



### Índice

#### II *Atos não legislativos*

##### ACORDOS INTERNACIONAIS

- ★ **Decisão (UE) 2018/145 do Conselho, de 9 de outubro de 2017, relativa à celebração, em nome da União, do Acordo Multilateral entre a Comunidade Europeia e os seus Estados-Membros, a República da Albânia, a Bósnia e Herzegovina, a República da Bulgária, a República da Croácia, a Antiga República Jugoslava da Macedónia, a República da Islândia, a República de Montenegro, o Reino da Noruega, a Roménia, a República da Sérvia e a Missão de Administração Provisória das Nações Unidas no Kosovo\* sobre o estabelecimento de um Espaço de Aviação Comum Europeu (EACE)** ..... 1
- ★ **Decisão (UE) 2018/146 do Conselho, de 22 de janeiro de 2018, relativa à celebração, em nome da União, do Acordo Euro-Mediterrânico relativo aos serviços aéreos entre a Comunidade Europeia e os seus Estados-Membros, por um lado, e o Reino de Marrocos, por outro** ..... 4

##### REGULAMENTOS

- ★ **Regulamento (UE) 2018/147 do Conselho, de 29 de janeiro de 2018, que altera o Regulamento (UE) n.º 1370/2013, no respeitante à limitação quantitativa da compra de leite em pó desnatado** ..... 6
- ★ **Regulamento Delegado (UE) 2018/148 da Comissão, de 27 de setembro de 2017, que altera os anexos II, III e IV do Regulamento (UE) n.º 978/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à aplicação de um sistema de preferências pautais generalizadas** ..... 8
- ★ **Regulamento Delegado (UE) 2018/149 da Comissão, de 15 de novembro de 2017, que altera o Regulamento Delegado (UE) 2016/1238 da Comissão no respeitante aos requisitos de composição e às características de qualidade do leite e dos produtos lácteos elegíveis para intervenção pública e para a ajuda ao armazenamento privado** ..... 11

\* Esta designação não prejudica as posições relativas ao estatuto e está conforme com a Resolução 1244 (1999) do CSNU e com o parecer do Tribunal Internacional de Justiça sobre a declaração de independência do Kosovo.

- ★ Regulamento de Execução (UE) 2018/150 da Comissão, de 30 de janeiro de 2018, que altera o Regulamento (UE) 2016/1240 no respeitante aos métodos a utilizar para a análise e a avaliação da qualidade do leite e dos produtos lácteos elegíveis para intervenção pública e para a ajuda ao armazenamento privado ..... 14
- ★ Regulamento de Execução (UE) 2018/151 da Comissão, de 30 de janeiro de 2018, que estabelece normas de execução da Diretiva (UE) 2016/1148 do Parlamento Europeu e do Conselho no respeitante à especificação pormenorizada dos elementos a ter em conta pelos prestadores de serviços digitais na gestão dos riscos que se colocam à segurança das redes e dos sistemas de informação, bem como à especificação pormenorizada dos parâmetros para determinar se o impacto de um incidente é substancial ..... 48

#### DECISÕES

- ★ Decisão (UE) 2018/152 do Conselho, de 29 de janeiro de 2018, que nomeia um suplente do Comité das Regiões, proposto pela República Federal da Alemanha ..... 52

#### Retificações

- ★ Retificação do Regulamento (UE) 2017/1084 da Comissão, de 14 de junho de 2017, que altera o Regulamento (UE) n.º 651/2014 no que se refere aos auxílios às infraestruturas portuárias e aeroportuárias, aos limiares de notificação para os auxílios a favor da cultura e da conservação do património e para os auxílios a infraestruturas desportivas e recreativas multifuncionais, bem como aos regimes de auxílio regional ao funcionamento nas regiões ultraperiféricas e que altera o Regulamento (UE) n.º 702/2014 no que se refere ao cálculo dos custos elegíveis (JO L 156 de 20.6.2017) ..... 53

## II

(Atos não legislativos)

## ACORDOS INTERNACIONAIS

## DECISÃO (UE) 2018/145 DO CONSELHO

de 9 de outubro de 2017

**relativa à celebração, em nome da União, do Acordo Multilateral entre a Comunidade Europeia e os seus Estados-Membros, a República da Albânia, a Bósnia e Herzegovina, a República da Bulgária, a República da Croácia, a Antiga República Jugoslava da Macedónia, a República da Islândia, a República de Montenegro, o Reino da Noruega, a Roménia, a República da Sérvia e a Missão de Administração Provisória das Nações Unidas no Kosovo \* sobre o estabelecimento de um Espaço de Aviação Comum Europeu (EACE)**

O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia, nomeadamente o artigo 100.º, n.º 2, em conjugação com o artigo 218.º, n.º 6, alínea a),

Tendo em conta a proposta da Comissão Europeia,

Tendo em conta a aprovação do Parlamento Europeu <sup>(1)</sup>,

Considerando o seguinte:

- (1) A Comissão negociou, em nome da Comunidade Europeia e dos Estados-Membros, um acordo multilateral entre a Comunidade Europeia e os seus Estados-Membros, a República da Albânia, a Bósnia e Herzegovina, a República da Bulgária, a República da Croácia, a Antiga República Jugoslava da Macedónia, a República da Islândia, a República de Montenegro, o Reino da Noruega, a Roménia, a República da Sérvia e a Missão de Administração Provisória das Nações Unidas no Kosovo sobre o estabelecimento de um Espaço de Aviação Comum Europeu (EACE) («Acordo»).
- (2) O Acordo EACE foi assinado, em nome da Comunidade, em 9 de junho de 2006, sob reserva da sua celebração em data ulterior, em virtude da Decisão 2006/682/CE do Conselho e dos Representantes dos Governos dos Estados-Membros da União Europeia, reunidos no Conselho <sup>(2)</sup>.
- (3) O Acordo foi ratificado por todos os Estados-Membros.
- (4) No seguimento da adesão à União, a República da Bulgária, a Roménia e a República da Croácia tornaram-se Estados-Membros e, por conseguinte, deixaram automaticamente de ser Partes Associadas no âmbito do Acordo, nos termos do artigo 31.º, n.º 2, do mesmo. Este facto deverá ser recordado na notificação a efetuar aquando do depósito do instrumento de aprovação do Acordo.

\* Esta designação não prejudica as posições relativas ao estatuto e está conforme com a Resolução 1244 (1999) do CSNU e com o parecer do Tribunal Internacional de Justiça sobre a declaração de independência do Kosovo.

<sup>(1)</sup> JO C 81E de 15.3.2011, p. 5.

<sup>(2)</sup> Decisão 2006/682/CE do Conselho e dos Representantes dos Estados-Membros da União Europeia, reunidos no Conselho, de 9 de junho de 2006, relativa à assinatura e à aplicação provisória do Acordo Multilateral entre a Comunidade Europeia e os seus Estados-Membros, a República da Albânia, a Bósnia e Herzegovina, a República da Bulgária, a República da Croácia, a República da Islândia, a antiga República jugoslava da Macedónia, a República de Montenegro, o Reino da Noruega, a Roménia, a República da Sérvia e a Missão de Administração Provisória das Nações Unidas para o Kosovo sobre o estabelecimento de um Espaço de Aviação Comum Europeu (EACE) (JO L 285 de 16.10.2006, p. 1).

- (5) No que diz respeito às alterações do anexo I do Acordo relativas apenas à inclusão da legislação da União no referido anexo, que devem ser adotadas pelo Comité Misto criado nos termos do artigo 18.º do Acordo, o poder de aprovar essas alterações em nome da União deverá ser atribuído à Comissão, após consulta ao Comité Especial designado pelo Conselho.
- (6) Em todos os outros casos, a posição a tomar, em nome da União, no âmbito do Comité Misto no que concerne a matérias da competência da União, deverá ser estabelecida numa base casuística, nos termos das disposições do Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia (TFUE).
- (7) Considerando que tanto a União como os Estados-Membros são Partes no Acordo, é essencial uma cooperação estreita entre eles. Para garantir essa cooperação estreita e a unidade da representação externa no Comité Misto, e sem prejuízo do disposto nos Tratados, nomeadamente no artigo 16.º, n.º 1, do Tratado da União Europeia e no artigo 218.º, n.º 9, do TFUE, a coordenação das posições a tomar, em nome da União e dos Estados-Membros, no Comité Misto no que concerne a matérias que são da competência tanto da União como dos Estados-Membros, deverá ter lugar antes de qualquer reunião do Comité Misto sobre essas matérias.
- (8) O artigo 2.º da Decisão 2006/682/CE contém disposições relativas à definição das posições a tomar no âmbito do Comité Misto durante a aplicação provisória do Acordo. Tendo em conta o acórdão do Tribunal de Justiça de 28 de abril de 2015 no Processo C-28/12, *Comissão/Conselho* <sup>(1)</sup>, essas disposições deverão deixar de ser aplicáveis a partir da data de entrada em vigor da presente decisão.
- (9) O Acordo deverá ser aprovado,

ADOTOU A PRESENTE DECISÃO:

#### Artigo 1.º

1. É aprovado, em nome da União, o Acordo Multilateral entre a Comunidade Europeia e os seus Estados-Membros, a República da Albânia, a Bósnia e Herzegovina, a República da Bulgária, a República da Croácia, a Antiga República Jugoslava da Macedónia, a República da Islândia, a República de Montenegro, o Reino da Noruega, a Roménia, a República da Sérvia e a Missão de Administração Provisória das Nações Unidas no Kosovo sobre o estabelecimento de um Espaço de Aviação Comum Europeu (EACE) <sup>(2)</sup>.
2. O presidente do Conselho designa a(s) pessoa(s) com poderes para proceder ao depósito, em nome da União, do instrumento de aprovação previsto no artigo 29.º, n.º 2, do Acordo <sup>(3)</sup> e fazer a seguinte notificação:
  - «1. Em consequência da entrada em vigor do Tratado de Lisboa em 1 de dezembro de 2009, a União Europeia substituiu-se e sucedeu à Comunidade Europeia e desde essa data exerce todos os direitos e assume todas as obrigações da Comunidade Europeia. Por conseguinte, as referências à “Comunidade Europeia” no texto do Acordo devem ser lidas, quando adequado, como referências à “União Europeia”.
  2. No seguimento da sua adesão à União Europeia, a República da Bulgária, a Roménia e a República da Croácia tornaram-se Estados-Membros da União Europeia e, nos termos do artigo 31.º, n.º 2, do Acordo, deixaram, por conseguinte, de ser Partes Associadas no âmbito do presente Acordo.»

