REGULAMENTO (CE) Nº 322/96 DA COMISSÃO

de 22 de Fevereiro de 1996

relativo às regras de execução da armazenagem pública do leite em pó desnatado

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CEE) nº 804/68 do Conselho, de 27 de Junho de 1968, que estabelece a organização comum de mercado no sector do leite e dos produtos lácteos (1), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) nº 2931/95 da Comissão (2), e, nomeadamente, o nº 5 do seu artigo 7º e o seu artigo 28º,

Considerando que o Regulamento (CEE) nº 1014/68 do Conselho, de 20 de Julho de 1968, que estabelece as regras gerais por que se rege a armazenagem pública do leite em pó desnatado (3), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 3577/90 (4), será revogado com efeitos a partir de 1 de Março de 1996 pelo Regulamento (CE) nº 1538/95 do Conselho (5); que é, pois, necessário incluir as regras que não foram integradas no Regulamento (CEE) nº 804/68 nas regras de execução da armazenagem pública do leite em pó desnatado previstas pelo Regulamento (CEE) nº 625/78 da Comissão (6), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) nº 1802/95 (7); que a importância das adaptações a introduzir no regulamento referido e o elevado número de alterações de que esse regulamento já foi objecto tornam adequada a sua reformulação por razões de clareza e transparência; que, por conseguinte, é necessário revogar o Regulamento (CEE) nº 625/78;

Considerando que só o leite em pó desnatado com um teor mínimo de matérias proteicas pode ser comprado pelos organismos de intervenção; que, além disso, o preço de compra pode variar consoante o teor de matérias proteicas; que é necessário determinar o método de análise a utilizar para constatar esse teor e especificar a forma de calcular o preço de compra;

Considerando que, para assegurar que não seja efectuado qualquer pagamento indevido do leite em pó desnatado comprado, é conveniente especificar que seja verificado o respeito de todas as condições exigidas e que o teor de matérias proteicas seja constatado antes do pagamento;

Considerando que foi estabelecido um método de referência para a detecção de leitelho; que, para garantir uma aplicação uniforme das medidas de controlo, se deve recorrer a esse método de análise para o controlo do leite em pó desnatado comprado pelos organismos de intervenção;

Considerando que a Directiva 92/46/CEE do Conselho, de 16 de Junho de 1992, que adopta as normas sanitárias relativas à produção de leite cru, de leite tratado termicamente e de produtos à base de leite e à sua colocação no mercado (8), com a última redacção que lhe foi dada pela directiva 94/71/CE (9), prevê que o leite cujo teor de substâncias antimicrobianas exceda o nível autorizado pelo Regulamento (CEE) nº 2377/90 do Conselho (10), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) nº 282/96 (11), não pode ser destinado ao consumo humano; que é oportuno controlar o leite em pó desnatado comprado pelos organismos de intervenção relativamente à presença das substâncias antimicrobianas utilizadas correntemente; que é necessário prever um método de controlo para esse efeito;

Considerando que, para além disso, as disposições relativas à armazenagem pública do leite em pó desnatado se revelaram adequadas e, com certas adaptações de ordem técnica, podem ser mantidas;

Considerando que os factos geradores da taxa de conversão agrícola aplicável ao regime de armazenagem pública são fixados no Regulamento (CEE) nº 1756/93 da Comissão (12), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) nº 693/95 (13);

Considerando que 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:

Artigo 1º

1. Os organismos de intervenção só comprarão leite em pó desnatado que satisfaça a definição prevista no nº 1 do artigo 7º do Regulamento (CEE) nº 804/68 e as exigências de qualidade previstas no anexo I desde que:

a) O controlo da qualidade tenha sido efectuado segundo os métodos de análise referidos nos anexos I, V, VI e VII com base em amostras colhidas segundo as normas previstas no anexo IV;

(1) JO nº L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.
(2) JO nº L 307 de 20. 12. 1995, p. 10.
(3) JO nº L 173 de 22. 7. 1968, p. 4.
(4) JO nº L 353 de 17. 12. 1990, p. 23.
(5) JO nº L 148 de 30. 6. 1995, p. 17.
(6) JO nº L 84 de 31. 3. 1978, p. 19.
(7) JO nº L 174 de 26. 7. 1995, p. 27.
(8) JO nº L 268 de 14. 1. 1992, p. 1.
(9) JO nº L 368 de 31. 12. 1994, p. 33.
(10) JO nº L 224 de 18. 8. 1990, p. 1.
(11) JO nº L 37 de 15. 2. 1996, p. 9.
(12) JO nº L 161 de 2. 7. 1993, p. 48.
(13) JO nº L 71 de 31. 3. 1995, p. 52.

b) O leite satisfaça as condições previstas nos anexos II e III no que diz respeito à embalagem e às menções dela constantes;

c) O leite não contenha outros produtos, nomeadamente leitelho ou lactossoro;

d) O leite tenha sido fabricado durante o período de um mês que antecede o dia da recepção da proposta de venda pelo organismo de intervenção ou, no caso referido na alínea e), segunda frase, do anexo III, de quatro semanas que precede a semana em que a proposta é recebida;

e) Os níveis máximos admissíveis de radioactividade do leite não excedam os previstos na regulamentação comunitária.

Os níveis aplicáveis são os fixados no artigo 3º do Regulamento (CEE) nº 737/90 do Conselho (1). O controlo do nível de contaminação radioactiva do produto só será efectuado se a situação o exigir e durante o período necessário. Em caso de necessidade, o período de aplicação e o alcance das medidas de controlo são determinados segundo o processo previsto no artigo 30º do Regulamento (CEE) nº 804/68.

2. Na acepção do presente regulamento, entende-se por:

a) *Leitelho:* o subproduto do fabrico da manteiga obtido após batedura ou butirificação em contínuo da nata e separação da fracção gorda sólida;

b) *Lactossoro:* o subproduto do fabrico do queijo ou da caseína por meio da acção de ácidos, de coalho e/ou de processos físico-químicos.

3. A quantidade mínima da proposta é de 20 toneladas. Os Estados-membros podem aumentar a quantidade mínima e/ou prever que o leite em pó desnatado seja proposto por tonelada completa.

