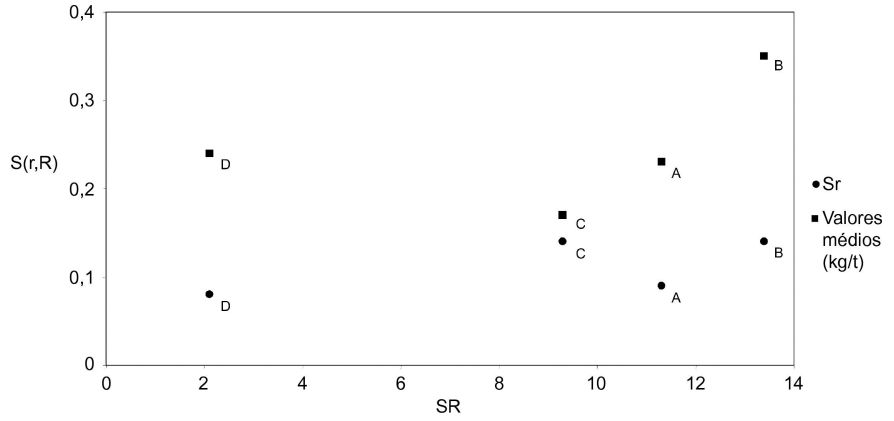
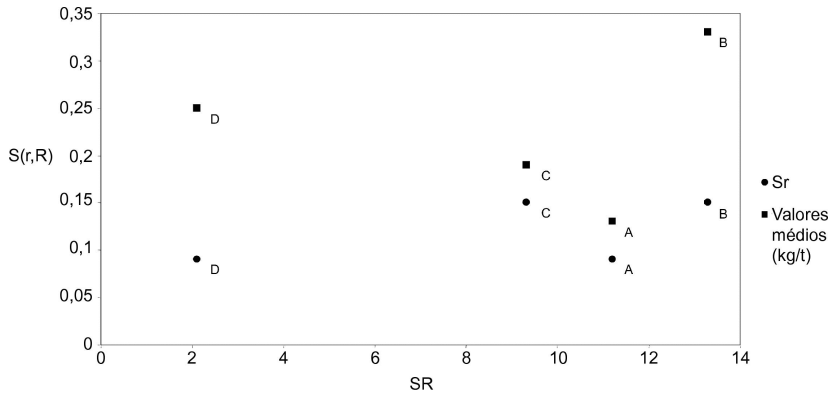


Figura 3

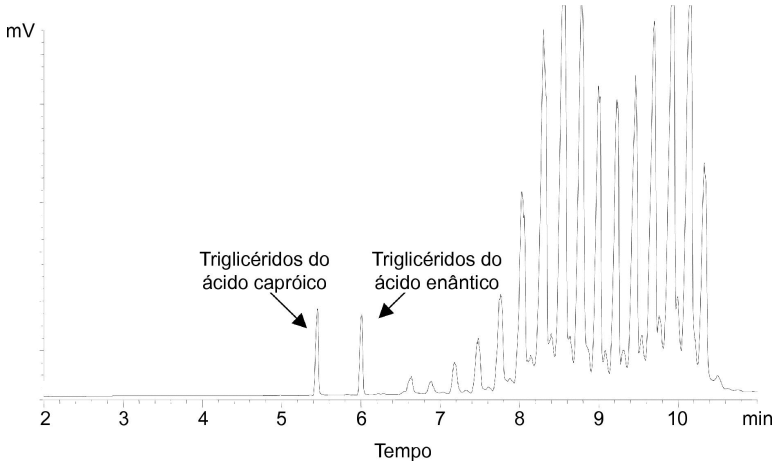
Desvio-padrão da repetibilidade e da reprodutivibilidade (TG)



▼B

Figura 4

Exemplo com utilização de injector na coluna



▼B

ANEXO VI

(Artigo 5.º)

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE VANILINA DA MANTEIGA CONCENTRADA, MANTEIGA OU NATA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

1. OBJECTO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

O presente método descreve um procedimento para a determinação quantitativa de vanilina na manteiga concentrada, na manteiga ou na nata.

2. PRINCÍPIO

Extracção de uma quantidade conhecida de amostra utilizando uma mistura de isopropanol/etanol/acetonitrilo (1:1:2). Precipitação da maior parte da matéria gorda por refrigeração a uma temperatura compreendida entre –15 °C e –20 °C, seguida de centrifugação.

Após diluição com água, determinação do teor de vanilina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. EQUIPAMENTO

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

3.1. Congelador apto a funcionar a temperaturas compreendidas entre –15 °C e –20 °C.

3.2. Seringas descartáveis de 2 ml.

3.3. Microfiltros de membrana com poros de 0,45 μm, resistentes a uma solução com 5 % de solução de extracção (4.4).

3.4. Sistema de cromatografia líquida constituído por uma bomba (caudal de 1,0 ml/minuto), um injector (injecção automática ou manual de 20 μl), um detector de UV (regulado para 306 nm, com 0,01 Å para toda a escala), um registador ou integrador e um termóstato de coluna regulado para 25 °C.

3.5. Coluna analítica (250 mm × 4,6 mm de diâmetro interno) com enchimento LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) ou equivalente.

3.6. Pré-coluna (cerca de 20 mm × 3 mm de diâmetro interno) com enchimento a seco de LiChrospher RP 18 (5-10 μm) ou equivalente.

3.7. Centrifugadora que atinja uma velocidade de 2 000 rpm.

4. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados devem ser de qualidade analítica reconhecida.

4.1. Isopropanol.

4.2. Etanol a 96 % (v/v).

4.3. Acetonitrilo.

4.4. Solução de extracção

Misturar isopropanol (4.1), etanol (4.2) e acetonitrilo (4.3) na proporção 1:1:2 (v/v).

4.5. Vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) ≥ 98 %

4.5.1. *Solução de reserva de vanilina (500 μg/ml)*

Pesar, com a aproximação de 0,1 mg, cerca de 50 mg (CM mg) de vanilina (4.5) num balão aferido de 100 ml, adicionar 25 ml de solução de extracção (4.4) e completar com água.

4.5.2. *Solução-padrão de vanilina (10 μg/ml)*

Pipetar 5 ml de solução de reserva de vanilina (4.5.1) para um balão aferido de 250 ml e completar com água.

4.5.3. *Metanol para HPLC*

4.5.4. *Ácido acético glacial*

4.5.5. *Água para HPLC*

▼B

4.5.6. *Fase móvel para HPLC*

Misturar 300 ml de metanol (4.5.3) com cerca de 500 ml de água (4.5.5) e 20 ml de ácido acético (4.5.4) num balão aferido de 1 000 ml, completando o volume com água (4.5.5). Filtrar através de um filtro de 0,45 µm (3.3).

5. PROCEDIMENTO

5.1. **Preparação da amostra de ensaio**

5.1.1. *Manteiga*

Aquecer a amostra até a mesma começar a fundir. Evitar sobreaquecimentos locais a cerca de 30 °C. A manteiga não pode, em caso algum, separar-se em duas fases. Quando a amostra se tornar suficientemente plástica, homogenizá-la por agitação. Mexer a manteiga durante 15 s antes de retirar uma amostra. Pesar cerca de 5 g (SM g) de manteiga, com a aproximação de 1 mg, num balão aferido de 100 ml.

5.1.2. *Manteiga concentrada*

Imediatamente antes da recolha da amostra, colocar o recipiente com a manteiga concentrada numa estufa regulada para 40-50 °C, até à fusão completa. Misturar a amostra agitando ou mexendo e evitando a formação de bolhas de ar devido a uma agitação excessiva. Pesar cerca de 4 g (SM g) de manteiga concentrada, com a aproximação de 1 mg, num balão aferido de 100 ml.

5.1.3. *Nata*

Aquecer a amostra em banho-maria ou numa estufa a uma temperatura de 35-40 °C. Repartir a matéria gorda de forma homogénea por agitação e, se necessário, mexendo. Arrefecer rapidamente a amostra até 20 ± 2 °C. A amostra deve apresentar um aspecto homogéneo; caso contrário, recomeçar a operação. Pesar cerca de 10 g (SM g) de nata, com a aproximação de 1 mg, num balão aferido de 100 ml.

5.2. **Preparação da solução a analisar**

Adicionar cerca de 75 ml de solução de extracção (4.4) à amostra de ensaio (5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3), agitar ou sacudir vigorosamente durante cerca de 15 minutos e completar o volume com a solução de extracção (4.4). Transferir cerca de 10 ml do extracto obtido para um tubo de ensaio munido de rolha. Colocar o tubo no frigorífico (3.1) e deixar em repouso cerca de 30 minutos. Centrifugar o extracto frio durante 5 minutos a cerca de 2 000 rpm e decantar de imediato. Deixar a solução decantada atingir a temperatura ambiente. Pipetar 5 ml da solução decantada para um balão aferido de 100 ml e completar o volume com água. Filtrar uma alíquota através de um microfiltro de membrana (3.3), utilizando uma seringa (3.2). O filtrado encontra-se pronto para a determinação por HPLC.

5.3. **Calibração**

Pipetar 5 ml de solução-padrão de vanilina (4.5.2) para um balão aferido de 100 ml. Adicionar 5 ml de solução de extracção (4.4) e completar com água até à marca. A concentração de vanilina desta solução é de 0,5 µg/ml.

5.4. **Determinação por HPLC**

Estabilizar o sistema cromatográfico durante cerca de 30 minutos. Injectar a solução-padrão (5.3). Repetir o procedimento até que a diferença entre as áreas ou alturas dos picos correspondentes a duas injecções consecutivas seja inferior a 2 %. Nas condições descritas, o tempo de retenção da vanilina é de cerca de 9 minutos. Analisar a solução-padrão (5.3) em duplicado, injectando um volume de 20 µl. Injectar 20 µl das soluções a analisar (5.2). Determinar a área ou a altura de cada pico de vanilina obtido. Repetir a injecção duplicada de solução-padrão (5.3) após cada 10 injecções da solução a analisar (5.2).

6. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Calcular a área (ou a altura) média (AC) dos picos da vanilina correspondentes às injecções de cada lote de soluções a analisar injectadas entre duplicados da solução-padrão (quatro áreas ou alturas no total).

▼B

Calcular o factor de resposta (R):

$$R = AC / CM$$

em que CM representa a massa de vanilina em mg (4.5.1).

O teor (mg/kg) de vanilina (C) da amostra em análise é dado pela seguinte fórmula:

$$C = [(AS \times 20 \times 0,96)/(SM \times R)]$$

em que:

AS = área ou altura do pico de vanilina correspondente à amostra em análise

SM = massa da amostra em análise, em g (5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3)

Nota: Na determinação do teor de vanilina da nata, deve exprimir-se a concentração do marcador em mg/kg de matéria gorda butírica, multiplicando C por 100/f, sendo f o teor de matéria gorda da nata, expresso em % (m/m).

20 = factor relacionado com as diluições da solução-padrão e da amostra a analisar

0,96 = factor de correcção do teor de matéria gorda da primeira diluição da amostra a analisar

Nota: Podem utilizar-se as alturas dos picos, em vez da área respectiva (ver o ponto 8.3).

7. PRECISÃO DO MÉTODO

7.1. **Repetibilidade (r)**

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas com o menor intervalo de tempo possível pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, com materias de ensaio idênticas, não deve exceder 16 mg/kg.

7.2. **Reprodutibilidade (R)**

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamentos diferentes, com matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 27 mg/kg.

8. LIMITES DE TOLERÂNCIA

8.1. Para verificar a homogeneidade da marcação do produto, devem colher-se três amostras do produto marcado.

8.2. Marcador obtido a partir de baunilha ou de vanilina sintética

8.2.1. A taxa de incorporação de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído é de 250 g por tonelada de manteiga concentrada ou de manteiga. No caso da marcação de nata, a taxa de incorporação é de 250 g por tonelada de matéria gorda láctea.

8.2.2. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 220,8 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação),

— 158,3 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação).

A concentração de marcador da amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 220,8 mg/kg e 158,3 mg/kg.

8.3. Marcador obtido exclusivamente a partir de vagens de baunilha ou de extractos integrais de vagens de baunilha

8.3.1. A taxa de incorporação de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído é de 100 g por tonelada de manteiga concentrada ou de manteiga. No caso marcação de nata, a taxa de incorporação é de 100 g por tonelada de matéria gorda láctea.

▼B

8.3.2. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 78,3 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação),

— 53,3 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação).

A concentração de marcador na amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 78,3 mg/kg e 53,3 mg/kg.

9. NOTAS

9.1. Para uma taxa de incorporação de 250 mg/kg de *butteroil*, a taxa de recuperação da vanilina adicionada varia entre 97,0 e 103,8. O teor médio determinado foi de 99,9 %, com um desvio-padrão de 2,7 %.

9.2. A solução-padrão contém 5 % de solução de extracção, para compensar o alargamento dos picos provocado pela presença de 5 % da solução de extracção das amostras a analisar. A quantificação pode, assim, ser feita com base na altura dos picos.

9.3. A análise baseia-se numa curva de calibração linear, com ordenada na origem igual a zero.

9.4. Utilizando para o efeito diluições apropriadas da solução-padrão (4.5.2), deve confirmar-se a linearidade na primeira vez que se efectuem as análises e, posteriormente, a intervalos regulares e depois de qualquer modificação ou reparação do equipamento de HPLC. A vanilina pode ser degradada em ácido vanilínico, divalinina ou noutros compostos pela actividade de enzimas intrínsecos da nata não-pasteurizada ou de produtos à base dessa nata.

▼B

ANEXO VII

(Artigo 5.º)

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÉSTER ETÍLICO DO ÁCIDO β-APO--8'-CAROTÉNICO NA MANTEIGA CONCENTRADA E NA MANTEIGA POR ESPECTROMETRIA

1. Objecto e âmbito de aplicação

O presente método descreve um procedimento para a determinação quantitativa do éster etílico do ácido β-apo-8'-caroténico (éster apo--caroténico) na manteiga concentrada e na manteiga. O éster apo-caroténico representa a soma de todas as substâncias presentes num extracto de amostras obtido nas condições descritas no método, que absorve luz a 440 nm.

2. Princípio

Dissolve-se a matéria gorda butírica é dissolvida em éter de petróleo e mede-se a absorvância a 440 nm. Dtermina-se o teor de éster apo--caroténico em relação a um padrão externo.

3. Equipamento

3.1. Pipetas graduadas, com capacidades de 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 ml.

3.2. Espectrofotómetro adequado para utilização a 440 nm (e na gama de 447-449 nm), equipado com células com 1 cm de percurso óptico.

3.3. Balões aferidos de 20 ml e 100 ml.

3.4. Balança analítica capaz de pesar com a aproximação de 1 mg, com leitura das décimas de miligrama.

3.5. Estufa, 45 ± 1 °C.

3.6. Filtros sem cinzas, de filtração rápida.

4. Reagentes

Todos os reagentes devem ser de grau analítico reconhecido.

4.1. Suspensão de éster apo-caroténico (aproximadamente 20 %)

4.1.1. Determinar o teor da suspensão do seguinte modo:

Aquecer a suspensão a 45-50 °C e homogeneizar na embalagem original, sem a abrir. Pesar cerca de 400 mg num balão aferido de 100 ml, dissolver em 20 ml de clorofórmio (4.4) e completar o volume com ciclo-hexano (4.5). Diluir 5 ml desta solução até 100 ml, com ciclo--hexano (solução A). Diluir 5 ml de solução A até 100 ml, com ciclo--hexano. Medir a absorvância a 447-449 nm (medir a absorvância máxima em relação a um branco de ciclo-hexano, utilizando células com 1 cm de percurso óptico).

Teor de éster apo-caroténico, P (%) = $(Abs_{máx} \times 40\,000)/(M_{susp} \times 2\,550)$ **ou**: $(Abs_{max} /2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

Abs_{max} = absorvância máxima da solução medida

M_{susp} = massa da suspensão (g)

2 550 = valor de referência da absorvância (1 %, 1 cm)

P = Pureza (teor) da suspensão (%)

▼B

Nota: A suspensão de éster ap-ocaroténico é sensível ao ar, ao calor e à luz. Pode ser armazenada durante cerca de doze meses em local fresco, no recipiente original fechado (selado em atmosfera de azoto). Após abertura, o conteúdo deve ser utilizado num prazo curto.

4.1.2. Solução-padrão de éster apo-caroténico, aproximadamente 0,2 mg/ml

Pesar cerca de 0,100 g, com a aproximação de 1 mg, de suspensão de éster apo-caroténico (4.1.1) (W), dissolver em éter de petróleo (4.2), transferir quantitativamente para um balão aferido de 100 ml e completar o volume até à marca com éter de petróleo.

Esta solução contém (W × P) / 10 mg/ml de éster apo-caroténico.

Nota: A solução deve ser armazenada em local fresco, ao abrigo da luz. Eliminar a solução que não tenha sido utilizada no prazo de um mês.

4.2. Éter de petróleo (40-60 °C).

4.3. Sulfate de sódio anidro granulado, previamente seco a 102 °C durante duas horas.

4.4. Clorofórmio.

4.5. Ciclo-hexano.

5. PROCEDIMENTO

5.1. **Preparação da amostra de ensaio**

5.1.1. *Manteiga concentrada*

Derreter a amostra numa estufa a cerca de 45 °C.

5.1.2. *Manteiga*

Derreter a amostra numa estufa a cerca de 45 °C e filtrar uma quantidade representativa com um filtro que contenha cerca de 10 g de sulfato de sódio anidro (4.3), ao abrigo de luz forte natural ou artificial e mantendo uma temperatura de 45 °C. Recolher uma quantidade apropriada de matéria gorda butírica.

5.2. **Determinação**

Pesar, com a aproximação de 1 mg, cerca de 1 g de manteiga concentrada (ou de matéria gorda butírica separada (5.1.2)), (M). Transferir quantitativamente para um balão aferido de 20 ml (V), utilizando éter de petróleo (4.2), completar até à marca e misturar cuidadosamente.

Transferir uma alíquota para uma célula de 1 cm e medir a absorvância a 440 nm, em relação a um branco de éter de petróleo. Obter a concentração de éster apo-caroténico na solução a partir da curva de calibração (C µg/ml).

5.3. **Calibração**

Pipetar 0, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 ml de solução-padrão de éster apo--caroténico (4.1.2) para cinco balões aferidos de 100 ml. Diluir com éter de petróleo (4.2) até completar o volume e misturar.

As concentrações aproximadas das soluções variam de 0 a 2 µg/ml e são calculadas rigorosamente a partir da concentração da solução-padrão (4.1.2) (W × P)/10 mg/ml. Medir as absorvâncias a 440 nm, em relação a um branco de éter de petróleo (4.2).

Traçar um gráfico com os valores da absorvância no eixo das ordenadas e as concentrações de éster apo-caroténico no eixo das abcissas. Calcular a equação da curva-padrão.

▼B

6. CÁLCULO DOS RESULTADOS

6.1. O teor de éster apo-caroténico, expresso em mg/kg de produto, é dado por:

Manteiga concentrada: (C × V)/M

Manteiga: 0,82 (C × V)M

em que:

C = teor de éster apo-caroténico (μg/ml) obtido a partir da curva de calibração (5.3)

V = volume (ml) da solução de ensaio (5.2)

M = massa (g) da toma para análise (5.2)

0,82 = factor de correcção, devido ao teor de matéria gorda da manteiga

7. PRECISÃO DO MÉTODO

7.1. **Repetibilidade**

7.1.1. *Análise da manteiga*

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas com o menor intervalo de tempo possível pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, com matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 1,4 mg/kg.

7.1.2. *Análise da manteiga concentrada*

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas com o menor intervalo de tempo possível pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 1,6 mg/kg.

7.2. **Reprodutibilidade**

7.2.1. *Análise da manteiga*

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamentos diferentes, com matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 4,7 mg/kg.

7.3. **Análise da manteiga concentrada**

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamentos diferentes, com matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 5,3 mg/kg.

7.4. **Fonte dos parâmetros de precisão**

Os parâmetros de precisão foram determinados com base em testes efectuados em 1995, em onze laboratórios, a doze amostras marcadas de manteiga (seis duplicados em teste cego) e doze amostras marcadas de manteiga concentrada (seis duplicados em teste cego).

8. LIMITES DE TOLERÂNCIA

8.1. Para verificar se o produto foi marcado de forma adequada, devem colher-se três amostras do produto marcado.

8.2. **Manteiga**

8.2.1. A taxa de incorporação para a manteiga, tendo em conta a absorvância de fundo, é de 22 mg/kg.

8.2.2. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 17,7 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação),

— 12,2 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação).

▼B

A concentração de marcador da amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 17,7 mg/kg e 12,2 mg/kg.

8.3. **Manteiga concentrada**

8.3.1. A taxa de incorporação para a manteiga concentrada, tendo em conta a absorvância de fundo, é de 24 mg/kg.

Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 19,2 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação),

— 13,2 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação).

A concentração de marcador da amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 19,2 mg/kg e 13,2 mg/kg.

▼B

ANEXO VIII

(Artigo 5.º)

DETERMINAÇÃO DO SITOSTEROL OU DO ESTIGMASTEROL NA MANTEIGA E NA MANTEIGA CONCENTRADA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA EM COLUNA CAPILAR

1. OBJECTO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

O presente método descreve um procedimento para a determinação quantitativa do sitosterol ou do estigmasterol na manteiga e na manteiga concentrada. Considera-se o sitosterol como a soma do β-sitosterol e do 22-di-hidro-β-sitosterol, sendo os restantes sitosteróis considerados desprezáveis.

2. PRINCÍPIO

Saponifica-se a manteiga ou manteiga concentrada com uma solução etanólica de hidróxido de potássio e extraem-se os insaponificáveis com éter dietílico.

Convertem-se os esteróis em éteres trimetilsilílicos e analisam-se por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar, em relação a um padrão interno de betulina.

3. EQUIPAMENTO

3.1. Balão de saponificação de 150 ml, munido de um condensador de refluxo com juntas esmeriladas.

3.2. Ampolas de decantação de 500 ml.

3.3. Balões de 250 ml.

3.4. Balões de 250 ml ou capacidade similar, para equilíbrio da pressão, para a recolha do éter etílico evaporado.

3.5. Coluna de vidro com 350 mm × 20 mm, com tampa de vidro sinterizado.

3.6. Banho-maria ou manta de aquecimento.

3.7. Tubos de reacção de 2 ml.

3.8. Cromatógrafo de fase gasosa utilizável com coluna capilar, equipado com um sistema de divisão da amostra e constituído por:

3.8.1. Uma câmara termostática para colunas, capaz de manter a temperatura pretendida com a aproximação de ±1 °C;

3.8.2. Uma unidade de vaporização com regulação de temperatura;

3.8.3. Um detector de ionização por chama com conversor-amplificador;

3.8.4. Um integrador-registador adequado ao conversor-amplificador (3.8.3).

3.9. Coluna capilar de sílica fundida totalmente revestida com BP1 ou equivalente (ou qualquer outra coluna de resolução pelo menos idêntica), com uma espessura uniforme de 0,25 μm; a coluna deve permitir a resolução dos picos dos derivados trimetilsilílicos do lanosterol e do sitosterol. É recomendável uma coluna com 0,2 mm de diâmetro interno e 12 m de comprimento, revestida com BP1.

3.10. Microsseringa para cromatografia em fase gasosa, com 1 μl de capacidade e agulha temperada.

4. REAGENTES

Todos os reagentes devem ser de grau analítico reconhecido. A água utilizada deve ser destilada ou de pureza pelo menos equivalente.

4.1. Etanol com grau de pureza mínimo de 95 %.

4.2. Solução de hidróxido de potássio a 60 %: dissolver 600 g de hidróxido de potássio (grau de pureza mínimo de 85 %) em água e completar o volume até um litro com água.

▼B

4.3. Betulina com grau de pureza mínimo de 99 %.

4.3.1. Soluções de betulina em éter dietílico (4.4).

4.3.1.1. A concentração da solução de betulina utilizada na determinação do sitosterol deve ser de 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. A concentração da solução de betulina utilizada na determinação do estigmasterol deve ser 0,4 mg/ml.

4.4. Éter dietílico de pureza analítica (isento de peróxidos e de resíduos).

4.5. Sulfato de sódio anidro granulado, previamente seco a 102 °C durante duas horas

4.6. Reagente de sililação, por exemplo o TRI-SIL (fornecido pela Pierce Chemical Co., número de catálogo 49001), ou equivalente (importante: o TRI-SIL é inflamável, tóxico, corrosivo e possivelmente cancerígeno. O pessoal de laboratório deve estar familiarizado com os cuidados a ter com o TRI-SIL e tomar as precauções apropriadas).

4.7. Lanosterol.

4.8. Sitosterol de grau de pureza conhecido, não inferior a 90 % (P).

Nota 1: O grau de pureza dos padrões utilizados na calibração deve ser determinado pelo método da normalização. Considerar que todos os esteróis presentes na amostra figuram no cromatograma, que a área total dos picos representa 100 % dos esteróis e que todos os esteróis produzem a mesma resposta do detector. A linearidade do sistema deve ser validada para a gama de concentrações utilizada.

4.8.1. Solução-padrão de sitosterol: preparar, com a aproximação de 0,001 mg/ml, uma solução a cerca de 0,5 mg/ml (W_1) de sitosterol (4.8) em éter dietílico (4.4).

4.9. Estigmasterol de grau de pureza (P) conhecido, não inferior a 90 %.

4.9.1. Solução-padrão de estigmasterol: preparar, com a aproximação de 0,001 mg/ml, uma solução a cerca de 0,2 mg/ml (W_1) de estigmasterol (4.9) em éter dietílico (4.4).

4.10. Solução de teste da resolução: preparar uma solução a 0,05 mg/ml de lanosterol (4.7) e 0,5 mg/ml de sitosterol (4.8) em éter dietílico (4.4).

5. PROCEDIMENTO

5.1. **Preparação das soluções-padrão para cromatografia**

o padrão interno (4.3.1) deve ser adicionado à solução-padrão do esterol apropriado ao mesmo tempo que for adicionado à amostra saponificada (5.2.2).