#### Artigo 2.º

A posição a tomar pela União no que respeita às decisões do Comité Misto nos termos do artigo 17.º do Acordo relativas à simples inclusão de legislação da União no anexo I do Acordo, sob reserva das adaptações técnicas necessárias, é adotada pela Comissão, após consulta a um Comité Especial designado pelo Conselho.

#### Artigo 3.º

O artigo 2.º da Decisão 2006/682/CE deixa de ser aplicável a partir da data de entrada em vigor da presente decisão.

<sup>(1)</sup> ECLI:EU:C:2015:282.

<sup>(2)</sup> O Acordo foi publicado no *Jornal Oficial da União Europeia* (JO L 285 de 16.10.2006, p. 3) juntamente com a decisão relativa à assinatura e aplicação provisória.

<sup>(3)</sup> A data de entrada em vigor do Acordo será publicada no *Jornal Oficial da União Europeia* pelo Secretariado-Geral do Conselho.

*Artigo 4.º*

A presente decisão entra em vigor na data da sua adoção.

Feito no Luxemburgo, em 9 de outubro de 2017.

*Pelo Conselho*

*O Presidente*

S. KIISLER

---

**DECISÃO (UE) 2018/146 DO CONSELHO****de 22 de janeiro de 2018****relativa à celebração, em nome da União, do Acordo Euro-Mediterrânico relativo aos serviços aéreos entre a Comunidade Europeia e os seus Estados-Membros, por um lado, e o Reino de Marrocos, por outro**

O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia, nomeadamente o artigo 100.º, n.º 2, em conjugação com o artigo 218.º, n.º 6, alínea a),

Tendo em conta a proposta da Comissão Europeia,

Tendo em conta a aprovação do Parlamento Europeu <sup>(1)</sup>,

Considerando o seguinte:

- (1) A Comissão negociou, em nome da União e dos Estados-Membros, um acordo euro-mediterrânico relativo aos serviços aéreos com o Reino de Marrocos («Acordo») em conformidade com a decisão do Conselho que autorizou a Comissão a iniciar negociações.
- (2) O Acordo foi assinado em 12 de dezembro de 2006, em virtude da Decisão 2006/959/CE do Conselho e dos Representantes dos Governos dos Estados-Membros, reunidos no Conselho <sup>(2)</sup>. O Acordo foi ratificado por todos os Estados-Membros, exceto a Bulgária, a Roménia e a Croácia. Pretende-se que estes Estados-Membros adiram ao Acordo nos termos do artigo 6.º, n.º 2, dos respetivos Atos de Adesão.
- (3) No que diz respeito às alterações de determinados anexos do Acordo, que devem ser adotadas pelo Comité Misto criado nos termos do artigo 22.º do Acordo, o poder de aprovar essas alterações em nome da União deverá ser atribuído à Comissão, após consulta ao Comité Especial designado pelo Conselho.
- (4) Em todos os outros casos, as posições a tomar, em nome da União, no âmbito do Comité Misto no que concerne a matérias da competência da União deverão ser estabelecidas numa base casuística nos termos das disposições aplicáveis do Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia (TFUE).
- (5) Considerando que tanto a União como os Estados-Membros são Partes no Acordo, é essencial uma cooperação estreita entre eles. A fim de garantir a cooperação estreita e a unidade da representação externa no Comité Misto, e sem prejuízo do disposto nos Tratados, nomeadamente no artigo 16.º, n.º 1, do Tratado da União Europeia e no artigo 218.º, n.º 9, do TFUE, a coordenação das posições a tomar, em nome da União e dos Estados-Membros, no Comité Misto no que concerne a matérias que são da competência tanto da União como dos Estados-Membros, deverá ter lugar antes de qualquer reunião do Comité Misto sobre essas matérias.
- (6) Os artigos 2.º a 5.º da Decisão 2006/959/CE contêm disposições relativas ao processo de decisão do Conselho no que se refere a diversas matérias referidas no Acordo, incluindo a definição das posições a tomar no âmbito do Comité Misto, e às obrigações de informação dos Estados-Membros, durante a aplicação provisória do Acordo. Essas disposições não são necessárias ou deverão deixar de ser aplicáveis tendo em conta o acórdão do Tribunal de Justiça de 28 de abril de 2015 no Processo C-28/12, *Comissão/Conselho* <sup>(3)</sup>. Por conseguinte, é conveniente que todas estas disposições deixem de ser aplicáveis a partir da data da entrada em vigor da presente decisão.
- (7) O Acordo deverá ser aprovado,

<sup>(1)</sup> JO C 81E de 15.3.2011, p. 5.

<sup>(2)</sup> Decisão 2006/959/CE do Conselho e dos Representantes dos Governos dos Estados-Membros da União Europeia, reunidos no Conselho, de 4 de dezembro de 2006, relativa à assinatura e aplicação provisória do Acordo Euro-Mediterrânico relativo aos serviços aéreos entre a Comunidade Europeia e os seus Estados-Membros, por um lado, e o Reino de Marrocos, por outro (JO L 386 de 29.12.2006, p. 55).

<sup>(3)</sup> ECLI:EU:C:2015:282.

ADOTOU A PRESENTE DECISÃO:

*Artigo 1.º*

1. É aprovado, em nome da União, o Acordo Euro-Mediterrânico relativo aos serviços aéreos entre a Comunidade Europeia e os seus Estados-Membros, por um lado, e o Reino de Marrocos, por outro <sup>(1)</sup>.
2. O presidente do Conselho fica autorizado a designar a(s) pessoa(s) com poderes para entregarem ao Reino de Marrocos as notas diplomáticas previstas no artigo 30.º do Acordo <sup>(2)</sup> e apresentarem a seguinte notificação:

«Em consequência da entrada em vigor do Tratado de Lisboa em 1 de dezembro de 2009, a União Europeia substituiu-se e sucedeu à Comunidade Europeia e desde essa data exerce todos os direitos e assume todas as obrigações da Comunidade Europeia. Por conseguinte, as referências à “Comunidade Europeia” no texto do Acordo devem ser lidas, quando adequado, como referências à “União Europeia”.»

*Artigo 2.º*

As posições a tomar pela União no âmbito do Comité Misto criado nos termos do artigo 22.º do Acordo no que respeita à alteração dos anexos do Acordo, com exceção do anexo I (Serviços acordados e rotas especificadas) e do anexo IV (Disposições transitórias), são adotadas pela Comissão, após consulta a um Comité Especial designado pelo Conselho.

*Artigo 3.º*

Os artigos 2.º a 5.º da Decisão 2006/959/CE deixam de ser aplicáveis a partir da data de entrada em vigor da presente decisão.

*Artigo 4.º*

A presente decisão entra em vigor no dia da sua adoção.

Feito em Bruxelas, em 22 de janeiro de 2018.

*Pelo Conselho*  
*A Presidente*  
F. MOGHERINI

---

<sup>(1)</sup> O Acordo foi publicado no *Jornal Oficial da União Europeia* (JO L 386 de 29.12.2006, p. 57) juntamente com a decisão relativa à assinatura e aplicação provisória.

<sup>(2)</sup> A data de entrada em vigor do Acordo será publicada no *Jornal Oficial da União Europeia* pelo Secretariado-Geral do Conselho.

# REGULAMENTOS

## REGULAMENTO (UE) 2018/147 DO CONSELHO

de 29 de janeiro de 2018

**que altera o Regulamento (UE) n.º 1370/2013, no respeitante à limitação quantitativa da compra de leite em pó desnatado**

O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia, nomeadamente o artigo 43.º, n.º 3,

Tendo em conta a proposta da Comissão Europeia,

Considerando o seguinte:

- (1) No final de julho de 2017, as existências de intervenção pública de leite em pó desnatado na União eram de 357 359 toneladas. Até ao termo do período de intervenção em 30 de setembro de 2017, disponibilizaram-se 22 710 toneladas adicionais para compra a preço fixado.
- (2) Na sequência de uma procura particularmente elevada de manteiga, o setor do leite e dos produtos lácteos enfrenta uma desconexão sem precedentes entre os preços das matérias gordas e da proteína.
- (3) Prevê-se um aumento, em 2018, das entregas de leite na União, o que resultará numa maior produção de manteiga e de leite em pó desnatado.
- (4) Em 2018, dado o atual nível elevado de procura da manteiga e do queijo, não obstante os preços relativamente baixos das proteínas lácteas, os preços do leite cru pagos aos agricultores deverão permanecer a um nível que torne a produção leiteira remunerativa.
- (5) Esses fatores comerciais estão a gerar, para 2018, uma situação excecional que importa ter em conta, especificamente, no que respeita ao funcionamento do mecanismo de intervenção pública para os produtos lácteos.
- (6) O artigo 3.º do Regulamento (UE) n.º 1370/2013 do Conselho <sup>(1)</sup> estabelece uma limitação quantitativa para a compra de leite em pó desnatado ao preço fixado referido no artigo 2.º do mesmo regulamento. Atingido esse limite, as compras devem ser efetuadas por um procedimento de concurso, para se determinar o preço máximo de compra.
- (7) A fim de evitar a compra de leite em pó desnatado a preço fixado, numa situação em que tal não seria conforme com os objetivos da rede de segurança, qualquer intervenção pública para o leite em pó desnatado deverá ser executada por meio de concurso. Para esse efeito, em 2018, a limitação quantitativa da compra de leite em pó desnatado a preço fixado deverá ser de zero.
- (8) O Regulamento (UE) n.º 1370/2013 deverá, por conseguinte, ser alterado em conformidade.
- (9) A fim de garantir que a medida temporária prevista no presente regulamento tenha efeitos imediatos no mercado e para permitir que os operadores de mercado sejam informados atempadamente antes do início da próxima campanha de intervenção, o presente regulamento deverá entrar em vigor no dia seguinte ao da sua publicação,

<sup>(1)</sup> Regulamento (UE) n.º 1370/2013 do Conselho, de 16 de dezembro de 2013, que determina medidas sobre a fixação de certas ajudas e restituições relativas à organização comum dos mercados dos produtos agrícolas (JO L 346 de 20.12.2013, p. 12).



ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

*Artigo 1.º*

No artigo 3.º, n.º 1, do Regulamento (UE) n.º 1370/2013, é aditado o seguinte parágrafo:

«Em derrogação do disposto no primeiro parágrafo, em 2018, a limitação quantitativa para a compra de leite em pó desnatado a preço fixado é de 0 toneladas.».

*Artigo 2.º*

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

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

Feito em Bruxelas, em 29 de janeiro de 2018.

*Pelo Conselho*  
*O Presidente*  
R. PORODZANOV

---

**REGULAMENTO DELEGADO (UE) 2018/148 DA COMISSÃO****de 27 de setembro de 2017****que altera os anexos II, III e IV do Regulamento (UE) n.º 978/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à aplicação de um sistema de preferências pautais generalizadas**

A COMISSÃO EUROPEIA,

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

Tendo em conta o Regulamento (UE) n.º 978/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2012, relativo à aplicação de um sistema de preferências pautais generalizadas e que revoga o Regulamento (CE) n.º 732/2008 do Conselho <sup>(1)</sup>, nomeadamente o artigo 5.º, n.º 3, o artigo 10.º, n.º 5, e o artigo 17.º, n.º 2,

Considerando o seguinte:

- (1) O artigo 4.º do Regulamento (UE) n.º 978/2012 estabelece os critérios para a concessão de preferências pautais ao abrigo do regime geral do sistema de preferências generalizadas («SPG»).
- (2) No artigo 4.º, n.º 1, as alíneas a) e b), do Regulamento (UE) n.º 978/2012 preveem respetivamente que um país que tenha sido classificado pelo Banco Mundial como um país de rendimento elevado ou de rendimento médio-elevado durante três anos consecutivos, ou um país que beneficie de um regime de acesso preferencial ao mercado que ofereça as mesmas preferências pautais que o SPG, ou melhores, no que respeita a praticamente toda a atividade comercial, não deve beneficiar do SPG.
- (3) A lista de países beneficiários do regime geral do SPG referida no artigo 1.º, n.º 2, alínea a), do Regulamento (UE) n.º 978/2012 é estabelecida no anexo II do mesmo regulamento. O artigo 5.º, n.º 2, do Regulamento (UE) n.º 978/2012 estabelece que o anexo II deve ser revisto, o mais tardar, em 1 de janeiro de cada ano. A revisão deve ter em conta a evolução das condições económicas, de desenvolvimento ou comerciais dos países beneficiários em relação aos critérios estabelecidos no artigo 4.º.
- (4) Nos termos do artigo 5.º, n.º 2, do Regulamento (UE) n.º 978/2012, deve ser dado aos países e operadores económicos beneficiários do SPG o tempo necessário para estes se adaptarem corretamente à revisão do estatuto SPG do país. Assim sendo, o regime SPG deve continuar durante um ano após a data de entrada em vigor de uma alteração no estatuto do país, como previsto no artigo 4.º, n.º 1, alínea a), e durante dois anos a partir da data de aplicação do regime de acesso preferencial ao mercado, conforme previsto no artigo 4.º, n.º 1, alínea b).
- (5) O Paraguai foi classificado pelo Banco Mundial como um país de rendimento médio-elevado em 2015, 2016 e 2017. Por conseguinte, o Paraguai deixou de satisfazer as condições para beneficiar do estatuto de país beneficiário do SPG ao abrigo do artigo 4.º, n.º 1, alínea a), do Regulamento (UE) n.º 978/2012, e deve ser retirado da lista de países beneficiários do SPG no anexo II do referido regulamento, com aplicação a partir de 1 de janeiro de 2019.
- (6) Os acordos de acesso preferencial ao mercado começaram a aplicar-se à Costa do Marfim em 3 de setembro de 2016, à Suazilândia em 10 de outubro de 2016 e ao Gana em 15 de dezembro de 2016. Por conseguinte, em conformidade com o artigo 4.º, n.º 1, alínea b), a Costa do Marfim, a Suazilândia e o Gana devem igualmente ser retirados do anexo II do Regulamento (UE) n.º 978/2012, com aplicação a partir de 1 de janeiro de 2019.
- (7) O artigo 9.º, n.º 1, do Regulamento (UE) n.º 978/2012 estabelece os critérios de elegibilidade específicos para a concessão, aos países beneficiários do SPG, das preferências pautais ao abrigo do regime especial de incentivo ao desenvolvimento sustentável e à boa governação (SPG+). A lista de países beneficiários do SPG+ é estabelecida no anexo III do Regulamento (UE) n.º 978/2012.
- (8) Em consequência de deixar de ser um país beneficiário do SPG a partir de 1 de janeiro de 2019, o Paraguai deixa também de ser beneficiário do SPG+ ao abrigo do artigo 9.º, n.º 1, do Regulamento (UE) n.º 978/2012. Por conseguinte, o Paraguai deve ser retirado do anexo III desse regulamento, com aplicação a partir de 1 de janeiro de 2019.

<sup>(1)</sup> JO L 303 de 31.10.2012, p. 1.

- (9) O artigo 17.º, n.º 1, do Regulamento (UE) n.º 978/2012 prevê que um país que seja identificado pela Organização das Nações Unidas (ONU) como um país menos avançado deve beneficiar das preferências pautais concedidas ao abrigo do regime especial a favor dos países menos avançados, o regime TMA («Tudo Menos Armas»). A lista dos países beneficiários do regime TMA consta do anexo IV do referido regulamento.
- (10) A ONU graduou a Guiné Equatorial da categoria dos países menos avançados em 4 de junho de 2017. Assim sendo, a Guiné Equatorial deixou de satisfazer as condições para beneficiar do estatuto de beneficiário do TMA ao abrigo do artigo 17.º, n.º 1, devendo ser retirada do anexo IV do referido regulamento. Nos termos do artigo 17.º, n.º 2, do Regulamento (UE) n.º 978/2012, a retirada da Guiné Equatorial da lista de países beneficiários do TMA deve ser aplicável após um período transitório de três anos a contar da data de entrada em vigor do presente regulamento, a saber, 1 de janeiro de 2021.
- (11) Além disso, a Guiné Equatorial foi classificada pelo Banco Mundial como país de rendimento elevado em 2015 e como país de rendimento médio-elevado em 2016 e 2017. Por conseguinte, a Guiné Equatorial deixou de satisfazer as condições para beneficiar do estatuto de país beneficiário do SPG ao abrigo do artigo 4.º, n.º 1, alínea a), do Regulamento (UE) n.º 978/2012, e deve ser retirada da lista de países beneficiários do SPG no anexo II do referido regulamento, com aplicação a partir de 1 de janeiro de 2021,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

*Artigo 1.º*

#### **Alterações do Regulamento (UE) n.º 978/2012**

O Regulamento (UE) n.º 978/2012 é alterado do seguinte modo:

- 1) No anexo II, os seguintes códigos alfabéticos e os países correspondentes são suprimidos das colunas A e B, respetivamente:

CI Costa do Marfim

GH Gana

PY Paraguai

SZ Suazilândia

- 2) No anexo III, o seguinte código alfabético e o país correspondente são suprimidos das colunas A e B, respetivamente:

PY Paraguai

- 3) Nos anexos II e IV, o seguinte código alfabético e o país correspondente são suprimidos das colunas A e B, respetivamente:

GQ Guiné Equatorial

*Artigo 2.º*

#### **Entrada em vigor e aplicação**

O presente regulamento entra em vigor em 1 de janeiro de 2018.

O artigo 1.º, n.ºs 1 e 2, é aplicável a partir de 1 de janeiro de 2019.

O artigo 1.º, n.º 3, é aplicável a partir de 1 de janeiro de 2021.

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

Feito em Bruxelas, em 27 de setembro de 2017.

*Pela Comissão*  
*O Presidente*  
Jean-Claude JUNCKER

---

**REGULAMENTO DELEGADO (UE) 2018/149 DA COMISSÃO****de 15 de novembro de 2017****que altera o Regulamento Delegado (UE) 2016/1238 da Comissão no respeitante aos requisitos de composição e às características de qualidade do leite e dos produtos lácteos elegíveis para intervenção pública e para a ajuda ao armazenamento privado**

A COMISSÃO EUROPEIA,

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

Tendo em conta o Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de dezembro de 2013, que estabelece uma organização comum dos mercados dos produtos agrícolas e que revoga os Regulamentos (CEE) n.º 922/72, (CEE) n.º 234/79, (CE) n.º 1037/2001 e (CE) n.º 1234/2007 do Conselho <sup>(1)</sup>, nomeadamente o artigo 19.º, n.º 1, alínea a),

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento Delegado (UE) 2016/1238 da Comissão <sup>(2)</sup> estabelece os requisitos de composição e as características de qualidade do leite e dos produtos lácteos elegíveis para intervenção pública e para a ajuda ao armazenamento privado.
- (2) Devido aos vários melhoramentos técnicos introduzidos na metodologia adotada na análise e avaliação da qualidade do leite e dos produtos lácteos e de modo a harmonizar as regras em vigor na União relativas aos requisitos de higiene, é necessário rever e atualizar os parâmetros dos requisitos de composição e das características de qualidade de determinados produtos lácteos elegíveis para intervenção pública e para a ajuda ao armazenamento privado.
- (3) Os anexos IV e V do Regulamento Delegado (UE) 2016/1238 da Comissão devem, por conseguinte, ser alterados em conformidade,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

*Artigo 1.º*

Os anexos do Regulamento Delegado (UE) 2016/1238 são alterados do seguinte modo:

- a) no anexo IV, a parte II é substituída pelo texto constante do anexo I do presente regulamento;
- b) no anexo V, a parte II é substituída pelo texto constante do anexo II do presente regulamento.