4. O organismo de intervenção registará o dia de recepção da proposta de venda e as quantidades e datas de fabrico correspondentes, bem como o local onde o leite em pó desnatado proposto se encontra armazenado.

5. Uma proposta só será válida se for apresentada prova de que o proponente constituiu uma garantia de 12 ecus por tonelada de leite em pó desnatado proposta.

No âmbito do presente regulamento, a manutenção da proposta e a entrega do leite em pó desnatado no armazém designado pelo organismo de intervenção constituem as exigências principais cuja execução é assegurada por essa garantia. No entanto, no caso de se concluir, em resultado do controlo referido na alínea a) do nº 1, que o leite em pó desnatado não está em conformidade com as exigências previstas no nº 1, a garantia será apesar disso liberada para as quantidades ainda não entregues.

A garantia será constituída no Estado-membro onde a proposta for apresentada.

Artigo 2º

1. A empresa referida no nº 1 do artigo 7º do Regulamento (CEE) nº 804/68 só será aprovada se:

a) For aprovada em conformidade com o artigo 10º da Directiva 92/46/CEE e dispuser de instalações técnicas adequadas;

b) Se comprometer a manter em permanência os registos, determinados pelo organismo competente de cada Estado-membro, relativos à origem das matérias-primas, às quantidades de leite desnatado, de leitelho e de lactossoro tratadas, ao tipo de tratamento térmico do leite desnatado, às quantidades de produtos obtidas e ao acondicionamento, identificação e data de saída de cada lote de leite em pó desnatado, de leitelho em pó e de lactossoro em pó;

c) Aceitar submeter a um controlo oficial específico o seu fabrico de leite em pó desnatado susceptível de ser proposto para intervenção pública;

d) Se comprometer a informar o organismo competente encarregado do controlo, com uma antecedência de pelo menos dois dias úteis, da sua intenção de fabricar leite em pó desnatado destinado à intervenção pública. No entanto, o Estado-membro pode fixar um prazo mais curto.

2. Para assegurar o respeito do disposto no presente regulamento, os organismos competentes assegurarão a realização de controlos inesperados no local, em função do programa de produção de leite em pó desnatado de intervenção das empresas em causa.

Esses controlos devem assegurar, pelo menos:

— um controlo por cada período de 28 dias de fabrico para a intervenção e pelo menos uma vez por semestre, para examinar os elementos referidos na alínea b) do nº 1,

— um controlo por semestre para verificar o respeito das condições de aprovação referidas no nº 1.

3. A aprovação será revogada se as condições prévias previstas no nº 1 deixarem de ser satisfeitas. A pedido da empresa em causa, a aprovação pode, na sequência de um controlo aprofundado, ser restabelecida após um período de seis meses.

No caso de se constatar que uma empresa não respeitou um dos seus compromissos referidos nas alíneas b), c) e d) do nº 1, excepto em caso de força maior, a aprovação será suspendida por um período de um a doze meses, consoante a gravidade da irregularidade.

O Estado-membro pode decidir não impor a referida sanção quando se estabeleça que a irregularidade não foi cometida deliberadamente ou por negligência grave e que se reveste de uma importância mínima relativamente à eficácia dos controlos previstos no nº 2.

(1) JO nº L 82 de 29. 3. 1990, p. 1.

4. Os controlos efectuados por força dos nºs 2 e 3 devem ser objecto de um relatório que especifique:

— a data do controlo,

— a sua duração,

— as operações efectuadas.

O relatório do controlo deve ser assinado pelo agente responsável.

5. Os Estados-membros comunicarão à Comissão as medidas tomadas relativamente aos controlos previstos nos nºs 2 e 3 num prazo de um mês a contar da data da sua adopção.

Artigo 3º

O organismo que assegura o controlo do respeito das disposições previstas no nº 1 do artigo 1º registará, especificando cada uma das características do produto enumeradas no ponto 1 do anexo I, os resultados da análise de cada lote proposto, que serão posteriormente incluídos num certificado, emitido na sequência de pedido, nomeadamente no caso de trocas comerciais entre Estados-membros ou de exportação.

Artigo 4º

1. Após verificação dos elementos da proposta, o organismo de intervenção emitirá logo que possível uma nota de entrega datada e numerada da qual devem constar:

a) A quantidade a entregar;

b) A data-limite de entrega do leite em pó desnatado;

c) O armazém onde o leite deve ser entregue.

2. A entrega do leite em pó desnatado deve verificar-se num prazo de 28 dias seguintes ao dia da recepção da proposta de venda referida no nº 1, alínea d), do artigo 1º A entrega pode ser fraccionada.

3. Na acepção do presente regulamento, a tomada a cargo do leite em pó desnatado pelo organismo de intervenção verifica-se no dia da entrada do leite em pó desnatado no armazém, mas nunca antes do dia seguinte ao dia da emissão da nota de entrega referida no nº 1.

4. O pagamento do leite em pó desnatado comprado pelo organismo de intervenção será efectuado entre o centésimo vigésimo e o centésimo quadragésimo dia após a tomada a cargo do leite em pó desnatado, desde que o respeito das exigências referidas no artigo 1º seja verificado.

5. O preço de compra do leite em pó desnatado será calculado do seguinte modo:

— se o teor de matérias proteicas do extracto seco sem matérias gordas, constatado segundo o método indicado no anexo I, for igual ou superior a 35,6 %, o preço de compra será igual ao preço de intervenção,

— se esse teor for de pelo menos 31,4 % e inferior a 35,6 %, o preço de compra será igual ao preço de intervenção diminuído de um montante calculado do seguinte modo: preço de intervenção × [(0,356 − teor de matérias proteicas) × 1,75].

6. Pela sua proposta, o vendedor compromete-se, no caso de o controlo efectuado indicar que o leite em pó desnatado não está em confromidade com as exigências previstas no nº 1 do artigo 1º:

— a retomar a mercadoria em causa,

— a pagar os custos de armazenagem das quantidades em causa estabelecidas a partir do dia da tomada a cargo até à data de saída.

Esses custos de armazenagem serão fixados forfetariamente, por tonelada, do seguinte modo:

a) 21 ecus para os custos fixos;

b) 0,10 ecus por dia de armazenagem, para os custos de armazenagem.