5.1.1. Solução-padrão cromatográfica de sitosterol: transferir 1 ml da solução-padrão de sitosterol (4.8.1) para cada um de dois tubos de reacção (3.7) e purgar o éter dietílico com uma corrente de azoto. Adicionar 1 ml do padrão interno (4.3.1.1) e purgar o éter dietílico com uma corrente de azoto.

5.1.2. Solução-padrão cromatográfica de estigmasterol: transferir 1 ml da solução-padrão de estigmasterol (4.9.1) para dois tubos de reacção (3.7) e purgar o éter dietílico com uma corrente de azoto. Adicionar 1 ml do padrão interno (4.3.1.2) e purgar o éter dietílico com uma corrente de azoto.

5.2. **Preparação dos insaponificáveis**

5.2.1. Fundir a amostra de manteiga a uma temperatura não superior a 35 °C, misturando bem por agitação.

Pesar num balão de 150 ml (3.1), com a aproximação de 1 mg, cerca de 1 g de manteiga (W_2) ou de manteiga concentrada (W_2). Adicionar 50 ml de etanol (4.1) e 10 ml da solução de hidróxido de potássio (4.2). Instalar o condensador de refluxo e aquecer, a cerca de 75 °C, durante 30 minutos. Retirar o condensador e arrefecer o balão aproximadamente até à temperatura ambiente.

▼B

5.2.2. Se se pretender determinar o sitosterol, adicionar ao balão 1,0 ml da solução do padrão interno (4.3.1.1); se se pretender determinar o estigmasterol, adicionar ao balão 1,0 ml da solução do padrão interno (4.3.1.2). Homogeneizar. Transferir quantitativamente o conteúdo do balão para uma ampola de decantação de 500 ml (3.2), lavando primeiro com 50 ml de água e depois com 250 ml de éter dietílico (4.4). Agitar o funil de decantação vigorosamente durante dois minutos e deixar as fases separarem-se. Escoar a fase aquosa inferior e lavar a fase etérea, agitando a ampola com quatro alíquotas sucessivas de 100 ml de água.

Nota 2: Para evitar a formação de emulsões, é essencial que as duas primeiras lavagens com água sejam efectuadas com precaução (procedendo a 10 inversões). Na terceira lavagem, pode agitar-se vigorosamente durante 30 segundos. Se se formar uma emulsão, esta pode ser eliminada através da adição de 5-10 ml de etanol. Se se adicionar etanol, é essencial proceder a mais duas lavagens vigorosas com água.

5.2.3. Passar a fase etérea, límpida e isenta de sabões, por uma coluna de vidro (3.5) que contenha 30 g de sulfato de sódio anidro (4.5). Recolher a fase etérea num balão de 250 ml (3.3). Introduzir um grânulo regularizador da ebulição e evaporar quase até à secura num banho de água ou com uma manta de aquecimento, recolhendo os solventes evaporados.

Nota 3: Se um extracto da amostra for levado à secura total, a temperaturas muito elevadas, podem ocorrer perdas de esteróis.

5.3. **Preparação dos éteres trimetilsilílicos**

5.3.1. Transferir a solução etérea remanescente, do balão, para um tubo de reacção de 2 ml (3.7), com 2 ml de éter dietílico, e purgar o éter com uma corrente de azoto. Lavar o balão com mais duas alíquotas de 2 ml de éter dietílico, transferindo-as para o tubo de reacção e purgando o éter, de cada uma das vezes, com uma corrente de azoto.

5.3.2. Proceder à sililação da amostra, adicionando 1 ml de TRI-SIL (4.6). Tapar o tubo de reacção e agitar vigorosamente, para dissolver. Caso a dissolução não seja completa, aquecer a 65-70 °C. Deixar em repouso durante pelo menos cinco minutos, antes de proceder à injecção no cromatógrafo de fase gasosa. Proceder à sililação dos padrões do mesmo modo que as amostras. Proceder à sililação da solução de teste da resolução (4.10) do mesmo modo que as amostras.

Nota 4: A sililação deve ser efectuada em meio anidro. A sililação incompleta da betulina é revelada pela presença de um segundo pico, próximo do pico correspondente à betulina.

A presença de etanol durante a sililação interfere nesse processo, podendo resultar de uma lavagem inadequada na etapa de extracção. Se este problema persistir, poderá ser efectuada uma quinta lavagem na etapa de extracção, com agitação vigorosa durante 30 segundos.

5.4. **Análise por cromatografia em fase gasosa**

5.4.1. *Selecção das condições operatórias*

Programar o cromatógrafo de acordo com as instruções do fabricante.

Apresentam-se a seguir condições operatórias indicativas:

— temperatura da coluna: 265 °C

— temperatura do injector: 265 °C

— temperatura do detector: 300 °C

— caudal do gás transportador: 0,6 ml/min

— pressão de hidrogénio: 84 kPa

— pressão de ar: 155 kPa

▼B

— divisão da amostra: de 10:1 a 50:1; esta relação deve ser optimizada de acordo com as instruções do fabricante e a linearidade da resposta do detector, devendo em seguida ser validada em toda a gama de concentrações utilizada.

Nota 5: É particularmente importante que a câmara de injecção seja limpa com regularidade.

— quantidade de amostra a injectar: 1 µl de solução de éteres trimetilsilílicos

Deixar que o sistema atinja o equilíbrio e obter uma resposta suficientemente estável antes de iniciar as análises.

As condições indicadas podem ser alteradas em função das características da coluna e do cromatógrafo de fase gasosa, de modo a obter cromatogramas que satisfaçam as seguintes condições:

— o pico do sitosterol deve distinguir-se claramente do pico do lanosterol. A figura 1 mostra o cromatograma típico que deve ser obtido com a solução de teste da resolução (4.10), depois de submetida a sililação;

— os tempos de retenção relativos dos esteróis a seguir indicados devem ser, aproximadamente:

colesterol: 1,0

estigmasterol: 1,3

sitosterol 1,5

betulina: 2,5

— o tempo de retenção da betulina deve ser de aproximadamente 24 minutos.

5.4.2. *Procedimento analítico*

Injectar 1 µl da solução-padrão sililada (estigmasterol ou sitosterol) e ajustar os parâmetros de calibração do integrador.

Injectar mais 1 µl da solução-padrão sililada, para determinar os factores de resposta da betulina.

Injectar 1 µl da solução-amostra sililada e medir as áreas dos picos. Intercalar a cromatografia de cada série de amostras com injecções dos padrões.

A título de orientação, proceder a seis injecções de solução-amostra em cada série delimitada pelos padrões.

Nota 6: A integração do pico do estigmasterol deve incluir a respectiva cauda, como se indica pelos pontos 1, 2 e 3 da figura 2b.

Para o cálculo do sitosterol total, incluir na integração do pico de sitosterol a área do pico do 22-di-hidro-β-sitosterol (estigmastanol), que é eluído imediatamente a seguir ao sitosterol (ver a figura 3 b).

6. CÁLCULO DOS RESULTADOS

6.1. Determinar as áreas dos picos do esterol e da betulina em ambos os padrões que delimitam cada série de amostras e calcular R_1:

R_1 = (área média do pico de esterol na solução-padrão)/(área média do pico da betulina na solução-padrão)

Determinar a área do pico do esterol (estigmasterol e sitosterol) e do pico da betulina na amostra e calcular R_2:

R_2 = (área do pico de esterol na solução-amostra)/(área do pico da betulina na solução-amostra)

W_1 = massa (em mg) de esterol contida em 1 ml de solução-padrão (4.8.1 ou 4.9.1)

W_2 = massa da amostra (em g) (5.2.1)

P = grau de pureza do esterol padrão (4.8 ou 4.9)

▼B

Teor de esterol da amostra (em mg/kg) = $((R_2) / (R_1)) \times ((W_1) / (W_2)) \times P \times 10$

7. PRECISÃO DO MÉTODO

7.1. **Manteiga**

7.1.1. *Repetibilidade*

7.1.1.1. Estigmasterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas com o menor intervalo de tempo possível pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, a matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitosterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas com o menor intervalo de tempo possível pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, a matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 23,0 mg/kg.

7.1.2. *Reprodutibilidade*

7.1.2.1. Estigmasterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamentos diferentes, a matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitosterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamento diferente, a matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 8,7 % da média das determinações.

7.1.3. *Fonte dos parâmetros de precisão*

Os parâmetros de precisão foram determinados com base em testes efectuados em 1992, em oito laboratórios, a seis amostras (três duplicados em teste cego) de estigmasterol e seis amostras (três duplicados em teste cego) de sitosterol.

7.2. **Manteiga concentrada**

7.2.1. *Repetibilidade*

7.2.1.1. Estigmasterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas com o menor intervalo de tempo possível pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, a matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitosterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas com o menor intervalo de tempo possível pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, a matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 3,6 % da média das determinações.

7.2.2. *Reprodutibilidade*

7.2.2.1. Estigmasterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamentos diferentes, a matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitosterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamentos diferentes, a matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 8,9 % da média das determinações.

▼B

7.2.3. *Fonte dos parâmetros de precisão*

Os parâmetros de precisão foram determinados com base em testes efectuados em 1991, em nove laboratórios, a seis amostras (três duplicados em teste cego) de estigmasterol e seis amostras (três duplicados em teste cego) de sitosterol.

8. LIMITES DE TOLERÂNCIA

8.1. Para verificar se o produto foi marcado de forma adequada, devem colher-se três amostras do produto marcado.

8.2. **Manteiga**

8.2.1. *Estigmasterol*

8.2.1.1. A taxa de incorporação de estigmasterol é de 150 g de estigmasterol, com grau de pureza mínimo de 95 %, por tonelada de manteiga, isto é, 142,5 mg/kg; ou 170 g de estigmasterol, com grau de pureza mínimo de 85 %, por tonelada de manteiga, isto é, 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 115,8 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 95 %),

— 117,7 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 85 %),

— 80,1 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 95 %),

— 81,5 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 85 %).

A concentração de marcador da amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 115,8 mg/kg e 80,1 mg/kg ou entre 117,7 mg/kg e 81,5 mg/kg, respectivamente.

8.2.2. *Sitosterol*

8.2.2.1. A taxa de incorporação de sitosterol é de 600 g de sitosterol, com grau de pureza mínimo de 90 %, por tonelada de manteiga, isto é, 540 mg/kg.

8.2.2.2. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 482,6 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação de sistosterol com grau de pureza de 90 %),

— 347,6 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação de sistosterol com grau de pureza de 90 %).

A concentração de marcador da amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 482,6 mg/kg e 347,6 mg/kg.

8.3. **Manteiga concentrada**

8.3.1. *Estigmasterol*

8.3.1.1. A taxa de incorporação de estigmasterol é de 150 g de estigmasterol, com grau de pureza mínimo de 95 %, por tonelada de manteiga concentrada, isto é, 142,5 mg/kg; ou 170 g de estigmasterol, com grau de pureza mínimo de 85 %, por tonelada de manteiga concentrada, isto é, 144,5 mg/kg.

▼B

8.3.1.2. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 118,5 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 95 %),

— 120,4 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 85 %),

— 82,9 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 95 %),

— 84,3 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 85 %).

A concentração de marcador da amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 118,5 mg/kg e 82,9 mg/kg ou entre 120,4 mg/kg e 84,3 mg/kg, respectivamente.

8.3.2. *Sitosterol*

8.3.2.1. A taxa de incorporação de sitosterol é de 600 g de sitosterol, com grau de pureza mínimo de 90 % por tonelada de manteiga concentrada, isto é, 540 mg/kg.

8.3.2.2. Os resultados obtidos para as três amostras na análise do produto são utilizados para verificar a taxa e homogeneidade da incorporação do marcador, sendo o menor desses resultados comparado com os seguintes limites:

— 480,9 mg/kg (95 % da taxa mínima de incorporação de sistosterol com grau de pureza de 90 %),

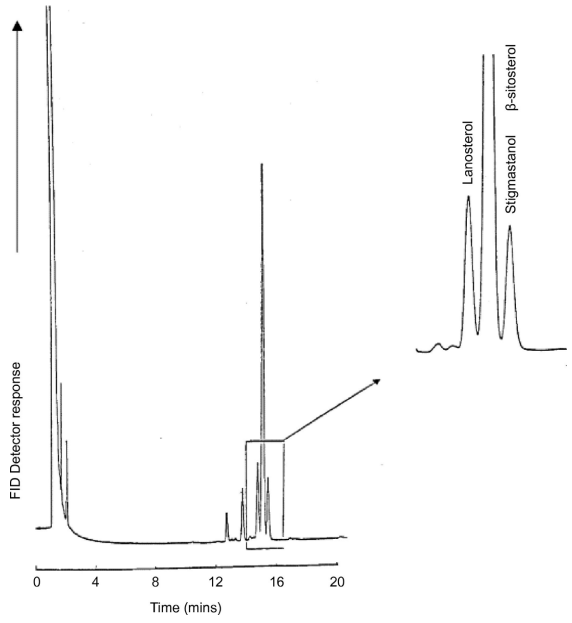
— 345,9 mg/kg (70 % da taxa mínima de incorporação de sistosterol com grau de pureza de 90 %).

A concentração de marcador da amostra com o resultado mais baixo é conjugada com uma interpolação entre 480,9 mg/kg e 345,9 mg/kg.

Figure 1

Chromatogram of resolution test mixture

Complete resolution is preferable, i.e. the peak trace for lanosterol should return to baseline before leaving for the silosterol peak although incomplete resolution is tolerable.



▼B

Figure 2a
Stigmasterol standard

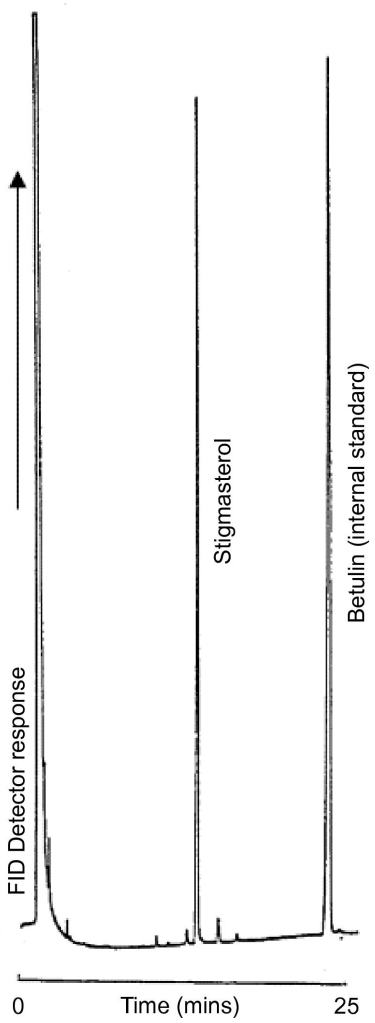
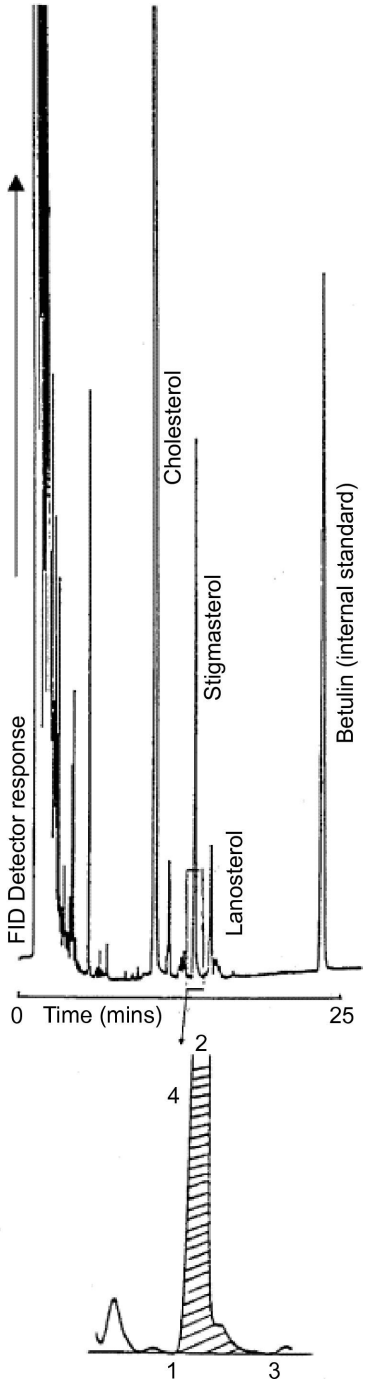


Figure 2b
Butter sample denatured with stigmasterol



Note: Integration of the stigmasterol peak should include any tailing as defined by points 1, 2 and 3.

▼B

Figure 3a
Sistosterol standard

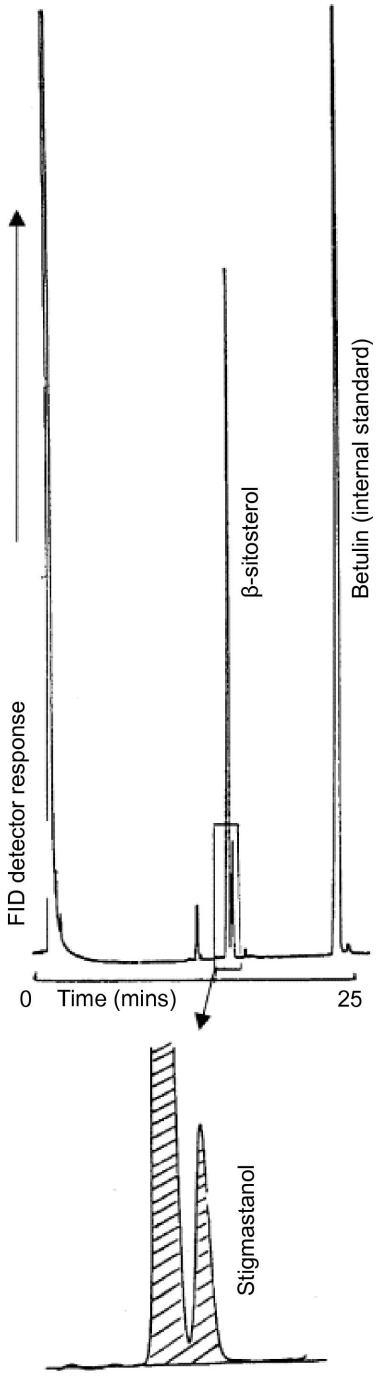
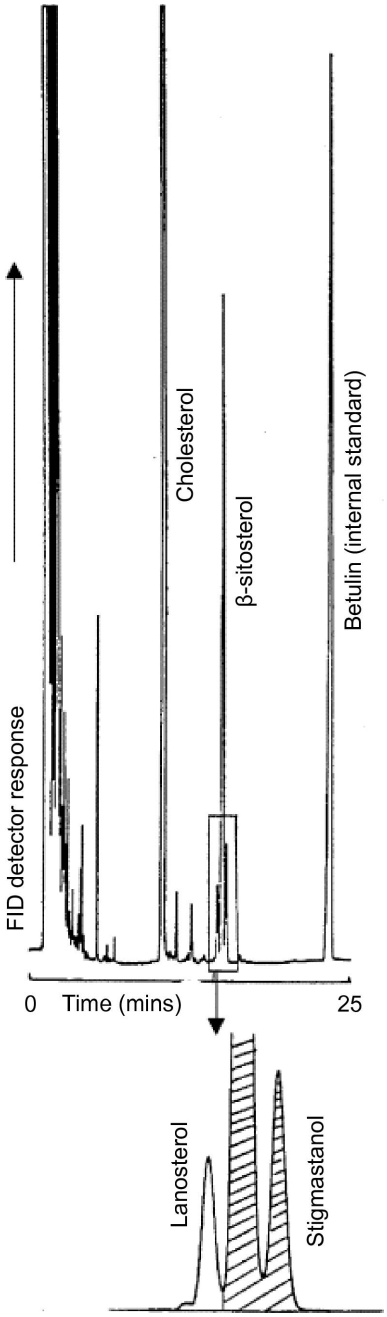


Figure 3b
Butter sample denatured with β-Sitosterol



Note: β-sitosterol often contains an impurity (identified as stigmastanol) wich elutes immediately after β-sitosterol. The areas of these two peaks should be summed when evaluating the total β-sitosterol present.

▼B

ANEXO IX

(Artigo 6.º)

MÉTODO DE REFERÊNCIA PARA A DETECÇÃO DE LEITE DE VACA E DE CASEINATOS PROVENIENTES DE LEITE DE VACA EM QUEIJOS DE LEITE DE OVELHA, LEITE DE CABRA OU LEITE DE BÚFALA OU DE MISTURAS DE LEITES DE OVELHA, CABRA E BÚFALA

1. OBJECTO

Detecção de leite de vaca e de caseinatos provenientes de leite de vaca em queijos produzidos com leite de ovelha, leiteb de cabra e leite de búfala ou com misturas de leites de ovelha, cabra e búfala, por focagem isoeléctrica das γ-caseínas após plasminólise.

2. ÂMBITO DE APLICAÇÃO

O presente método é adequado para uma detecção sensível e específica de leite de vaca crú ou tratado termicamente e de caseinatos provenientes de leite de vaca em queijos frescos ou curados produzidos com leite de ovelha, leite de cabra ou leite de búfala ou com misturas de leites de ovelha, cabra e búfala. O método não é adequado para a detecção de leite e queijo adulterados com concentrados proteicos de soro de leite de vaca tratados termicamente.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

3.1. Isolamento das caseínas do queijo e dos padrões de referência.

3.2. Dissolução das caseínas isoladas e clivagem pela plasmina (EC.3.4.21.7).

3.3. Focagem isoeléctrica das caseínas tratadas com plasmina, na presença de ureia, e coloração das proteínas.

3.4. Avaliação das bandas coradas de γ_3-caseína e de γ_2-caseína (indício da presença de leite de vaca) por comparação entre as bandas correspondentes à amostra e as bandas dos padrões de referência com 0 % e 1 % de leite de vaca, obtidas no mesmo gel.

4. REAGENTES

Salvo indicação em contrário, devem ser utilizados reagentes de grau analítico. A água deve ser bidestilada ou de pureza equivalente.

Nota: As especificações a seguir descritas aplicam-se a géis de poliacrilamida com ureia, de dimensões 265 mm × 125 mm × 0,25 mm, preparados em laboratório. Caso sejam utilizadas outras dimensões e tipos de gel, poderá ser necessário ajustar as condições de separação.

Focagem isoeléctrica

4.1. **Reagentes para a produção de géis de poliacrilamida com ureia**

4.1.1. *Solução de reserva de gel*

Dissolver:

4,85 g de acrilamida

0,15 g de N,N'-metileno-bis-acrilamida (BIS)

48,05 g de ureia

15,00 g de glicerol (87 % m/m)

em água e completar o volume até 100 ml. Guardar no frigorífico, em recipiente de vidro ambarizado.

▼B

Nota: Em vez das acrilamidas neurotóxicas, é preferível utilizar uma solução disponível no comércio de acrilamida e BIS, previamente misturadas, Caso essa solução contenha 30 % (m/v) de acrilamida e 0,8 % (m/v) de BIS, deve ser utilizado na formulação um volume de 16,2 ml, em vez das quantidades indicadas. A solução de reserva pode ser guardada durante um período máximo de 10 dias. Se a sua condutividade for superior a 5 μS, proceder a uma desionização, por agitação com 2 g de Amberlite MB-3 durante 30 minutos, seguida de filtração através de uma membrana de 0,45 μm.

4.1.2. *Solução de gel*

Preparar uma solução de gel misturando os aditivos e anfólitos com a solução de reserva de gel (ver o ponto 4.1.1):

9,0 ml de solução de reserva

24 mg de *β*-alanina

500 μl de anfólitos de pH 3,5-9,5 ([1])

250 μl de anfólitos de pH 5-7 ([1])

250 μl de anfólitos de pH 6-8 ([1])

Misturar a solução de gel e desgaseificar durante 2 a 3 minutos num banho de ultra-sons ou sob vácuo.

Nota: Preparar a solução de gel imediatamente antes da sua utilização (ver 6.2).

4.1.3. *Soluções catalisadoras*

4.1.3.1. N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED)

4.1.3.2. Solução de persulfato de amónio (PER) a 40 % (m/v):

Dissolver 800 mg de PER em água e completar o volume até 2 ml.

Nota: Utilizar sempre solução de PER preparada de fresco.

4.2. **Fluido de contacto**

Querosene ou parafina líquida.

4.3. **Solução anódica**

Dissolver 5,77 g de ácido fosfórico (85 % m/m) em água e diluir até 100 ml.

4.4. **Solução catódica**

Dissolver 2,00 g de hidróxido de sódio em água e diluir até 100 ml com água.

Preparação da amostra

4.5. **Reagentes para o isolamento das proteínas**

4.5.1. *Ácido acético diluído (25,0 ml de ácido acético glacial, diluído com água até 100 ml)*

4.5.2. *Diclorometano*

4.5.3. *Acetona*

4.6. **Solução-tampão para dissolução das proteínas**

Dissolver

5,75 g de glicerol (87 % m/m)

24,03 g de ureia

250 mg de ditiotreitol

em água e completar o volume até 50 ml.

([1]) Os produtos Ampholine® de pH 3,5-9,5 (Pharmacia) e Resolyte® de pH 5-7 e pH 6-8 (BDH, Merck) mostraram-se especialmente adequados à obtenção da necessária separação das γ-caseínas.

▼B

Nota: Guardar no frigorífico durante um período máximo de uma semana.

4.7. **Reagentes para a clivagem das caseínas pela plasmina**

4.7.1. *Solução-tampão de carbonato de amónio*

Titular, até pH 8, uma solução 0,2 mol/1 de hidrogenocarbonato de amónio (1,58 g/100 ml de água) contendo 0,05 mol/l de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 1,46 g/100 ml) com uma solução 0,2 mol/l de carbonato de amónio (1,92 g/100 ml de água) contendo 0,05 mol/l de EDTA.