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

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

Feito em Bruxelas, em 15 de novembro de 2017.

*Pela Comissão*  
*O Presidente*  
Jean-Claude JUNCKER

---

<sup>(1)</sup> JO L 347 de 20.12.2013, p. 671.

<sup>(2)</sup> Regulamento Delegado (UE) 2016/1238 da Comissão, de 18 de maio de 2016, que complementa o Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, no que se refere à intervenção pública e à ajuda ao armazenamento privado (JO L 206 de 30.7.2016, p. 15).

## ANEXO I

## «PARTE II

**Requisitos de composição e características de qualidade**

A manteiga é uma emulsão sólida, essencialmente de água em óleo, com as seguintes características de composição e qualidade:

Parâmetros	Teor e características de qualidade
Matéria gorda	Mínimo 82 %
Água	Máximo 16 %
Resíduo seco isento de matéria gorda	Máximo 2 %
Acidez da matéria gorda	Máximo 1,2 mmole/100 g de matéria gorda
Índice de peróxidos	Máximo 0,3 meq de oxigénio/1 000 g de matéria gorda
Matérias gordas não lácteas	Não detetáveis na análise de triglicéridos
Características organoléticas	Mínimo 4 pontos em 5 no aspeto, no aroma e na consistência»

## ANEXO II

## «PARTE II

**Requisitos de composição e características de qualidade**

Parâmetros	Teor e características de qualidade
Proteínas	Mínimo 34,0 % do resíduo seco isento de matéria gorda
Matéria gorda	Máximo 1,00 %
Água	Máximo 3,5 %
Acidez titulável, em mililitros de solução decinormal de hidróxido de sódio	Máximo 19,5 ml
Lactatos	Máximo 150 mg/100 g
Prova da fosfatase	Negativo, i.e., não superior a 350 mU de atividade fosfatásica por litro de leite reconstituído
Índice de insolubilidade	Máximo 0,5 ml (24 °C)
Partículas queimadas	Máximo 15,0 mg, i.e., mínimo disco B
Microrganismos	Máximo 40 000 UFC por grama
Leitelho <sup>(1)</sup>	Nenhum <sup>(2)</sup>
Lactossoro de coagulação <sup>(3)</sup>	Nenhum
Lactossoro ácido <sup>(3)</sup>	Nenhum <sup>(4)</sup> ou máximo 150 mg/100 g <sup>(5)</sup>
Sabor e odor	Francos
Aspeto	Cor branca ou ligeiramente amarelada, ausência de impurezas e de partículas coloridas

<sup>(1)</sup> «Leitelho»: subproduto resultante da produção da manteiga, obtido por batedura ou butirificação da nata e separação da fase gorda sólida.

<sup>(2)</sup> A ausência de leitelho deve ser determinada mediante um controlo sem aviso prévio nos centros de produção, efetuado pelo menos uma vez por semana, ou por análise em laboratório do produto acabado, que indique 69,31 mg de dipalmitoilfosfatidiletanolamina (PEDP) por 100 g, no máximo.

<sup>(3)</sup> «Lactossoro»: subproduto resultante da produção do queijo ou da caseína, obtido por meio da ação de ácidos, de coalho e/ou de processos físico/químicos.

<sup>(4)</sup> Quando se realizam inspeções no local.

<sup>(5)</sup> Quando se aplica a norma ISO 8069.»

**REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) 2018/150 DA COMISSÃO****de 30 de janeiro de 2018****que altera o Regulamento (UE) 2016/1240 no respeitante aos métodos a utilizar para a análise e a avaliação da qualidade do leite e dos produtos lácteos elegíveis para intervenção pública e para a ajuda ao armazenamento privado**

A COMISSÃO EUROPEIA,

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

Tendo em conta o Regulamento (UE) n.º 1306/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de dezembro de 2013, relativo ao financiamento, à gestão e ao acompanhamento da política agrícola comum e que revoga os Regulamentos (CEE) n.º 352/78, (CE) n.º 165/94, (CE) n.º 2799/98, (CE) n.º 814/2000, (CE) n.º 1290/2005 e (CE) n.º 485/2008 do Conselho <sup>(1)</sup>, nomeadamente o artigo 62.º, n.º 2, alínea i),

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento Delegado (UE) 2016/1238 da Comissão <sup>(2)</sup> e o Regulamento de Execução (UE) 2016/1240 da Comissão <sup>(3)</sup> estabelecem as regras aplicáveis à intervenção pública e à ajuda ao armazenamento privado. O Regulamento (CE) n.º 273/2008 da Comissão <sup>(4)</sup> estabelece os métodos a aplicar para avaliar se o leite e os produtos lácteos cumprem os requisitos de elegibilidade estabelecidos nos referidos regulamentos para efeitos de intervenção pública e de ajuda ao armazenamento privado.
- (2) Tendo em conta os avanços técnicos nas metodologias utilizada para a análise e a avaliação da qualidade do leite e dos produtos lácteos, importa adotar alterações substanciais para simplificar e para providenciar referências atualizadas das normas ISO. Por uma questão de clareza e de eficiência, e tendo em conta o alcance e a natureza técnica das alterações às disposições do Regulamento (CE) n.º 273/2008, as disposições pertinentes desse regulamento devem ser inseridas no Regulamento de Execução (UE) 2016/1240.
- (3) De modo a garantir a observância uniforme dos novos métodos e regras em todos os Estados-Membros, os laboratórios devem dispor de um período suficiente para rever procedimentos e aplicar os métodos atualizados.
- (4) O Regulamento de Execução (UE) 2016/1240 deve, por conseguinte, ser alterado em conformidade.
- (5) No interesse da segurança jurídica, o Regulamento (CE) n.º 273/2008 deve ser revogado.
- (6) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité para a Organização Comum dos Mercados Agrícolas,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

*Artigo 1.º*

O Regulamento de Execução (UE) 2016/1240 é alterado do seguinte modo:

- 1) O artigo 4.º é alterado do seguinte modo:
  - a) O n.º 1 é alterado do seguinte modo:
    - i) A alínea d) passa a ter a seguinte redação:

«d) manteiga: anexo IV, parte I e parte I-A, do presente regulamento»;
    - ii) A alínea e) passa a ter a seguinte redação:

«e) leite em pó desnatado: anexo V, parte I e parte I-A, do presente regulamento»;

<sup>(1)</sup> JO L 347 de 20.12.2013, p. 549.

<sup>(2)</sup> Regulamento Delegado (UE) 2016/1238 da Comissão, de 18 de maio de 2016, que complementa o Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere à intervenção pública e à ajuda à armazenagem privada (JO L 206 de 30.7.2016, p. 15).

<sup>(3)</sup> Regulamento Delegado (UE) 2016/1240 da Comissão, de 18 de maio de 2016, que estabelece normas de execução do Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere à intervenção pública e à ajuda ao armazenamento privado (JO L 206 de 30.7.2016, p. 71).

<sup>(4)</sup> 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).



b) O n.º 2 passa a ter a seguinte redação:

«2. Os métodos a utilizar para determinar a qualidade dos cereais, manteiga e leite em pó desnatado elegíveis para intervenção pública referidos nos anexos I, IV e V, respetivamente, são os métodos estabelecidos pela última versão das correspondentes normas europeias ou internacionais vigentes pelo menos 6 meses antes do primeiro dia do período de intervenção pública, tal como definido no artigo 12.º do Regulamento (UE) n.º 1308/2013.»

2) É aditado um artigo 60.º-A com a seguinte redação:

«Artigo 60.º-A

**Disposições específicas sobre os controlos relativos à intervenção pública e à ajuda ao armazenamento privado para o leite e os produtos lácteos**

1. A elegibilidade da manteiga, do leite em pó desnatado e do queijo para beneficiarem de ajudas ao armazenamento privado deve ser determinada em conformidade com os métodos definidos nos anexos VI, VII e VIII, respetivamente.

Esses métodos devem ser determinados com base na última versão das correspondentes normas europeias ou internacionais vigentes pelo menos 6 meses antes do primeiro dia do período de intervenção pública, tal como definido no artigo 12.º do Regulamento (UE) n.º 1308/2013.

2. Os resultados dos controlos efetuados por meio dos métodos previstos no presente regulamento devem ser avaliados de acordo com o anexo IX.»

3) Os anexos são alterados em conformidade com o anexo do presente regulamento.

*Artigo 2.º*

O Regulamento (CE) n.º 273/2008 é revogado.

*Artigo 3.º*

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

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

Feito em Bruxelas, em 30 de janeiro de 2018.

*Pela Comissão*  
*O Presidente*  
Jean-Claude JUNCKER

## ANEXO

Os anexos do Regulamento de Execução (UE) 2016/1240 são alterados do seguinte modo:

1) O anexo IV é alterado do seguinte modo:

a) Na parte I, ponto 2, o segundo parágrafo passa a ter a seguinte redação:

«Cada amostra deve ser examinada individualmente. Não é autorizada qualquer repetição da colheita de amostras ou sua reapreciação.»

b) É aditada a seguinte parte I-A:

## «PARTE I-A

**Métodos de análise de manteiga sem sal para intervenção pública**

Parâmetro	Método
Matéria gorda <sup>(1)</sup>	ISO 17189 ou ISO 3727, parte 3
Humidade	ISO 3727, parte 1
Resíduo seco isento de matéria gorda	ISO 3727, parte 2
Acidez da matéria gorda	ISO 1740
Índice de peróxidos	ISO 3976
Matérias gordas não-lácteas	ISO 17678
Características organoléticas	ISO 22935, partes 2 e 3, e tabela de pontuação seguinte.

<sup>(1)</sup> O método a aplicar deve ser aprovado pelo organismo pagador.

