

REGULAMENTO (UE) N.º 118/2010 DA COMISSÃO**de 9 de Fevereiro de 2010****que altera o Regulamento (CE) n.º 900/2008, que define os métodos de análise e outras normas de carácter técnico necessários à aplicação do regime de importações de certas mercadorias resultantes da transformação de produtos agrícolas**

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia,

Tendo em conta 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 ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 9.º,

Considerando o seguinte:

(1) O Regulamento (CE) n.º 900/2008 da Comissão ⁽²⁾ define as fórmulas, procedimentos e métodos a utilizar na determinação do teor de amido/glucose para efeitos de aplicação dos anexos II e III do Regulamento (CE) n.º 1460/96 da Comissão, de 25 de Julho de 1996, que estabelece as normas de aplicação dos regimes de trocas preferenciais, referidos no artigo 7.º do Regulamento (CE) n.º 3448/93 do Conselho ⁽³⁾, a determinadas mercadorias resultantes da transformação de produtos agrícolas.

(2) Um grupo de peritos procedeu à análise do Regulamento (CE) n.º 900/2008, a fim de determinar se o regulamento contempla a evolução científica e tecnológica dos métodos nele definidos. Os estudos e ensaios realizados no âmbito dessa análise indicaram que a determinação do teor de amido/glucose por solubilização com hidróxido de sódio (antes da degradação enzimática em glucose) e que a medição do teor total de glucose através do mé-

todo enzimático com espectrofotometria, tal como actualmente estabelecido para a maioria das mercadorias, deixaram de respeitar os requisitos técnicos em vigor, pelo que têm de ser actualizados.

(3) Convém, pois, providenciar no sentido de que a degradação do amido/glucose se processe de forma enzimática pela amilase e amiloglucosidase e que o teor total de glucose seja determinado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), bem como de especificar a forma como o método deve ser aplicado.

(4) O Regulamento (CE) n.º 900/2008 deve, por conseguinte, ser alterado em conformidade.

(5) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité do Código Aduaneiro,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

O anexo I do Regulamento (CE) n.º 900/2008 é substituído pelo texto constante do anexo do presente regulamento.

*Artigo 2.º*O presente regulamento entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

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

Feito em Bruxelas, em 9 de Fevereiro de 2010.

*Pela Comissão**O Presidente*

José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ JO L 256 de 7.9.1987, p. 1.⁽²⁾ JO L 248 de 17.9.2008, p. 8.⁽³⁾ JO L 187 de 26.7.1996, p. 18.

ANEXO

«ANEXO I

Determinação enzimática do amido e dos seus produtos de degradação, incluindo a glucose, em produtos alimentares pelo método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)**1. Âmbito**

O presente método aplica-se à determinação do teor de amido e dos seus produtos de degradação, incluindo a glucose, em produtos alimentares para consumo humano, a seguir designados por “amido”. Determina-se o teor de amido a partir da análise quantitativa da glucose por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), após a conversão enzimática do amido e dos seus produtos de degradação em glucose.

2. Definição do teor total de glucose e do teor total de glucose expresso em amido

Por teor total de glucose entende-se o valor Z, calculado em conformidade com o descrito no ponto 7.2.1 do presente anexo. Representa o teor de amido e de todos os seus produtos de degradação, incluindo a glucose.

O teor de amido/glucose definido no anexo III do Regulamento (CE) n.º 1460/96 deve ser calculado com base no teor total de glucose Z e seguindo o estabelecido no ponto 1 do artigo 2.º do presente regulamento.

O teor de amido (ou dextrinas) referido na coluna 3 do anexo IV do Regulamento (CE) n.º 1043/2005 da Comissão ⁽¹⁾ deve ser calculado com base no teor total de glucose Z e seguindo o estabelecido no ponto 2.1 do artigo 2.º do Regulamento (CE) n.º 904/2008 da Comissão ⁽²⁾.

Por teor de amido referido no ponto 1 do presente anexo entende-se o valor E, calculado em conformidade com o descrito no ponto 7.2.2 do presente anexo. Expressa-se em % (m/m). Equivale ao teor total de glucose Z, expresso em amido. Este valor E não é considerado nos cálculos acima mencionados.