4.7.2. *Plasmina de bovino (E.C. 3.4.21.7), com actividade de pelo menos 5 U/ml*

4.7.3. *Solução de ácido ε-aminocapróico para inibição enzimática*

Dissolver 2,624 g de ácido ε-aminocapróico (ácido 6-amino-*n*-hexanóico) em 100 ml de etanol a 40 % (v/v).

4.8. **Padrões**

4.8.1. *Estão disponíveis no Instituto de Materiais e Medidas de Referência da Comissão, B-2440 Geel, Bélgica, padrões de referência certificados de uma mistura de leites desnatados coalhados de ovelha e de cabra com 0 % e 1 % de leite de vaca.*

4.8.2. *Preparação de padrões laboratoriais provisórios de leite de búfala coalhado com 0 % e 1 % de leite de vaca.*

Os leites desnatados são preparados por centrifugação de leite cru a granel, de búfala ou de vaca, a 37 °C e 2 500 g durante 20 minutos. Após arrefecimento rápido do tubo e do seu conteúdo para 6-8 °C, remover completamente a camada superior de matéria gorda. Para a preparação do padrão a 1 %, adicionar 5,00 ml de leite de vaca desnatado a 495 ml de leite de búfala desnatado, num copo de 1 l, e ajustar o pH a 6,4 com ácido láctico diluído (10 % m/v). Ajustar a temperatura a 35 °C e adicionar 100 µl de coalho de vitelo (actividade do coalho 1:10 000, c. 3 000 U/ml), agitar durante um minuto e deixar o copo coberto com uma folha de alumínio, a 35 °C, durante uma hora, a fim de permitir a coagulação. Depois da coagulação, liofiliza-se todo o leite coalhado sem homogeneização ou escorrimento prévios do soro. Depois de liofilizada, mói-se finamente a amostra, a fim de produzir um pó homogéneo. Para a preparação do padrão a 0 %, proceder do mesmo modo, com leite desnatado de búfala puro. Os padrões devem ser conservados a –20 °C.

Nota: Antes da preparação dos padrões, é aconselhável verificar a pureza do leite de búfala, por focagem isoeléctrica das caseínas tratadas com plasmina

Reagentes para a coloração das proteínas

4.9. **Fixador**

Dissolver 150 g de ácido tricloroacético em água e completar o volume até 1 000 ml.

4.10. **Solução de descoloração**

Misturar 500 ml de metanol e 200 ml de ácido acético glacial e completar o volume até 2 000 ml com água destilada.

Nota: Preparar um frasco da solução de descoloração todos os dias. Esta pode ser facilmente preparada misturando volumes iguais de soluções de reserva de metanol a 50 % (v/v) e de ácido acético glacial a 20 % (v/v).

4.11. **Soluções de coloração**

4.11.1. *Solução de coloração (solução de reserva 1)*

Dissolver 3,0 g de Coomassie Brilliant Blue g 250 (Color Index 42655) em 1 000 ml de metanol a 90 % (v/v), utilizando um agitador magnético (aproximadamente 45 minutos) e filtrar através de dois filtros de pregas de velocidade média.

▼B

4.11.2. *Solução de coloração (solução de reserva 2)*

Dissolver 5,0 g de sulfato de cobre penta-hidratado em 1 000 ml de ácido acético a 20 % (v/v).

4.11.3. *Solução de coloração (solução de trabalho)*

Misturar 125 ml de cada solução de reserva (4.11.1 e 4.11.2) imediatamente antes da coloração.

Nota: A solução de coloração deve ser preparada no dia da utilização.

5. EQUIPAMENTO

5.1. Placas de vidro (265 mm × 125 mm × 4 mm); rolo de borracha (largura: 15 cm); mesa de nivelamento.

5.2. Folha de suporte do gel (265 mm × 125 mm).

5.3. Folha de cobertura (280 mm × 125 mm). Colar uma faixa de fita adesiva (280 mm × 6 mm × 0,25 mm) em cada uma das margens mais longas (ver a figura 1).

5.4. Câmara de electrofocagem com placa de arrefecimento (por exemplo, 265 mm × 125 mm) e alimentação eléctrica adequada (≥ 2,5 kV) ou aparelho automático de electroforese.

5.5. Crióstato de circulação, termostatizado a 12 ± 0,5 °C.

5.6. Centrifugadora regultável a 3 000 g.

5.7. Eléctrodos de fita (≥ 265 mm de comprimento).

5.8. Frascos conta-gotas de plástico para as soluções anódica e catódica.

5.9. Aplicadores de amostra (10 × 5 mm, viscose ou papel de filtro com baixa adsorção de proteínas).

5.10. Tesouras, bisturis e pinças de aço inoxidável.

5.11. Tinas de aço inoxidável ou de vidro para coloração e descoloração (por exemplo, tabuleiros de instrumentos com 280 × 150 mm).

5.12. Homogeneizador de varinha, regulável (varinha com 10 mm de diâmetro); gama de velocidades de 8 000 rpm a 20 000 rpm.

5.13. Agitador magnético.

5.14. Banho de ultra-sons.

5.15. Soldador de folhas.

5.16. Micropipetas de 25 µl.

5.17. Concentrador de vácuo ou liofilizador.

5.18. Banho-maria termostático, regulável a 35 °C e 40 °C ± 1 °C, com agitador.

5.19. Densitémetro, com leitura a λ = 634 nm.

6. PROCEDIMENTO

6.1. **Preparação da amostra**

6.1.1. *Isolamento das caseínas*

Pesar a quantidade correspondente a 5 g de matéria seca de queijo ou dos padrões de referência para um tubo de centrifugação de 100 ml, adicionar 60 ml de água destilada e homogeneizar com um homogeneizador de varinha (8 000 rpm a 10 000 rpm). Ajustar o pH a 4,6 com ácido acético diluído (4.5.1) e centrifugar (5 minutos a 3 000 g). Decantar a matéria gorda e o soro, homogeneizar o resíduo a 20 000 rpm em 40 ml de água destilada e ajustada a pH 4,5 com ácido acético diluído (4.5.1), adicionar 20 ml de diclorometano (4.5.2), homogeneizar novamente e centrifugar (5 minutos a 3 000 g). Retirar com uma espátula a camada de caseína que se encontra entre as fases aquosa e

▼B

orgânica (ver a figura 2) e decantar ambas as fases. Homogeneizar de novo a caseína em 40 ml de água destilada (ver acima) e 20 ml de diclorometano (4.5.2) e centrifugar. Repetir este processo até que ambas as fases extraídas se apresentem incolores (2 a 3 vezes). Homogeneizar o resíduo proteico com 50 ml de acetona (5.3) e filtrar através de papel de filtro com pregas de velocidade média. Lavar o resíduo retido no filtro com duas porções sucessivas de 25 ml de acetona e secar ao ar ou numa corrente de azoto. Em seguida, pulverizar finamente num almofariz.

Nota: Os isolados de caseína secos devem ser conservados a –20 °C.

6.1.2. *Clivagem pela plasmina das β-caseínas, para intensificação das γ-caseínas*

Suspender 25 mg de caseínas isoladas (6.1.1) em 0,5 ml de tampão de carbonato de amónio (4.7.1) e homogeneizar durante 20 minutos, por exemplo com ultra-sons. Aquecer a 40 °C e adicionar 10 µl de plasmina (4.7.2), misturar e incubar durante 1 hora a 40 °C, com agitação contínua. A fim de inibir as enzimas, adicionar 20 µl de solução de ácido ε--aminocapróico (4.7.3) e, seguidamente, 200 mg de ureia sólida e 2 mg de ditiotreitol.

Nota: Para obter mais simetria nas bandas de caseína focadas, é aconselhável liofilizar a solução depois de adicionar o ácido ε-aminocapróico e dissolver em seguida os resíduos em 0,5 ml de solução-tampão para dissolução das proteínas (4.6).

6.2. **Preparação dos géis de poliacrilamida com ureia**

Com a ajuda de algumas gotas de água, estender com o rolo a folha de suporte de gel (5.2) numa placa de vidro (5.1) e retirar toda a água remanescente com um toalhete ou um lenço de papel. Estender, da mesma forma, a folha de cobertura (5.3) com separadores (0,25 mm) noutra placa de vidro. Colocar a placa horizontalmente numa mesa de nivelamento.

Adicionar 10 µl da solução TEMED (4.1.3.1) à solução de gel preparada e desgaseificada (4.1.2), agitar e adicionar 10 µl de solução PER (4.1.3.2), misturar bem e deitar imediatamente, de maneira uniforme, no centro da folha de cobertura. Colocar uma extremidade da placa de suporte do gel (folha virada para baixo) sobre a placa de cobertura e rebatê-la lentamente, de modo a que se forme um filme de gel entre as folhas, distribuído regularmente e sem bolhas de ar (figura 3). Com cuidado, rebater completamente a placa de suporte do gel, utilizando uma espátula fina, e colocar por cima mais três placas de vidro, que servirão de pesos. Depois de terminada a polimerização (cerca de 60 minutos), retirar o gel polimerizado para a placa de suporte do gel juntamente com a folha de cobertura, inclinando as placas de vidro. Limpar cuidadosamente o reverso da placa de suporte do gel, para remover os resíduos de gel e de ureia. Unir os bordos da «sanduíche de gel» enrolada, de modo a formar um tubo, e guardá-la no frigorífico (no máximo 6 semanas).

Nota: A folha de cobertura com os separadores pode ser reutilizada. O gel de poliacrilamida pode ser cortado em dimensões mais pequenas, cuja utilização é recomendada quando se disponha de poucas amostras ou se se utilizar um aparelho automático de electroforese (dois géis, dimensão 4,5 × 5 cm).

6.3. **Focagem isoeléctrica**

Ligar o termóstato de arrefecimento a 12 °C. Limpar o reverso da folha de suporte do gel com querosene e, em seguida, deitar algumas gotas de querosene (4.2) no centro do bloco de arrefecimento. Aplicar a sanduíche de gel, desenrolando-a com o lado de suporte para baixo, tendo o cuidado de evitar bolhas de ar. Limpar qualquer excesso de querosene e retirar a folha de cobertura. Impregnar os eléctrodos de fita com as soluções de electrólise (4.3, 4.4), cortá-los ao comprimento do gel e colocá-los nas posições previstas (a distância entre os eléctrodos deve ser de 9,5 cm).

▼B

Condições da focagem isoeléctrica:

6.3.1. *Formato do gel: 265 mm × 125 mm × 0,25 mm*

Passo	Tempo (min.)	Tensão (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Volt.hora (Vh)
1. Pré-focagem	30	máximo 2 500	máximo 15	4, constante	cerca de 300
2. Focagem da amostra ([1])	60	máximo 2 500	máximo 15	4, constante	cerca de 1 000
3. Focagem final	60	máximo 2 500	máximo 5	máximo 20	cerca de 3 000
	40	máximo 2 500	máximo 6	máximo 20	cerca de 3 000
	30	máximo 2 500	máximo 7	máximo 25	cerca de 3 000

([1]) Aplicação da amostra: Depois da pré-focagem (passo 1), pipetar 18 µl da amostra e das soluções-padrão para os aplicadores de amostra (10 mm × 5 mm), colocá-los sobre o gel com intervalos de 1 mm entre cada aplicador e a uma distância de 5 mm do ânodo, no sentido longitudinal, e pressionar ligeiramente. Proceder à focagem nas condições acima descritas e remover cuidadosamente os aplicadores de amostra passados os 60 minutos de focagem da amostra.

Nota: Se a espessura ou largura dos géis forem alteradas, os valores da corrente eléctrica e da potência terão de ser devidamente adaptados (duplicar os valores da corrente eléctrica e da potência se for utilizado um gel de 265 mm × 125 mm × 0,5 mm).

6.3.2. *Exemplo de um programa de tensão para um aparelho automático de electroforese (dois géis de 5,0 cm × 4,5 cm), com eléctrodos sem fitas aplicados directamente no gel*

Passo	Tensão	Corrente	Potência	Temperatura	Volt.hora
1. Pré-focagem	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Focagem da amostra	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Focagem	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Focagem	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Colocar o aplicador de amostras na fase 2 a 0 Vh.

Retirar o aplicador de amostras na fase 2 a 30 Vh.

6.4. **Coloração das proteínas**

6.4.1. *Fixação das proteínas*

Retirar os eléctrodos de fitas imediatamente após desligar a corrente e colocar logo o gel numa tina de coloração/descoloração cheia com 200 ml de fixador (4.9); deixar imerso durante 15 minutos, agitando continuamente.

6.4.2. *Lavagem e coloração da placa de gel*

Escorrer todo o fixador e lavar a placa de gel duas vezes, durante 30 segundos de cada vez, com 100 ml da solução de descoloração (4.10). Escorrer a solução de descoloração e encher a tina com 250 ml de solução de coloração (4.11.3); deixar corar durante 45 minutos, agitando suavemente.

6.4.3. *Descoloração da placa de gel*

Escorrer a solução de coloração, lavar a placa de gel duas vezes, com 100 ml de solução de descoloração (4.10) de cada vez, e, em seguida, agitar durante 15 minutos com 200 ml de solução de descoloração, repetindo o passo da descoloração pelo menos duas ou três vezes, até que o fundo esteja claro e incolor. Lavar a placa de gel com água destilada (2 × 2 minutos) e secar ao ar (2 a 3 horas) ou com um secador de cabelo (10 a 15 minutos).

▼B

Nota 1: Proceder à fixação, lavagem, coloração e descoloração a 20 °C. Não utilizar temperaturas elevadas.

Nota 2: No caso de se preferir uma coloração pela prata, de maior sensibilidade (por exemplo Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, código 17-1150-01), as amostras de caseína tratadas com plasmina terão de ser diluídas a 5 mg/ml.

7. AVALIAÇÃO

A avaliação é efectuada por comparação das bandas proteicas da amostra desconhecida com as bandas dos padrões de referência no mesmo gel. A detecção de leite de vaca em queijos produzidos com leite de ovelha, leite de cabra ou leite de búfala ou com misturas de leites de ovelha, cabra e búfala é efectuada através da γ_3-caseína e da γ_2-caseína, cujos pontos isoeléctricos se situam entre pH 6,5 e pH 7,5 (figuras 4a, 4b e 5). O limite de detecção é inferior a 0,5 %.

7.1. **Avaliação visual**

Para a avaliação visual da quantidade de leite de vaca, é aconselhável ajustar as concentrações das amostras e dos padrões de modo a obter o mesmo nível de intensidade da γ_2-caseína e da γ_3-caseína de ovelha (E), de cabra (G) ou de búfala (B) (ver «γ_2 E, G, B» e «γ_3 E, G, B» nas figuras 4a, 4b e 5). Em seguida, a quantidade de leite de vaca (inferior, igual ou superior a 1 %) na amostra desconhecida poderá ser directamente avaliada por comparação da intensidade da γ_2-caseína e da γ_3--caseína bovinas (ver «γ_2 C» e «γ_3 C» nas figuras 4a, 4b e 5) com a dos padrões de referência 0 % e 1 % (ovelha, cabra) ou a dos padrões provisórios de laboratório (búfala).

7.2. **Avaliação densiométrica**

Se possível, determinar por densitometria (5.19) a razão das áreas dos picos da γ_2-caseína e da γ_3-caseína bovinas e da γ_2-caseína e da γ_3--caseína de ovelha, de cabra e/ou de búfala (ver figura 5). Comparar este valor com a razão das áreas dos picos da γ_2-caseína e da γ_3-caseína dos padrões de referência de 1 % (ovelha, cabra) ou dos padrões provisórios de laboratório (búfala) analisados no mesmo gel.

Nota: O método estará a funcionar satisfatoriamente caso exista um sinal positivo claro da γ_2-caseína e da γ_3-caseína bovinas no padrão de referência 1 %, mas não no padrão de referência 0 %. Se não for assim, optimizar os procedimentos, seguindo rigorosamente a descrição do método.

Considera-se uma amostra positiva se tanto a γ_2-caseína e γ_3--caseína bovinas como as razões correspondentes de áreas de picos foram iguais ou superiores aos níveis do padrão de referência 1 %.

8. REFERÊNCIAS

1. *Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I, Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2-caseins. Milchwissenschaft 45, 708-711 (1990).*

2. *Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. Milchwissenschaft 50, 83-85 (1995).*

3. *Krause I., Berner I, Klostermeyer H.: Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ-caseins using plasmin as signal amplifier. in: Electrophoresis--Forum 89 (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, München (1989).*

4. *Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: Nachweis von Kuhmilch in Schaf and Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195-199 (1982).*

▼B

5. *Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 µm polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. Electrophoresis 1, 43-56 (1980).*

Figura 1

Representação esquemática da folha de cobertura

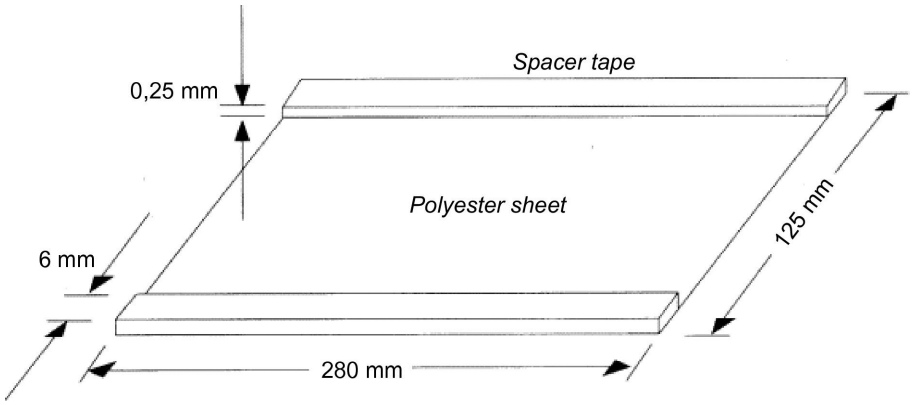


Figura 2

Camada de caseína a flutuar entre as fases aquosa e orgânica, após centrifugação

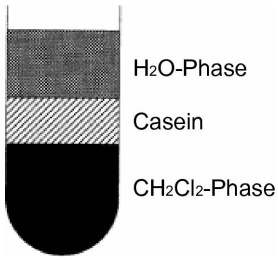
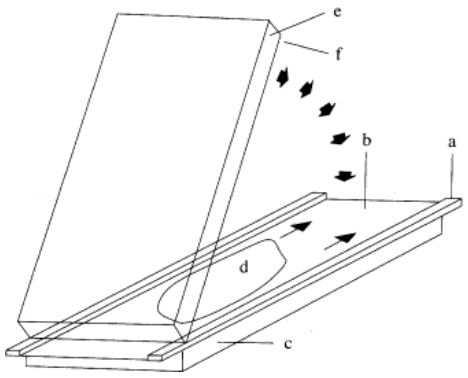


Figura 3

Técnica de rebatimento para a distribuição de géis ultrafinos de poliacrilamida

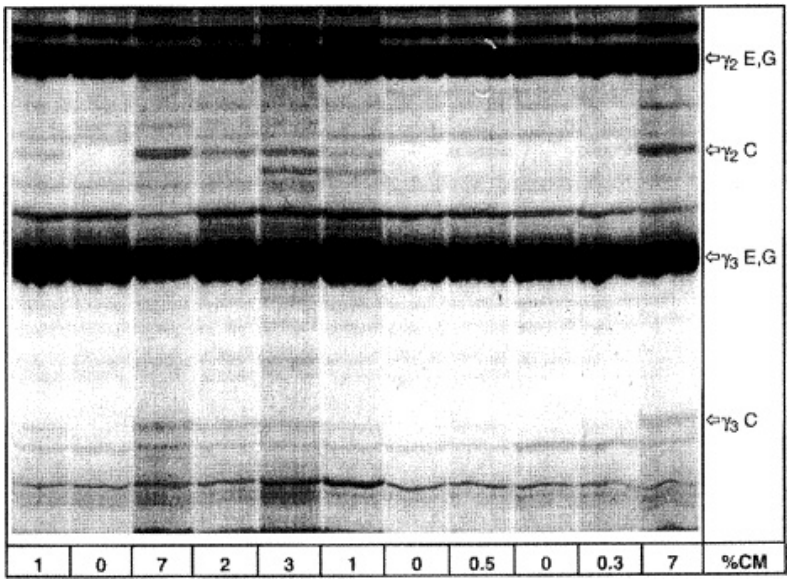


a = fita separadora (0,25 mm); b = folha de cobertura (5.3); c, e = placas de vidro (5.1); d = solução de gel (4.1.2); f = folha de suporte de gel (5.2).

▼B

Figura 4a

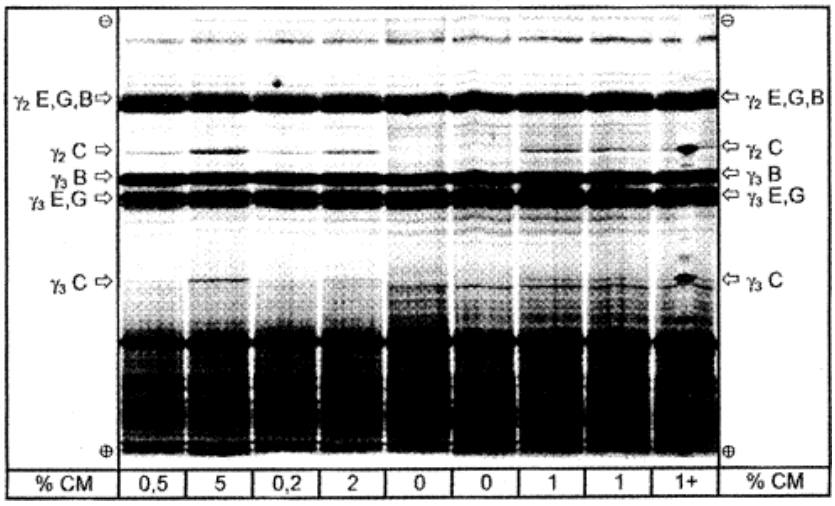
Focagem isoeléctrica de caseínas tratadas com plasmina proveniente de queijo produzido com leites de ovelha e de cabra com diferentes quantidades de leite de vaca



% CM = percentagem de leite de vaca; C = vaca; E = ovelha; G = cabra
Apresenta-se a metade superior do gel da focagem isoeléctrica.

Figura 4b

Focagem isoeléctrica de caseínas tratadas com plasmina proveniente de queijos produzidos com misturas de leites de ovelha, cabra e búfala, com diferentes quantidades de leite de vaca



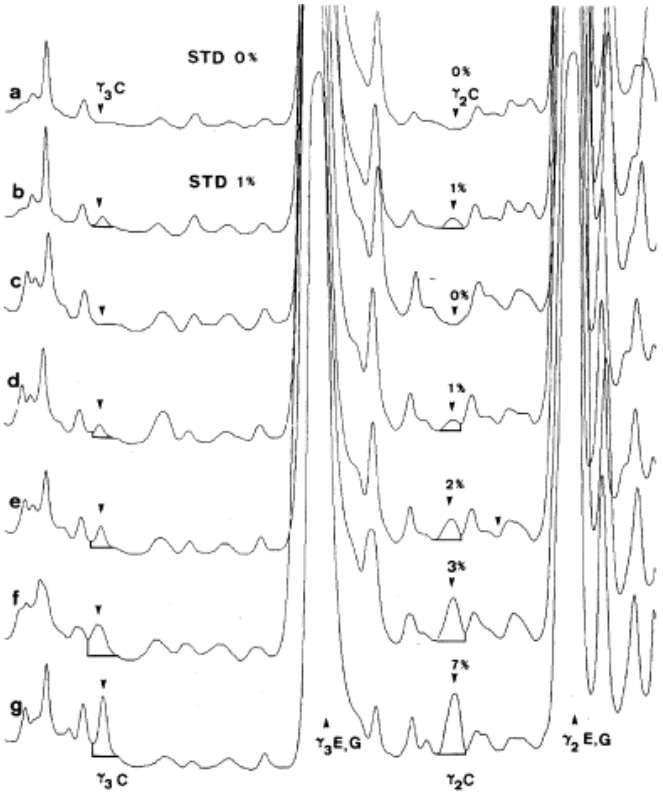
% CM = percentagem de leite de vaca; 1 + = amostra com 1 % de leite de vaca e com adição de caseína bovina pura a meio do percurso; C = vaca; E = ovelha; G = cabra; B = búfala

Apresenta-se a distância de separação total do gel da focagem isoeléctrica.

▼B

Figura 5

Sobreposição de densitogramas de padrões (STD) e de amostras de queijo produzido com uma mistura de leites de ovelha e de cabra, após focagem isoeléctrica



a, b = padrões com 0 % e 1 % de leite de vaca; c-g = amostras de queijo com 0 %, 1 %, 2 %, 3 % e 7 % de leite de vaca; C = vaca; E = ovelha; G = cabra.
Varreu-se a metade superior do gel de focagem isoeléctrica a λ = 634 nm.

▼B

ANEXO X

(Artigo 7.º)

MÉTODO DE REFERÊNCIA PARA A DETECÇÃO DE COLIFORMES NA MANTEIGA, NO LEITE EM PÓ DESNATADO, NA CASEÍNA E NOS CASEINATOS

1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

   Norma ISO 8261.

2. PROCEDIMENTO

   Norma ISO 4831.

   Inocular no meio de cultura amostras correspondentes a 1 g de manteiga ou a 0,1 g de leite em pó desnatado ou de caseína/caseinatos.

   Inocular três tubos por amostra.

3. RESULTADOS

   Se os 3 tubos apresentarem um resultado negativo, o resultado da análise é «conforme».

   Se os 3 tubos apresentarem 2 ou 3 resultados positivos, o resultado da análise é «não-conforme».

   Se os 3 tubos apresentarem 2 resultados negativos, a análise deve ser repetida duas vezes (com dois tubos):

   — Se os dois resultados forem negativos, o resultado da análise é «conforme»;

   — Se um ou dois dos resultados forem positivos, o resultado da análise é «não-conforme».

▼B

ANEXO XI

(Artigo 8.º)

DETERMINAÇÃO DA LACTOSE EM ALIMENTOS COMPOSTOS PARA ANIMAIS

1. OBJECTO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Determinação da lactose em alimentos compostos para animais.