**Quadro de classificação**

Aspeto		Consistência		Sabor e aroma	
Pontos	Observações	Pontos	Observações	Pontos	Observações
5	<i>Muito bom</i> Tipo ideal Qualidade superior (sem humidade visível)	5	<i>Muito boa</i> Tipo ideal Qualidade superior (uniformemente barrável)	5	<i>Muito bom</i> Tipo ideal Qualidade superior (aroma absolutamente puro e perfeito)
4	<i>Bom</i> (sem defeitos evidentes)	4	<i>Boa</i> (sem defeitos evidentes)	4	<i>Bom</i> (sem defeitos evidentes)
1, 2 ou 3	Qualquer defeito	1, 2 ou 3	Qualquer defeito	1, 2 ou 3	Qualquer defeito»

2) Ao anexo V é aditada a seguinte parte I-A:

«PARTE I-A

**Métodos de análise de leite em pó desnatado para intervenção pública**

Parâmetro	Método
Proteínas	ISO 8968, parte 1
Matéria gorda	ISO 1736
Humidade	ISO 5537
Acidez	ISO 6091
Lactatos	ISO 8069
Prova da fosfatase	ISO 11816, parte 1
Índice de insolubilidade	ISO 8156
Partículas queimadas <sup>(1)</sup>	ADPI ( <i>American Dairy Products Institute</i> )
Microrganismos	ISO 4833 parte 1
Leitelho	Apêndice I
Soro de coagulação <sup>(2)</sup>	Apêndices II e III
Soro ácido <sup>(3)</sup>	ISO 8069 ou inspeções no local
Exames organoléticos <sup>(4)</sup>	ISO 22935, partes 2 e 3

<sup>(1)</sup> A análise de partículas queimadas pode ou não ser realizada de forma sistemática. No entanto, devem realizar-se essas análises sempre que não se efetuam exames organoléticos.

<sup>(2)</sup> O método a aplicar deve ser aprovado pelo organismo pagador (um método ou ambos).

<sup>(3)</sup> O método a aplicar deve ser aprovado pelo organismo pagador.

<sup>(4)</sup> Devem ser efetuados exames organoléticos se tal for considerado necessário após uma análise de riscos aprovada pelo organismo pagador.

*Apêndice I***LEITE EM PÓ DESNATADO: DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA FOSFATIDILSERINA E DA FOSFATIDILETANOLAMINA*****Método: HPLC com inversão de fases*****1. OBJETO 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 deteção de sólidos de leite nesse leite em pó.

**2. DEFINIÇÃO**

Teor de PS+PE: fração 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**

Extração, 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 deteção 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 mínimo 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 a aproximação de 1 mg, com leitura das décimas de miligrama****5.2. Copos de 25 e de 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 100 µl****5.8. Banho de ultrassons****5.9. Centrifugadora capaz de atingir 27 000 g****5.10. Frascos de vidro de 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. Injetor automático, com possibilidade de derivação

5.13.3. Câmara aquecida, capaz de manter a coluna a 30 °C ± 1 °C

5.13.4. Detetor 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 LiChrospher® — 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 efetuada 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 monoclóridrato 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 °C ± 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 balão, 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 por HPLC.

### 7.3. Preparação da solução do padrão externo

- 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 °C ± 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 por 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 injetar: 50 µl do reagente para a obtenção de derivados e 50 µl da solução da amostra*

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 injetando 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. *Efetuar a sequência de análises cromatográficas mantendo um intervalo de tempo constante entre passagens, de modo a obter tempos de retenção constantes. Injetar a solução do padrão externo (7.3) entre cada 5-10 soluções da amostra a analisar, a fim de calcular o fator de resposta*

*Nota:* A coluna deve ser limpa, efetuando 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 o mínimo que precede o pico e o mínimo que se lhe segue.

7.6.2. *Pico da triptamina*

A eluição da triptamina produz um único pico (figura 1). Determinar a área do pico por integração entre o mínimo que precede o pico e o mínimo que se lhe segue.

7.6.3. *Grupos de picos da PS e da PE*

Nas condições descritas (figura 1), a eluição da PS produz dois picos principais, parcialmente sobrepostos, precedidos de um pico secundário. A eluição da 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<sub>1</sub> = Área do pico do PEDP da solução da amostra-padrão (7.3);

A<sub>2</sub> = Área do pico da PS ou da PE da solução da amostra para análise (7.2);

T<sub>1</sub> = Área do pico da triptamina da solução da amostra-padrão (7.3);

T<sub>2</sub> = 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 (\*).

### 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, na análise da mesma amostra, num curto intervalo de tempo, não deve exceder 2 %. 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

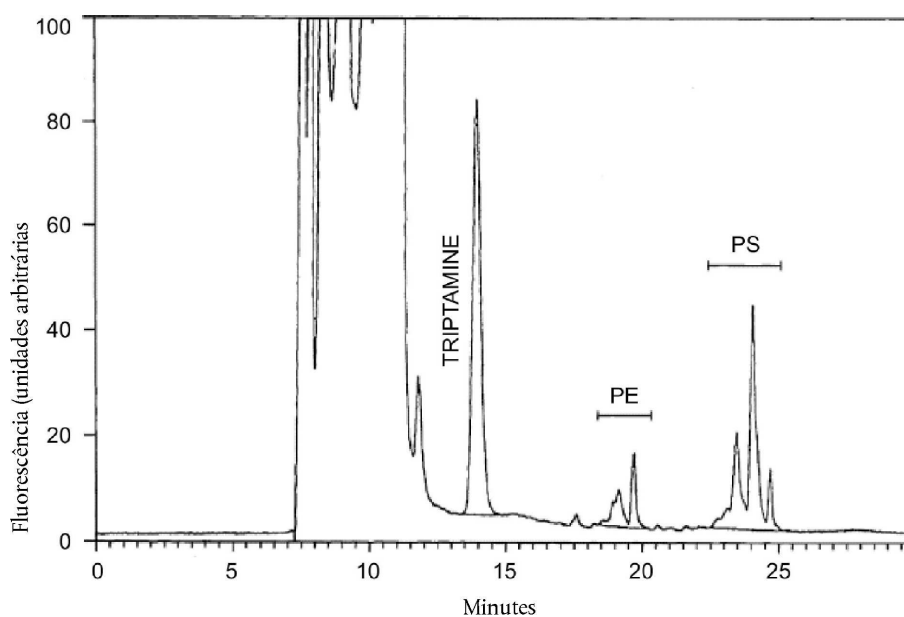
Se forem efetuadas duas determinações por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamento diferente, em condições diferentes, na análise da mesma amostra, a diferença relativa entre os dois resultados não deve exceder 11 % da média aritmética dos resultados.

## 10. REFERÊNCIAS

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., «Detection of buttermilk solids in skim milk 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 extrato metanólico de leite em pó desnatado reconstituído. É indicado o modo de integração dos picos da PS, da PE e da triptamina (padrão interno)**





## Apêndice II

**DETEÇÃO 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. OBJETO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

O presente método permite detetar 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 - Milk and Milk Products - Guidance on sampling.

## 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 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 ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) 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 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 12,37 g de di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 21,41 g de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 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  $\mu\text{m}$ .

5.3. **Solução de lavagem das colunas**

Misturar um volume de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) com nove volumes de água. Antes de a utilizar, filtrar a mistura através de um filtro de membrana com poros de 0,45  $\mu\text{m}$ .

*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 (i.e. [0])

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

## 6. EQUIPAMENTO

6.1. **Balança analítica**

6.2. **Em opção, centrífuga 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 °C ± 0,5 °C**

6.11. **Equipamento de HPLC, composto pelo seguinte:**

6.11.1. *Bomba*

6.11.2. *Injetor 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 (por exemplo: 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 °C ± 1 °C*

6.11.5. *Detetor UV de comprimento de onda variável, capaz de efetuar medições a 205 nm com a sensibilidade de 0,008 Å*

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 das amostras deve ser efetuada 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

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 quente (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 a 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 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. Injetar 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 fabricante das colunas.

Nota 2. 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 respetivo, 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 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 <sub>II</sub> :	área do pico II,
A <sub>III</sub> :	área do pico III.

É essencial examinar o aspeto de cada cromatograma antes de qualquer interpretação quantitativa, para detetar eventuais anomalias devidas a funcionamento deficiente do equipamento ou das colunas 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) exatamente 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 injeções 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 fatores de resposta, R, injetando um volume de filtrados (8.5.1) idêntico ao utilizado para as amostras.

#### 9. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

##### 9.1. Modo de cálculo e fórmulas

9.1.1. Cálculo dos fatores de resposta, R:

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

em que:

R<sub>II</sub> = fator de resposta do pico II,

A<sub>II</sub> [0] = área do pico II da amostra-padrão [0] obtida em 8.5.3;

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

em que:

- $R_{III}$  = fator de resposta do pico III,  
 $A_{III} [0]$  e  $A_{III} [5]$  = áreas dos picos III das amostras-padrão [0] e [5], respetivamente, 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, respetivamente, da amostra [E];  
 $A_{II} [E]$ ,  $A_{III} [E]$  = áreas dos picos II e III, respetivamente, da amostra [E] obtidas em 8.4.2;  
 $R_{II}$ ,  $R_{III}$  = fatores 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;  
 $RT_{III} [5]$  = 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  $\geq 1,000$  quando o teor de soro é  $\leq 5$  %.

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

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 de 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;  
 $1,3$  = área relativa média do pico III, expressa em gramas de soro de coagulação por 100 g, determinada com leites em pó desnatados não-adulterados de origens diversas; este valor foi obtido experimentalmente;  
 $S_{III} [0]$  = área relativa do pico III, igual a  $R_{III} \times A_{III} [0]$ ; valores obtidos em 9.1.1 e 8.5.3, respetivamente;  
 $(S_{III} [0] - 0,9)$  = correção 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 efetuadas 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).

#### 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  $\leq 2,0 + (S_{III}[O] - 0,9)$ ,

em que:

2,0	valor máximo admitido para a área relativa do pico III, tomando em consideração a área relativa média 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);
$(S_{III} [O] - 0,9)$	correção a introduzir quando a área $S_{III} [O]$ for diferente de 0,9 (ver o ponto 9.2).

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

9.4.3. Se a área relativa do pico III,  $S_{III}$  [E], for  $> 2,0 + (S_{III}[O] - 0,9)$  e a área relativa do pico II,  $S_{II}$  [E], for  $\leq 160$ , 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 reta a cheio representa a regressão linear, cujos coeficientes foram calculados pelo método dos mínimos quadrados.