Os montantes serão creditados ao Fundo Europeu de Orientação e de Garantia Agrícola (FEOGA), secção «Garantia».

Artigo 5º

1. Os armazéns referidos no nº 1, quarto parágrafo, do artigo 7º do Regulamento (CEE) nº 804/68 devem satisfazer as seguintes condições:

a) Encontrar-se secos, em bom estado de conservação e isentos de parasitas;

b) Não apresentar qualquer odor estranho;

c) Permitir um bom arejamento;

d) Dispor de capacidade suficiente e de equipamento correspondente a essa capacidade.

Os riscos relativos à armazenagem do leite em pó desnatado serão cobertos por um seguro que assumirá a forma de uma obrigação contratual dos armazenistas ou de um seguro global do organismo de intervenção. O Estado-membro pode também ser o seu próprio segurador.

2. Os organismos de intervenção exigirão que a colocação em armazém e a armazenagem do leite em pó desnatado sejam efectuadas em paletes e de forma a constituir lotes facilmente identificáveis e acessíveis.

3. O organismo competente responsável pelo controlo procederá ao controlo da presença dos produtos em armazém, conforme previsto no artigo 4º do Regulamento (CEE) nº 618/90 da Comissão [1].

Artigo 6º

1. O organismo de intervenção escolherá o armazém frigorífico disponível mais próximo do local onde o leite em pó desnatado esteja armazenado.

[1] JO nº L 67 de 15. 3. 1990, p. 21.

No entanto, e desde que a escolha de outro armazém não implique custos suplementares de armazenagem, o organismo pode:

a) Escolher outro armazém que esteja a uma distância não superior à distância referida no nº 2;

b) Para além dessa distância, escolher outro armazém quando essa escolha implique uma menor despesa, tendo em conta os custos de armazenagem e de transporte envolvidos. Nesse caso, o organismo de intervenção comunicará imediatamente à Comissão a sua escolha.

2. A distância máxima referida no nº 1, terceiro parágrafo, do artigo 7º do Regulamento (CEE) nº 804/68 será fixada em 350 quilómetros. Para distâncias superiores, os custos suplementares de transporte a cargo do organismo de intervenção serão fixados em 0,05 ecus por tonelada e por quilómetro.

No entanto, se o organismo de intervenção comprador for o de um Estado-membro que não aquele em cujo território o leite em pó desnatado proposto está armazenado, a distância entre o armazém do vendedor e a fronteira do Estado-membro do organismo de intervenção comprador não será tida em conta para o cálculo da distância máxima referida no primeiro parágrafo.

Artigo 7º

Aquando da desarmazenagem, o organismo de intervenção, em caso de entrega a partir do armazém frigorífico, porá à disposição o leite em pó desnatado:

— carregado no armazém num meio de transporte, com exclusão da arrumação caso se trate de um camião ou de um vagão de caminho-de-ferro,

— à saída do armazém, caso se trate de outro meio de transporte, nomeadamente de um contentor.

Os custos eventuais de arrumação e de remoção das paletes ficarão a cargo do comprador do leite em pó desnatado. Esses custos serão fixados forfetariamente pelo Estado-membro, que informará os interessados a pedidos destes.

Artigo 8º

Fica revogado o Regulamento (CEE) nº 625/78.

As referências ao Regulamento (CEE) nº 625/78 devem considerar-se como sendo feitas ao presente regulamento.

Artigo 9º

O presente regulamento entra em vigor no sétimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias.*

É aplicável a partir de 1 de Março de 1996.

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

Feito em Bruxelas, em 22 de Fevereiro de 1996.

Pela Comissão

Franz FISCHLER

Membro da Comissão

ANEXO I

QUALIDADE DO LEITE EM PÓ DESNATADO

1. **Caractéristicas**

a) Teor de matérias proteicas:	31,4 % em extracto seco sem matérias gordas, no mínimo;
b) Teor de matérias gordas:	1,00 %, no máximo;
c) Teor de água:	3,5 %, no máximo;
d) Acidez titulável em mililitros de solução de hidróxido de sódio decinormal:	19,5 ml, no máximo;
e) Teor de lactatos:	150 mg/100 g, no máximo;
f) Aditivos:	nenhum;
g) Prova da fosfatase:	negativa, isto é igual ou inferior a 4 microgramas de fenol por grama de leite reconstituído;
h) Índice de insolubilidade:	0,5 ml (24 °C), no máximo;
i) Teor de partículas queimadas:	15,0 mg, no máximo, ou seja, pelo menos disco B;
j) Teor de microrganismos:	40 000 por grama, no máximo;
k) Pesquisa de coliformes:	negativa em 0,1 g;
l) Pesquisa de leitelho:	negativa;
m) Pesquisa de lactossoro:	negativa;
n) Sabor e odor:	francos;
o) Aspecto:	cor branca ou ligeiramente amarelada, ausência de impurezas e de parcelas coloridas;
p) Antimicrobióticos:	*negativo* (1).

2. **Métodos de controlo**

a) Sem prejuízo das disposições relativas à harmonização dos métodos de análise, são obrigatórios, para aplicação do presente regulamento, os métodos de referência a seguir mencionados:

— doseamento das matérias proteicas (N × 6,38):	norma internacional FIL 20B: 1993,
— doseamento das matérias gordas:	norma internacional FIL 9C: 1987,
— doseamento da água:	norma internacional FIL 26A: 1993,
— doseamento de acidez:	norma internacional FIL 86: 1981,
— doseamento de lactatos:	norma internacional FIL 69B: 1987,
— prova de fosfatase:	norma internacional ISO 3356: 1975,
— índice de insolubilidade:	norma internacional FIL 129A: 1988,
— determinação do teor de partículas queimadas:	métodos normalizados ADPI 1990,
— determinação do número de microrganismos:	norma internacional FIL 100B: 1991,
— pesquisas de coliformes:	norma internacional FIL 73A: 1975.

b) No que diz respeito às pesquisas de:

— *lactossoro coalhado:*	doseamento dos *glicomacropéptidos por cromatografia* líquida de alta resolução segundo o método de análise constante do anexo V,
— lactorisso ácido:	provas estabelecidas pelos Estados-membros,
— leitelho:	a ausência de leitelho pode ser estabelecida quer por um controlo inesperado no local de produção, pelo menos uma vez por semana, quer por análise laboratorial — segundo o método constante do anexo VI — do produto final, indicando 69,31 mg de PEDP por 100 g, no máximo,
— substâncias antimicrobianas:	segundo o método descrito no anexo VII.

c) A colheita das amostras será efectuada segundo o processo previsto pela norma internacional ISO 707; os Estados-membros podem todavia utilizar outro método de amostragem que esteja em conformidade com os princípios da norma referida.