2. REFERÊNCIA

O teor de lactose é definido em percentagem mássica, determinada pelo procedimento descrito.

3. DEFINIÇÃO

O teor de lactose anidra é expresso em g/100 g.

4. PRINCÍPIO

Reconstitui-se o alimento composto para animais com água. Adiciona-se «solução de Biggs» a uma alíquota diluída e pesada, de modo a precipitar as fracções dos componentes da matéria gorda e proteicos do alimento composto para animais. A amostra é filtrada (ou centrifugada) e o filtrado (ou sobrenadante) é injectado numa coluna de HPLC de permuta catiónica (forma chumbo), utilizando água para HPLC como fase móvel. A lactose eluída é detectada com um refractómetro diferencial ([i]).

5. REAGENTES

5.1. **Generalidades**

Usar apenas reagentes de grau analítico reconhecido, salvo indicação em contrário, e água para HPLC desgaseificada.

5.2. **Lactose**

A D-lactose monohidratada ($(C_{12}H_{22})O_{11}.\ H_2O$) pode absorver humidade. Antes da utilização, medir a quantidade real de água pelo método de Karl-Fisher ou remover a humidade em excesso, colocando a lactose durante 8 horas numa estufa a 105 °C (este tratamento não faz com que a lactose perca a água de cristalização).

5.3. **Solução concentrada de Biggs/Szijarto** ([ii])

Dissolver 9,10 g de acetato de zinco bi-hidratado ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) e 5,46 g de ácido fosfotúngstico mono-hidratado ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) em cerca de 70 ml de água para HPLC (6.8), num balão aferido de 100 ml.

Juntar 5,81 ml de ácido acético glacial (CH_3COOH). Perfazer até à marca com água para HPLC (6.8) e misturar. Esta solução pode ser armazenada à temperatura ambiente por um período máximo de 1 ano.

5.4. **Solução diluída de Biggs/Szijarto**

Diluir com água, num balão aferido, 25 ml da solução concentrada de Biggs/Szijarto (5.3), completando o volume até 500 ml. Esta solução pode ser armazenada à temperatura ambiente por um período máximo de 1 mês.

5.5. **Preparação da água para HPLC**

Filtrar a água ultra-pura (6.8) através de um sistema de filtração por vácuo (6.9). A fim de melhorar o desempenho da bomba e de garantir uma linha de base estável, desgaseificar a fase móvel diariamente através de uma das técnicas existentes para esse fim, como a purga com hélio, o tratamento por ultra-sons, a aplicação de vácuo ou um sistema de desgaseificação acoplado.

Nota: Para prolongar a vida útil da coluna, é essencial garantir que o eluente tenha um teor de dióxido de carbono tão baixo quanto possível e que não reabsorva dióxido de carbono.

▼B

6. EQUIPAMENTO

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

6.1. **Coluna de HPLC com enchimento de resina de permuta iónica**

Enchimento da coluna: Co-polímero de poliestireno-divinilbenzeno 8 % reticulado, activado com grupos chumbo de permuta catiónica.

Dimensões da coluna: comprimento de 300 mm, diâmetro interno de cerca de 8 mm.

É possível utilizar outros diâmetros internos, desde que o caudal de gás seja ajustado em conformidade.

6.2. **Pré-coluna**

A pré-coluna é uma combinação de um permutador de catiões (H^+) e de um permutador de aniões (CO_3-) separados, cada um dos quais como enchimento de colunas com cerca de 30 mm × 4,6 mm (L × DI) (por exemplo: pré-microcolunas montadas num micro-suporte), ligadas em série ou, em alternativa, sob a forma de uma mistura 35:65 (m/m) de AG 50W-X4 com 400 mesh (H^+) e de AG3-X4A, com 200--400 mesh (OH-), numa coluna com cerca de 20 mm × 9 mm (L × DI), cheia manualmemnte.

6.3. **Câmara para a coluna**

Estufa capaz de manter uma temperatura constante de 85 ± 1 °C.

6.4. **Bomba de HPLC**

Bomba capaz de gerar um caudal constante de 0,2-1,0 ml/min (com flutuações inferiores a 0,5 %).

6.5. **Injector de HPLC**

Injector automático, capaz de injectar volumes de 25 µl com uma repetibilidade < 0,5 %.

Em alternativa, pode utilizar-se um injector manual (desde que cumpra os mesmos requisitos).

6.6. **Detector de HPLC**

Detector de índice de refracção de alta sensibilidade, com um nível de ruído < $5{,}10^{-9}$ unidades de índice de refracção.

6.7. **Integrador**

Programa informático ou integrador dedicado para a aquisição e processamento de dados e para o cálculo da área e da altura dos picos, que são convertíveis em concentrações de lactose.

6.8. **Unidade de purificação de água**

Sistema capaz de produzir água ultra-pura (tipo 1) com resistividade >14 MΩ.cm.

6.9. **Unidade de filtração do solvente**

Sistema que permita a filtração de água através de filtros de membranas com poros de 0,45 µm.

Nota: Muitas unidades de purificação de água (6.8) já vêm equipadas com um sistema de filtração de 0,45 µm ou 0,2 µm. Se for esse o caso, a água pode ser utilizada directamente, sem filtração adicional.

6.10. **Balança analítica**

Balança com leitura das décimas de miligrama.

6.11. **Banho-maria**

Banho-maria capaz de manter a temperatura de 40 °C (±0,5 °C).

6.12. **Centrifugadora**

Centrifugadora capaz de gerar pelo menos 3 000 g, para tubos Eppendorf ou equivalentes ou para tubos de maior dimensão.

▼B

6.13. **Balão aferido de 50 ml**

Capacidade de 50 ml, classe A.

Nota: Podem utilizar-se balões com outra capacidade, desde que se tenha em conta o factor volumétrico.

6.14. **Balão aferido de 100 ml**

Capacidade de 100 ml, classe A.

6.15. **Pipeta graduada**

Pipeta graduada de 10 ml.

Nota: Em alternativa, pode utilizar-se um pipetador manual de 5 ml, adicionando duas vezes um volume de 5 ml de reagente (5.3).

7. AMOSTRAGEM

É importante que o laboratório receba uma amostra colhida de acordo com a norma ISO 707/IDF 50 ([iii]) que seja verdadeiramente representativa e que não tenha sido danificada durante o transporte ou armazenagem.

8. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO-PADRÃO DE LACTOSE

8.1. **Padrão 1**

Dissolver uma quantidade rigorosamente pesada (leitura até às décimas de miligrama) de cerca de 50 mg de lactose mono-hidratada (5.2) num balão aferido de 100 ml (6.14) e completar o volume até à marca com água.

8.2. **Padrão 2**

Dissolver uma rigorosamente pesada (leitura até às décimas de miligrama) de cerca de 100 mg de lactose mono-hidratada (5.2) num balão aferido de 100 ml (6.14) e completar o volume até à marca com água.

Nota: As soluções-padrão podem ser guardadas, no máximo durante uma semana, a cerca de 5 °C.

9. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE

9.1. **Reconstituição da amostra**

Pesar cerca de 5 g do pó num balão aferido de 50 ml (6.13) e registar a quantidade com a aproximação de 1 mg (W_1, (11)). Juntar 50 ml de água e registar o aumento de peso (W_2 (11)), com a aproximação de 0,01 g. Colocar o balão fechado em banho-maria (6.11) durante 30 minutos, invertendo o balão algumas vezes durante esse período. Deixar arrefecer o balão até atingir a temperatura ambiente.

9.2. **Tratamento das amostras**

Pesar cerca de 1 g desta solução num balão aferido de 50 ml (6.13) e registar a sua massa com a aproximação de 1 mg (W_3, (11)), juntar 20 ml de água e depois 10 ml do reagente de Biggs/Szijarto diluído (5.4), completando o volume até à marca com água. Inverter cuidadosamente o balão 5 vezes nos primeiros 30 minutos.

Passada uma hora, retirar uma alíquota e centrifugar (6.12) a 3 000 g durante 10 minutos (pode utilizar-se uma velocidade de rotação mais elevada, reduzindo o tempo de centrifugação de forma correspondente). Analisar uma alíquota do sobrenadante por HPLC.

10. DETERMINAÇÃO POR HPLC

10.1. **Preparação preliminar do HPLC**

10.1.1. *Instalação da coluna e da pré-coluna*

Instalar a pré-coluna (6.2) fora da câmara da coluna (6.3) e a coluna (6.1) no interior da mesma câmara.

Nota: Caso a câmara não tenha tubagem que permita pré-aquecer o eluente, será necessário passar esse líquido por um tubo de aço inoxidável com cerca de 15 cm, dentro da câmara, antes de o fazer entrar na coluna (é absolutamente necessário que o eluente seja aquecido antes de entrar na coluna, sob pena de alargamento dos picos).

▼B

10.1.2. *Detector e caudal inicial*

A fim de obter uma linha de base estável, ligar o detector (6.6) pelo menos 24 horas antes de iniciar a análise. Regular a temperatura interna do detector a 35 °C. Regular o caudal de líquido a 0,2 ml/min (6.4) durante pelo menos 20 minutos, com a câmara da coluna (6.3) à temperatura ambiente.

10.1.3. *Câmara de cromatografia e caudal final*

Regular a temperatura da câmara da coluna (6.3) a 85 °C. 30 minutos depois de atingida essa temperatura, aumentar gradualmente o caudal de eluente de 0,2 ml/min para 0,6 ml/min (6.4). Deixar o sistema estabilizar com esse caudal a 85 °C durante 2 horas ou esperar até à obtenção de uma linha de base estável.

10.1.4. *Integração*

Seleccionar cuidadosamente os parâmetros de aquisição e de integração (6.7), nomeadamente a frequência de aquisição dos dados, a sensibilidade, a constante de tempo e a largura e definição dos limites dos picos.

O tempo de retenção da lactose é de cerca de 11 minutos.

Nota: Muitos programas informáticos de aquisição de dados (6.7) permitem medir facilmente o número teórico de pratos. Medir regularmente o número teórico de pratos do padrão 1 (8.1) e substituir a coluna (6.1) sempre que esse número atinja um valor inferior em 25 % ao número inicial da mesma coluna, quando nova.

10.1.5. *Ensaio da pré-coluna*

Verificar regularmente (pelo menos uma vez em cada sequência de injecções) a capacidade da pré-coluna (6.2) para eliminar os sais da amostra, injectando 25 µl de uma solução a 0,05 % de cloreto de sódio. Sempre que surjam picos, a pré-coluna deve ser substituída.

10.2. **Injecção dos padrões**

Injectar, antes de cada série de análises, 25 µl (6.5) do padrão 1 (8.1) e, em seguida, do padrão 2 (8.2). Repetir este procedimento a cada 10 a 20 amostras, bem como no final da sequência.

10.3. **Injecção das amostras**

Injectar 25 µl do sobrenadante (9.2) da amostra.

11. CÁLCULO E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

11.1. **Calibração**

Normalmente, os resultados são calculados a partir da altura dos picos, mas se o sinal tiver muito ruído, pode utilizar-se a área dos picos (a quantificação pela altura dos picos é menos influenciada pela ocorrência de picos correspondentes a compostos presentes em pequena concentração, insuficientemente separados do pico da lactose).

O programa informático (6.7) deve calcular uma curva de calibração linear, forçando a passagem pela origem. Verificar a curva para detectar qualquer desvio da linearidade (as causas mais prováveis desses desvios são erros na preparação dos padrões 1 (8.1) ou 2 (8.2), problemas de integração e, com menor probabilidade, defeitos no funcionamento do injector).

Utilizar como base para o gráfico as concentrações de lactose (anidra) calculadas para os padrões 1 (8.1) e 2 (8.2), em mg/l.

O declive (RF) da recta de calibração é definido pela área/concentração em mg/ml.

11.2. **Amostras**

O resultado das análises, em g/100 g, é calculado pelo programa informático (6.7) ou, em alternativa, através da seguinte fórmula:

$$C = \frac{H \times (W_1 + W_2) \times 50}{RF \times W_1 \times W_3} \times 0,1$$

▼B

em que:

C: Concentração de lactose, em g/100 g de pó;

H: Altura do pico de lactose da amostra;

RF: Factor de resposta (ou declive) da curva de calibração, em mV/mg/ml;

W_1: Massa da amostra de pó (9.1), em g;

W_2: Massa da água acrescentada à amostra de pó (9.1), em g;

W_3: Massa da amostra da solução reconstituída a partir do pó (9.2), em g;

50: Volume do balão utilizado em (9.2);

0,1: Factor de conversão dos resultados em g/100 g.

12. PRECISÃO

Os valores extraídos deste ensaio interlaboratorial podem não ser aplicáveis a gamas de concentração e matrizes diferentes das indicadas. Os valores de repetibilidade e de reprodutibilidade serão calculados a partir dos resultados de um ensaio interlaboratorial a realizar em conformidade com a norma ISO 5725 ([iv]).

12.1. **Repetibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados diferentes, obtidos pelo mesmo método, a matérias de ensaio idênticas, no mesmo laboratório e pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento num curto intervalo de tempo, não deve exceder, em mais de 5 % dos casos, o limite de xxx (a determinar num ensaio interlaboratorial) ([v]).

12.2. **Reprodutibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados diferentes, obtidos pelo mesmo método, a matérias de ensaio idênticas, em laboratórios diferentes, por operadores diferentes, utilizando equipamentos diferentes, não deve exceder, em mais de 5 % dos casos, o limite de 0,5 g/100 g (a determinar num ensaio interlaboratorial).

13. REFERÊNCIAS

([i]) J. Koops en C. Olieman, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39 (1985) 89--106.

([ii]) D.A. Biggs en L. Szijarto, Journal of Dairy Science, 46 (1963) 1196.

([iii]) ISO 707 (IDF 50), Milk and milk products — Methods of sampling.

([iv]) ISO 5725-1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Parte 1: General principles and definitions.

([v]) ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Parte 2: A basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.

▼B

ANEXO XII

(Artigo 9.º)

DETECÇÃO DE SORO DE COAGULAÇÃO NO LEITE EM PÓ DESNATADO DESTINADO À ARMAZENAGEM PÚBLICA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DOS CASEINOMACROPÉPTIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

1. OBJECTO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

O presente método permite detectar a presença de soro de coagulação no leite em pó desnatado destinado à armazenagem pública através da determinação dos caseinomacropéptidos.

2. REFERÊNCIA

Norma internacional ISO 707 — Leite e produtos lácteos — Métodos de amostragem, em conformidade com as indicações do ponto 2, último parágrafo da alínea c), do anexo I.

3. DEFINIÇÃO

O teor de sólidos de soro de coagulação é definido em percentagem mássica, determinada em função do teor de caseinomacropéptidos obtido pelo procedimento descrito.

4. PRINCÍPIO

— Reconstituição do leite em pó desnatado e eliminação da matéria gorda e das proteínas com ácido tricloroacético, seguida de centrifugação ou filtração;

— Determinação, por por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), da quantidade de caseinomacropéptidos (CMP) presentes no sobrenadante;

— Avaliação dos resultados obtidos para as amostras por comparação com amostras-padrão de leite em pó desnatado com ou sem adição de percentagens conhecidas de soro de coagulação em pó.

5. REAGENTES

Todos os reagentes devem ser de grau analítico reconhecido. A água utilizada deve ser destilada ou de pureza pelo menos equivalente.

5.1. **Solução de ácido tricloroacético**

Dissolver 240 g de ácido tricloroacético (CCl_3COOH) em água e completar o volume até 1 000 ml. A solução deve apresentar-se límpida e incolor.

5.2. **Eluente, pH 6,0**

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

Completar o volume com água até 1 000 ml e homogeneizar.

Nota: A composição do eluente pode ser adaptada de modo a corresponder à certificação dos padrões ou às recomendações do fabricante do enchimento da coluna.

Antes de o utilizar, filtrar o eluente através de um filtro de membrana com poros de 0,45 μm.

5.3. **Solução de lavagem das colunas**

Misturar um volume de acetonitrilo (CH_3CN) com nove volumes de água. Antes de a utilizar, filtrar a mistura através de um filtro de membrana com poros de 0,45 μm.

▼B

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

5.4. **Amostras-padrão**

5.4.1. *Leite em pó desnatado que satisfaça as exigências do presente regulamento, ([0]).*

5.4.2. *Leite em pó desnatado idêntico, mas adulterado com 5 % (m/m) de soro de coagulação em pó de composição padrão, ([5]).*

6. EQUIPAMENTO

6.1. Balança analítica

6.2. Centrifugadora capaz de centrifugar a 2 200 g, dotada de tubos de centrifugação rolhados ou capsulados de cerca de 50 ml.

6.3. Agitador mecânico.

6.4. Agitador magnético.

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

6.6. Papel de filtro para filtração média, com cerca de 12,5 cm de diâmetro.

6.7. Dispositivo de filtração de vidro, com filtro de membrana de 0,45 μm de diâmetro de poro.

6.8. Pipetas graduadas de 10 ml (ISO 648, classe A, ou ISO/R 835) ou sistema que permita debitar 10,0 ml em dois minutos.

6.9. Sistema que permita debitar 20,0 ml de água a cerca de 50 °C.

6.10. Banho-maria termostático regulado para 25 ± 0,5 °C.

6.11. Equipamento de HPLC, constituído pelo seguinte:

6.11.1. Bomba.

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

6.11.3. Duas colunas TSK 2 000-SW em série (comprimento de 30 cm, diâmetro interno de 0,75 cm) ou colunas equivalentes (p.ex.: coluna TSK 2 000-SWxl, coluna Agilent Technologies Zorbax GF 250) e uma pré-coluna (3 cm × 0,3 cm) com enchimento de I 125 ou de um material de eficácia equivalente.

6.11.4. Câmara termostática para a coluna, regulada para 35 ± 1 °C.

6.11.5. Detector UV de comprimento de onda variável, capaz de efectuar medições a 205 nm com a sensibilidade de 0,008 A.

6.11.6. Integrador com possibilidade de integração entre mínimos consecutivos.

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

7. AMOSTRAGEM

7.1. A colheita de amostras deve ser efectuada de acordo com a norma internacional ISO 707. Todavia, os Estados-Membros podem utilizar outro método de amostragem, desde que respeite os princípios da referida norma.

7.2. Conservar as amostras em condições que evitem qualquer deterioração ou alteração de composição.

8. PROCEDIMENTO

▼B

8.1. **Preparação da amostra para análise**

Colocar o leite em pó num recipiente de capacidade aproximadamente dupla do volume do pó, equipado com uma tampa hermética. Fechar de imediato o recipiente. Misturar bem o leite em pó, invertendo várias vezes o recipiente.

8.2. **Toma para análise**

Pesar 2,000 ± 0,001 g da amostra para análise num tubo de centrifugação (6.2) ou num balão rolhado adequado (50 ml).

8.3. **Eliminação da matéria gorda e das proteínas**

8.3.1. Adicionar 20,0 ml de água quante (50 °C) à toma para análise. Dissolver o pó, agitando durante cinco minutos com um agitador mecânico (6.3). Colocar o tubo em banho-maria (6.10) e deixar estabilizar à temperatura de 25 °C.

8.3.2. Adicionar, ao longo de dois minutos, 10,0 ml da solução de ácido tricloroacético (5.1), a cerca de 25 °C, agitando sempre vigorosamente com o agitador magnético (6.4). Colocar o tubo no banho-maria (6.10) e deixar estabilizar durante 60 minutos.

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

8.4. **Determinação cromatográfica**

8.4.1. Injectar 15 a 30 µl de sobrenadante ou filtrado (8.3.3), rigorosamente medidos, no aparelho de HPLC (6.11), com um caudal de 1,0 ml de eluente (5.2) por minuto.

Nota 1. Pode utilizar-se um caudal diferente, em função do diâmetro interno das colunas utilizadas ou das instruções do seu fabricante.

Nota 2. Manter o eluente (5.2) a 85 °C durante toda a análise cromatográfica, a fim de o conservar desgaseificado e de evitar qualquer proliferação bacteriana. Pode ser utilizada qualquer outra precaução de efeitos semelhantes.

Nota 3. A cada interrupção, lavar as colunas com água. Nunca deixar eluente (5.2) nas colunas.

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

8.4.2. Os resultados da análise cromatográfica da amostra em análise [E] são obtidos sob a forma de um cromatograma, no qual cada pico é identificado pelo tempo de retenção respectivo, RT, do seguinte modo:

Pico II:	Segundo pico do cromatograma, com RT de cerca de 12,5 minutos
Pico III:	Terceiro pico do cromatograma, correspondente aos caseínomacropéptidos (CMP), com um RT de 15,5 minutos

A escolha da(s) coluna(s) pode influenciar consideravelmente o tempo de retenção dos diferentes picos.

O integrador (6.11.6) calcula automaticamente a área, A, de cada pico:

A_{II}:	Área do pico II
A_{III}:	Área do pico III

É essencial examinar o aspecto de cada cromatograma antes de qualquer interpretação quantitativa, para detectar eventuais anomalias devidas a um funcionamento deficiente do equipamento ou das colunas ou decorrentes da origem ou natureza da amostra analisada.

Em caso de dúvida, repetir a análise.

▼B

8.5. **Calibração**

8.5.1. Aplicar às amostras-padrão (5.4) exactamente o procedimento descrito nos pontos 8.2 a 8.4.2.

Utilizar soluções preparadas de fresco, já que os CMP se degradam em meio tricloroacético a 8 %. O seu teor diminui aproximadamente 0,2 % por hora, a 30 °C.

8.5.2. Antes da determinação cromatográfica às amostras, condicionar as colunas através de injecções sucessivas de solução (8.5.1) da amostra-padrão (5.4.2) até a área e o tempo de retenção do pico correspondente aos CMP se tornarem constantes.

8.5.3. Determinar os factores de resposta, R, injectando um volume de filtrados (8.5.1) idêntico ao utilizado para as amostras.

9. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

9.1. **Método de cálculo e fórmulas**

9.1.1. *Cálculo dos factores de resposta, R:*

Pico II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$

em que:

R_{II} = Factores de resposta do pico II

A_{II} [0] = Áreas dos picos II da amostra-padrão [0] obtidas em 8.5.3

Pico III:	$R_{III} = W/(A_{III}[5] - A_{III}[0])$

em que:

R_{III} = Factor de resposta do pico III

A_{III} [0] e A_{III} [5] = Áreas do pico III das amostras-padrão [0] e [5], respectivamente, obtidas em 8.5.3

W = Quantidade de soro de coagulação presente na amostra-padrão [5], ou seja, 5

9.1.2. *Cálculo da área 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] = Áreas relativas dos picos II, III e IV, respectivamente, da amostra [E]

A_{II} [E], A_{III} [E] = Áreas dos picos II e III, respectivamente, da amostra [E] obtidas em 8.4.2

R_{II}, R_{III} = Factores de resposta calculados em 9.1.1

9.1.3. *Cálculo do tempo de retenção relativo do pico III da amostra [E]: $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$*

em que:

RRT_{III} [E] = Tempo de retenção relativo do pico III da amostra [E]

RT_{III} [E] = Tempo de retenção do pico III da amostra [E] obtido em 8.4.2

▼B

RT_{III} [5] = Tempo de retenção do pico III da amostra-padrão [5] obtido em 8.5.3

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

— O RRT_{III} [E] é < 1,000 quando o teor de soro é > 5 %;

— O RRT_{III} [E] é ≥ 1,000 quando o teor de soro é ≤ 5 %.

O grau de incerteza admitido nos valores RRT_{III} é de ± 0,002.

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

9.2. Cálculo da percentagem do soro de coagulação em pó da amostra:

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

em que:

W = Percentagem (m/m) de soro de coagulação presente na amostra [E]

S_{III} [E] = Área relativa do pico III da amostra em análise [E], obtida em 9.1.2

1,3 = Representa a área relativa média do pico III, expressa em gramas de soro de coagulação por cada 100 g, determinada com leites em pó desnatados não-adulterados de origens diversas. Este valor foi obtido experimentalmente

S_{III} [0] = Representa a área relativa do pico III, igual a $R_{III} \times A_{III}$ [0]. Estes valores foram obtidos em 9.1.1 e 8.5.3, respectivamente

(S_{III} [0] – 0,9) = Representa a correcção a introduzir na área relativa média 1,3 quando o valor S_{III} [0] não for igual a 0,9. Experimentalmente, a área relativa média do pico III da amostra-padrão [0] é 0,9

9.3. **Precisão do método**

9.3.1. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas simultaneamente ou com um curto intervalo de tempo, pelo mesmo analista, utilizando os mesmos aparelhos, com matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 0,2 % m/m.

9.3.2. *Reprodutibilidade*

A diferença entre dois resultados independentes, obtidos em dois laboratórios diferentes com matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 0,4 % m/m.

9.4. **Interpretação**

9.4.1. Concluir pela ausência de soro se a área relativa do pico III, S_{III} [E], expressa em gramas de soro de coagulação por 100 g de produto, for ≤ 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9), em que:

2,0 = Valor máximo admitido para a área relativa do pico III, tomando em consideração a área relativa do pico III (1,3), a incerteza devida às variações de composição do leite em pó desnatado e a reprodutibilidade do método (9.3.2)

(S_{III} [0] – 0,9) = Correção a introduzir quando a área de S_{III} [0] for diferente de 0,9 (ver o ponto 9.2)

9.4.2. Se a área relativa do pico III, S_{III} [E], for > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) e a área relativa do pico II, S_{II} [E] ≤ 160, determinar o teor de soro de coagulação segundo as indicações do ponto 9.2.

▼B

9.4.3. Se a área relativa do pico III, S_{III} [E], for > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) e a área relativa do pico II, S_{II} [E], for ≤ 160, determinar o teor de proteínas totais (P %); examinar depois os gráficos 1 e 2.

9.4.3.1. Os dados obtidos após análise de amostras de leites em pó desnatados não-adulterados, com teores de proteínas totais elevados, representam-se nos gráficos 1 e 2.

A recta a cheio representa a regressão linear, cujos coeficientes foram calculados pelo método dos mínimos quadrados.