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

As equações das retas 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 de pico  $S_{II}$  [E];

P % teor de 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:  $T_1 = S_{III}[E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III}[O] - 0,9)]$ ;  $T_2 = S_{III}[E] - [(0,0123 S_{II}[E] + 0,93) + (S_{III}[O] - 0,9)]$ .

9.4.3.2. Se  $T_1$  e/ou  $T_2$  forem iguais ou inferiores a zero, não se pode concluir pela presença ou não de soro de coagulação.

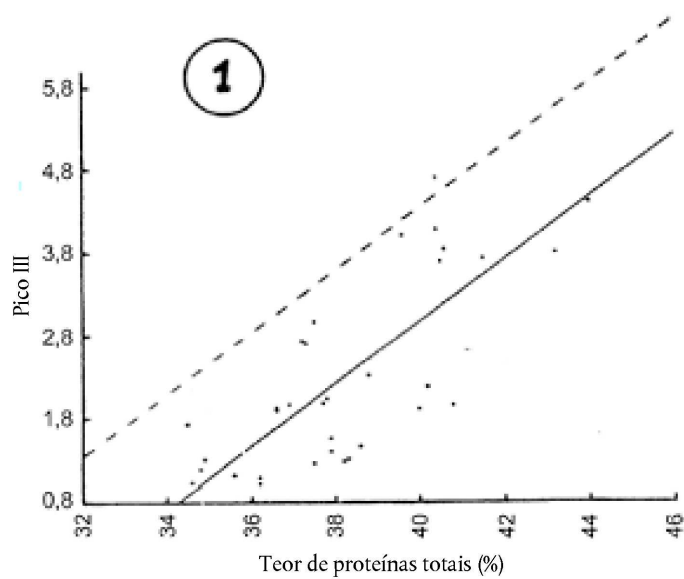
Se  $T_1$  e/ou  $T_2$  forem superiores a zero, fica comprovada a presença de soro de coagulação.

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

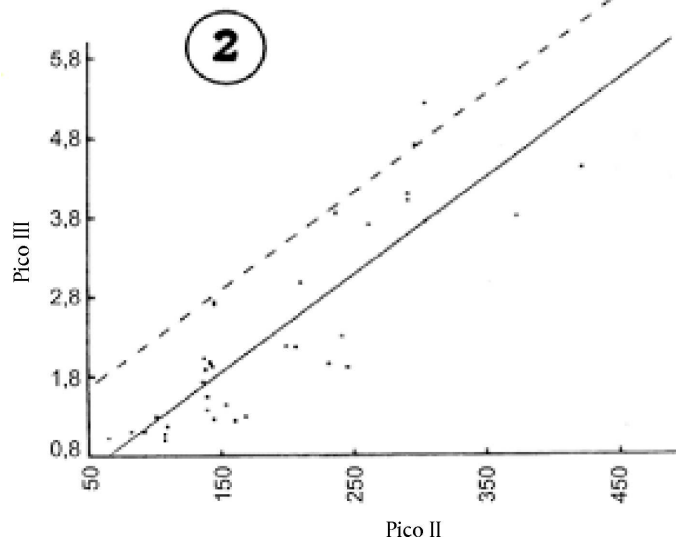
em que:

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

#### Leite em pó desnatado



#### Leite em pó desnatado



## Apêndice III

**DETEÇÃO DE SÓLIDOS DE SORO DE COAGULAÇÃO EM LEITE EM PÓ DESNATADO**

1. OBJECTO: DETECÇÃO DA ADIÇÃO DE SÓLIDOS DE SORO DE COAGULAÇÃO A LEITE EM PÓ DESNATADO.

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

As amostras são analisadas para detecção de caseinomacropéptidos A por um método de 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.

5.1. **Solução de ácido tricloroacético**

Dissolver 240 g de ácido tricloroacético ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) 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 ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), 20 ml de isopropanol ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ ) e 1,00 ml de ácido trifluoroacético (TFA,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) 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 o utilizar, filtrar o eluente através de um filtro de membrana com poros de 0,45  $\mu\text{m}$ .

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 (i.e. [0]).*

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

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

6. EQUIPAMENTO

6.1. **Balança analítica**

6.2. **Em opção, centrífugadora 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 °C ± 0,5 °C**
- 6.11. **Equipamento de HPLC, composto por:**
  - 6.11.1. *Sistema de bombagem de gradiente binário*
  - 6.11.2. *Injetor 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, com enchimento de sílica de poros largos*
  - 6.11.4. *Câmara termostática para a coluna, regulada para 35 °C ± 1 °C*
  - 6.11.5. *Detetor UV de comprimento de onda variável, capaz de efetuar medições a 210 nm (se necessário, pode ser utilizado um comprimento de onda superior, até 220 nm) com a sensibilidade de 0,02 Å*
  - 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 das amostras deve ser efetuada 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

### 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  $2,00 \pm 0,001$  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 cinco 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 vigorosamente 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. O método HPLC com inversão de fases exclui a possibilidade de resultados falsamente positivos devido à presença de leite ácido em pó.
- 8.4.2. Antes de se proceder à análise HPLC com inversão de fases, devem ser otimizadas 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 injetor, inclusive), o tempo de retenção ótimo para os  $CMP_A$  é de  $26 \pm 2$  minutos. Os sistemas de gradiente com menos volume morto (por exemplo: 2 ml) devem utilizar 22 minutos como tempo de retenção ótimo.

Tomar as soluções de amostras-padrão (5.4) sem e com 50 % de soro de coagulação.

Injetar 100  $\mu$ l 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 otimização da cromatografia

Tempo (minutos)	Caudal (ml/minuto)	% A	% B	Curva
Inicial	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  $CMP_A$ .

Utilizando a fórmula a seguir indicada, pode calcular-se a composição inicial do solvente a utilizar para o gradiente normal (ver 8.4.3):  $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 30 / 27$  %;  $B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} - 26) / 6) \times 1,11$ .

em que:

- $RT_{cmpA}$ : tempo de retenção dos  $CMP_A$  com o gradiente de aferição;
- 10: % B inicial no gradiente de aferição;
- 2,5: % B no ponto médio menos % B inicial no 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

Injetar 100  $\mu$ l 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 injeção, 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 cinco minutos. Esta composição é mantida durante cinco minutos, voltando depois a mudar em cinco minutos, através de um gradiente linear, para a composição inicial. A injeção 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  $26 \pm 2$  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. Tal 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 injetada a amostra de referência (5), que será utilizada para calcular um novo fator 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 incorretamente localizada.

*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 projeção 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 se recorra a uma linha de base comum, verificar a sua aplicabilidade às amostras e ao padrão.

É essencial examinar o aspeto de cada cromatograma antes de qualquer interpretação quantitativa, para detetar eventuais anomalias devidas a 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) exatamente 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 injetor 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. Nesta figura, o pico dos  $CMP_A$  é precedido por dois pequenos picos. É essencial obter uma separação semelhante.

- 8.5.2. *Antes da determinação cromatográfica às amostras, injetar 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 fatores de resposta,  $R$ , injetando um volume de filtrados (8.5.1) idêntico ao utilizado para as amostras*

## 9. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

### 9.1. **Modo de cálculo e fórmulas**

- 9.1.1. *Cálculo do fator de resposta  $R$ :*

$$\text{Pico dos } CMP_A: R = W/H$$

em que:

$R$  = fator 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 da amostra

$$W(E) = R \times H(E)$$

em que:

W(E) = percentagem (m/m) de soro de coagulação presente na amostra (E);

R = fator de resposta do pico dos CMP<sub>A</sub> (9.1.1);

H(E) = altura do pico dos CMP<sub>A</sub> 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 efetuadas 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).

### 9.3.2. Reprodutibilidade

Não determinada.

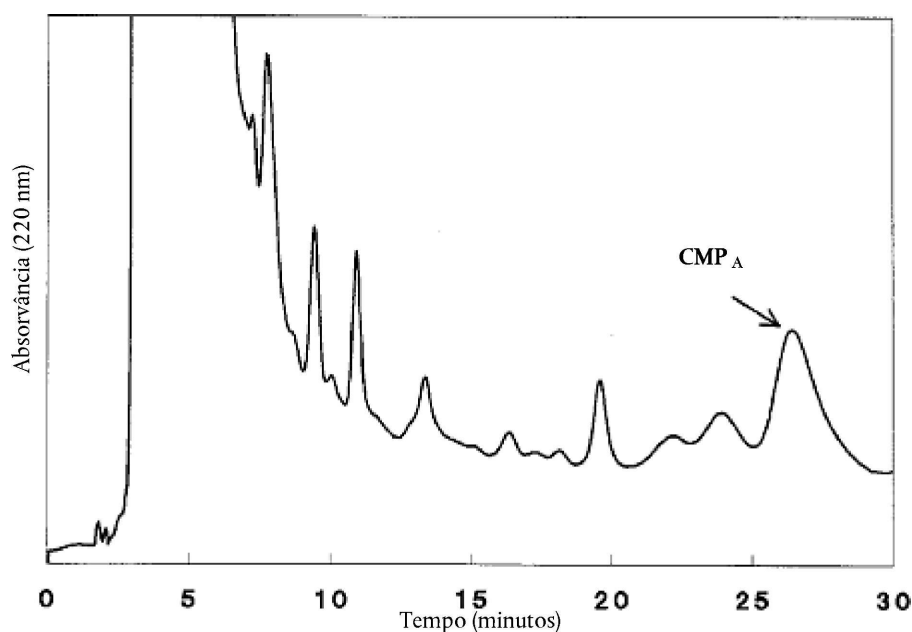
### 9.3.3. Linearidade

Entre 0 % e 16 % de soro de coagulação, deve ser obtida uma relação linear com um coeficiente de correlação superior a 0,99.

## 9.4. Interpretação

O limite de 1 % a inclui incerteza associada à reprodutibilidade.

Figura 1  
Padrão Ni-4.6



(\*) Norma internacional IDF 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure.»