3. Princípio

As amostras são homogeneizadas e suspensas em água. O amido e os seus produtos de degradação, presentes nas amostras, são enzimaticamente convertidos em glucose, em duas etapas:

1. O amido e os seus produtos de degradação são parcialmente convertidos em cadeias de glucose solúvel, usando a alfa-amilase termo-estável a 90 °C. Para que a conversão seja eficaz, é necessário que as amostras estejam completamente dissolvidas ou estejam presentes sob a forma de suspensão, contendo partículas sólidas de dimensão muito pequena.
2. As cadeias de glucose solúvel são convertidas em glucose usando a amiloglucosidase a 60 °C.

Os produtos que contenham um elevado teor de proteínas ou de matéria gorda devem ser clarificados e filtrados.

Os açúcares são determinados por HPLC.

Uma vez que, durante o tratamento enzimático, pode ocorrer uma inversão parcial da sacarose, efectua-se também por HPLC a determinação dos açúcares livres, a fim de calcular o teor de glucose corrigido.

4. Reagentes e outros materiais

Utilizar reagentes de qualidade analítica reconhecida e água desmineralizada.

- 4.1. Glucose de pureza mínima 99 %.
- 4.2. Frutose de pureza mínima 99 %.
- 4.3. Sacarose de pureza mínima 99 %.
- 4.4. Maltose mono-hidratada de pureza mínima 99 %.
- 4.5. Lactose mono-hidratada de pureza mínima 99 %.
- 4.6. Solução de alfa-amilase (1,4-alfa-D-Glucan-glucanohidrolase) termo-estável, com uma actividade aproximada de 31 000 U/ml (1 U liberta 1,0 mg de maltose a partir do amido, em 3 minutos, a um pH de 6,9 e a uma temperatura de 20 °C). Esta enzima pode conter uma quantidade reduzida de impurezas (por exemplo, glucose ou sacarose) e de outras enzimas interferentes. Armazenar a cerca de 4 °C. Podem, em alternativa, utilizar-se alfa-amilases de origens diferentes que permitam obter uma solução final com uma actividade enzimática equivalente.

⁽¹⁾ JO L 172 de 5.7.2005, p. 24.

⁽²⁾ JO L 249 de 18.9.2008, p. 9.

- 4.7. Amiloglucosidase (1,4-alfa-D-Glucan-glucohidrolase) produzida por *Aspergillus niger*, em pó, com uma actividade aproximada de 120 U/mg ou de 70 U/mg (1 U liberta 1 micromol de glucose a partir do amido, por minuto, a um pH de 4,8 e a uma temperatura de 60 °C). Esta enzima pode conter uma quantidade reduzida de impurezas (por exemplo, glucose ou sacarose) e de outras enzimas interferentes (por exemplo, invertase). Armazenar a cerca de 4 °C. Podem, em alternativa, utilizar-se amiloglucosidasas de origens diferentes que permitam obter uma solução final com uma actividade enzimática equivalente.
- 4.8. Acetato de zinco di-hidratado, p.a.
- 4.9. Hexacianoferrato (II) de potássio ($K_4[Fe(CN)]_6 \cdot 3H_2O$), extrapuro.
- 4.10. Acetato de sódio anidro, p.a.
- 4.11. Ácido acético glacial a 96 % (v/v) (no mínimo).
- 4.12. Tampão de acetato de sódio (0,2 mol/l). Pesar 16,4 g de acetato de sódio (ponto 4.10) para um copo de vidro. Dissolver em água e transferir para um balão volumétrico de 1 000 ml. Diluir até à marca com água e ajustar o pH para 4,7 com ácido acético usando um medidor de pH (ponto 5.7). Esta solução pode ser utilizada por um período máximo de 6 meses, com armazenagem a 4 °C.
- 4.13. Solução de amiloglucosidase. Preparar uma solução de amiloglucosidase em pó (ponto 4.7), em tampão de acetato de sódio (ponto 4.12). A actividade enzimática deve ser suficiente e corresponder ao teor de amido presente na toma de ensaio (por exemplo, obtém-se uma actividade aproximada de 600 U/ml a partir de 0,5 g de amiloglucosidase em pó com 120 U/mg (ponto 4.7) num volume final de 100 ml para 1 g de amido na toma de ensaio). Preparar imediatamente antes da utilização.
- 4.14. Soluções de referência. Preparar soluções de glucose, frutose, sacarose, maltose e lactose em água da forma convencional utilizada na análise de açúcares por HPLC.
- 4.15. Reagente de clarificação (Carrez I). Utilizar um copo de vidro para dissolver 219,5 g de acetato de zinco (ponto 4.8) em água. Transferir para um balão volumétrico de 1 000 ml e adicionar 30 ml de ácido acético (ponto 4.11). Homogeneizar e diluir com água até à marca. Esta solução pode ser utilizada por um período máximo de 6 meses se armazenada à temperatura ambiente. Podem utilizar-se outros reagentes de clarificação equivalentes à solução de Carrez.
- 4.16. Reagente de clarificação (Carrez II). Utilizar um copo de vidro para dissolver 106,0 g de hexacianoferrato (II) de potássio (ponto 4.9) em água. Transferir para um balão volumétrico de 1 000 ml. Homogeneizar e diluir com água até à marca. Esta solução pode ser utilizada por um período máximo de 6 meses se armazenada à temperatura ambiente. Podem utilizar-se outros reagentes de clarificação equivalentes à solução de Carrez.
- 4.17. Fase móvel para HPLC. Preparar uma fase móvel da forma convencional utilizada na análise de açúcares por HPLC. Com uma coluna de aminopropil-silicagel, por exemplo, uma das fases móveis mais comuns é uma mistura de água de qualidade para HPLC com acetonitrilo.