A recta a tracejado fixa o limite superior da área 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 as seguintes:

$S_{III} = 0{,}376\ P\ \% - 10{,}7$	(gráfico 1)
$S_{III} = 0{,}0123\ S_{II}\ [E] + 0{,}93$	(gráfico 2)

em que:

S_{III} = Área relativa do pico III calculada em função do teor de proteínas totais ou da área relativa do pico S_{II} [E]

P % = Teor em proteínas totais, expresso em percentagem mássica

S_{II} [E] = Área relativa da amostra, calculada no ponto 9.1.2

Estas equações são equivalentes ao valor 1,3 referido no ponto 9.2. A diferença (T_1 e T_2) entre a área relativa S_{III} [E] observada e a área relativa S_{III} é dada pelas seguintes expressões: $T_1 = S_{III}$ [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 iguais ou menores que zero, não se pode concluir pela presença ou não de soro de coagulação

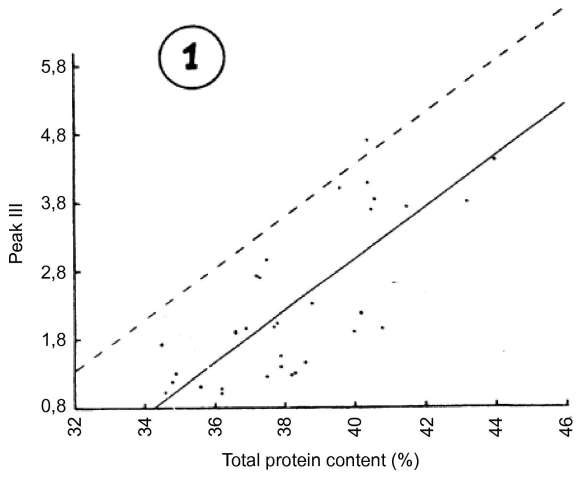
Se T_1 e T_2 forem maiores do que zero, fica comprovada a presença de soro de coagulação

O teor de soro de coagulação presente é calculado por meio da seguinte equação: $W = T_2 + 0{,}91$

em que:

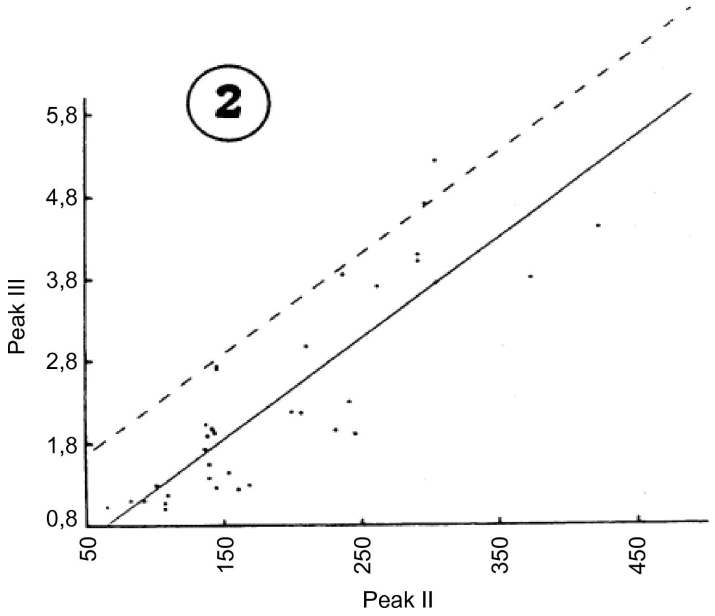
0,91 representa a diferença entre as rectas a cheio e a tracejado, medida no eixo vertical.

Skimmed-milk powder



▼B

Skimmed-milk powder



▼B

ANEXO XIII

(Artigo 9.º)

DETECÇÃO DE SÓLIDOS DE SORO DE COAGULAÇÃO NO LEITE EM PÓ DESNATADO E NAS MISTURAS REFERIDAS NO REGULAMENTO (CE) N.º 2799/1999

1. OBJECTO: DETECÇÃO DA ADIÇÃO DE SÓLIDOS DE SORO DE COAGULAÇÃO AOS SEGUINTES PRODUTOS:

   a) Leite em pó desnatado, definido no artigo 2.º do Regulamento (CE) n.º 2799/1999; e

   b) Misturas, definidas no artigo 4.º do Regulamento (CE) n.º 2799/1999.

2. REFERÊNCIAS: NORMA INTERNACIONAL ISO 707.

3. DEFINIÇÃO

   O teor de sólidos de soro de coagulação é definido em percentagem mássica, determinada em função do teor de caseinomacropéptidos obtido pelo procedimento descrito.

4. PRINCÍPIO

   Determina-se o teor de caseinomacropéptidos de acordo com o anexo XII. Nas amostras que apresentem resultados positivos, pesquisa-se o glicomacropéptido A por um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com inversão de fases. Em alternativa, as amostras podem ser analisadas directamente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com inversão de fases. A avaliação dos resultados obtidos é feita por comparação com amostras-padrão de leite em pó desnatado com e sem uma percentagem conhecida de soro de coagulação em pó. Qualquer resultado superior a 1 % (m/m) revela a presença de sólidos de soro de coagulação.

5. REAGENTES

   Todos os reagentes devem ser de grau analítico reconhecido. A água utilizada deve ser destilada ou de pureza pelo menos equivalente. O acetonitrilo deve ser de qualidade para espectroscopia ou para HPLC.

   Os reagentes necessários são descritos no anexo XII.

   Reagentes para HPLC com inversão de fases.

5.1. **Solução de ácido tricloroacético**

   Dissolver 240 g de ácido tricloroacético (CCl_3COOH) em água e completar o volume até 1 000 ml. A solução deve apresentar-se límpida e incolor.

5.2. **Eluentes A e B**

   Eluente A: misturar 150 ml de acetonitrilo (CH_3CN), 20 ml de isopropanol ($CH_3CHOHCH_3$) e 1,00 ml de ácido trifluoroacético (TFA, CF_3COOH) num balão aferido de 1 000 ml. Completar o volume com água.

   Eluente B: misturar 550 ml de acetonitrilo, 20 ml de isopropanol e 1,00 ml de TFA num balão aferido de 1 000 ml. Completar o volume com água. Antes de os utilizar, filtrar os eluentes através de um filtro de membrana com poros de 0,45 μm.

5.3. **Conservação da coluna**

   Após as análises, lavar a coluna com o líquido B (aumentando o caudal gradualmente) e, a seguir, com acetonitrilo (aumentando o caudal gradualmente durante 30 minutos). A coluna é conservada em acetonitrilo.

5.4. **Amostras-padrão**

5.4.1. Leite em pó desnatado que satisfaça as exigências aplicáveis à armazenagem pública ([0]).

▼B

5.4.2. Leite em pó desnatado idêntico, mas adulterado com 5 % (m/m) de soro de coagulação em pó de composição padrão ([5]).

5.4.3. Leite em pó desnatado idêntico, mas adulterado com 50 % (m/m) de soro de coagulação em pó de composição padrão ([50]) ([1]).

6. EQUIPAMENTO

O equipamento necessário é descrito no anexo XII.

6.1. Balança analítica.

6.2. Em opção, centrifugadora capaz de centrifugar a 2 200 g, dotada de tubos de centrifugação rolhados ou capsulados de cerca de 50 ml.

6.3. Agitador mecânico.

6.4. Agitador magnético.

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

6.6. Papel de filtro para filtração média, com cerca de 12,5 cm de diâmetro.

6.7. Dispositivo de filtração de vidro com filtro de membrana de 0,45 μm de diâmetro de poro.

6.8. Pipetas graduadas de 10 ml (ISO 648, classe A ou ISO/R 835) ou sistema que possa debitar 10,0 ml em dois minutos.

6.9. Sistema que permita debitar 20,0 ml de água a cerca de 50 °C.

6.10. Banho-maria termostático regulado para 25 ± 0,5 °C.

6.11. Equipamento de HPLC, composto por:

6.11.1. Sistema de bombagem de gradiente binário.

6.11.2. Injector manual ou automático, com 100 μl de capacidade.

6.11.3. Coluna Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (comprimento de 25 cm, diâmetro interno de 0,46 cm) ou coluna equivalente de inversão de fases, em sílica, de poros largos.

6.11.4. Câmara termostática para a coluna, regulada para 35 ± 1 °C.

6.11.5. Detector UV de comprimento de onda variável, capaz de efectuar medições a 210 nm (se necessário, pode ser utilizado um comprimento de onda superior, até 220 nm) com a sensibilidade de 0,02 unidades de absorvância.

6.11.6. Integrador com possibilidade de integração em relação à linha de base comum ou entre mínimos consecutivos.

Nota: É possível trabalhar com colunas à temperatura ambiente, desde que esta não varie mais de 1 °C; caso contrário, registam-se demasiadas variações do tempo de retenção dos CMP_A.

7. AMOSTRAGEM

7.1. A colheita de amostras deve ser efectuada de acordo com a norma internacional ISO 707. Todavia, os Estados-Membros podem utilizar outro método de amostragem, desde que respeite os princípios da referida norma.

7.2. Conservar as amostras em condições que evitem qualquer deterioração ou alteração de composição.

8. PROCEDIMENTO

([1]) O soro de coagulação em pó de composição-padrão, bem como o leite em pó desnatado adulterado, são fornecidos por NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL-6710 BA Ede. Todavia, também podem ser utilizados produtos que permitam obter resultados idênticos aos dos produtos da NIZO.

▼B

8.1. **Preparação da amostra para análise**

Colocar o leite em pó num recipiente de capacidade aproximadamente dupla do volume do pó, equipado com uma tampa hermética. Fechar de imediato o recipiente. Misturar bem o leite em pó, invertendo várias vezes o recipiente

8.2. **Toma para análise**

Pesar 2,00 ± 0,001 g da amostra para análise num tubo de centrifugação (6.2) ou num balão rolhado adequado (50 ml).

Nota: No caso das misturas, pesar uma quantidade da amostra para análise que corresponda a 2,00 g de amostra sem matérias gordas.

8.3. **Eliminação da matéria gorda e das proteínas**

8.3.1. Adicionar 20,0 ml de água quente (50 °C) à toma para análise. Dissolver o pó, agitando durante 5 minutos — ou, no caso do leitelho ácido, durante 30 minutos -, com um agitador mecânico (6.3). Colocar o tubo em banho-maria (6.10) e deixar estabilizar a 25 °C.

8.3.2. Adicionar ao longo de 2 minutos, de forma constante, 10,0 ml da solução de ácido tricloroacético, a cerca de 25 °C (5.1), agitando sempre com o agitador magnético (6.4). Colocar o tubo no banho-maria (6.10) e deixar em repouso durante 60 minutos

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

8.4. **Determinação cromatográfica**

8.4.1. Proceder à análise por HPLC como é descrito no anexo XII. Caso seja obtido um resultado negativo, a amostra analisada não contém sólidos de soro de coagulação em quantidade detectável. Se o resultado for positivo, será necessário aplicar o método HPLC com inversão de fases a seguir descrito. Em alternativa, pode ser aplicado directamente o método HPLC com inversão de fases. A presença de leitelho ácido pode originar falsos resultados positivos, quando se utiliza o método descrito no anexo XII. O método HPLC com inversão de fases exclui essa possibilidade.

8.4.2. Antes de se proceder à análise HPLC com inversão de fases, devem ser optimizadas as condições de gradiente. No caso dos sistemas de gradiente com um volume morto de cerca de 6 ml (volume a partir do ponto em que os solventes se juntam até ao volume da ansa do injector, inclusive), o tempo de retenção óptimo para o CMP_A é de 26 ± 2 minutos. Os sistemas de gradiente com menos volume morto (por exemplo: 2 ml) devem utilizar 22 minutos como tempo de retenção óptimo.

Tomar as soluções de amostras-padrão (5.4) sem e com 50 % de soro de coagulação.

Injectar 100 µl do sobrenadante ou filtrado (8.3.3) no aparelho de HPLC, que deve funcionar nas condições de gradiente de aferição indicadas no quadro 1.

Quadro 1

Condições de gradiente de aferição para optimização da cromatografia

Tempo (minutos)	Caudal (ml/minuto)	% A	% B	Curva
Início	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	Linear
32	1,0	10	90	Linear
37	1,0	10	90	Linear
42	1,0	90	10	Linear

A comparação dos dois cromatogramas deve revelar a localização do pico dos CMP_A.

▼B

Utilizando a fórmula a seguir indicada, pode calcular-se a composição inicial do solvente a utilizar para o gradiente normal (ver 8.4.3): % B = 10 – 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 30 / 27 % B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} – 26) / 6) × 1,11

em que:

RT_{cmpA}: Tempo de retenção dos CMP_A com o gradiente de aferição.

10: % B inicial com o gradiente de aferição.

2,5: % B no ponto médio menos % B inicial do gradiente normal.

13,5: Tempo médio no gradiente de aferição.

26: Tempo de retenção pretendido dos CMP_A.

6: Razão entre os declives do gradiente de aferição e do gradiente normal.

30: % B inicial menos % B após 27 minutos no gradiente de aferição.

27: Tempo decorrido do gradiente de aferição.

8.4.3. Toma das soluções das amostras para análise

Injectar 100 µl de sobrenadante ou filtrado (8.3.3), medidos rigorosamente, no aparelho de HPLC, com um caudal de 1,0 ml de eluente (5.2) por minuto.

A composição do eluente no início da análise é obtida aplicando o ponto 8.4.2. Normalmente, será próxima de A:B = 76:24 (5.2). Imediatamente após a injecção, dá-se início a um gradiente linear, de modo a atingir uma percentagem de B 5 % mais elevada após 27 minutos. Em seguida, dá-se início a um novo gradiente linear para levar a composição do eluente a 90 % de B em 5 minutos. Esta composição é mantida durante 5 minutos, voltando depois a mudar em 5 minutos, através de um gradiente linear, para a composição inicial. A injecção seguinte, que depende do volume interno do sistema de bombagem, pode ser feita 15 minutos após a obtenção das condições iniciais.

Nota: 1. O tempo de retenção dos CMP_A deve ser de 26 ± 2 minutos. Esse tempo de retenção pode ser conseguido adaptando as condições iniciais e finais do primeiro gradiente. Todavia, a diferença entre a % de B nas condições iniciais e finais do primeiro gradiente deve manter-se em 5 % de B.

Nota 2. Os eluentes devem ser suficientemente desgaseificados e permanecer nesse estado, factor que é essencial para o funcionamento adequado do sistema de bombagem em gradiente. O desvio-padrão do tempo de retenção do pico dos CMP_A deve ser inferior a 0,1 minutos (n =10).

Nota 3. Após cada cinco amostras, deve voltar a ser injectada a amostra de referência (5), que será utilizada para calcular um novo factor de resposta, R (9.1.1).

8.4.4. Os resultados da análise cromatográfica da amostra em análise (E) são obtidos sob a forma de um cromatograma, no qual o pico dos CMP_A é identificado pelo seu tempo de retenção de cerca de 26 minutos.

O integrador (6.11.6) calcula automaticamente a altura, H, do pico dos CMP_A. Em todos os cromatogramas, deve ser verificada a localização da linha de base. Deve repetir-se a análise ou a integração se a linha de base estiver incorrectamente localizada.

▼B

Nota: Se o pico dos CMP_A estiver suficientemente separado dos outros picos, deve aplicar-se uma integração entre mínimos consecutivos na linha de base, caso contrário, utilizar a projecção perpendicular sobre uma linha de base comum, que deverá ter início perto do pico dos CMP_A (e, portanto, não em t = 0 min!). Utilizar o mesmo tipo de integração para as amostras e para o padrão e, caso a linha de base seja comum, verificar a sua aplicabilidade às amostras e ao padrão.

É essencial examinar o aspecto de cada cromatograma antes de qualquer interpretação quantitativa, para detectar eventuais anomalias devidas a um funcionamento deficiente do equipamento ou da coluna ou decorrentes da origem ou natureza da amostra analisada. Em caso de dúvida, repetir a análise.

8.5. **Calibração**

8.5.1. Aplicar às amostras-padrão (5.4.1 e 5.4.2) exactamente o procedimento descrito nos pontos 8.2 a 8.4.4. Utilizar soluções preparadas de fresco, já que os CMP se degradam, à temperatura ambiente, em meio de ácido tricloroacético a 8 %. A 4 °C, a solução mantém.-se estável durante 24 horas. No caso de séries longas de análises, é desejável a utilização de um recipiente arrefecido para amostras no injector automático.

Nota: O ponto 8.4.2. pode ser suprimido se a % de B nas condições iniciais for conhecida de análises anteriores.

O cromatograma da amostra de referência [5] deve ser idêntico à figura 1, na qual o pico dos CMP_A é antecedido de dois pequenos picos. É essencial obter uma separação semelhante.

8.5.2. Antes da determinação cromatográfica às amostras, injectar 100 µl da amostra-padrão sem soro de coagulação [0] (5.4.1).

O cromatograma não deve apresentar nenhum pico com o mesmo tempo de retenção que o pico dos CMP_A.

8.5.3. Determinar os factores de resposta, R, injectando um volume de filtrados (8.5.1) idêntico ao utilizado para as amostras.

9. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

9.1. **Método de cálculo e fórmulas**

9.1.1. *Cálculo do factor de resposta, R:*

Pico dos CMP_A: $R = W/H$

em que:

R = Factor de resposta do pico dos CMP_A

H = Altura do pico dos CMP_A

W = Quantidade de soro na amostra-padrão [5]

9.2. **Cálculo da percentagem de soro de coagulação em pó na amostra**

$W(E) = R \times H(E)$

em que:

W(E) = Percentagem (m/m) de soro de coagulação da amostra [E]

R = Factor de resposta do pico dos CMP_A (9.1.1)

H(E) = Altura do pico dos CMP_A da amostra (E)

Se W(E) for superior a 1 % e a diferença entre o tempo de retenção e o da amostra-padrão [5] for inferior a 0,2 minutos, conclui-se pela presença de sólidos de soro de coagulação.

9.3. **Precisão do método**

9.3.1. *Repetibilidade*

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas simultaneamente ou com um curto intervalo de tempo, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, a matérias de ensaio idênticas, não deve exceder 0,2 % m/m.

▼B

9.3.2. *Reprodutibilidade*

Não foi determinada.

9.3.3. *Linearidade*

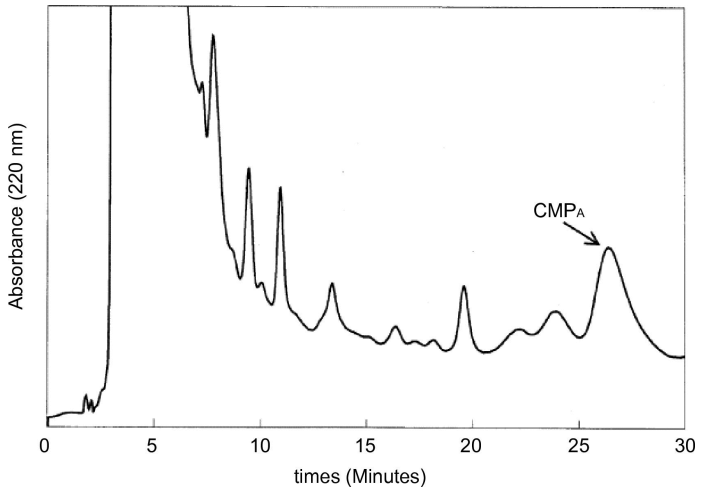
Entre 0 % e 16 % de soro de coagulação, deve obter-se uma relação linear, com coeficiente de correlação superior a 0,99.

9.4. **Interpretação**

O limite de 1 % foi fixado em conformidade com os pontos 9.2 e 9.4.1 do anexo XIX do Regulamento (CE) n.º 214/2001 e inclui a incerteza associada à reprodutibilidade.

Table 1

Ni –4,6 standard



▼B

ANEXO XIV

(Artigo 10.º)

LEITE EM PÓ DESNATADO: DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA FOSFATIDILSERINA E DA FOSFATIDILETANOLAMINA

Método: HPLC com inversão de fases

1. OBJECTO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

O presente método descreve um procedimento para a determinação quantitativa de fosfatidilserina (PS) e de fosfatidiletanolamina (PE) no leite em pó desnatado, podendo ser utilizado para a detecção de sólidos de leitelho nesse leite em pó.

2. DEFINIÇÃO

Teor de PS+PE: fracção mássica da substância, determinada pelo procedimento a seguir descrito. O resultado é expresso em miligramas de dipalmitato de fosfatidiletanolamina (PEDP) por 100 g de pó.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Extracção, em metanol, dos aminofosfolípidos do leite em pó reconstituído. Determinação da PS e da PE, na forma de derivados *o*-ftaldialdeídicos (OPA) por HPLC com inversão de fases e detecção por fluorescência. Quantificação do teor de PS e PE na amostra de ensaio em relação a uma amostra-padrão com uma quantidade conhecida de PEDP.

4. REAGENTES

Todos os reagentes devem ser de grau analítico reconhecido. Salvo indicação em contrário, a água deve ser destilada ou de pureza pelo menos equivalente.

4.1. **Substância-padrão: PEDP com grau de pureza mínima de 99 %**

Nota: A substância-padrão deve ser armazenada a –18 °C.

4.2. **Reagentes para a preparação da amostra-padrão e da amostra de ensaio.**

4.2.1. Metanol para HPLC.

4.2.2. Clorofórmio para HPLC.

4.2.3. Monocloridrato de triptamina.

4.3. **Reagentes para a preparação de derivados o-ftaldialdeídicos.**

4.3.1. Solução aquosa 12 M de hidróxido de sódio.

4.3.2. Solução aquosa 0,4 M de ácido bórico, com o pH ajustado a 10,0 com hidróxido de sódio (4.3.1).

4.3.3. 2-Mercaptoetanol.

4.3.4. o-Ftaldialdeído (OPA).

4.4. **Eluentes para a HPLC.**

4.4.1. Preparar os eluentes com reagentes para HPLC.

4.4.2. Água para HPLC.

4.4.3. Metanol de pureza fluorimétrica comprovada.

4.4.4. Tetra-hidrofurano.

4.4.5. Di-hidrogenofosfato de sódio.

4.4.6. Acetato de sódio.

4.4.7. Ácido acético.

5. EQUIPAMENTO

5.1. Balança analítica capaz de pesar com uma aproximação de 1 mg, com leitura das décimas de miligrama.

▼B

5.2. Copos de 25 ml e 100 ml.

5.3. Pipetas de 1 ml e de 10 ml.

5.4. Agitador magnético.

5.5. Pipetas graduadas de 0,2 ml, 0,5 ml e 5 ml.

5.6. Balões aferidos de 10 ml, 50 ml e 100 ml.

5.7. Seringas de 20 µl e de 100 µl.

5.8. Banho de ultra-sons.

5.9. Centrifugadora capaz de atingir 27 000 g.

5.10. Frascos de vidro com cerca de 5 ml.

5.11. Proveta graduada de 25 ml.

5.12. Medidor de pH, com a aproximação de 0,1 unidades de pH.

5.13. Equipamento de HPLC.

5.13.1. Sistema de bombagem de gradiente, regulável para 1,0 ml/min a 200 bar.

5.13.2. Injector automático, com possibilidade de derivação.

5.13.3. Câmara aquecida, capaz de manter a coluna a 30 ± 1 °C.

5.13.4. Detector de fluorescência, regulável para um comprimento de onda de excitação de 330 nm e um comprimento de onda de emissão de 440 nm.

5.13.5. Integrador ou programa informático de tratamento de dados para a determinação da área dos picos.

5.13.6. Coluna Lichrosphere — 100 (250 mm × 4,6 mm) ou coluna equivalente, com enchimento de octadecilsilano (C 18) em partículas de 5 µm.

6. AMOSTRAGEM

A colheita de amostras deve ser efectuada de acordo com a Norma ISO 707.

7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparação da solução do padrão interno**

7.1.1. Pesar 30,0 ± 0,1 mg de monocloridrato de triptamina (4.2.3) num balão aferido de 100 ml (5.6) e completar o volume até à marca com metanol (4.2.1).

7.1.2. Pipetar 1 ml (5.3) desta solução para um balão aferido de 10 ml (5.6) e completar o volume até à marca com metanol (4.2.1), de modo a obter a concentração de 0,15 mM de triptamina.

7.2. **Preparação da solução da amostra para análise**

7.2.1. Pesar 1,000 ± 0,001 g da amostra de leite em pó desnatado num frasco de 25 ml (5.2). Utilizando uma pipeta (5.3), adicionar 10 ml de água destilada a 40 ± 1 °C e agitar com um agitador magnético (5.4) durante 30 minutos, para dissolver eventuais grumos.

7.2.2. Pipetar 0,2 ml (5.5) do leite reconstituído para um balão aferido de 10 ml (5.6), adicionar 100 µl da solução 0,15 mM de triptamina (7.1) com uma seringa (5.7) e completar o volume até à marca com metanol (4.2.1). Misturar cuidadosamente, invertendo o blão, e tratar a amostra com ultrassons (5.8) durante 15 minutos.

7.2.3. Centrifugar (5.9) a 27 000 g durante 10 minutos e recolher o sobrenadante num frasco de vidro (5.10).

Nota: A solução da amostra para análise deve ser guardada a 4 °C até à análise em HPLC.

7.3. **Preparação da solução do padrão externo**

▼B

7.3.1. Pesar 55,4 mg de PEDP (4.1) num balão aferido de 50 ml (5.6) e adicionar cerca de 25 ml de clorofórmio (4.2.2) utilizando uma proveta graduada (5.11). Aquecer o balão rolhado até à temperatura de 50 ± 1 °C e misturar cuidadosamente até o PEDP se dissolver. Arrefecer o balão até 20 °C, completar o volume até à marca com metanol (4.2.1) e misturar por inversão.

7.3.2. Pipetar 1 ml (5.3) desta solução para um balão aferido de 100 ml (5.6) e completar o volume até à marca com metanol (4.2.1). Pipetar 1 ml (5.3) desta solução para um balão aferido de 10 ml (5.6), adicionar 100 µl (5.7) da solução 0,15 mM de triptamina (7.1) e completar o volume até à marca com metanol (4.2.1). Misturar por inversão.