3) São aditados os seguintes anexos:

«ANEXO VI

**Métodos de análise de manteiga em armazenamento privado**

Parâmetro	Método
Matéria gorda <sup>(1)</sup>	ISO 17189 ou ISO 3727, parte 3
Humidade	ISO 3727, parte 1
Resíduo seco isento de matéria gorda (exceto sal)	ISO 3727, parte 2
Sal	ISO 15648

<sup>(1)</sup> O método a aplicar deve ser aprovado pelo organismo pagador.

ANEXO VII

**Métodos de análise de leite em pó desnatado em armazenamento privado**

Parâmetro	Método
Matéria gorda	ISO 1736
Proteínas	ISO 8968, parte 1
Humidade	ISO 5537

## ANEXO VIII

**Métodos de análise de queijo em armazenamento privado**

1. O método de análise descrito no apêndice 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 contém caseína de leite de vaca.

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 apêndice.

2. Podem ser utilizados outros métodos de deteção de caseína de leite de vaca nos queijos referidos no n.º 1, nas seguintes condições:
  - a) O limite de deteção é, no máximo, de 0,5 %; e
  - b) Não se observam falsos resultados positivos; e
  - c) A caseína de leite de vaca é detetável 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, deve ser usado o método descrito no apêndice.

---

## Apêndice

**MÉTODO 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. OBJETO

Deteção de leite de vaca e de caseinatos provenientes de leite de vaca em queijos produzidos com leite de ovelha, leite de cabra e leite de búfala ou com misturas de leites de ovelha, cabra e búfala, por focagem isoelétrica das  $\gamma$ -caseínas após plasminólise.

## 2. ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Este método é adequado para uma deteção sensível e específica de leite de vaca cru ou tratado termicamente e de caseinatos provenientes desses leites 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. Não é adequado para a deteção 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 isoelétrica das caseínas tratadas com plasmina, na presença de ureia, e coloração das proteínas.

3.4. Avaliação das bandas coradas de  $\gamma_3$ -caseína e de  $\gamma_2$ -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 isoelétrica**

## 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 e

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

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

*Nota:* Em vez das quantidades indicadas das acrilamidas neurotóxicas, pode ser 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  $\mu$ S, 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  $\mu$ m.

#### 4.1.2. Solução de gel

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

9,0 ml de solução de reserva,

24 mg de  $\beta$ -alanina,

500  $\mu$ l de anfólitos de pH 3,5-9,5,

250  $\mu$ l de anfólitos de pH 5-7,

250  $\mu$ l de anfólitos de pH 6-8.

Misturar a solução de gel e desgaseificar durante 2 a 3 minutos num banho de ultrassons 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'-tetrametiletenodiamina (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 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

e 250 mg de ditiotreitol

em água e completar o volume até 50 ml.

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

**4.7. Reagentes para clivagem das caseínas pela plasmina****4.7.1. Solução-tampão de carbonato de amónio**

Titular, até pH 8, uma solução 0,2 mol/l de hidrogenocarbonato de amónio (1,58 g/100 ml de água) contendo 0,05 mol/l de ácido etilendiaminotetracético (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 (EC 3.4.21.7), com atividade de, pelo menos, 5 U/ml.****4.7.3. Solução de ácido  $\epsilon$ -aminocapróico para inibição enzimática**

Dissolver 2,624 g de ácido  $\epsilon$ -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  $\mu$ l de coalho de vitelo (atividade 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. Em seguida, mói-se finamente o leite liofilizado, 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 isoelétrica das caseínas tratadas com plasmina.

**Reagentes para 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 solução de descoloração fresca 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 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.

**4.11.2. Solução de coloração 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 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 figura1).**
- 5.4. **Câmara de eletrofocagem com placa de arrefecimento (por exemplo, 265 mm × 125 mm) e alimentação elétrica adequada ( $\geq 2,5$  kV) ou aparelho automático de eletroforese.**
- 5.5. **Crióstato de circulação, termostatizado a  $12\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .**
- 5.6. **Centrifugadora regulável a 3 000 g.**
- 5.7. **Eléctrodos de fita ( $\geq 265$  mm de comprimento).**
- 5.8. **Frascos conta-gotas de plástico para as soluções anódica e catódica.**
- 5.9. **Aplicadores de amostra (10 mm × 5 mm, viscosa ou papel de filtro com baixa adsorção de proteínas).**
- 5.10. **Tinas de aço inoxidável ou de vidro para coloração e descoloração (por exemplo, tabuleiros de instrumentos com 280 mm × 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 ultrassons.**
- 5.15. **Soldador de folhas.**
- 5.16. **Micropipetas de 25  $\mu\text{l}$ .**
- 5.17. **Concentrador de vácuo ou liofilizador.**
- 5.18. **Banho-maria termostático, regulável a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com agitador.**
- 5.19. **Densitómetro, com leitura a  $\lambda = 634$  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 (cinco 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, ajustada a pH 4,5 com ácido acético diluído (4.5.1), adicionar 20 ml de diclorometano (4.5.2), homogeneizar novamente e centrifugar (cinco minutos a 3 000 g). Retirar com uma espátula a camada de caseína que se encontra entre as fases aquosa e 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 (duas a três 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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

6.1.2. *Clivagem pela plasmina das  $\beta$ -caseínas, para intensificação das  $\gamma$ -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 ultrassons. Aquecer a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  e adicionar 10  $\mu\text{l}$  de plasmina (4.7.2), misturar e incubar durante 1 hora a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com agitação contínua. A fim de inibir as enzimas, adicionar 20  $\mu\text{l}$  de solução de ácido  $\epsilon$ -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  $\epsilon$ -aminocaproico 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. Enrolar a «sanduíche de gel» de modo a formar um tubo revestido de filme, soldar e guardar no frigorífico (no máximo seis 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 eletroforese (dois géis, dimensão 4,5 cm × 5 cm).

## 6.3. Focagem isoeletrica

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 anódica e catódica (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).

### Condições da focagem isoeletrica:

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

Etapa	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 <sup>(1)</sup>	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

<sup>(1)</sup> Aplicação da amostra: Depois da pré-focagem (etapa 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 eletroforese (dois géis de 5,0 cm × 4,5 cm), com eléctrodos sem fitas aplicados diretamente no gel*

Etapa	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 etapa 2 a 0 Vh.

Retirar o aplicador de amostras na etapa 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 a etapa 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 (duas a três horas) ou com um secador de cabelo (10 a 15 minutos).

*Nota 1:* Proceder à fixação, lavagem, coloração e descoloração a 20 °C. Não o fazer a 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 n.º 17-1150-01), as amostras de caseína tratadas com plasmina terão de ser diluídas a 5 mg/ml.

## 7. AVALIAÇÃO

A avaliação é efetuada por comparação das bandas proteicas da amostra desconhecida com as bandas dos padrões de referência no mesmo gel. A deteção 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 efetuada através da  $\gamma_3$ -caseína e da  $\gamma_2$ -caseína, cujos pontos isoeléctricos se situam entre pH 6,5 e pH 7,5 (figuras 4a, 4b e 5). O limite de deteção 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  $\gamma_2$ -caseína e da  $\gamma_3$ -caseína de ovelha (E), cabra (G) e/ou búfala (B) (ver « $\gamma_2$  E,G,B» e « $\gamma_3$  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 diretamente avaliada por comparação da intensidade da  $\gamma_3$ -caseína e da  $\gamma_2$ -caseína (ver « $\gamma_3$  C» e « $\gamma_2$  C» nas figuras 4a, 4b e 5) com as intensidades correspondentes dos padrões de referência (ovelha, cabra) ou padrões laboratoriais provisórios (búfala) a 0 % e 1 %.

## 7.2. Avaliação densitométrica

Se possível, determinar por densitometria (5.19) a razão entre as áreas dos picos da  $\gamma_2$ -caseína e da  $\gamma_3$ -caseína bovinas e as áreas dos picos da  $\gamma_2$ -caseína e da  $\gamma_3$ -caseína de ovelha, de cabra e/ou de búfala (ver figura 5). Comparar o valor obtido com a razão das áreas dos picos da  $\gamma_2$ -caseína e da  $\gamma_3$ -caseína dos padrões de referência (ovelha, cabra) ou padrões laboratoriais provisórios (búfala) a 1 % analisados no mesmo gel.

*Nota:* O método estará a funcionar satisfatoriamente caso exista um sinal positivo claro da  $\gamma_2$ -caseína e da  $\gamma_3$ -caseína bovinas no padrão de referência a 1 %, mas não no padrão de referência a 0 %. Caso contrário, otimizar os procedimentos, seguindo rigorosamente a descrição do método.

Considera-se uma amostra positiva se tanto a  $\gamma_2$ -caseína como a  $\gamma_3$ -caseína bovinas, ou as razões correspondentes de áreas de picos, forem iguais ou superiores aos níveis do padrão de referência a 1 %.

## 8. REFERÊNCIAS

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  $\gamma_2$ -caseins. *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).

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).

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  $\gamma$ -caseins using plasmin as signal amplifier. in *Electrophoresis-Forum 89* (B. J. Radola, ed.) pp. 389-393, Bode-Verlag, München (1989).

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).

