

381R2188

1. 8. 81

Jornal Oficial das Comunidades Europeias

Nº L 213/1

## REGULAMENTO (CEE) Nº 2188/81 DA COMISSÃO

de 28 de Julho de 1981

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

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

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

Tendo em conta o Regulamento (CEE) nº 804/68 do Conselho, de 27 de Junho de 1968, que estabelece a organização comum de mercado no sector do leite e dos produtos lácteos (<sup>1</sup>), com a última redacção que lhe foi dada pelo Acto de Adesão da Grécia e, nomeadamente, o nº 5 do seu artigo 7º,Considerando que do Anexo I do Regulamento (CEE) nº 625/78 da Comissão (<sup>2</sup>), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 2937/80 (<sup>3</sup>), que define as condições de qualidade a que deve corresponder o leite desnatado em pó para ser oferecido à intervenção, constam nomeadamente certas prescrições relativas aos processos de análise com vista à detecção do soro de leite pela dosagem de certos compostos no leite desnatado em pó; que a nota 2 do referido anexo previu proceder à fixação de valores limites comunitários para os referidos compostos, após um determinado período experimental nos Estados-membros;

Considerando que é possível actualmente instaurar, no plano comunitário, um método de análise que permita a determinação do soro de leite coalhado no leite desnatado em pó pela dosagem do ácido siálico livre; que convém, todavia, só tornar obrigatório este método de controlo após um certo período destinado a familiarizar os organismos de controlo e os operadores com este processo analítico;

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

a) Na alínea b) do ponto 2, o texto do segundo travessão passa a ter a seguinte redacção:

«— Soro de leite:

dosagem do ácido siálico livre (<sup>2</sup>) e/ou do complexo cisteína-cistina, desde que pelo menos um dos três ensaios obrigatórios, a saber, o dos gli-comacropéptidos do soro do leite (determinados por uma análise simplificada), o dos lactatos ou o das cinzas, dê resultados superiores a 3 %, 150 mg/100 g e 8 %, respectivamente;»

b) O texto da nota 2 passa a ter a seguinte redacção:

«(<sup>2</sup>) No que respeita à detecção do soro de leite coalhado pela dosagem do ácido siálico livre, o método de análise aplicado a partir de 1 de Janeiro de 1982 é o estabelecido no Anexo IV.»

2. O anexo do presente regulamento é aditado como Anexo IV ao Regulamento (CEE) nº 625/78.

*Artigo 2º*O presente regulamento entra em vigor no terceiro dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.<sup>(1)</sup> JO nº L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.<sup>(2)</sup> JO nº L 84 de 31. 3. 1978, p. 19.<sup>(3)</sup> JO nº L 305 de 14. 11. 1980, p. 13.

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

Feito em Bruxelas em 28 de Julho de 1981.

*Pela Comissão*

*O Presidente*

Gaston THORN

## ANEXO

## «ANEXO IV

**DETECÇÃO DO SORO DE LEITE COALHADO NO LEITE DESNATADO EM PÓ DESTINADO À ARMAZENAGEM PÚBLICA PELA DOSAGEM DA ÁCIDO SIÁLICO LIVRE****1. Objectivo e domínio de aplicação**

Este método permite a determinação do soro de leite coalhado no leite desnatado em pó destinado à armazenagem pública.

**2. Princípio do método**

Quando se dá coagulação do leite, por acção do coalho, libertam-se glicomacropéptidos da caseína com um teor elevado de ácido siálico. A dosagem do ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) permite verificar a presença eventual do soro de leite coalhado no leite desnatado em pó. Após reconstituição do leite, os glicomacropéptidos que incluem o ácido siálico são precipitados pelo ácido fosfotúngstico a partir de um filtrado tricloroacético a 12 %. O ácido siálico libertado por hidrólise ácida forma com o resorcinol um complexo colorido medido por espectrofotometria a 580 nm.

**3. Reagentes**

Todos os reagentes devem ser de pureza analítica. A água deve ser destilada ou desionizada.

**3.1. Solução de ácido tricloroacético (TCA).**

Dissolver 240 g de ácido tricloroacético em água e diluir até 1 000 ml.

**3.2. Solução de ácido fosfotúngstico.**

Dissolver 20 g de ácido fosfotúngstico em água e diluir até 100 ml.

**3.3. Etanol a 95 % (V/V).****3.4. Solução de ácido sulfúrico a 0,1 N aproximadamente.**

Diluir 28,1 ml de ácido sulfúrico concentrado (95 % de  $H_2SO_4$ ) em água até 1 000 ml, de modo a obter uma solução de ácido sulfúrico 1 N. Diluir 100 ml de ácido sulfúrico 1 N em água até 1 000 ml de modo a obter uma solução de ácido sulfúrico 0,1 N.