Nota: A solução da amostra de referência deve ser guardada a 4 °C até à análise em HPLC.

7.4. **Preparação do reagente para a obtenção de derivados**

Pesar 25,0 ± 0,1 mg de OPA (4.3.4) num balão aferido de 10 ml (5.6), adicionar 0,5 ml (5.5) de metanol (4.2.1) e misturar cuidadosamente para dissolver o OPA. Completar o volume com solução de ácido bórico (4.3.2) e adicionar 20 µl de 2-mercaptoetanol (4.3.3) com uma seringa (5.7).

Nota: Este reagente deve ser guardado a 4 °C num frasco de vidro castanho, mantendo-se estável durante uma semana.

7.5. **Determinação por HPLC**

7.5.1. *Eluentes (4.4)*

Eluente A: solução 0,3 mM de di-hidrogenofosfato de sódio e 3 mM de acetato de sódio (pH ajustado a 6,5 ± 0,1 com ácido acético):metanol:tetra-hidrofurano = 558:440:2 (v/v/v).

Eluente B: metanol.

7.5.2. *Gradiente de eluição sugerido:*

Tempo (min.)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Caudal (ml/min)
Inicial	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

Nota: Para conseguir a resolução da figura 1, pode ser necessário alterar ligeiramente o gradiente de eluição.

Temperatura da coluna: 30 °C.

7.5.3. *Volume a injectar: 50 µl do reagente para a obtenção de derivados e 50 µl da solução da amostra.*

▼B

7.5.4. *Estabilização da coluna*

Diariamente, ao pôr o sistema em funcionamento, lavar a coluna com 100 % de eluente B durante 15 minutos; ajustar depois para uma proporção A:B = 40:60 e estabilizar a 1 ml/min durante 15 minutos. Fazer uma passagem em branco injectando metanol (4.2.1).

Nota: Antes de uma paragem prolongada, lavar a coluna com uma mistura 80:20 (v/v) de metanol:clorofórmio durante 30 minutos.

7.5.5. *Determinação do teor de PS + PE na amostra para análise*

7.5.6. *Efectuar a sequência de análises cromatográficas mantendo um intervalo de tempo constante entre passagens, de modo a obter tempos de retenção constantes. Injectar a solução do padrão externo (7.3) entre cada 5-10 soluções da amostra a analisar, a fim de calcular o factor de resposta.*

Nota: A coluna deve ser limpa, efectuando uma lavagem com 100 % de eluente B (7.5.1) durante pelo menos 30 minutos, depois de cada 20-25 passagens.

7.6. **Modo de integração**

7.6.1. *Pico do PEDP*

A eluição do PEDP produz um único pico. Determinar a área do pico por integração entre dois mínimos consecutivos.

7.6.2. *Pico da triptamina*

A eluição da triptamina produz um único pico (figura 1). Determinar a área do pico por integração entre dois mínimos consecutivos.

7.6.3. *Grupos de picos da PS e da PE*

Nas condições descritas (figura 1), a eluição do PS produz dois picos principais, parcialmente sobrepostos, precedidos de um pico secundário. A eluição do PE produz 3 picos principais, parcialmente sobrepostos. Determinar a área total de cada grupo de picos, estabelecendo a linha de base conforme se indica na figura 1.

8. CÁLCULO E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os teores de PS e PE da amostra para análise são calculados do seguinte modo: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$,

em que:

C = Teor de PS ou de PE (mg/100 g de pó) na amostra para análise

A_1 = Área do pico do PEDP da solução da amostra-padrão (7.3)

A_2 = Área do pico da PS ou da PE na solução da amostra para análise (7.2)

T_1 = Área do pico da triptamina da solução da amostra-padrão (7.3)

T_2 = Área do pico da triptamina da solução da amostra para análise (7.2)

9. PRECISÃO DO MÉTODO

Nota: Os valores de repetibilidade foram calculados em conformidade com a norma internacional IDF ([1]). O limite de reprodutibilidade provisório foi calculado em conformidade com a alínea b) do anexo III.

([1]) Norma Internacional IDF 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure.

▼B

9.1. **Repetibilidade**

O desvio-padrão relativo da repetibilidade, que exprime a variabilidade de resultados analíticos independentes obtidos pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, nas mesmas condições, para a análise da mesma amostra, num curto intervalo de tempo, não deve exceder 2 %. em valor relativo Se duas determinações forem obtidas nestas condições, a diferença relativa entre os dois resultados não deve exceder 6 % da média aritmética dos resultados.

9.2. **Reprodutibilidade**

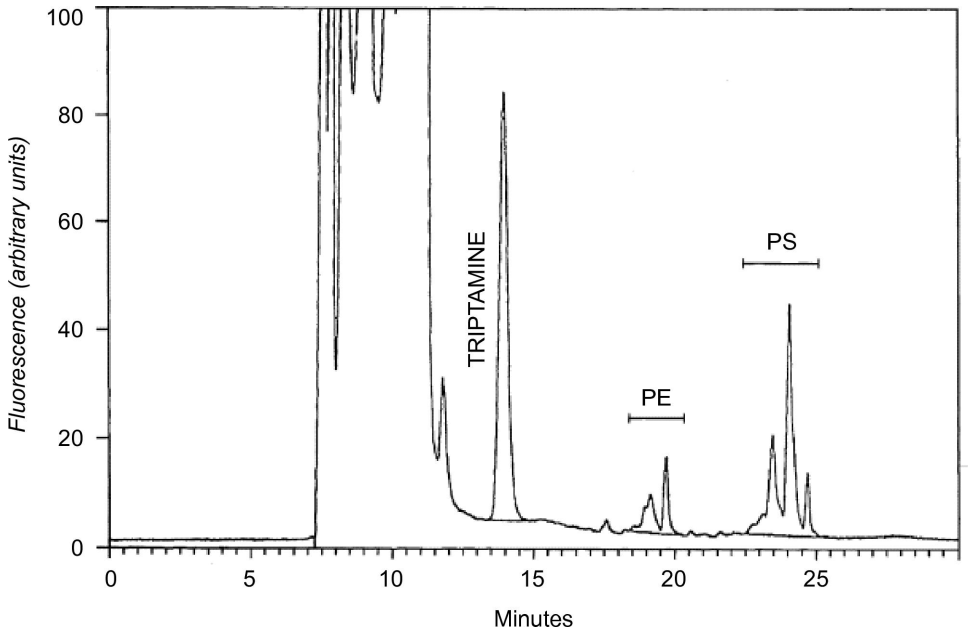
Se forem efectuadas duas determinações por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamento diferente, em condições diferentes, na análise da mesma amostra, a diferença relativa entre os dois resultados não deve exceder 11 % da média aritmética dos resultados.

10. REFERÊNCIAS

10.1. *Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., «Detection of buttermilk solids in skimmilk powder by HPLC quantification of aminophospholipids». Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39,395 (1988).*

Figura 1

Gráfico HPLC de derivados OPA da fosfatidilserina (PS) e da fosfatidiletanolamina (PE) presentes num extracto metanólico de leite em pó desnatado reconstituído. É indicado o modo de integração dos picos da PS, da PE e da triptamina (padrão interno)



▼B

ANEXO XV

(Artigo 11.º)

DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS NO LEITE EM PÓ DESNATADO

Recorre-se a rastreio de inibidores microbianos que utiliza o *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (idêntico à estirpe C953) como microrganismo de ensaio e tem uma sensibilidade suficiente para detectar 4 μg de benzilpenicilina por quilograma de leite e 100 μg de sulfadimidina por quilograma de leite. Podem ser utilizados conjuntos de ensaio existentes no comércio, desde que tenham a sensibilidade exigida no que respeita à benzilpenicilina e à sulfadimidina.

Utiliza-se no ensaio leite em pó desnatado reconstituído (1 g de pó +9 ml água destilada). O ensaio é efectuado conforme se descreve na norma técnica ISO/TS 26844:2006 «Milk and milk products — Determination of antimicrobial residues — Tube diffusion test IDF», Boletim IDF n.º 258/1991, secção 1, capítulo 2, ou de acordo com as instruções do fabricante do conjunto de ensaio ([1]).

A interpretação de resultados positivos é feita do seguinte modo:

1. Confirma-se a presença de *β*-lactama através da repetição do ensaio, adicionando penicilinase ao sistema de ensaio ([2]):

   Resultado negativo: A substância inibidora é um antibiótico do grupo da *β*-lactama.

   Recorrência do resultado positivo: A substância inibidora não pode ser identificada por este método; avançar para 2.

2. Pode confirmar-se a presença de sulfonamidas através da repetição do ensaio, adicionando ácido *p*-aminobenzóico ao sistema de ensaio:

   Resultado negativo: A substância inibidora é uma sulfonamida.

   Recorrência do resultado positivo: A substância inibidora não pode ser identificada por este método; avançar para 3.

3. Pode confirmar-se a presença de uma combinação de uma *β*-lactama e de uma sulfonamida através da repetição do ensaio, adicionando penicinilase e ácido *p*-aminobenzóico ao sistema de ensaio:

   Resultado negativo: As substâncias inibidoras são um antibiótico do grupo das *β*-lactamas e uma sulfonamida.

   Resultado positivo: A substância inibidora não pode ser identificada por este método.

([1]) Nota importante: a análise de leite em pó desnatado pode produzir falsos positivos. É importante, por conseguinte, verificar que o sistema de ensaio utilizado não produz falsos positivos.

([2]) Algumas *β*-lactamas são menos sensíveis à *β*-lactamase. Nesses casos, é recomendável um pré-tratamento adicional da amostra (juntar a 1 ml de amostra para análise 0,3 ml de concentrado de penase e manter a 37 °C durante 2 h).

▼B

ANEXO XVI

(Artigo 12.º)

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA, POR COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA DA PARA-CASEÍNA, DO LEITE EM PÓ DESNATADO PRESENTE NUM ALIMENTO COMPOSTO PARA ANIMAIS

1. OBJECTO

Determinação quantitativa, por coagulação enzimática da para-caseína, do leite em pó desnatado presente num alimento composto para animais.

2. ÂMBITO

O presente método é aplicável aos alimentos compostos para animais que contenham pelo menos 10 % de leite em pó desnatado; a presença de quantidades importantes de leitelho e/ou de certas proteínas não-lácteas pode provocar interferências.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

3.1. Solubilização da caseína contida no alimento composto para animais por extracção com uma solução de citrato de sódio.

3.2. Estabelecimento da concentração de iões cálcio necessária à precipitação da para-caseína, por adição de coalho.

3.3. Determinação do teor de azoto do precipitado de para-caseína pelo método de Kjeldahl, conforme é descrito na norma ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001; cálculo da quantidade de leite em pó desnatado presente, com base num teor mínimo de caseína de 27,5 % (ver ponto 8.1).

4. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados devem ser de qualidade analítica. A água utilizada deve ser água destilada ou água de pureza equivalente. Com excepção do coalho (4.5), todos os reagentes e soluções utilizados devem estar isentos de substâncias azotadas.

4.1. Citrato trissódico bi-hidratado (solução a 1 % m/v).

4.2. Cloreto de cálcio (solução aproximadamente 5 M).

Dissolver, com agitação, 75g de $CaCl_2.2H_2O$ em 100 ml de água destilada (atenção: reacção exotérmica). Deixar em repouso de um dia para o outro e filtrar em seguida a solução. Conservar em frigorífico.

4.3. Hidróxido de sódio 0,1 N.

4.4. Ácido clorídrico 0,1 N.

4.5. Coalho de vitelo líquido (actividade aproximada de 100 IMCU/ml, de acordo com a norma ISO 11815/IDF 157). Conservar em frigorífico a 4--6 °C.

4.6. Reagentes para a determinação quantitativa do azoto segundo o método de Kjeldahl, conforme descrito na norma ISO 8968-2:2001/IDF 20--2:2001.

5. EQUIPAMENTO

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

5.1. Almofariz ou moinho homogeneizador.

5.2. Balança analítica capaz de pesar com a aproximação de 1 mg, com leitura das décimas de miligrama.

5.3. Centrifugadora de bancada (500 g ou 2 000-3 000 rpm), equipada com tubos de 50 ml.

5.4. Agitador magnético com barras de 10-15 mm.

5.5. Copos de 150-200 ml.

5.6. Frascos de 250 ml e de 500 ml.

▼B

5.7. Funis de vidro com diâmetro de 60-80 mm.

5.8. Filtros sem cinzas, de filtração rápida, com diâmetro de 150 mm (Whatman N.º 41 ou equivalente).

5.9. Pipetas de vários volumes.

5.10. Banho-maria termostático, regulado a 37 ± 1 °C.

5.11. Medidor de pH, com a aproximação de 0,1 unidades de pH.

5.12. Termómetro com a aproximação de 1 °C.

6. PROCEDIMENTO

6.1. **Preparação da amostra**

Moer no almofariz ou homogeneizar no moinho 10-20 g de amostra, de modo a obter uma mistura homogénea.

6.2. **Dissolução do leite em pó e separação do resíduo insolúvel**

6.2.1. Pesar 1,000 ± 0,002 g de alimento composto para animais bem homogeneizado (6.1) directamente num tubo de centrifugação de 50 ml. Adicionar 30 ml de solução de citrato trissódico (4.1) previamente aquecida a 45 ± 2 °C. Misturar com o agitador magnético durante pelo menos cinco minutos ou agitar manualmente de forma vigorosa.

6.2.2. Centrifugar a 500 g (2 000-3 000 rpm) durante 10 minutos e decantar o sobrenadante aquoso e límpido para um copo de 150-200 ml. Ter o cuidado de evitar perdas da camada inferior.

6.2.3. Submeter o resíduo a duas novas extracções, procedendo do mesmo modo e misturando depois os três extractos aquosos.

6.2.4. Se se formar uma camada oleosa à superfície, arrefecer no frigorífico até à solidificação da gordura e retirá-la em seguida com uma espátula.

6.3. **Coagulação da caseína pelas enzimas do coalho**

6.3.1. Juntar ao extracto aquoso total (cerca de 100 ml), gota a gota e com agitação constante, 2 ml da solução de cloreto de cálcio (4.2). Ajustar o pH a 6,4-6,5 com solução de NaOH (4.3) ou HCl (4.4). Colocar a solução resultante num banho termostatizado a 37 ± 1 °C, durante 15 a 20 minutos, para permitir que se estabeleça o equilíbrio salino. Este manifesta-se pela aparição de uma ligeira turvação.

6.3.2. Transferir o líquido para um tubo de centrifugação e centrifugar a 2 000 g durante 10 minutos, para remover o precipitado. Transferir o sobrenadante, sem lavar o sedimento, para outro tubo de centrifugação.

6.3.3. Repor a temperatura do sobrenadante a 37 ± 1 °C. Agitando sempre o extracto, acrescentar, gota a gota, 0,5 ml de coalho líquido (4.5). A coagulação ocorre em dois minutos.

6.3.4. Colocar novamente a amostra no banho-maria e manter a 37 ± 1 °C durante 15 minutos. Retirar a amostra do banho e agitar, para desfazer o coágulo. Centrifugar a 2 000 g durante 10 minutos. Filtrar o sobrenadante com um papel de filtro adequado (5.8) e conservar o papel de filtro. Lavar o precipitado no tubo de centrifugação, utilizando 50 ml de água a cerca de 35 °C e mexendo o precipitado.

Centrifugar novamente a 2 000 g, durante 10 minutos. Filtrar o sobrenadante com o papel de filtro anteriormente conservado.

6.4. **Determinação do azoto da caseína**

6.4.1. Após lavagem, transferir quantitativamente o precipitado para o papel de filtro conservado do passo 6.3.4, utilizando água destilada. Transferir o papel de filtro, seco, para o balão de Kjeldahl. Determinar o teor de azoto pelo método de Kjeldahl, conforme é descrito na norma ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001.

▼B

7. ENSAIO EM BRANCO

7.1. Deve efectuar-se regularmente um ensaio em branco, procedendo à mineralização pelo método de Kjeldahl, conforme é descrito na norma ISO 8968-2:2001/IDF 20-2:2001, de um papel de filtro sem cinzas (5.8), impregnado com uma mistura de 90 ml de solução de citrato de sódio (4.1), 2 ml de solução de cloreto de cálcio (4.2) e 0,5 ml de coalho líquido (4.5) e lavado com 3 × 15 ml de água destilada.

7.2. Deduzir ao volume de ácido (4.4) utilizado na titulação da amostra analisada o volume necessário no ensaio em branco.

8. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

8.1. A percentagem de leite em pó desnatado (LPD) no alimento composto para animais é calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ OMП} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100\right) - 2,81}{0,908}$$

em que:

N é a percentagem de azoto da para-caseína;

27,5 é o factor de conversão da caseína, determinado em percentagem de leite em pó desnatado;

e 2,81 e 0,908 são factores de correcção obtidos por análise de regressão.

9. PRECISÃO DO MÉTODO

9.1. **Repetibilidade**

Em pelo menos 95 % dos casos estudados, a diferença entre os resultados da análise de um duplicado de uma amostra, pelo mesmo operador, no mesmo laboratório, não deve exceder o equivalente a 2,3 g de leite em pó desnatado por 100 g de alimento composto para animais.

9.2. **Reprodutibilidade**

Em pelo menos 95 % dos casos estudados, a diferença entre os resultados obtidos por dois laboratórios na análise da mesma amostra não deve exceder 6,5 g de leite em pó desnatado por 100 g de alimento composto para animais.

10. OBSERVAÇÕES

10.1. A adição de grandes percentagens de certas proteínas não-lácteas, nomeadamente de soja, que tenham sido aquecidas juntamente com o leite em pó desnatado, pode conduzir a resultados demasiado elevados, devido à co-precipitação dessas proteínas com a para-caseína do leite.

10.2. A adição de leitelho pode conduzir a valores um pouco baixos, dado que a determinação só incide na componente não-gorda. A adição de certos leitelhos ácidos pode conduzir a valores bastante baixos, devido à dissolução incompleta na solução de citrato.

10.3. A adição de 0,5 % ou mais de lecitina pode igualmente conduzir a resultados mais baixos.

10.4. A incorporação de leite em pó aquecido a alta temperatura pode conduzir a valores demasiado elevados, devido à co-precipitação de certas proteínas do soro lácteo com a para-caseína do leite.

▼B

ANEXO XVII

(Artigo 13.º)

DETECÇÃO DE AMIDO NO LEITE EM PÓ DESNATADO, NO LEITE EM PÓ DESNATURADO E NOS ALIMENTOS COMPOSTOS PARA ANIMAIS

1. ÂMBITO

O presente método destina-se à detecção do amido utilizado como marcador no leite em pó desnaturado.

O limite de detecção do método é de, aproximadamente, 0,05 g de amido por 100 g de amostra.

2. PRINCÍPIO

A reacção baseia-se na utilizada em iodometria:

— fixação pelos colóides do iodo livre em solução aquosa,

— absorção pelas micelas de amido e formação de cor.

3. REAGENTES

3.1. Solução de iodo:

— Iodo: 1,0 g

— Iodeto de potássio: 2,0 g

— Água destilada: 100 ml

— Dissolver 1,0 g de iodo e 2,0 g de iodeto de potássio em água, num balão aferido de 100 ml. Completar o volume até à marca com água e misturar.

4. EQUIPAMENTO

4.1. Balança analítica.

4.2. Banho de água em ebulição.

4.3. Tubos de ensaio de 25 mm × 200 mm.

5. PROCEDIMENTO

Pesar 1,0 g de amostra, com a aproximação de 0,1 g, e transferir a quantidade pesada para o tubo de ensaio (4.3).

Adicionar 20 ml de água destilada e agitar, a fim de dispersar a amostra.

Colocar no banho-maria em ebulição (4.2) durante 5 minutos.

Retirar do banho-maria e arrefecer até à temperatura ambiente.

Adicionar 0,5 ml de solução de iodo (3.1), agitar e observar a cor resultante.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Uma coloração azul indica a presença de amido nativo na amostra.

Se a amostra contiver amido modificado, a cor pode não ser azul.

7. OBSERVAÇÕES

A cor, a intensidade da cor e o aspecto microscópico do amido variam em função da origem do amido nativo (por exemplo, de milho ou de batata) e do tipo de amido modificado presente na amostra.

Na presença de amido modificado, a cor produzida passa a ser violeta, vermelho ou castanho, conforme o grau de modificação da estrutura cristalina do amido nativo.

▼B

ANEXO XVIII

(Artigo 14.º)

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE DAS NATAS SECAS

1. ÂMBITO

O presente anexo descreve um método para a determinação do teor de humidade da nata desidratada.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

Para efeitos do presente anexo, é aplicável a seguinte definição:

Teor de humidade: perda de massa, determinada pelo procedimento descrito na presente norma internacional.

É expresso em percentagem mássica.

3. PRINCÍPIO

Secagem de uma toma de ensaio a 102 ± 2 °C, até massa constante, seguida de pesagem para determinação da perda de massa.

4. EQUIPAMENTO

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

4.1. Balança analítica, capaz pesar com uma aproximação de 1 mg, com leitura das décimas de miligrama.

4.2. Estufa de secagem bem ventilada, equipada com um termóstato capaz de manter a temperatura de 102 ± 2 °C em todo o seu espaço útil interior.

4.3. Exsicadora, com silica gel com indicador da higrometria acabada de secar ou com outro agente exsicante eficaz.

4.4. Cápsulas rasas com a profundidade de cerca de 25 mm e o diâmetro de cerca de 50 mm, de material apropriado (por exemplo, vidro, aço inoxidável, níquel ou alumínio), com tampa bem adaptada e fácil de remover.

4.5. Garrafas bem rolhadas, para mistura das amostras laboratoriais.

5. AMOSTRAGEM

É importante que o laboratório receba uma amostra para ensaio que seja verdadeiramente representativa e que não tenha sido danificada nem alterada durante o transporte ou armazenagem.

A amostragem não está contemplada no método descrito na presente norma internacional. A norma ISO 707IDF 50 descreve um método de amostragem recomendado.

Guardar as amostras de modo a evitar que se deteriorem ou que a sua composição se altere.

6. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE

Misturar bem a amostra para análise, agitando repetidamente e invertendo o frasco (se necessário, transferir as amostras para análise para um frasco estanque, de capacidade suficiente para permitir essa operação).

Caso não se consiga garantir a homogeneidade completa através desse método, retirar as tomas para análise (para duas determinações separadas) da amostra preparada para o efeito, em dois pontos tão distantes um do outro quanto possível.

7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparação da cápsula**

7.1.1. Aquecer uma cápsula destapada e a respectiva tampa (4.4) na estufa de secagem (4.2), regulada para 102 ± 2 °C, durante pelo menos uma hora.

7.1.2. Colocar a tampa na cápsula e colocar esta no exsicador (4.3.), deixar arrefecer até à temperatura ambiente da sala de pesagem e pesar com a aproximação de 1 mg, registando o valor obtido até à décima de miligrama.

▼B

7.2. **Toma para análise**

Transferir entre 1 g e 3 g da amostra para análise preparada (6) para a cápsula, tapar e pesar com a aproximação de 1 mg, registando o valor obtido até à décima de miligrama.

7.3. **Determinação**

7.3.1. Destapar a cápsula e colocá-la, juntamente com a tampa, na estufa de secagem (4.2.), regulada para a temperatura de 102 ± 2 °C, durante duas horas.

7.3.2. Recolocar a tampa na cápsula e colocar esta no exsicador, deixar arrefecer até à temperatura ambiente da sala de pesagem e pesar com a aproximação de 1 mg, registando o valor obtido até à décima de miligrama.

7.3.3. Destapar a cápsula e aquecê-la novamente na estufa, juntamente com a respectiva tampa, durante uma hora. Seguidamente, repetir a operação 7.3.2.

7.3.4. Repetir os passos de aquecimento e de pesagem até que a perda de massa seja igual ou inferior a 1 mg, ou até que se verifique um aumento da massa em duas pesagens sucessivas.

Para efeitos de cálculo, utilizar a menor massa que tenha sido registada.

8. CÁLCULO E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

8.1. **Cálculo**

O teor de humidade, expresso em g/100 g, é igual a:

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

em que:

m_0 é a massa, em gramas, da cápsula com a respectiva tampa (7.1.2);

m_1 é a massa, em gramas, da cápsula, tampa e da toma para análise, antes da secagem (7.2);

m_2 é a massa, em gramas, da cápsula, da tampa e da toma para análise, após secagem (7.3.4).

Apresentar o resultado com duas casas decimais.

9. PRECISÃO

Nota: Os valores da repetibilidade e da reprodutibilidade foram obtidos a partir dos resultados de um ensaio interlaboratorial (ver Steiger, G., Boletim IDF n.º 285/1993, p. 21-28) efectuado de acordo com a norma IDF 135B:1991, «Milk and milk products — Precision characteristics of analytical methods — Outline of collaborative study procedure».

9.1. **Repetibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados de ensaio independentes, obtidos por aplicação do mesmo método, a matérias de ensaio idênticas, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento num curto intervalo de tempo, não deve exceder, em mais de 5 % dos casos, 0,20 g de humidade por 100 g de produto.

9.2. **Reprodutibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados de ensaio independentes, obtidos por aplicação do mesmo método, a matérias de ensaio idênticas, em laboratórios diferentes, por operadores diferentes, utilizando equipamentos diferentes, não deve exceder, em mais de 5 % dos casos, 0,40 g de humidade por 100 g de produto.

10. RELATÓRIO DO ENSAIO

Os relatórios dos ensaios devem mencionar:

— toda a informação necessária para a identificação completa da amostra;

— o método de amostragem utilizado, se for conhecido;

— o método de ensaio utilizado, através de referência à presente norma internacional;

▼B

— todas as condições operacionais não especificadas na presente norma internacional, ou consideradas opcionais, assim como a descrição de quaisquer incidentes que possam ter influenciado o(s) resultado(s) do ensaio.

o(s) resultado(s) obtido(s) no ensaio e, caso tenha sido verificada a repetibilidade, os resultados finais assim obtidos.

▼B

ANEXO XIX

(Artigo 15.º)

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE DO LEITELHO ÁCIDO EM PÓ

1. ÂMBITO

Determinação do teor de humidade de leitelho ácido em pó originalmente destinado a alimentos para animais.