---

(1) O leite cru utilizado para o fabrico do leite em pó desnatado deve satisfazer as exigências previstas no capítulo III, parte D, do anexo A da Directiva 92/46/CEE.

ANEXO II

EMBALAGEM

1. **Embalagens**

As embalagens devem ser novas, secas e intactas, com um conteúdo de 25 kg de peso líquido e confeccionadas segundo uma das seguintes fórmulas:

a) — 4 sacos em papel *kraft*, com resistência correspondente a um peso de 70 g por m^2, no mínimo,
— 1 saco de papel hidráulico intercalado, com uma resistência correspondente a um peso de 140 g por m^2, no mínimo,
— 1 bolsa interior em polietileno, de 0,08 mm de espessura, no mínimo, soldada ou de união dupla;

b) — 1 saco em papel *kraft*, com uma resistência correspondente a um peso de 70 g por m^2 no mínimo,
— 1 saco em papel *kraft*, com uma camada de polietileno, com uma resistência correspondente a um peso de 80 g + 15 g por m^2, no mínimo,
— 3 sacos em papel *kraft*, com uma resistência correspondente a um peso de 70 g por m^2, no mínimo,
— 1 bolsa interior em polietileno, de 0,08 mm de espessura, no mínimo, soldada ou de união dupla;

c) — 1 saco exterior em papel *kraft*, com uma resistência correspondente a um peso de 85 g por m^2, no mínimo,
— 1 saco em papel *kraft* com uma camada de polietileno, com uma resistência correspondente a um peso de 70 g + 15 g por m^2, no mínimo,
— 2 sacos em papel *kraft*, com uma resistência correspondente a um peso de 70 g por m^2, no mínimo,
— 1 bolsa interior em polietileno, com uma espessura de 0,12 mm, no mínimo, soldada ou de união dupla;

d) — 1 saco exterior em papel *kraft* semi-extensível, com uma resistência correspondente a um peso de 95 g por m^2, no mínimo,
— 1 saco em papel *kraft* semi-extensível, com uma camada interna de polietileno, com uma resistência correspondente a um peso de 95 g + 15 g por m^2, no mínimo,
— 1 saco em papel *kraft* semi-extensível, com uma resistência correspondente a um peso de 85 g por m^2, no mínimo,
— 1 bolsa interior em polietileno, com uma espessura de 0,12 mm, no mínimo, soldada ou de união dupla.

2. **Enchimento**

Aquando do enchimento, o saco deve ser bem compactado. A penetração de pó entre as diferentes pregas deve ser completamente evitada.

3. **Processo de ensaio**

A embalagem, em conformidade com o ponto 1, deve poder ser submetida a uma tensão média de absorção de 420 joules/m^2 para três camadas de papel, no mínimo, segundo o método ISO 1924-2-1985.

ANEXO III

MENÇÕES A INDICAR NA EMBALAGEM

A embalagem deve ostentar, pelo menos, as menções seguintes, se for caso disso transcritas em código:

a) Denominação numa das línguas da Comunidade «leite em pó desnatado *spray*»;

b) Peso líquido;

c) Número do lote de fabrico;

d) Número de aprovação que identifica a fábrica e o Estado-membro de produção;

e) Data de fabrico. Se o leite em pó desnatado estiver armazenado em silos, a data de fabrico será substituída pela semana de fabrico.

ANEXO IV

AMOSTRAGEM E ANÁLISE DO LEITE EM PÓ DESNATADO PROPOSTO

1. Número de embalagens a escolher aleatoriamente para constituição da amostra:
   — propostas que contenham até 800 sacos de 25 kg: 8, no mínimo,
   — propostas que contenham mais de 800 sacos de 25 kg: 8 + 1 por totalidade ou parte de uma fracção suplementar de 800 sacos, no mínimo.
2. Peso da amostra: em cada embalagem são colhidos 200 g, no mínimo.
3. Agrupamento das amostras: são reunidas numa amostra global 9 amostras, no máximo.
4. Análise das amostras: cada amostra global é submetida a uma análise susceptível de verificar todas as características qualitativas previstas no anexo I.
5. Directrizes a seguir em caso de defeito da amostra:
   a) Se uma amostra composta apresentar um defeito relativo a um parâmetro, a quantidade representada por essa amostra é rejeitada;
   b) Se uma amostra composta apresentar um defeito relativamente a vários parâmetros, a quantidade representada por essa amostra é rejeitada e o resto das quantidades da proposta provenientes da mesma fábrica são submetidas a uma segunda amostragem determinante para análise. Nesse caso:
      — o número de amostras previsto no ponto 1 é duplicado,
      — se uma amostra composta apresentar um defeito relativo a um ou vários parâmetros, a quantidade representada por essa amostra é rejeitada.

ANEXO V

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

1. Objectivo e campo de aplicação

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

2. Referência

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

3. Definição

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

4. Princípio

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

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

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

5. Reagentes

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

5.1. *Solução de ácido tricloroacético*

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

5.2. *Solução eluente, pH 6,0*

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

Completar com água até fazer 1 000 ml e homogeneizar.

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

5.3. *Solução de lavagem e conservação das colunas*

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

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

5.4. *Amostras-padrão*

5.4.1. Leite em pó desnatado que satisfaz as exigências do presente regulamento, seja [0].

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

6. **Aparelhos**

6.1. Balança analítica.

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

6.3. Agitador mecânico.

6.4. Agitador magnético.

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

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

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

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

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

6.10. Equipamento CLAR incluindo:

6.10.1. bomba;

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

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

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

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

6.10.6. integrador susceptível de integrar de vale a vale.