**3.5. Tampão acetato, a pH 4,8.**

Dissolver 19,7 g de acetato de sódio anidro em água, adicionar 9 ml de ácido acético glacial e completar com água até perfazer 1 000 ml. Verificar e ajustar eventualmente o pH.

**3.6. Solução de sulfato de cobre 0,1 M.**

Dissolver 2,497 g de sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) em água e diluir até 100 ml.

**3.7. Solução de resorcina a 2 %.**

Dissolver 2 g de resorcina em água e diluir até 100 ml. Esta solução pode conservar-se 4 meses a 5-8 °C.

3.8. Reagente de resorcinol  
Misturar 10 ml de solução de resorcina (3.7), 80 ml de ácido clorídrico concentrado ( $d_{20}^{\circ}\text{C} = 1,19 \text{ g/l}$ ) e 0,25 ml de solução de sulfato de cobre (3.6) e juntar água até perfazer 100 ml. Preparar esta solução no dia da utilização.

3.9. Álcool isoamílico.

3.10. Solução de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico).  
Dissolver 20 mg de ácido N-acetilneuramínico em água e diluir até 100 ml. Esta solução não se pode conservar mais de uma semana a  $+ 4^{\circ}\text{C}$ .

#### 4. Aparelhagem

4.1. Balança analítica.

4.2. Agitador magnético, barras magnéticas revestidas de teflon com 2 cm de comprimento.

4.3. Medidor de pH.

4.4. Centrifugadora que permita atingir uma força centrífuga de 3 000 g.

4.5. Tubos de centrifugação com uma capacidade de cerca de 75 ml.

4.6. Banho-maria, com termostato regulado a  $80^{\circ}\text{C}$ .

4.7. Banho-maria em ebulição.

4.8. Filtros com 125 mm de diâmetro (Schleicher e Schüll nº 589<sup>2</sup>, tipo «Weissband» ou de qualidade equivalente).

4.9. Funis de vidro, com um diâmetro de cerca de 7 cm.

4.10. Copos de precipitação de 100 e 150 ml.

4.11. Balões graduados de 50, 100 e 1 000 ml.

4.12. Tubos de ensaio de tampa roscada com uma capacidade de 10 ml.

4.13. Espectrofotómetro.

4.14. Cubas de vidro para espectrofotómetro (4.13), com trajecto óptico de 10 mm.

4.15. Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10, 20, 25 e 50 ml.

4.16. Varetas de vidro.

4.17. Estufa com termostato a  $35^{\circ}\text{C}$ .

#### 5. Preparação da amostra

A amostra, após ter sido homogeneizada, é examinada segundo as indicações previstas nos pontos 6 e seguintes.

#### 6. Modo de operação

6.1. Isolamento do ácido siálico livre.

6.1.1. Pesar  $5 \pm 0,005 \text{ g}$  de leite desnatado em pó num copo de precipitação de 150 ml.

Adicionar 50 ml de água. Misturar bem por agitação magnética (4.2) até completar a dissolução.

Adicionar lentamente, sob agitação, 50 ml da solução de ácido tricloroacético (3.1).

Deixar repousar 30 minutos (à temperatura ambiente).