2. PRINCÍPIO

Secagem da amostra sob vácuo. Determinação, por pesagem, da perda de massa.

3. EQUIPAMENTO

3.1. Balança analítica, capaz de pesar com a aproximação de 1 mg, com leitura das décimas de miligrama.

3.2. Cápsulas de metal inoxidável ou de vidro com tampa hermética; superfície útil que permita obter uma repartição da amostra da ordem dos 0,3 g/cm^2.

3.3. Forno de vácuo com aquecimento eléctrico, equipado com uma bomba hidráulica e com um mecanismo que permita a introdução de ar aquecido seco numa torre que contenha, por exemplo, óxido de cálcio ou sulfato de cálcio (com indicador do teor de humidade).

3.4. Exsicador, com um agente de exsicante eficaz.

3.5. Estufa de secagem ventilada, equipada com um termóstato e regulada a 102 ± 2 °C.

4. PROCEDIMENTO

Aquecer uma cápsula (3.2) e a respectiva tampa na estufa de secagem (3.5) durante pelo menos uma hora. Tapar o recipiente, transferi-lo imediatamente para um exsicador (3.4), deixar arrefecer até à temperatura ambiente e pesar com uma aproximação de 1 mg, registando a massa obtida até às décimas de miligrama.

Destapar a cápsula, transferir para a mesma cerca de 5 g de amostra e pesar com uma aproximação de 1 mg, registando a massa obtida até às décimas de miligrama. Colocar a cápsula e a respectiva tampa no forno de vácuo (3.3), previamente aquecido a 83 °C. Para evitar uma queda brusca da temperatura do forno, introduzir a cápsula o mais rapidamente possível.

Elevar a pressão até 100 Torr (13,3 kPa) e deixar secar até massa constante (cerca de 4 horas), a essa pressão e com circulação de ar quente seco.

Calcular o tempo de secagem a partir do momento em que a temperatura do forno voltar a estabilizar n.os 83 °C. Reduzir cuidadosamente a pressão no interior do forno até à pressão atmosférica. Abrir o forno, colocar imediatamente a tampa na cápsula, retirá-la do forno e deixá-la arrefecer durante 30-45 minutos no exsicador (3.4), pesando em seguida com a aproximação de 1 mg e registando a massa obtida até às décimas de miligrama. Secar mais 30 minutos no forno de vácuo (3.3) a 83 °C e repetir a pesagem. Repetir os passos de aquecimento da cápsula e de pesagem até que a perda de massa da cápsula com a respectiva tampa seja igual ou inferior a 1 mg, ou até que se verifique um aumento da massa em duas pesagens sucessivas. Para efeitos de cálculo, utilizar a menor massa que tenha sido registada.

5. CÁLCULO

$$\% \text{ humidade} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100\ \%$$

em que:

m_0 é a massa da cápsula com a respectiva tampa;

m_1 é a massa da cápsula, da tampa e da toma para análise, antes da secagem;

m_1 é a massa da cápsula, tampa e da toma para análise, após secagem;

Registar o resultado com a aproximação de 0,1 g / 100 g.

▼B

6. PRECISÃO

6.1. **Limite de repetibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados de ensaio independentes, obtidos pela aplicação do mesmo método, a matérias de ensaio idênticas, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento num curto intervalo de tempo, não deve exceder, em mais de 5 % dos casos, 0,4 g de humidade por 100 g de leitelho em pó.

6.2. **Limite de reprodutibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados de ensaio independentes, obtidos pela aplicação do mesmo método, a matérias de ensaio idênticas, em laboratórios diferentes, por operadores diferentes, utilizando equipamentos diferentes, não deve exceder, em mais de 5 % dos casos, 0,6 g de humidade por 100 g de leitelho ácido em pó.

6.3. **Fonte dos parâmetros de precisão**

Os parâmetros de precisão foram determinados com base em testes efectuados em 1995, em oito laboratórios, a 12 amostras (6 duplicados em teste cego).

▼B

ANEXO XX

(Artigo 16.º)

MÉTODO DE REFERÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DA MATÉRIA GORDA LÁCTEA POR ANÁLISE DOS TRIGLICÉRIDOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA — REVISÃO 2

1. OBJECTO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

A presente norma descreve um método de referência para a determinação do grau de pureza da matéria gorda láctea através de análise dos triglicéridos por cromatografia em fase gasosa. Podem ser detectadas matérias gordas tanto de origem vegetal ou animal, como o sebo de bovino ou a banha.

Utilizando equações específicas, em função dos teores de triglicéridos, é possível determinar a integridade da matéria gorda láctea. O método aplica-se, basicamente, ao leite de bovino a granel ou a produtos produzidos a partir do mesmo, independentemente das condições de alimentação, de criação e de lactação. Só os casos de alimentação excepcionalmente rica em óleos vegetais puros, como o óleo de colza, poderão resultar em falsos positivos. Os produtos lácteos obtidos a partir do leite de determinadas vacas poderão igualmente apresentar resultados falsos positivos.

O método é aplicável, nomeadamente, à matéria gorda extraída de produtos lácteos supostamente elaborados a partir de matéria gorda láctea pura sem alteração da composição, como a manteiga, a nata, o leite e o leite em pó. O tratamento tecnológico da matéria gorda láctea, por exemplo eliminação do colesterol ou o fraccionamento, podem originar resultados falsos positivos. O mesmo se aplica à matéria gorda obtida a partir de leite desnatado ou de leitelho. O método nem sempre é aplicável à matéria gorda extraída do queijo, já que o processo de cura pode afectar a composição da matéria gorda tão fortemente que se obtêm um resultados falsos positivos.

Nota 1: O ácido butírico (n-butanóico, C_4) ocorre exclusivamente na matéria gorda láctea e permite estimar quantitativamente a presença de quantidades pequenas a moderadas de matéria gorda láctea em matérias gordas de origem vegetal ou animal. Dada a grande variação do teor de C_4 na gama aproximada de percentagens mássicas compreendidas entre 3,1 % a 3,8 %, contudo, é difícil obter informações qualitativas e quantitativas no que respeita à presença de matérias gordas estranhas quando a proporção destas em relação à matéria gorda láctea pura for inferior a 20 % [1].

Nota 2: Em termos práticos, não podem deduzir-se resultados quantitativos a partir do teor de esteróis de matérias gordas vegetais, já que esse teor depende das condições de produção e de transformação. Por outro lado, a determinação qualitativa da presença de matérias gordas estranhas com base nos esteróis apresenta resultados ambíguos.

2. DEFINIÇÃO

Grau de pureza da matéria gorda láctea: ausência de matérias gordas de origem vegetal ou animal, determinada através do procedimento descrito na presente norma.

Nota: O grau de pureza é determinado utilizando os valores *S* calculados a partir da composição em triglicéridos. As fracções mássicas de triglicéridos são expressas em percentagem.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Análise da matéria gorda extraída do leite ou de produtos lácteos por cromatografia em fase gasosa, utilizando uma coluna com enchimento ou uma coluna capilar curta para a determinação dos triglicéridos (TG), discriminados em função do seu número total de átomos de carbono. Calculam-se os ditos valores de *S* inserindo as fracções mássicas, expressas em percentagem, das moléculas gordas de diferentes dimensões (C_{24} a C_{54}, utilizando apenas números pares de átomos de carbono) em equações adequadas à deterrminação dos TG. Se os valores de *S* excederem os limites definidos para a matéria gorda láctea pura, considera-se detectada a presença de matérias gordas estranhas.

▼B

Nota 1: A adequação e equivalência das colunas com enchimento e das colunas capilares foram demonstradas anteriormente [2-4].

Nota 2: O valor *S* representa a soma das fracções mássicas dos diferentes TG, ponderadas por factores específicos.

4. REAGENTES

Todos os reagentes devem ser de grau analítico reconhecido.

4.1. Gás transportador: azoto ou, em alternativa, hélio ou hidrogénio, em qualquer dos casos com um grau de pureza mínimo de 99,995 %.

4.2. Padrões de matéria gorda, para a obtenção de padrões de matéria gorda láctea de acordo com o ponto 7.3.3.

4.2.1. Padrões de triglicéridos saturados: encontram-se disponíveis no comércio produtos adequados.

4.2.2. Padrão de colesterol.

4.3. Metanol (CH_3OH) anidro.

4.4. n-Hexano ($CH_3(CH_2)4CH_3$).

4.5. n-Heptano ($CH_3(CH_2)5CH_3$).

4.6. Outros gases: hidrogénio com grau de pureza mínimo de 99,995 %, livre de impurezas orgânicas (C_nH_m < 1 µl/l); ar sintético, livre de impurezas orgânicas (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7. Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4).

5. EQUIPAMENTO

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

5.1. **Cromatógrafo de fase gasosa de alta temperatura**

O cromatógrafo de fase gasosa de alta temperatura deve estar preparado para funcionar a temperaturas de pelo menos 400 °C e estar equipado com um detector de ionização por chama (FID). Os septos utilizados no injector devem suportar temperaturas elevadas e apresentar um grau muito reduzido de perdas. Para a cromatografia com coluna capilar, utilizar um injector na coluna. Utilizar sempre juntas de grafite para a ligação das colunas, bem como das ansas do injector e/ou do detector (quando aplicável).

5.2. **Coluna de cromatografia**

5.2.1. *Coluna com enchimento*

Utilizar uma coluna de vidro com diâmetro interno de 2 mm e comprimento de 500 mm, cheia com uma fase estacionária de 3 % OV-1 em Gas ChromQ de 125-150 µm (100-120 mesh) ([1]). A preparação, silanização, enchimento e condicionamento da coluna com enchimento são descritos no anexo A.

Em alternativa, pode ser utilizada uma coluna capilar (5.2.2).

5.2.2. *Coluna capilar*

Utilizar uma coluna capilar curta, por exemplo com comprimento de 5 m, com uma fase estacionária não-polar capaz de suportar temperaturas de 400 °C ou mais ([2]). Condicionar a coluna procedendo à injecção de 20 amostras de solução de matéria gorda láctea (7.2) ao longo de 2-3 dias, de acordo com as especificações do ponto 7.3.4.2. Após esse processo, os factores de resposta (7.3.3) devem ser próximos de 1 e inferiores a 1,20.

Nota: Podem ser utilizadas colunas de diferentes dimensões e com outra fase estacionária não-polar resistente a altas temperaturas, desde que o seu desempenho satisfaça os requisitos da presente norma. Ver também o ponto 7.3.4.2.

([1]) Exemplo de um produto adequado disponível no comércio. Esta informação é fornecida para conveniência dos utilizadores da presente norma internacional e não representa um aval do produto.

([2]) A coluna CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) é um exemplo de produto adequado disponível no comércio. Esta informação é fornecida para conveniência dos utilizadores da presente norma internacional e não representa um aval do produto.

▼B

5.3. Coluna Extrelut, com capacidade de 1-3 ml e enchimento de sílica-gel, necessária apenas para a extracção da matéria gorda láctea de acordo com o ponto 7.1.3.

5.4. Juntas de grafite capazes de suportar temperaturas de pelo menos 400 °C, a utilizar para a ligação da coluna de cromatografia em fase gasosa, bem como das ansas do injector e/ou do detector.

5.5. Banho-maria, capaz de manter a temperatura a 50 ± 2 °C.

5.6. Estufa capaz de funcionar a 50 ± 2 °C e de 100 ± 2 °C.

5.7. Micropipeta graduada em microlitros.

5.8. Pipeta graduada de 5 ml.

5.9. Balão de fundo redondo, de 50 ml.

5.10. Balão de Erlenmeyer, com o volume nominal de 250 ml.

5.11. Funil.

5.12. Papel de filtro de poros finos.

5.13. Evaporador rotativo.

5.14. Frascos de amostra com capacidade nominal de 1 ml, com tampas de pressão ou de rosca de alumínio, revestido a politetrafluoretileno.

5.15. Seringas de injecção em que o êmbolo não entre na ponta da agulha (para coluna de cromatografia em fase gasosa com enchimento).

Nota: Estas seringas permitem obter uma melhor repetibilidade dos resultados.

5.16. Balança analítica, capaz de pesar com a aproximação de 1 mg, com leitura das décimas de miligrama.

6. AMOSTRAGEM

É importante que o laboratório receba uma amostra representativa que não tenha sido danificada nem alterada durante o transporte ou armazenagem.

A amostragem não está contemplada no método descrito na presente norma internacional. A norma ISO 707IDF 50[5] descreve um método de amostragem recomendado.

7. PROCEDIMENTO

7.1. **Preparação das amostras para análise**

Para a preparação das amostras para análise, utilizar um dos seguintes três métodos de extracção da matéria gorda láctea.

7.1.1. *Isolamento a partir da manteiga ou do butteroil*

Derreter 50-100 g da amostra para análise a 50 °C, em banho-maria (5.5) ou na estufa (5.6). Colocar 0,5-1,0 g de sulfato de sódio (4.7) num papel de filtro dobrado (5.12). Aquecer previamente um balão de Erlenmeyer de 250 ml (5.10) e um funil (5.11) com papel de filtro na estufa (5.6) regulada a 50 °C. Mantendo o balão e o funil com papel de filtro aquecidos na estufa, filtrar a camada gorda da amostra derretida. Evitar qualquer transferência de soro.

Nos casos em que apenas esteja disponível uma pequena quantidade de amostra, poderá utilizar-se uma amostra para análise mais pequena, devendo o procedimento ser adaptado em conformidade. No entanto, o manuseamento de amostras para análise mais pequenas aumenta o risco de se obterem amostras não-representativas.

Nota 1: Pode obter-se manteiga a partir de nata, por batedura e posterior lavagem cuidadosa da massa de manteiga formada.

Nota 2: A matéria gorda láctea obtida através do procedimento descrito no ponto 7.1.1 estará praticamente isenta de fosfolípidos.

▼B

7.1.2. *Extracção de acordo com o método gravimétrico de Röse–Gottlieb*

Extrair a fracção gorda da amostra para análise utilizando o método gravimétrico descrito nas normas ISO 1211 IDF 001D, ISO 2450IDF 016C ou ISO 7328IDF 116.

Nota: Caso a matéria gorda láctea obtida contenha fosfolípidos, o pico do colesterol aumentará cerca de 0,1 %. A composição de triglicéridos normalizada a 100 % com o colesterol só será, portanto, influenciada de forma negligenciável.

7.1.3. *Extracção a partir de leita, com uma coluna de sílica-gel*

Utilizando uma pipeta graduada em microlitros (5.7), introduzir 0,7 ml da amostra para análise, aquecida a 20 °C, numa coluna Extrelut de 1--3 ml (5.3) Deixar que a amostra se distribua uniformemente pela sílica--gel durante cerca de 5 minutos.

A fim de desnaturar os complexos proteico-lipídicos, pipetar 1,5 ml de metanol (4.3) para a coluna Extrelut, utilizando uma pipeta graduada (5.8). Seguidamente, extrair a fracção gorda da amostra para análise com 20 ml de *n*-hexano (4.4). Adicionar o *n*-hexano devagar, em pequenas quantidades. Recolher o solvente que for escorrendo num balão de fundo redondo de 50 ml (5.9), previamente seco até atingir massa constante e conhecida, pesada com a aproximação de 1 mg e registada até às décimas de miligrama.

Após a extracção, deixar a coluna escoar até ficar vazia. Separar o solvente do eluído por destilação em evaporador rotativo (5.13), em banho-maria regulado para 40-50 °C. Após a destilação dos solventes, secar e pesar o balão de fundo redondo e o seu conteúdo com a aproximação de 1 mg, registando a massa até às décimas de miligrama. Determinar a quantidade de matéria gorda, subtraindo à massa obtida a massa do balão vazio anteriormente registada.

Nota: As extracções de matéria gorda pelos processos de Gerber, Weibull-Berntrop e Schmid-Bondzynski-Ratzlaff ou o isolamento da matéria gorda láctea utilizando detergentes (método BDI) não são adequados para a análise dos triglicéridos, já que esses métodos permitem a passagem, para a fase gorda, de quantidades substanciais de glicéridos parciais ou de fosfolípidos. Assim, a aplicabilidade da presente norma internacional é limitada no que respeita a determinados produtos, nomeadamente o queijo.

7.2. **Preparação da solução para análise**

Para a cromatografia em fase gasosa em coluna com enchimento, preparar uma solução a 5 % (em volume) da matéria gorda, obtida de acordo com o ponto 7.1, em *n*-hexano (4.4) ou *n*-heptano (4.5). Dependendo das dimensões da coluna, utilizar uma concentração de 1 % (para uma coluna com 0,53 mm de diâmetro interno) ou uma concentração menor, caso se utilize uma coluna capilar e um sistema de injecção na coluna.

Consoante a coluna utilizada e a massa de matéria gorda obtida em 7.1.3, determinar a quantidade de solvente (4.4 ou 4.5) a acrescentar à amostra para análise no balão, com base em pesagens efectuadas com a aproximação de 1 mg, registadas até às décimas de miligrama. Dissolver totalmente o restante conteúdo do balão.

Transferir aproximadamente 1 ml da solução da amostra para um frasco de amostra (5.14).

7.3. **Determinação cromatográfica dos triglicéridos**

7.3.1. *Oscilação da linha de base*

A fim de minimizar a elevação da linha de base, a coluna deve ser condicionada de acordo com o ponto 5.2.2 (coluna capilar) ou com o ponto 4 do anexo A (coluna com enchimento).

Nota: Devido às elevadas temperaturas da coluna, há uma forte tendência para a elevação da linha de base na análise dos triglicéridos com os números de átomos de carbono mais elevados.

7.3.2. *Técnica de injecção*

▼B

7.3.2.1. Coluna com enchimento

A fim de evitar efeitos de discriminação, aplicar a técnica da agulha quente para melhorar as condições de quantificação dos triglicéridos com ponto de ebulição mais elevado. Encher a agulha com ar, aspirando a amostra de matéria gorda para o interior da seringa. Introduzir a agulha no injector. Antes de proceder à injecção, deixar a agulha aquecer durante cerca de 3 s. Passado esse tempo, injectar rapidamente o conteúdo da seringa.

7.3.2.2. Coluna capilar

Para a injecção a frio na coluna (7.3.4.2), inserir a agulha no injector e injectar imediatamente. O tempo de permanência da agulha no injector deve ser estabelecido de modo a evitar o arrastamento do pico de solvente.

Nota: O tempo de permanência óptimo é, normalmente, de 3 s.

7.3.3. *Calibração*

7.3.3.1. Generalidades

Para a calibração das amostras para análise, efectuar 2-3 análises de uma amostra-padrão de matéria gorda láctea no início de cada dia. Utilizar a última dessas análises para determinar os factores de resposta, RF_{Si} (fracção mássica/área do pico) dos triglicéridos e do colesterol e aplicar esses valores às amostras para análise subsequentemente injectadas (ver o ponto 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \qquad (1)$$

em que:

w_{Si} é a fracção mássica, expressa em percentagem, de cada triglicérido ou do colesterol na amostra-padrão de matéria gorda láctea;

A_{Si} é o valor numérico correspondente à área do pico de cada triglicérido ou do colesterol na amostra-padrão de matéria gorda láctea.

Para obter uma amostra-padrão de matéria gorda láctea com uma composição de triglicéridos conhecida, utilizar o procedimento descrito nos pontos 7.3.3.2 ou 7.3.3.3.

7.3.3.2. Amostras-padrão comerciais de matéria gorda láctea

A melhor maneira de determinar o factor de resposta de cada constituinte da amostra para análise é através da utilização de uma amostra-padrão de matéria gorda láctea com uma composição de triglicéridos certificada.

Nota: Um padrão adequado é o CRM 519 (matéria gorda láctea anidra), que pode ser solicitado ao Instituto de Materiais e Medidas de Referência, em Geel, na Bélgica [1].

7.3.3.3. Amostras-padrão laboratoriais de matéria gorda láctea

Preparar cerca de 1 g de uma mistura de padrões de matéria gorda (ver o ponto 4.2; deve conter pelo menos os triglicéridos saturados, C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} e C_{54}, bem como colesterol e ainda, de preferência, também os triglicéridos C_{50} e C_{52}), pesando com a aproximação de 1 mg e registando massa até às décimas de miligrama, de modo a obter uma composição relativa de triglicéridos semelhante à da matéria gorda láctea.

Analisar repetidamente, de acordo com o ponto 7.3.4, uma solução da mistura de padrões de matéria gorda em *n*-hexano (4.4) ou *n*-heptano (4.5). Na mesma sequência de injecções, analisar repetidamente uma matéria gorda láctea de composição média.

Determinar os factores de resposta dos triglicéridos presentes na mistura de padrões de matéria gorda. Os valores intermédios, correspondentes aos factores de resposta dos triglicéridos que não se encontrem

[1] Exemplo de um produto adequado disponível no comércio. Esta informação é fornecida para conveniência dos utilizadores da presente norma internacional e não representa um aval do produto.

▼B

presentes na mistura, podem ser calculados por interpolação matemática. Aplicar os factores de resposta assim obtidos à matéria gorda láctea, de modo a obter uma composição-padrão. O padrão de matéria gorda láctea assim obtido pode ser conservado durante vários anos, desde que seja armazenado em atmosfera de azoto à temperatura máxima de –18 °C.

7.3.4. *Condições cromatográficas*

Nota: A utilização de uma coluna com enchimento ou de uma coluna capilar permite geralmente obter uma resolução semelhante à da figura 1. A sub-divisão dos picos dos triglicéridos com número par de átomos de carbono normalmente não ocorre, devendo ser evitada.

7.3.4.1. Coluna com enchimento

a) Programa de temperaturas: regular a temperatura inicial da câmara para 210 °C. Manter essa temperatura durante 1 minuto e aumentá-la depois, ao gradiente de 6 °C/minuto, até atingir 350 °C. Manter essa temperatura final durante 5 minutos.

b) Temperaturas do injector e do detector: regular ambos para 370 °C.

c) Gás transportador: utilizar azoto a um caudal constante de cerca de 40 ml/minuto. Regular o caudal exacto do gás transportador de modo a que o pico do triglicérido C_{54} seja eluído a 341 °C.

d) Duração da análise: 29,3 minutos.

e) Volume injectado: injectar 0,5 µl de uma solução a 5 % (em volume) da amostra.

Caso não se efectuem análises dos triglicéridos, manter constantes, incluindo durante os períodos nocturnos e durante os fins-de-semana e feriados, a temperatura inicial da câmara, indicada na alínea a), as temperaturas do injector e do detector, indicadas na alínea b), e o caudal de gás transportador, indicado na alínea c). Esse procedimento permite obter o melhor desempenho da coluna.

7.3.4.2. Coluna capilar

a) Programa de temperaturas: regular a temperatura inicial da câmara para 80 °C. Manter essa temperatura durante meio minuto e aumentá-la depois ao gradiente de 50 °C/minuto até atingir 190 °C e a seguir ao gradiente de 6 °C/minuto, até atingir 350 °C. Manter essa temperatura final durante 5 minutos.

b) Temperatura do detector: regular para 370 °C.

c) Gás transportador: Utilizar azoto a um caudal constante de cerca de 3 ml/minuto.

d) Duração da análise: 34,4 minutos.

e) Volume de injeção: injectar 0,5 µl de uma solução a 1 % (em volume) da amostra.

Manter estas regulações durante os períodos de inactividade, a fim de garantir o melhor desempenho (ver o ponto 7.3.4.1).

As especificações analíticas do ponto 7.3.4.2 são adequadas para uma coluna de diâmetro largo (0,53 mm de diâmetro interno), conforme é descrito no ponto 5.2.2. Caso se utilize uma coluna com outras dimensões ou outra fase estacionária, poderão aplicar-se condições diferentes.

8. INTEGRAÇÃO, AVALIAÇÃO E CONTROLO DO DESEMPENHO ANALÍTICO

Quantificar os picos dos cromatogramas com um sistema de integração capaz de efectuar reajustamentos da linha de base e reintegrações dos picos. A figura 1 mostra um cromatograma integrado de forma correcta, enquanto que a figura 2 mostra um erro pontual na linha de base, após o pico C_{54}, que influencia as percentagens obtidas para todos os triglicéridos. De qualquer modo, excluir da integração os picos que surjam depois do pico C_{54}.

Os triglicéridos com número ímpar de átomos de carbono ($2n + 1$) nos grupos acilo devem ser combinados com os triglicéridos anteriores de número par ($2n$). Não tomar em consideração o pico correspondente ao baixo teor de C_{56}. Multiplicar as áreas percentuais dos restantes triglicéridos, mais o colesterol, pelos factores de resposta correspondentes obtidos com o padrão de matéria gorda láctea (última calibração efectuada) e normalizar o conjunto a 100 %, como se descreve no ponto 9.1.

▼B

Figura 1

Exemplo de um cromatograma dos triglicéridos da matéria gorda láctea com a linha de base correctamente definida

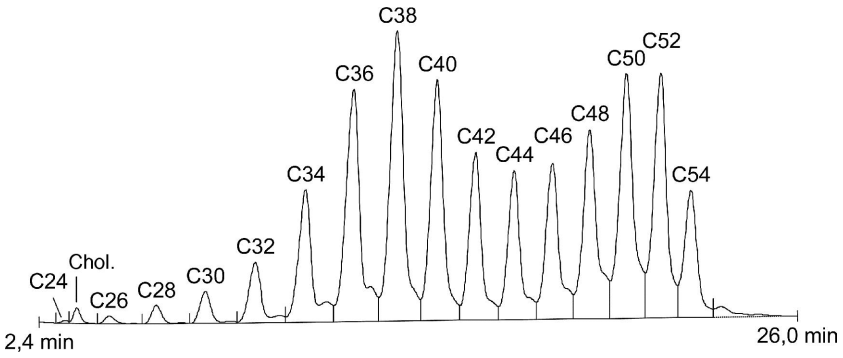
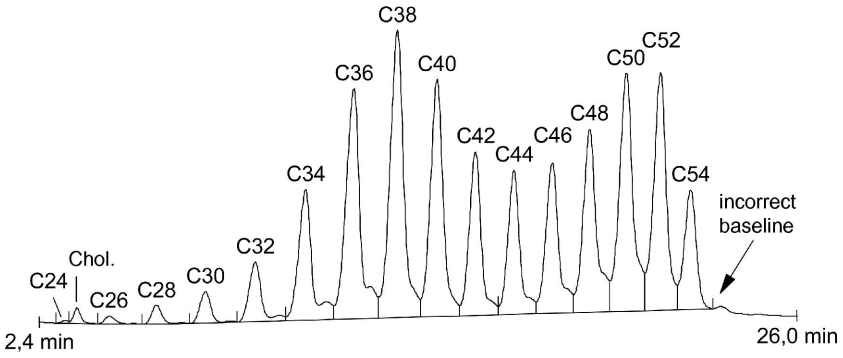


Figura 2

Exemplo de um cromatograma dos triglicéridos da matéria gorda láctea com a linha de base incorrectamente definida



Para ajuizar das condições de medição, comparar com os coeficientes de variação, CV, dos diferentes triglicéridos, expressos em percentagem, indicados no quadro 1, que se baseiam em 19 análises consecutivas da mesma amostra de matéria gorda láctea.