5. Equipamento

- 5.1. Material de vidro de uso laboratorial corrente
- 5.2. Filtros de pregas (p. ex., 185 mm).
- 5.3. Filtros de seringa de 0,45 µm, adequados a soluções aquosas.
- 5.4. Tubos para amostras adequados ao amostrador automático para HPLC.
- 5.5. Balões volumétricos de 100 ml.
- 5.6. Seringas de plástico de 10 ml.
- 5.7. Medidor de pH.
- 5.8. Balança analítica.
- 5.9. Banho-maria com termóstato ajustável a 60 °C e 90 °C.
- 5.10. Aparelho de HPLC adequado à análise de açúcares.

6. Procedimento

6.1. Preparação da amostra a partir de diversos tipos de produtos

O produto é homogeneizado.

6.2. Toma de ensaio

Estima-se a toma de ensaio a partir da lista de ingredientes declarados e das condições da análise por HPLC (concentração da solução de referência de glucose), não devendo ultrapassar:

$$\text{toma de ensaio (g)} = \frac{\text{volume do balão volumétrico (por exemplo : 100 ml)}}{\text{teor de amido estimado (\%)}}$$

Pesar a amostra com uma precisão de 0,1 mg.

6.3. Ensaio em branco

O ensaio em branco é efectuado através de uma análise completa (como descrito no ponto 6.4), sem adição de amostra. O resultado dessa análise é utilizado para calcular o teor de amido (ponto 7.2).

6.4. Análise

6.4.1. Preparação das amostras

Homogeneizar a amostra por mistura ou agitação. Pesar a toma de ensaio escolhida (ponto 6.2) num balão volumétrico (ponto 5.5) e adicionar cerca de 70 ml de água morna.

Após a dissolução ou suspensão, adicionar 50 microlitros de alfa-amilase termo-estável (ponto 4.6) e aquecer a 90 °C, durante 30 minutos, em banho-maria (ponto 5.9). Arrefecer, o mais rapidamente possível, até 60 °C, em banho-maria, e adicionar 5 ml de solução de amiloglucosidase (ponto 4.13). Em relação a amostras susceptíveis de influenciar o pH da solução de reacção, controlar o pH e, se necessário, ajustá-lo entre 4,6 e 4,8. Deixar reagir durante 60 minutos a uma temperatura de 60 °C. Arrefecer as amostras à temperatura ambiente.