- 6.1.2. Agitar e filtrar imediatamente (4.8).
- 6.1.3. Introduzir num tubo de centrifugação (4.5) 50 ml do filtrado recolhido nos 60 minutos que se seguem ao início da filtragem.
- Juntar 1 ml de ácido fosfotúngstico (3.2). Homogeneizar por agitação e deixar repousar 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugar a 3 000 g durante 10 minutos.
- 6.1.4. Eliminar o líquido sobrenadante. Lavar 2 vezes o sedimento com 5 ml de etanol (3.3) garantindo a sua suspensão com a ajuda de um agitador magnético ou de uma vareta de vidro (4.16). Neste último caso adicionar 2 ml de etanol para pôr em suspensão o sedimento e lavar a vareta com a ajuda dos 3 ml de etanol restantes). Centrifugar de cada vez a 3 000 g durante 10 minutos.
- Deixar secar o sedimento assim obtido ou de um dia para o outro à temperatura ambiente, ou durante 90 minutos a 35 °C.
- 6.1.5. Adicionar 4 ml de ácido sulfúrico 0,1 N (3.4) ao sedimento seco e agitar para o pôr em suspensão.
- Rolhar os tubos da centrifugadora e colocá-los durante 40 minutos num banho-maria a 80 °C agitando-os de vez em quando para assegurar uma boa dispersão. Arrefecer à temperatura ambiente e adicionar 4 ml de tampão acetato (3.5). Misturar cuidadosamente.
- 6.1.6. Centrifugar durante 10 minutos a 3 000 g. A dosagem do ácido siálico ou ácido N-acetilneuramínico é verificada no líquido sobrenadante.
- 6.2. Determinação espectrofotométrica do ácido siálico livre.
- 6.2.1. Introduzir 2 ml do líquido sobrenadante num tubo de ensaio (4.12) e adicionar 2 ml de reagente de resorcinol (3.8).
- 6.2.2. Rolhar os tubos, misturar cuidadosamente o conteúdo, colocar os tubos durante 15 minutos exactos num banho-maria a 100 °C (4.7). Arrefecer à temperatura ambiente em água corrente.
- 6.2.3. Adicionar 5 ml de álcool isoamílico (3.9), rolar e misturar cuidadosamente o conteúdo agitando vigorosamente os tubos colocando-os depois durante 15 minutos num banho de água gelada.
- 6.2.4. Centrifugar a 1 000 g durante 2 minutos para separar bem as duas fases.
- 6.2.5. Colocar cerca de 3 ml da camada superior (fase alcoólica) numa cuba de vidro e medir a extinção a 580 nm em relação ao ensaio a branco, nos 30 minutos que se seguem ao retirar dos tubos do banho de água gelada.
- 6.3. Ensaio a branco.
- Preparar um ensaio a branco de acordo com os pontos 6.2.1 a 6.2.5, utilizando 1 ml de solução de ácido sulfúrico 0,1 N (3.4) e 1 ml de tampão acetato (3.5) em vez de 2 ml de filtrado, como previsto no ponto 6.2.1.
- 6.4. Curva de calibragem.
- 6.4.1. Introduzir exactamente 0-2-5-10-20 e 30 ml da solução (3.10) correspondente a 0-0,4-1-2-4-6 mg de ácido siálico em balões graduados com uma capacidade de 50 ml, completar com a solução de ácido sulfúrico 0,1 N (3.4) até perfazer 50 ml e misturar bem.
- 6.4.2. Introduzir 1 ml do conteúdo de cada balão graduado num tubo de ensaio (4.12). Adicionar 1 ml de tampão acetato (3.5), a fim de obter uma série de soluções padrão contendo o (valor zero), 8, 20, 40, 80, 120 microgramas de ácido siálico. Depois de ter misturado bem, proceder à dosagem de acordo com os pontos 6.2.2 a 6.2.5.
- 6.4.3. Para obter a curva de calibragem, fazer um gráfico com as extinções obtidas no ponto 6.4.2 e as quantidades de ácido siálico correspondentes em microgramas indicadas no ponto 6.4.2.

7. **Expressão dos resultados**

## 7.1. Modo de cálculo.

Calcular o teor de ácido siálico, expresso em microgramas por grama, segundo a fórmula seguinte:

$$\frac{C \cdot 8}{E}$$

na qual C representa a massa de ácido siálico em microgramas, lida na curva de calibragem correspondente à medida de extinção obtida no ponto 6.2.5 e E é a massa da solução de ensaio (6.1.1) em gramas. Expressar o resultado até ao micrograma.

## 7.2. Repetibilidade.

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas simultaneamente ou em sucessão rápida pelo mesmo analista não deve exceder 5 % da média aritmética dos resultados.

8. **Interpretação dos resultados**

Este método permite quantificar a presença eventual de soro do leite no leite desnatado em pó.

## 8.1. Cálculo do valor médio de ácido siálico livre em microgramas por grama de amostra, referido ao seu teor de proteínas expresso em percentagem (m/m)

$$Y = 40 + 3 (X - 34)^2$$

em que:

40 é o teor médio de ácido siálico em microgramas por grama para um leite desnatado em pó que contém, pelo menos, 34 % de proteínas;

X é o teor de proteínas totais, determinado pelo método Kjeldhal FIL IDF 20: 1962.

## 8.2. Cálculo da percentagem de soro do leite em pó eventualmente presente

$$\% \text{ soro de leite} = \frac{Z - Y}{10}$$

em que:

Z é o teor de ácido siálico da amostra determinado no ponto 7.1 em microgramas por grama,

Y é o teor médio de ácido siálico livre, expresso em microgramas, de um grama de soro do leite coalhado em pó.

Y é o teor médio de ácido siálico livre da amostra calculado no ponto 8.1.

10 representa, por convenção, o teor de ácido siálico livre, expresso em microgramas, de um grama de soro coalhado em pó.

## 8.3. Tendo em conta os erros inerentes ao método e às variações naturais da composição da amostra, pode-se concluir em definitivo pela ausência de soro do leite quando o valor obtido no ponto 8.2 é igual ou inferior a 2,0.

No caso de se obter um valor superior, pode-se concluir pela presença de soro do leite, que é quantificável segundo a fórmula indicada no ponto 8.2»