Se os coeficientes CV forem consideravelmente superiores aos indicados no quadro 1, as condições cromatográficas não são adequadas.

Nota: Os valores indicados no quadro 1 não são vinculativos, constituindo apenas uma orientação para o controlo de qualidade.

Mesmo que se aceitem coeficientes CV mais elevados, será necessário respeitar os limites de repetibilidade e reprodutibilidade indicados no ponto 10.

Quadro 1

Coeficientes de variação e teores de triglicéridos (19 análises consecutivas)

Triglicérido	CV (%)
C_{24}	10,00
C_{26}	2,69
C_{28}	3,03
C_{30}	1,76
C_{32}	1,03
C_{34}	0,79
C_{36}	0,25
C_{38}	0,42

▼B

Triglicérido	CV (%)
C_{40}	0,20
C_{42}	0,26
C_{44}	0,34
C_{46}	0,37
C_{48}	0,53
C_{50}	0,38
C_{52}	0,54
C_{54}	0,60

9. CÁLCULO E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

9.1. **Composição em triglicéridos**

9.1.1. *Cálculo*

Calcular a fracção mássica de cada triglicérido (para i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52} e C_{54}) e do colesterol, w_i, expressas em percentagem do teor total de triglicéridos da amostra para análise, utilizando a seguinte equação:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum \left(A_1 \times RF_{si} \right)} \times 100 \qquad (2)$$

em que:

A_i é o valor numérico correspondente à área do pico de cada triglicérido presente na amostra para análise;

RF_{si} é o factor de resposta de cada triglicérido, determinado na calibração (7.3.3).

9.1.2. *Apresentação dos resultados do ensaio*

Apresentar os resultados com duas casas decimais.

9.2. **Valores *S***

9.2.1. *Cálculo*

9.2.1.1. Calcular os valores de S, expressos em percentagem, inserindo nas equações (3) a (7) os w_i calculados (9.1.1) para as percentagens correspondentes de triglicéridos. Utilizar todas as equações, independentemente dos tipos de matérias gordas estranhas de cuja presença se suspeite.

9.2.1.2. Azeite e óleo de soja, girassol, colza, linhaça, gérmen de trigo, gérmen de milho, sementes de algodão ou peixe.

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Gordura de coco e óleo de palmiste

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Óleo de palma e sebo de bovino

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Banha

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

▼B

9.2.1.6. Total

$$S = -2{,}757\,5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\,7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\,7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\,7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\,0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\,8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\,6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\,6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\,1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Apresentação dos resultados do ensaio*

Apresentar os resultados com duas casas decimais.

9.3. **Detecção de matérias gordas estranhas**

Comparar os valores *S* obtidos em 9.2.1 com os limites correspondentes desses valores, indicados no quadro 2.

Considerar a amostra para análise como uma amostra de matéria gorda láctea pura se os 5 valores *S* se encontrarem dentro dos limites indicados no quadro 2. Se, porém, algum valor *S* estiver fora desses limites, deve considerar-se que a amostra contém matérias gordas estranhas.

Embora as equações (3) a (6) sejam mais sensíveis para determinadas matérias gordas estranhas do que a equação total (7) (ver o quadro B.1), um resultado positivo obtido em apenas uma das equações (3) a (6) não permite tirar conclusões sobre o tipo de matéria gorda estranha presente.

O anexo B descreve um procedimento para o cálculo do teor de matérias gordas de origem vegetal ou animal em matéria gorda láctea adulterada. Esse procedimento não se encontra validado e é apresentado apenas a título informativo.

Quadro 2

Valores-limite de *S* para matérias gordas lácteas puras

Matéria gorda estranha	Equação	*Limites dos valores S* (a)
Azeite e óleo de soja, girassol, colza, linhaça, gérmen de trigo, gérmen de milho, sementes de algodão ou peixe	(3)	98,05 a 101,95
Gordura de coco e óleo de palmiste	(4)	99,42 a 100,58
Óleo de palma e sebo de bovino	(5)	95,90 a 104,10
Banha	(6)	97,96 a 102,04
Total	(7)	95,68 a 104,32

(a) Calculados com um intervalo de confiança a 99 %, para que a adição de matérias gordas estranhas só seja indicada se os limites de detecção da equação correspondente forem ultrapassados (ver o quadro B.1).

10. PRECISÃO

10.1. **Ensaio interlaboratorial**

Os valores da repetibilidade e da reprodutibilidade foram determinados com base nas equações (3) a (7), utilizando matéria gorda láctea pura, e podem não ser aplicáveis a matrizes diferentes das indicadas.

10.2. **Repetibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados de ensaio independentes, obtidos por aplicação do mesmo método, a matérias de ensaio idênticas, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento num curto intervalo de tempo, não deve exceder, em mais de 5 % dos casos, os limites indicados no quadro 3.

▼B

Quadro 3

Limites da repetibilidade, r, para as equações (3) a (7)

Matéria gorda estranha	Equação	r (%)
Azeite e óleo de soja, girassol, colza, linhaça, gérmen de trigo, gérmen de milho, sementes de algodão ou peixe	(3)	0,67
Gordura de coco e óleo de palmiste	(4)	0,12
Óleo de palma e sebo de bovino	(5)	1,20
Banha	(6)	0,58
Total	(7)	1,49

10.3. **Reprodutibilidade**

A diferença absoluta entre dois resultados de ensaio independentes, obtidos pela aplicação do mesmo método, a matérias de ensaio idênticas, em laboratórios diferentes, por operadores diferentes, utilizando equipamentos diferentes, não deve exceder, em mais de 5 % dos casos, os limites indicados no quadro 4.

Quadro 4

Limites da reprodutibilidade, R, para as equações (3) a (7)

Matéria gorda estranha	Equação	R %
Azeite e óleo de soja, girassol, colza, linhaça, gérmen de trigo, gérmen de milho, sementes de algodão ou peixe	(3)	1,08
Gordura de coco e óleo de palmiste	(4)	0,40
Óleo de palma e sebo de bovino	(5)	1,81
Banha	(6)	0,60
Total	(7)	2,07

11. INCERTEZA DE MEDIÇÃO

A partir da repetibilidade, *r*, e da reprodutibilidade, *R*, é possível calcular a incerteza expandida de um determinado valor *S*.

A associação de uma incerteza expandida (com base na análise de duplicados) aos valores-limite de *S* constantes do quadro 2 permite calcular os valores-limite expandidos de *S*, indicados no quadro 5.

Quadro 5

Valores-limite expandidos de *S* para matérias gordas lácteas puras, incluindo a incerteza expandida correspondente

Matéria gorda estranha	Equação	Valores-limite expandidos de *S*
Azeite e óleo de soja, girassol, colza, linhaça, gérmen de trigo, gérmen de milho, sementes de algodão ou peixe	(3)	97,36 a 102,64
Gordura de coco e óleo de palmiste	(4)	99,14 a 100,86
Óleo de palma e sebo de bovino	(5)	94,77 a 105,23
Banha	(6)	97,65 a 102,35
Total	(7)	94,42 a 105,58

▼B

12. RELATÓRIO DO ENSAIO

Os relatórios de ensaios devem mencionar:

— toda a informação necessária para a identificação completa da amostra;

— o método de amostragem utilizado, se for conhecido;

— o método de ensaio utilizado, através de referência à presente norma internacional;

— todas as condições operacionais não especificadas na presente norma internacional, ou consideradas opcionais, assim como a descrição de quaisquer incidentes que possam ter influenciado o(s) resultado(s) do ensaio;

— o(s) resultado(s) obtido(s) no ensaio e, caso tenha sido verificada a repetibilidade, os resultados finais assim obtidos.

▼B

ANEXO A

(normativo)

PREPARAÇÃO DA COLUNA COM ENCHIMENTO

A.1 REAGENTES E EQUIPAMENTO

A.1.1 **Tolueno** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2 Solução de **dimetildiclorossilano** [$Si(CH_3)_2Cl_2$].

Dissolver 50 ml de dimetildiclorossilano em 283 ml de tolueno (A.1.1).

A.1.3 Solução de **manteiga de cacau** a 5 % (em massa) em *n*-hexano (4.4) ou *n*-heptano (4.5).

A.1.4 **Fase estacionária**: 3 % OV-1 em Gas ChromQ de 125-150 μm (100--120 *mesh*) ([1]).

Nota: A granulometria das partículas foi convertida em micrómetros, de acordo com a norma BS 410 (todas as partes)[6].

A.1.5 **Coluna de vidro** em forma de U, com diâmetro interno de 2 mm e comprimento de 500 mm.

A.1.6 **Sistema** para enchimento da coluna de vidro.

A.1.6.1 *Coluna para enchimento*, com tampas de rosca nas extremidades e com uma marca até à qual pode ser introduzida a quantidade necessária de fase estacionária.

A.1.6.2 *Rede fina* (dimensão de malha de cerca de 100 μm) com uma tampa de rosca adequada para fechar a coluna de vidro, de acordo com a figura A.3.

A.1.6.3 *Lã de vidro silanizada* desactivada.

A.1.6.4 *Vibrador*, para distribuição uniforme da fase estacionária durante o enchimento.

A.1.6.5 *Dispositivo de silanização*, para silanização da superfície de vidro da coluna.

A.1.6.6 *Garrafa de Woulff.*

A.1.6.7 *Trompa de água.*

A.2 SILANIZAÇÃO (DESACTIVAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE VIDRO)

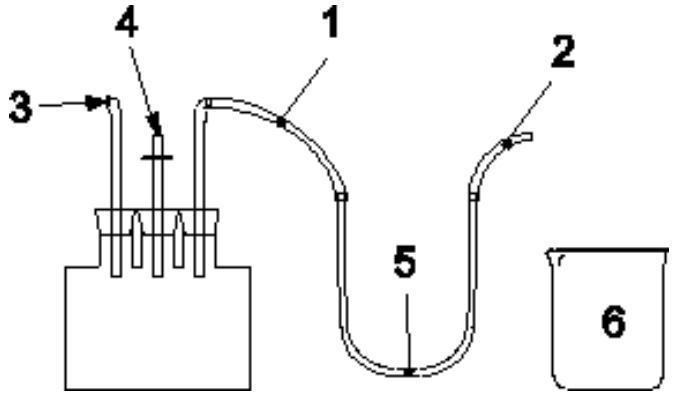
Depois de ligar a garrafa de Woulff (A.1.6.6) à trompa de água (A.1.6.7), mergulhar o tubo 2 (ver a figura A.1) na solução de dimetildiclorossilano (A.1.2). Encher a coluna (A.1.5) com essa solução, fechando a torneira. Abrir novamente a torneira e retirar os dois tubos. Fixar a coluna num suporte e completar o enchimento com solução de dimetildiclorossilano (A.1.2), utilizando uma pipeta.

([1]) Exemplo de um produto adequado disponível no comércio. Esta informação é fornecida para conveniência dos utilizadores da presente norma internacional e não representa um aval do produto por parte da ISO ou da IDF.

▼B

Figura A.1

Sistema de silanização



Legenda

1 tubo 1

2 tubo 2

3 trompa de água

4 torneira

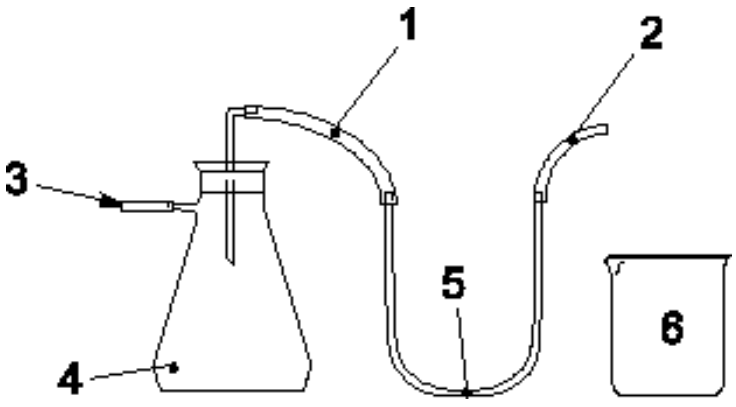
5 coluna de vidro

6 dimetildiclorossilano e tolueno

Deixar a coluna em repouso durante 20-30 minutos. Substituir em seguida a garrafa de Woulff por um balão de filtração. Esvaziar a coluna, ligando-a à trompa de água (A.1.6.7) (ver a figura A.2). Lavar a coluna vazia com 75 ml de tolueno (A.1.1) e depois com 50 ml de metanol (4.3), mergulhando sucessivamente o tubo 2 nos dois solventes. Secar a coluna lavada na estufa (5.6), regulada a 100 °C, durante aproximadamente 30 minutos.

Figura A.2

Sistema de lavagem



Legenda

1 tubo 1

2 tubo 2

3 trompa de água

4 balão de filtração

5 coluna de vidro

6 solvente de lavagem

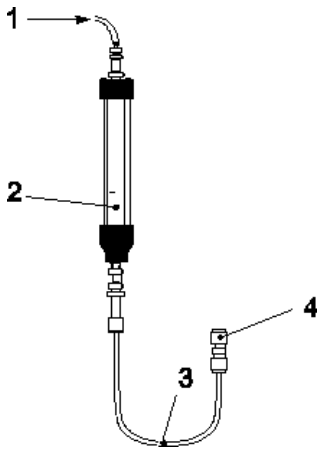
▼B

A.3 ENCHIMENTO

Encher a coluna utilizando o sistema representado na figura A.3 Encher a coluna para enchimento (A.1.6.1), até à marca, com a fase estacionária (A.1.4). Selar a parte inferior da coluna de vidro a encher com uma rolha de cerca de 1 cm de comprimento, de lã de vidro silanizada e comprimida (A.1.6.3). Fechar a extremidade da coluna com a rede fina (A.1.6.2).

Figura A.3

Enchimento da coluna de vidro



Legenda

1 entrada de azoto

2 coluna para enchimento, a encher até à marca com OV-1

3 coluna de vidro a encher

4 tampa de rosca com filtro, contra a qual vão ficar comprimidas a lã de vidro e a fase estacionária

Encher a coluna, sob pressão (300 kPa, com fluxo de azoto), com a fase estacionária. Para obter um empacotamento uniforme, contínuo e firme, passar com um vibrador para cima e para baixo, ao longo da coluna de vidro, durante o enchimento. Após o enchimento, introduzir uma rolha de lã de vidro silanizada (A.1.6.3), bem comprimida, na outra extremidade da coluna cheia. Cortar as extremidades salientes de lã de vidro. Empurrar a rolha com uma espátula alguns milímetros para o interior da coluna.

A.4 CONDICIONAMENTO

Durante os passos a) a c), não ligar a extremidade de saída da coluna ao detector, para evitar contaminações. Condicionar a coluna cheia (A.3) do seguinte modo:

a) Purgar a coluna com azoto durante 15 minutos, com o caudal de 40 ml/min e a câmara do cromatógrafo regulada a 50 °C;

b) Aquecer a coluna até 355 °C, ao gradiente de 1 °C/min, com um caudal de azoto regulado a 10 ml/min;

c) Manter a coluna a 355 °C durante 12-15 h;

d) Utilizando o programa de temperaturas para a coluna com enchimento descrito no ponto 7.3.4.1, proceder a duas injecções de 1 µl de solução de manteiga de cacau (A.1.3);

Nota: A manteiga de cacau é quase exclusivamente composta de triglicéridos C_{50} a C_{54} cujo ponto de ebulição é elevado, reduzindo assim o esforço necessário para condicionar a coluna em relação aos factores de resposta desses compostos.

▼B

e) Proceder a vinte injecções, de 0,5 µl cada, da solução de matéria gorda láctea descrita no ponto 7.2, ao longo de 2-3 dias, utilizando as regulações descritas no ponto 7.3.4.1 para a coluna com enchimento.

— Utilizar apenas as colunas que apresentem factores de resposta próximos de 1 na análise de amostras. Os factores de resposta não devem ser superiores a 1,20.

▼B

ANEXO B

(a título informativo)

QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE MATÉRIAS GORDAS ESTRANHAS

B.1 GENERALIDADES

O quadro B.1 indica os limites de detecção para diferentes matérias gordas estranhas, calculados com um nível de confiança de 99 %. A coluna do meio mostra os limites de detecção da melhor de entre as equações (3) a (6).

Os limites de detecção da equação total, (7), indicados na coluna da direita, são ligeiramente mais elevados. Em princípio, só será necessário aplicar a equação (7) para a quantificação das matérias gordas estranhas.

Utilizando todas as equações, é possível detectar também combinações de diferentes matérias gordas estranhas. As variações da composição de triglicéridos entre diferentes amostras de uma determinada matéria gorda estranha não têm efeitos significativos sobre os limites de detecção.

Quando se utilizarem tanto as equações específicas para uma determinada matéria gorda como a equação total, serão aplicáveis os limites de detecção das primeiras. No entanto, em certos casos o valor *S* obtido pela equação total será necessário para a quantificação (B.2).

Quadro B.1

Limites de detecção da percentagem de matéria gorda estranha adicionada à matéria gorda láctea, com um nível de confiança de 99 %

Matéria gorda estranha	Equação específica %	Equação total %
Óleo de soja	2,1	4,4
Óleo de girassol	2,3	4,8
Azeite	2,4	4,7
Gordura de coco	3,5	4,3
Óleo de palma	4,4	4,7
Óleo de palmiste	4,6	5,9
Óleo de colza	2,0	4,4
Óleo de linhaça	2,0	4,0
Óleo de germe de trigo	2,7	6,4
Óleo de germe de milho	2,2	4,5
Óleo de sementes de algodão	3,3	4,4
Banha	2,7	4,7
Sebo de bovino	5,2	5,4
Óleo de peixe hidrogenado	5,4	6,1

B.2 CÁLCULOS

Proceder a uma determinação quantitativa da matéria gorda estranha apenas nos casos em que pelo menos um dos valores-limite de *S* (quadro 2 ou quadro 5) seja excedido. A fim de obter essa informação quantitativa, calcular a fracção mássica, em percentagem, da matéria gorda estranha ou mistura de matérias gordas estranhas na amostra para análise, w_f, utilizando a seguinte equação:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad \text{(B. 1)}$$

▼B

em que:

S é o resultado obtido quando se inserem nas equações (3) a (7) os dados relativos aos triglicéridos presentes na matéria gorda láctea à qual foi adicionada uma matéria gorda estranha ou mistura de matérias gordas estranhas;

S_f é uma constante, dependente do tipo de matéria gorda estranha adicionada.

Se o tipo de matéria gorda estranha adicionada à matéria gorda láctea não for conhecido, utilizar um valor geral de $S = 7{,}46$ (quadro B.2). Utilizar sempre o valor S obtido a partir da equação (7), mesmo quando os valores-limite de S dessa equação não tenham sido ultrapassados, mas onde noutra equação o tenham sido

Se a matéria gorda estranha for conhecida, inserir os valores de S_f relativos a essa matéria gorda (quadro B.2) na equação (B.1) Para o cálculo de S, escolher de entre as equações (3) a (6) a equação correspondente à matéria gorda estranha em causa.

Quadro B.2

Valores S_f para diversas matérias gordas estranhas

Matéria gorda estranha	S_f
Desconhecida	7,46
Óleo de soja	8,18
Óleo de girassol	9,43
Azeite	12,75
Gordura de coco	118,13
Óleo de palma	7,55
Óleo de palmiste	112,32
Óleo de colza	3,30
Óleo de linhaça	4,44
Óleo de germe de trigo	27,45
Óleo de germe de milho	9,29
Óleo de sementes de algodão	41,18
Banha	177,55
Sebo de bovino	17,56
Óleo de peixe	64,12

B.3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

Apresentar os resultados com duas casas decimais.

Bibliografia

(1) Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, pp. 82-85.

(2) Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pp. 16-17.

(3) Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, pp. 265-270.

(4) Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, pp. 791-797.

(5) ISO 707IDF 50, Milk and milk products — Guidance on sampling.

▼B

(6) BS 410:1988, Test sieves — Technical requirements and testing.

(7) Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber*., 43, 1991, pp. 219-242.

(8) Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol*., 93, 1991, pp. 538-544.

(9) DIN 10336:1994, Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse [Detecção e determinação de matérias gordas estranhas em matéria gorda láctea, através de análise dos triglicéridos por cromatografia em fase gasosa].

(10) Comissão das Comunidades Europeias: Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat; Doc. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, VI/4604/93.

(11) Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, pp. 505-510.

▼B

ANEXO XXI

(Artigo 18.º)

PROCEDIMENTO APLICÁVEL EM CASO DE CONTESTAÇÃO DE RESULTADOS ANALÍTICOS (ANÁLISES QUÍMICAS)

1. A pedido do fabricante, procede-se a nova análise, pelo método em causa, noutro laboratório acreditado pela autoridade competente, desde que existam duplicados das amostras do produto que tenham sido selados e guardados de forma adequada pala autoridade competente. O pedido deve ser apresentado no prazo de sete dias úteis a contar da notificação dos resultados da primeira análise. A segunda análise terá lugar no prazo de 21 dias úteis a contar da recepção do pedido. A autoridade competente enviará as referidas amostras a um segundo laboratório a pedido e a custas do fabricante. Esse laboratório deve estar autorizado a efectuar análises oficiais e ser reconhecido como competente para a realização das análises em questão.

2. As incertezas expandidas (k = 2) do valor médio, $\overline{y}_1$, das n_1 medições repetidas no laboratório 1, e do valor médio, $\overline{y}_2$, das n_2 medições repetidas no laboratório 2, são as seguintes:

3. $U_{\overline{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1-\frac{1}{n_1}\right)}$ e $U_{\overline{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1-\frac{1}{n_2}\right)}$

respectivamente, em que σ_r é o desvio-padrão da repetibilidade e σ_R é o desvio-padrão da reprodutibilidade do método relevante. Se o resultado final da medição nos dois laboratórios, y, for calculado utilizando uma fórmula com a forma $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot 2$ ou $y = x_1/x_2$ a incerteza deve ser obtida segundo os procedimentos habituais de combinação dos desvios-padrão nesses casos.

4. A fim de verificar se os resultados dos dois laboratórios são conformes com o desvio padrão da reprodutibilidade do método, σ_R calcula-se a incerteza expandida da diferença $\overline{y}_1 - \overline{y}_2$.

5. $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2} = \sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Se o valor absoluto da diferença entre as médias dos dois laboratórios, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, não for superior à respectiva incerteza, $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| \leq U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

os resultados dos dois laboratórios serão conformes com o desvio-padrão da reprodutibilidade, σ_r, e a média aritmética das médias dos dois laboratórios,

$$\overline{y} = \frac{\overline{y}_1 + \overline{y}_2}{2},$$

será apresentada como resultado final. A sua incerteza expandida será

$$U_{\overline{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\overline{y}_1}^2 + U_{\overline{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

A remessa será rejeitada por não estar em conformidade com o limite legal máximo, *UL*, quando:

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} > UL;$$

caso contrário, será considerada em conformidade com o *UL*.

A remessa será rejeitada por não estar em conformidade com o limite legal mínimo, *LL*, quando:

$$\overline{y} - U_{\overline{y}} < LL;$$

caso contrário, será considerada em conformidade com o *LL*.

Se o valor absoluto da diferença entre as médias dos dois laboratórios, $|\overline{y}_1 - \overline{y}_2|$, for superior à respectiva incerteza, $U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2}$,

$$|\overline{y}_1 - \overline{y}_2| > U_{\overline{y}_1 - \overline{y}_2},$$

▼B

os resultados dos dois laboratórios não estarão em conformidade com o desvio-padrão da reprodutibilidade.

Nesse caso, a remessa será rejeitada por não-conformidade se a segunda análise confirmar os resultados da primeira. Caso contrário, a remessa será considerada conforme.

O resultado final será comunicado pela autoridade competente ao fabricante logo que possível. Caso a remessa seja rejeitada, os custos da segunda análise serão suportados pelo fabricante.

▼B

ANEXO XXII

QUADRO DE CORRESPONDÊNCIA

Regulamento (CE) n.º 213/2001	Presente Regulamento
Artigo 1.º	Artigo 1.º
Artigo 2.º	Artigo 1.º
Artigo 3.º	Artigo 2.º
—	Artigo 3.º
Artigo 4.º	—
Artigo 5.º	—
Artigo 6.º	Artigo 4.º
Artigo 7.º	Artigo 18.º
Artigo 8.º	—
Artigo 9.º	Artigo 5.º
Artigo 10.º	Artigo 6.º
Artigo 11.º	Artigo 7.º
Artigo 12.º	Artigo 8.º
Artigo 13.º	Artigo 9.º
Artigo 14.º	Artigo 10.º
Artigo 15.º	Artigo 11.º
Artigo 16.º	Artigo 12.º
Artigo 17.º	Artigo 13.º
—	Artigo 14.º
Artigo 18.º	Artigo 15.º
Artigo 19.º	Artigo 16.º
	Artigo 17.º
	Artigo 19.º
Artigo 20.º	—
Artigo 21.º	—
Artigo 22.º	Artigo 20.º
Artigo 23.º	Artigo 21.º