6.4.2. Clarificação

No caso de amostras com elevado teor de proteínas ou de matéria gorda, é necessário proceder a uma clarificação, adicionando 1 ml de solução de Carrez I (ponto 4.15) à solução da amostra. Após agitação, adicionar 1 ml de solução de Carrez II (ponto 4.16). Agitar a amostra mais uma vez.

6.4.3. Preparação para a análise por HPLC

Diluir com água, até à marca, a amostra contida no balão volumétrico, homogeneizar e filtrar com um filtro de pregas (ponto 5.2). Recolher o extracto da amostra.

Filtrar os extractos com um filtro de seringa (ponto 5.3), depois de ter lavado a seringa (ponto 5.6) com o extracto. Recolher os filtrados em tubos para amostras (ponto 5.4).

6.5. Cromatografia

Executar a HPLC da forma convencional utilizada na análise de açúcares. Se a análise por HPLC revelar vestígios de maltose, isso significa que o amido não foi convertido completamente, o que resulta numa recuperação de glucose demasiado baixa.

7. Cálculos e expressão dos resultados

7.1. Cálculo dos resultados da HPLC

Para calcular o teor de amido, são necessários os resultados de duas análises por HPLC, nomeadamente os açúcares presentes na amostra antes ("açúcares livres") e depois do tratamento enzimático (conforme descrito no presente método). Tem também de realizar-se um ensaio em branco para a correcção dos açúcares presentes nas enzimas.

Na análise por HPLC, determina-se a área dos picos após integração, sendo a concentração calculada após a calibração com soluções de referência (ponto 4.14). Subtrai-se a concentração de glucose (g/100 ml) no ensaio em branco da concentração de glucose (g/100 ml) após tratamento enzimático. Calcula-se o teor de açúcares (g de açúcar/100 g de amostra) utilizando o peso da amostra, o que resulta no seguinte:

1. Análise por HPLC antes do tratamento enzimático: teor (g/100 g) de açúcares livres:

— glucose G

— frutose F

— sacarose S

2. Análise por HPLC após o tratamento enzimático: teor (g/100 g) de açúcares:

— glucose após correcção para o ensaio em branco ($G_{e\text{ cor}}$)

— frutose F_e

— sacarose S_e

7.2. Cálculo do teor de amido

7.2.1. Cálculo da glucose total “Z”

Se a quantidade de frutose após o tratamento enzimático (F_e) for superior à quantidade de frutose antes do tratamento enzimático (F), é porque a sacarose presente na amostra foi parcialmente convertida em frutose e glucose. Isto significa que é necessário fazer uma correcção para a glucose libertada ($F_e - F$).

Z, teor final de glucose, após correcção, em g/100 g:

$$Z = (G_{e\text{ cor}}) - (F_e - F)$$

7.2.2. Cálculo do teor total de glucose expresso em amido

E, teor de “amido”, em g/100 g:

$$E = [(G_{e\text{ cor}}) - (F_e - F)] \times 0,9$$

8. Precisão

São apresentados neste ponto os pormenores de um estudo interlaboratorial relacionado com os dados de precisão do método efectuado em duas amostras. Reflectem os requisitos de desempenho do método descrito no presente anexo.

Resultados de um estudo interlaboratorial (informativo).

Realizou-se em 2008 um estudo interlaboratorial com a participação dos laboratórios aduaneiros europeus.

A avaliação dos dados relativos à precisão foi realizada de acordo com o *Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies* (Protocolo para a concepção, realização e interpretação de estudos de desempenho de métodos), W. Horwitz (IUPAC technical report), *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 67, N.º 2, pp. 331-343, 1995.

Os dados relativos à precisão constam do seguinte quadro:

Amostras 1 : Barra de bolacha com chocolate 2 : Bolacha	Z Amostra 1	Z Amostra 2
Número de laboratórios	41	42
Número de laboratórios após eliminação dos casos anómalos	38	39
Média (% m/m)	29,8	55,0
Desvio-padrão da repetibilidade, sr (% m/m)	0,5	0,5
Desvio-padrão da reprodutibilidade, sR (% m/m)	1,5	2,3
Limite de repetibilidade, r (% m/m)	1,4	1,4
Limite de reprodutibilidade, R (% m/m)	4,2	6,6»