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

7. **Amostragem**

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

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

8. **Metodologia**

8.1. *Preparação da amostra para análise*

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

8.2. *Tomada da amostra para a análise*

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

8.3. *Eliminação das gorduras e proteínas*

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

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

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

8.4. *Determinação cromatográfica*

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

Notas:

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

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

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

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

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

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

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

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

A_{II}: superfície do pico II;

A_{III}: superfície do pico III;

A_{IV}: superfície do pico IV.

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

Em caso de dúvida, repetir a análise.

8.5. *Calibração*

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

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

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

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

9. Expressão dos resultados

9.1. *Processo de cálculo e fórmulas*

9.1.1. Cálculo dos coeficientes de resposta R:

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

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

em que:

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

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

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

em que:

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

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

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

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

S_{II} [E] = R_{II} × A_{II} [E]
S_{III} [E] = R_{III} × A_{III} [E]
S_{IV} [E] = R_{IV} × A_{IV} [E]

em que:

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

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

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

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

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

em que:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

em que:

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

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

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

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

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

9.3. *Precisão do método*

9.3.1. Repetibilidade

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

9.3.2. Reprodutibilidade

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

9.4. *Interpretação*

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

em que

2,0	é o valor máximo admitido para a superfície relativa do pico III, que tem em conta a superfície relativa do pico III, i.e. 1,3, a incerteza devida às variações de composição dos leites desnatados em pó e a reprodutibilidade do método (9.3.2),
$(S_{III}\ [0] - 0{,}9)$	é a correcção a utilizar quando a superfície S_{III} [0] for diferente de 0,9 (ver ponto 9.2).

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

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

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

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

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

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

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

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

em que

S_{III}	é a superfície relativa do pico III calculada ou a partir do teor em matérias proteicas totais, ou a partir da superfície relativa do pico S_{II} [E],
P %	é o teor em matérias proteicas totais expresso em percentagem do seu peso,
S_{II} [E]	é a superfície relativa da amostra, calculada no ponto 9.1.2.

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

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

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

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

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

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

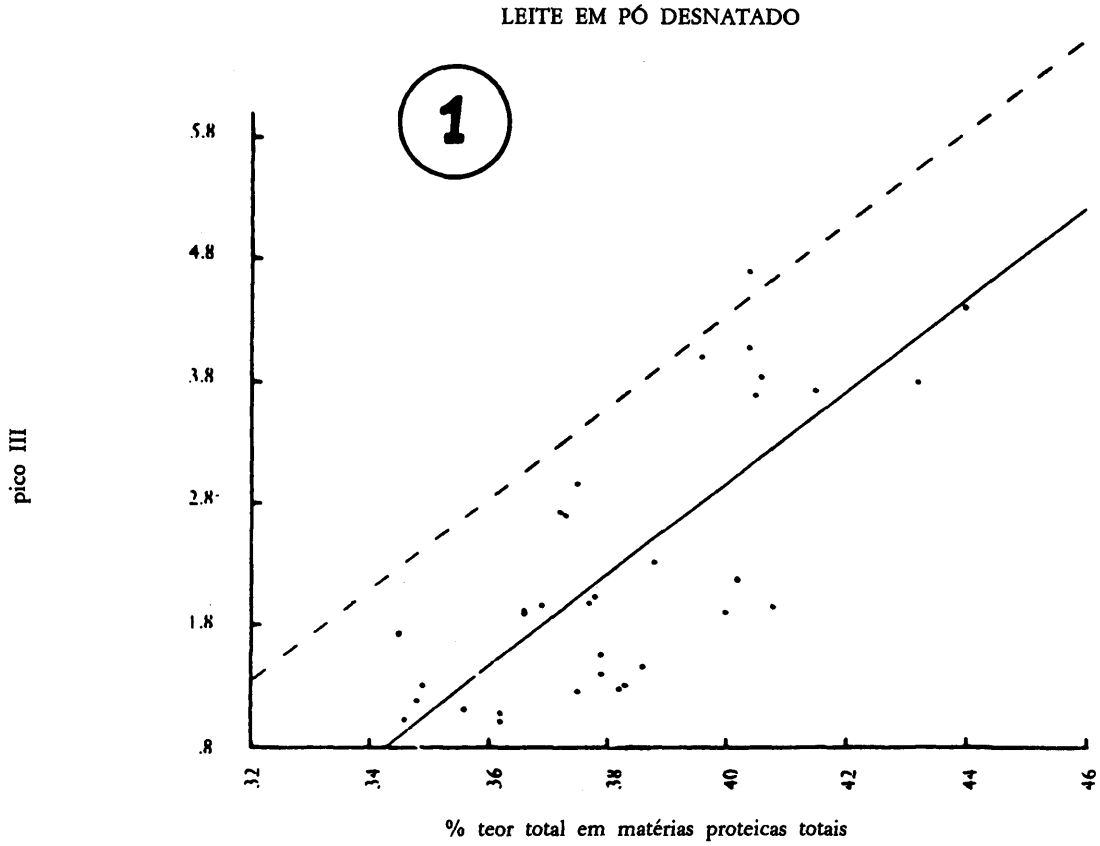
O teor em soro presente é calculado por meio da expressão seguinte:

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

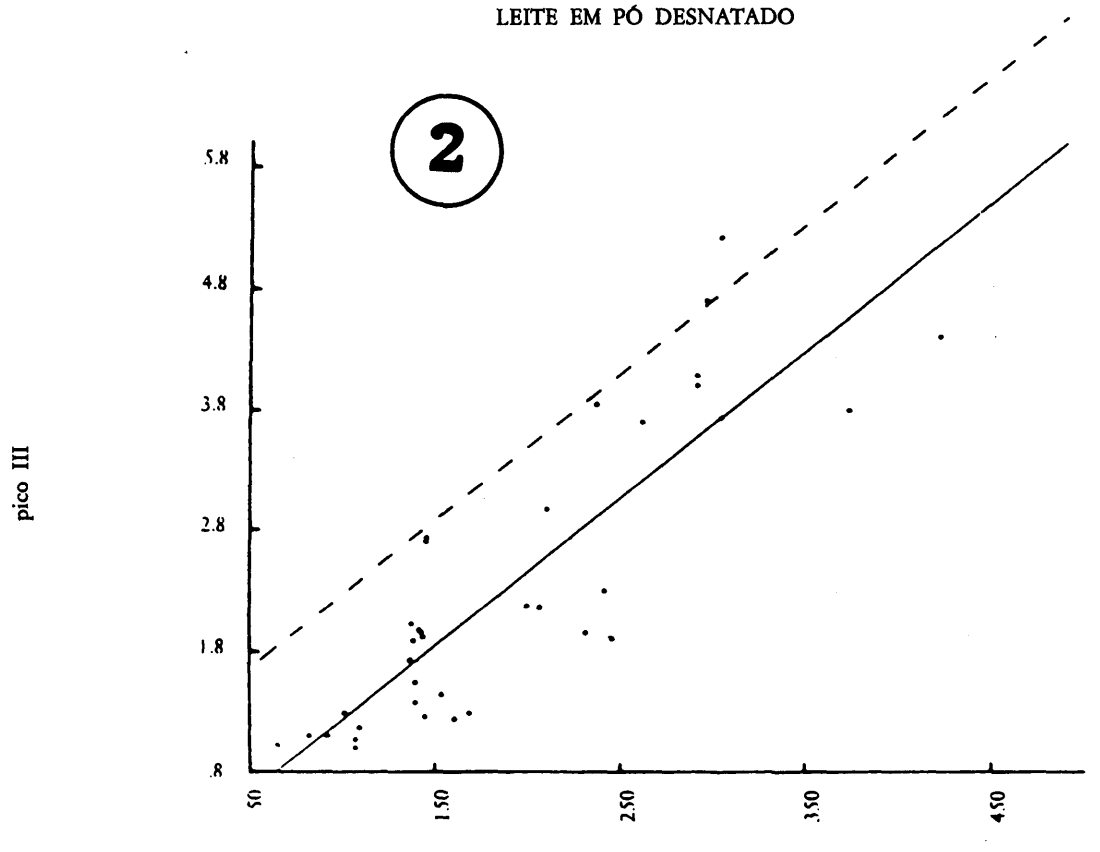
em que

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

LEITE EM PÓ DESNATADO



LEITE EM PÓ DESNATADO



ANEXO VI

LEITE EM PÓ DESNATADO: DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FOSFATIDILSERINA E DE FOSFATIDILETANOLAMINA

MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO COM INVERSÃO DE FASE

1. Âmbito e domínio de aplicação

O método descreve um processo de determinação quantitativa da fosfatidilserina (PS) e da fosfatidiletanolamina (PE) no leite em pó desnatado, e pode ser utilizado para a detecção de sólidos de leitelho no leite em pó desnatado.

2. Definição

Teor de PS + PE: a fracção, em massa, da substância determinada pelo processo especificado abaixo. O resultado é expresso em miligramas de dipalmitato de fosfatidiletanolamina (PEDP) por 100 g de pó.

3. Princípio

Extracção pelo metanol de aminofosfolípidos do leite em pó reconstituído. Determinação da PS e da PE na forma de derivados o-ftaldialdeídicos (OPA) por cromatografia líquida de alta resolução com inversão de fase [(RP) HULC] e detecção de fuorescência. Quantificação do teor de PS e de PE na amostra de ensaio por referência a uma amostra padrão contendo uma quantidade conhecida de PEDP.

4. Reagentes

Todos os reagentes devem ser de grau analítico reconhecido. A água deve ser destilada ou de pureza pelo menos equivalente, salvo indicação em contrário.

4.1. *Substância padrão: PEDP, de pureza mínima 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. Minohidrocloreto de triptamina.

4.3. **Reagentes para a preparação de derivados de o-ftaldialdeído.**

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. **Solventes para eluição em HPLC.**
Os solventes para eluição devem ser preparados com reagentes para HPLC.

4.4.1. Água para HPLC.

4.4.2. Metanol de pureza comprovada por fluorimentria.

4.4.3. Tetrahidrofurano.

4.4.4. Dihidrogenofosfato de sódio.

4.4.5. Acetato de sódio.

4.4.6. Ácido acético.

5. Aparelhagem

5.1. *Balança analítica.*

5.2. *Copos, de 25 e 100 ml de capacidade.*

5.3. *Pipetas, para medição de 1 e 10 ml.*

5.4. *Agitador magnético.*

5.5. *Pipetas graduadas, para medição de 0,2, 0,5 e 5ml.*

5.6. *Balões aferidos, de 10, 50 e 100 ml de capacidade.*

5.7. *Seringas, de 20 e de 100 µl* (de capacidade).

5.8. *Banho ultrassónico.*

5.9. *Centrifugadora atingindo uma acelaração de 27 000 × g.*

5.10 *Frascos de vidro, de cerca de 5 ml de capacidade.*

5.11. *Proveta graduada, de 25 ml de capacidade.*

5.12. *Mediador de pH.*

5.13. *Equipamento para HPLC.*

5.13.1. Sistema de bombear de gradiente, capaz de bombear 1,0 ml/min. a 200 bar.

5.13.2. Dispositivo automático de colheita de amostras, com capacidade de produção de derivados.

5.13.3. Dispositivo de aquecimento da coluna, regulado para 30 °C.

5.13.4. Detector de fluorescência regulado 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 *software* para processamento de dados que permita medir a área dos picos.

5.13.6. Uma coluna Licrosphere — 100 (250 × 4,6 mm) ou uma coluna equivalente, com enchimento de octadecilsilano (C18), em partículas de 5 µm.

6. Colheita de amostras

A colheita de amostras será efectuada em conformidade com a norma IDF 50B 1985.

7. Técnica

7.1. *Preparação da solução do padrão interno*

Pesar 30,0 ± 0,1 mg de monohidrocloreto de triptamina (4.2.3) num balão aferido de 100 ml (5.6) e ajustar o volume até ao traço com metanol (4.2.1). Pipetar 1 ml (5.3) desta solução para um balão aferido de 10 ml (5.6) e ajustar o volume até ao traço com metanol (4.2.1), de forma a obter uma concentração de triptamina de 0,15 mM.

7.2. *Preparação da solução da amostra a ensaiar*

Pesar 1,000 ± 0,001 g da amostra de leite em pó desnatado num copo de 25 ml (5.2). Utilizando uma pipeta (5.3) adicionar 10 ml de água destilada a 40 °C e agitar com um agitador magnético (5.4) durante 30 min., para dissolver quaisquer agregados eventuais. Pipetar 0,2 ml (5.5) do leite reconstituído para um balão aferido de 10 ml (5.6), adicionar 100 µl da solução de triptamina 0,15 mM (7.1) com uma seringa (5.7) e completar o volume até ao traço com metanol (4.2.1). Misturar cuidadosamente por inversão e passar num aparelho de ultrassons (5.8) durante 15 min. Centrifugar (5.9) a 27 000 × g durante 10 min., e recolher o sobrenadante num frasco de vidro (5.10).

Nota:

A solução de ensaio deve ser armazenada a 4 °C até que seja realizada a análise por HPLC.

7.3. *Preparação da solução do padrão externo*

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 selado até uma temperatura de 50 °C e misturar cuidadosamente até dissolver o PEDP. Arrefecer o balão até 20 °C, completar o volume com metanol (4.2.1) e misturar por inversão. Pipetar 1 ml (5.3) desta solução para um balão aferido de 100 ml (5.6) e completar o volume 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 de triptamina 0,15 mM (7.1) e completar o volume com metanol (4.2.1). Misturar por inversão.

Nota:

A solução do padrão externo deve ser armazenada a 4 °C até à realização da análise por HPLC.

7.4. *Preparação do reagente para a obtenção de derivados*

Pesar 25,0 ± 0,1 mg 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. Ajustar o volume até ao traço com solução de ácido bórico (4.3.2) e adicionar 20 µl de 2-mercaptoetanol (4.3.3) com uma seringa (5.7).

Nota:

O reagente para a obtenção de derivados deve ser armazenado a 4 °C num frasco protegido da luz, mantendo-se estável durante uma semana.

7.5. *Determinação por HPLC*

7.5.1. Solventes de eluição (4.4)

Solvente A:

solução 0,3 mM de di-hidrogenofosfato de sódio e 3 mM de acetato de sódio (com pH ajustado a 6,5 por adição de ácido acético): metanol: tetrahidrofurano = 558: 440: 2 (v/v/v).

Solvente B:

metanol.

7.5.2. Gradiante de eluição sugerido:

Tempo (min.)	Solvente A (%)	Solvente 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: Pode ser necessário alterar ligeiramente o gradiante de eluição a fim conseguir a resolução indicada na figura 1.
Temperatura da coluna: 30 °C.

7.5.3. Volume a injectar: 50 µl de reagente para obtenção de derivados e 50 µl da solução a ensaiar.

7.5.4. Condicionamento da coluna

Diariamente, ao pôr o sistema em funcionamento, lavar a coluna com 100 % de solvente B durante 15 min., depois ajustar para uma proporção A: B = 40: 60 e equilibrar a 1 ml/min. durante 15 min.

Fazer uma passagem em branco injectando metanol (4.2.1).

Nota:

Antes de um armazenamento prolongado, lavar a coluna com metanol: clorofórmio = 80: 20 (v/v) durante 30 min.

7.5.5. Determinação do teor de PS + PE na amostra a ensaiar

Realizar a sequência de análises cromatográficas mantendo um intervalo constante entre passagens de forma a obter tempos de retenção constantes. Injectar a solução do padrão externo (7.3) entre cada 5 — 10 amostras da solução a ensaiar a fim de avaliar o factor de resposta.

Nota:

A coluna deve ser limpa efectuando uma lavagem com 100 % de solvente B (7.5.1) durante pelo menos 30 min., após cada 20 — 25 passagens.

7.6. *Modo de integração.*

7.6.1. Pico PEDP

O PEDP é eluído num único pico. Determinar a área do pico procedendo à integração entre dois mínimos consecutivos da curva.

7.6.2. Pico da triptamina

A triptamina é eluída num único pico (figura 1). Determinar a área do pico procedendo à integração entre dois mínimos consecutivos da curva.

7.6.3. Grupos de picos da PS e da PE

Nas condições descritas (figura 1), a PS é eluída em dois picos principais parcialmente não resolvidos, precedidos de um pico secundário. A PE é eluída em 3 picos principais parcialmente não resolvidos. Determinar a área total de cada grupo de picos, estabelecendo a linha de base conforme indicado na figura 1.

8. **Cálculo e expressão dos resultados**

O teor de PS e PE na amostra é calculado do seguinte modo:

$$C = 55{,}36 \times \frac{A_2}{A_1} \times \frac{T_1}{T_2}$$

sendo:

C: teor de PS ou de PE na amostra de ensaio (mg/100g de pó);

A_1: área do pico do PEDP da solução padrão (7.3);

A_2: área do pico da PS ou da PE na solução da amostra de ensaio (7.2);

T_1: área do pico da triptamina na solução padrão (7.3);

T_2: área do pico da triptamina na solução da amostra de ensaio (7.2).

9. **Precisão**

Nota: Os valores de repetibilidade foram calculados de acordo com a norma internacional IDF (1). O limite provisório de reprodutibilidade foi calculado de acordo com as «Orientações relativas à interpretação do leite e produtos lácteos no âmbito da organização comum de mercado» (Documento da Comissão VI/2721/95).

9.1. *Repetibilidade*

O desvio-padrão relativo da repetibilidade, que exprime a variabilidade de resultados analíticos independentes obtidos pelo mesmo operador utilizando o mesmo aparelho nas mesmas condições, com a mesma amostra, num intervalo curto, não deve exceder 2 %. Se duas determinações forem obtidas nestas condições, a diferença relativa entre os dois resultados não deve ser superior a 6 % da média aritmética dos resultados.

9.2. *Reprodutibilidade*

Se foram efectuadas duas determinações por operadores em laboratórios diferentes, utilizando aparelhos diferentes, 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. **Bibliografia**

10.1. *Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M. Detection of buttermilk solids in skimmilk powder by HPLG quantification of aminophospholipids. Sci. Tecn. Latt.-Cas. 39, 395 (1988).*

(1) International IDF Standard 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure.

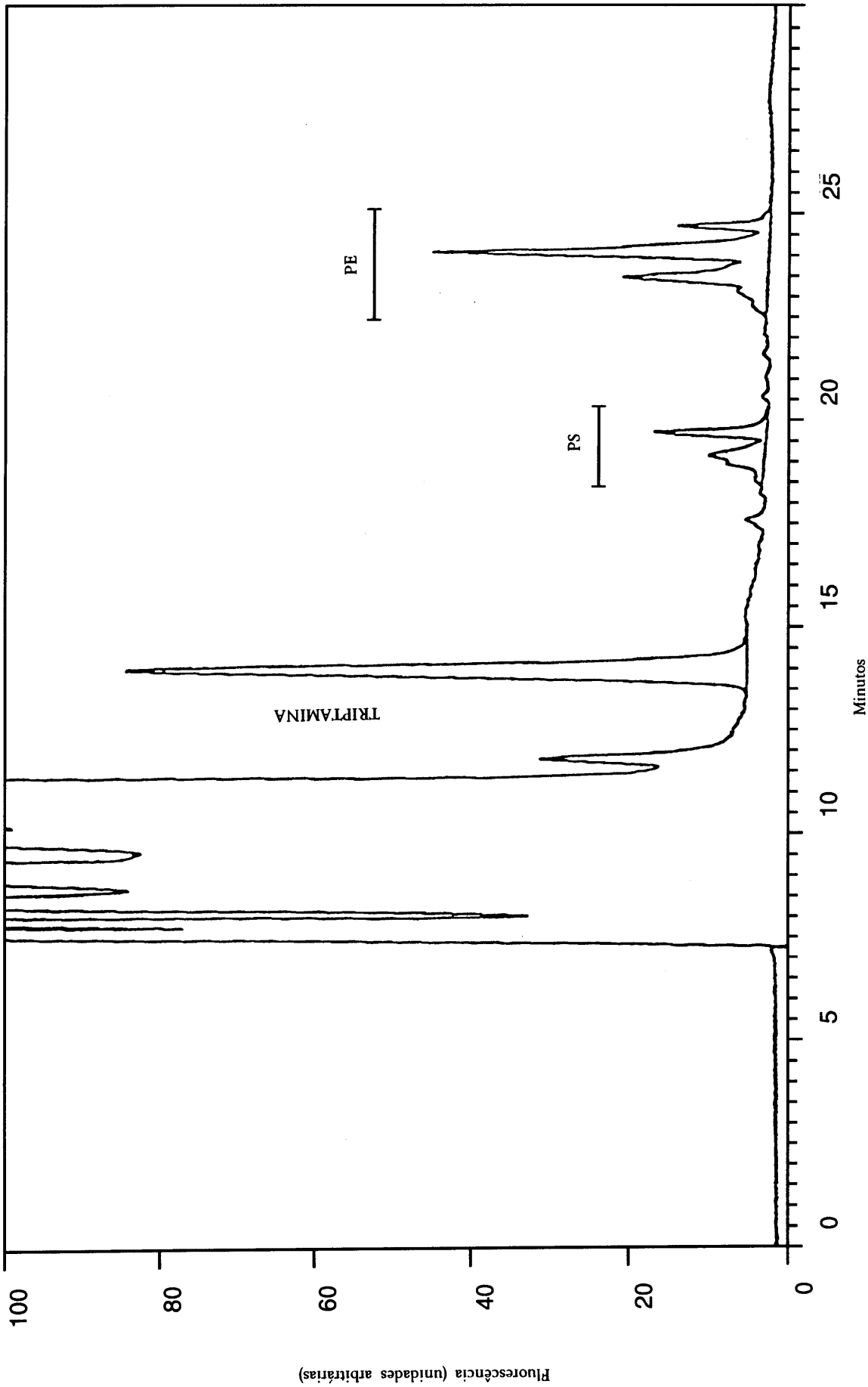


Figura 1: Curva resultante da HPLC de derivados OPA da fosfatidilserina (PS) e da fosfatidiletanolamina (PE) obtidas por extracção com metanol de leite em pó desnatado reconstituído. O modo de integração dos picos de PS, PE e triptamina (padrão interno) encontra-se indicado.

ANEXO VII

PESQUISA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICO E DE SULFONAMIDA/DAPSONA EM LEITE EM PÓ DESNATADO

Utilizar um teste de selecção com inibidor microbiano, usando *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 como microrganismo de ensaio, devendo o teste ter uma sensibilidade suficiente para detectar 4 µg de benzilpenicilina por litro de leite e 100 µg de sulfadimidina por litro de leite. Podem ser utilizados *kits* de ensaio existentes no comércio, desde que tenham a sensibilidade exigida no que respeita à benzilpenicilina e à sulfadimidina (1).

No ensaio é utilizado leite em pó desnatado reconstituído (1 g de pó + 9 ml *aqua dest*). O ensaio é efectuado conforme descrito no Boletim IDF nº 258/1991, secção 1, capítulo 2 ou de acordo com as intruções do fabricante do *kit* de ensaio.

A interpretação dos resultados positivos é feita do seguinte modo:

1. Repetir o ensaio adicionando penicilinase ao sistema de ensaio:

   Resultado positivo: A substância inibidora não pode ser identificada por este método.

   Resultado negativo: A substância inibidora é um antibiótico do grupo de ß-lactame.

2. Repetir o teste adicionando ácido p-aminobenzóico ao sistema de ensaio:

   Resultado positivo: A substância inibidora não pode ser identificada por este método.

   Resultado negativo: A substância inibidora é uma sulfonamida/dapsona.

3. Repetir o teste adicionando penicilinase + ácido p-aminobenzóico ao sistema de ensaio:

   Resultado positivo: A substância inibidora não pode ser identificada por este método.

   Resultado negativo: As substâncias inibidoras são um antibiótico do grupo do ß-lactame e uma sulfonamida/dapsona.

---

(1) *Aviso importante:* a análise de leite em pó desnatado pode produzir resultados positivos falsos. É importante, por conseguinte, verificar que o sistema de ensaio utilizado não produz resultados positivos falsos.