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

Figura 1

### Representação esquemática da folha de cobertura

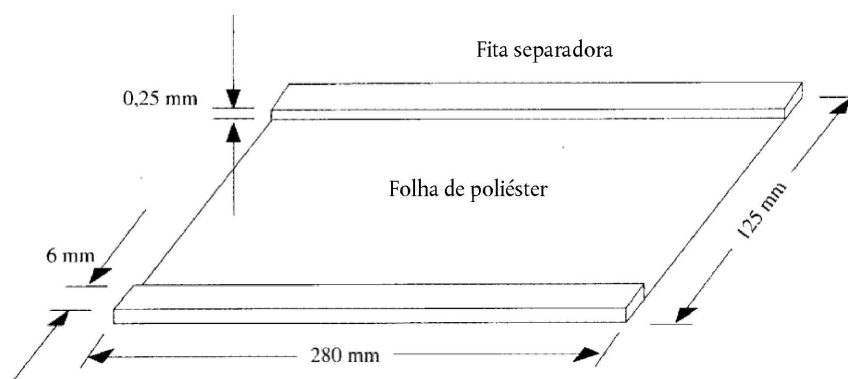


Figura 2

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

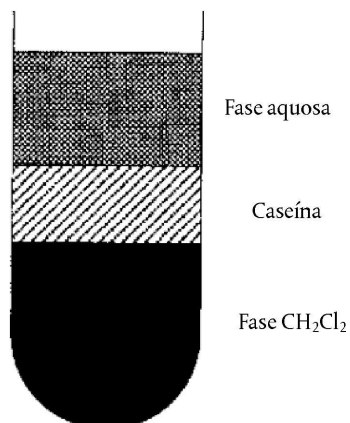
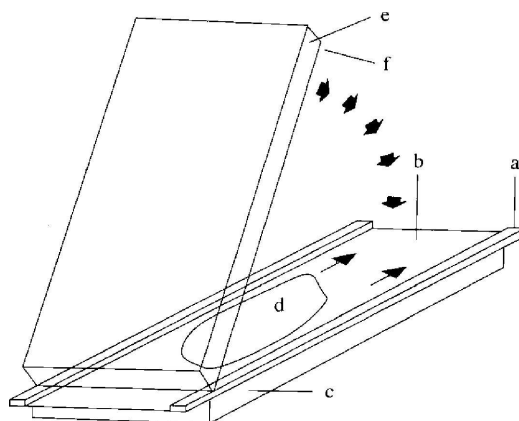


Figura 3

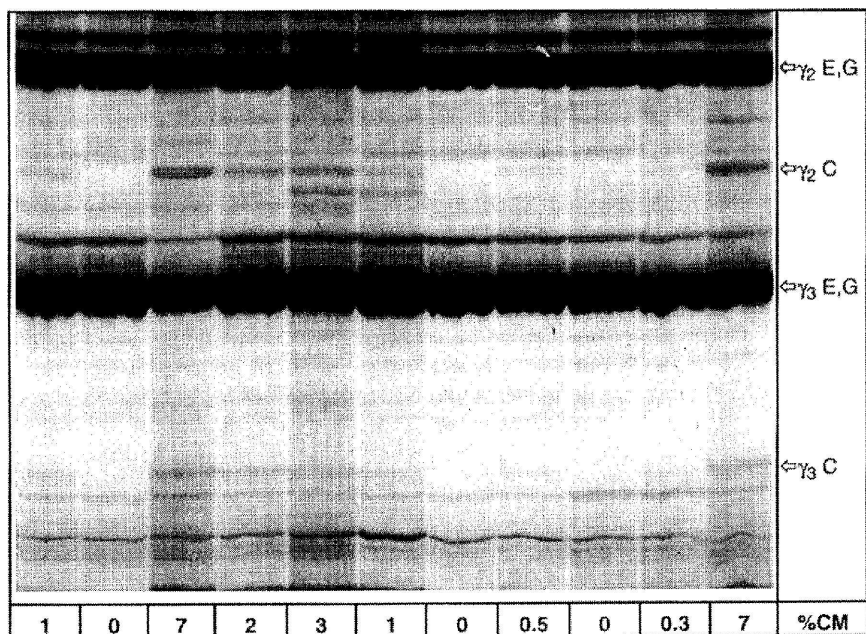
Técnica de rebatimento para distribuição de géis ultrafinos de poliacrilamida



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).

Figura 4a

Focagem isoelétrica de caseínas provenientes de queijo produzido com leites de ovelha e de cabra com diferentes quantidades de leite de vaca, após tratamento com plasmina

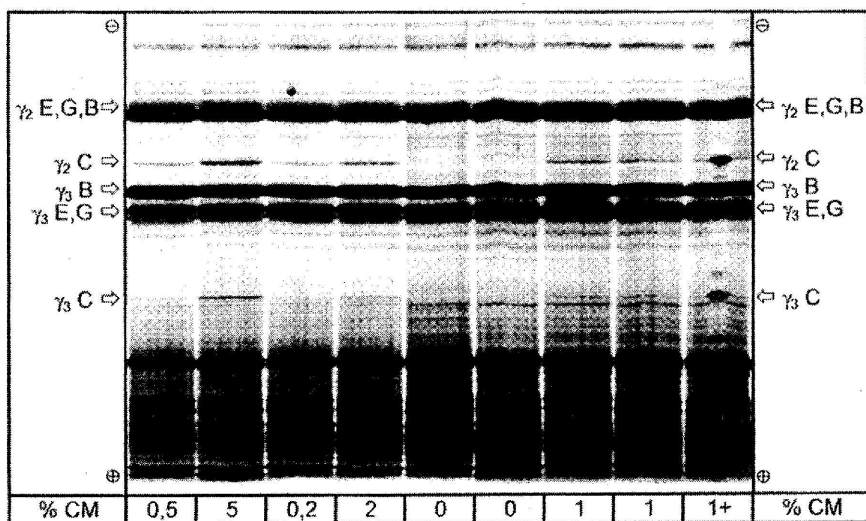


% CM = percentagem de leite de vaca; C = vaca; E = ovelha; G = cabra.

Apresenta-se a metade superior do gel da focagem isoelétrica.

Figura 4b

Focagem isoelétrica de caseínas provenientes de queijos produzidos com misturas de leites de ovelha, cabra e búfala, com diferentes quantidades de leite de vaca, após tratamento com plasmina

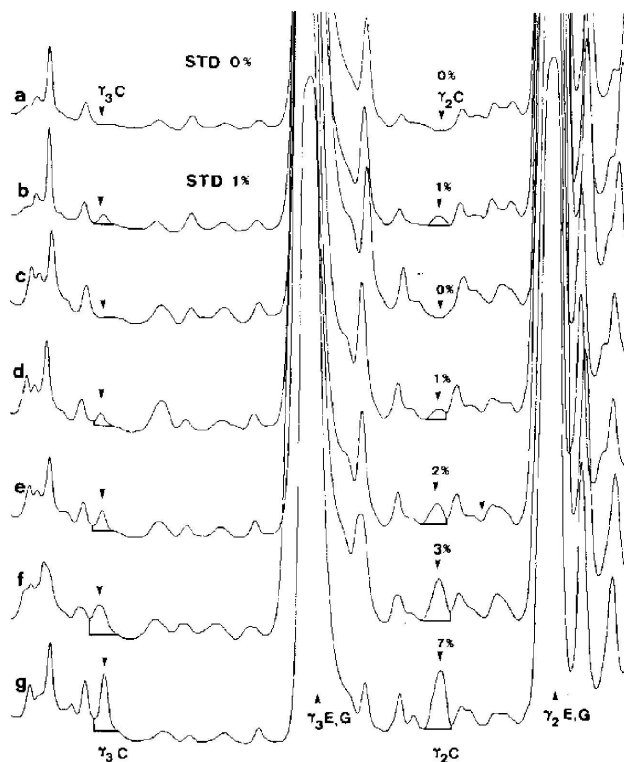


% CM = percentagem de leite de vaca; 1 + = amostra com 1 % de leite de vaca e com adição de caseína bovina pura a meio do percurso; C = vaca; E = ovelha; G = cabra; B = búfala.

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

Figura 5

Sobreposição de densitogramas de padrões (STD) e de amostras de queijos produzidos com misturas de leites de ovelha e de cabra, após focagem isoeletrica



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 da focagem isoeletrica a  $\lambda = 634$  nm.

## ANEXO IX

**Avaliação das análises****1. Garantia da qualidade**

As análises devem ser realizadas por laboratórios designados em conformidade com o artigo 12.º do Regulamento (CE) n.º 882/2004 (\*\*), ou designados pelas autoridades competentes do Estado-Membro.

**2. Amostragem e contestação dos resultados das análises**

1. A amostragem deve ser efetuada em conformidade com a regulamentação pertinente para o produto em causa. Na ausência de disposições expressamente previstas, aplicam-se as disposições da norma ISO 707, *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 o apêndice.
3. Para a realização das análises previstas pela legislação da UE, devem colher-se amostras em duplicado.
4. Se houver um diferendo quanto aos resultados, o organismo pagador deve providenciar a repetição da análise necessária do produto em causa, sendo os custos desta suportados pela parte vencida.

A análise acima referida só será efetuada se existirem duplicados selados das amostras do produto que tenham sido guardados de forma adequada pela autoridade competente. O fabricante deve enviar um pedido para efetuar a análise ao organismo pagador no prazo de 7 dias úteis, a contar da notificação dos resultados da primeira análise. O organismo pagador deve efetuar a segunda análise no prazo de 21 dias úteis, a contar da receção do pedido.

5. O resultado da segunda análise é definitivo.
  6. Se o fabricante conseguir provar, nos cinco dias úteis seguintes à colheita das amostras, que esta não foi efetuada corretamente, procede-se a nova colheita da amostra, na medida do possível. Caso não seja possível colher novas amostras, a remessa deve ser aceite.
-



## Apêndice

**Avaliação da conformidade de uma remessa com os limites legais****1. Princípio**

Sempre que a legislação atinente à intervenção pública e ao armazenamento privado estabeleça procedimentos de amostragem pormenorizados, aplicar-se-ão esses procedimentos. 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 deve ser 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  $\sigma_r$  e  $\sigma_R$ , ou 2) caso o método de validação tenha sido desenvolvido internamente, da 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,  $\sigma_r$ , e o desvio-padrão da reprodutibilidade,  $\sigma_R$ , 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:

;

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, deve proceder-se 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  $\sigma_r$  e  $\sigma_R$ , respetivamente, nas fórmulas de cálculo da incerteza expandida,  $U$ .

As regras a seguir para determinar a conformidade com o limite legal são as estabelecidas no 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, avaliando-se em seguida o resultado em conformidade com o ponto 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  $\gamma$ -caseínas.

(\*\*) Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo aos controlos 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 (JO L 165 de 30.4.2004, p. 1).»

**REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) 2018/151 DA COMISSÃO****de 30 de janeiro de 2018**

**que estabelece normas de execução da Diretiva (UE) 2016/1148 do Parlamento Europeu e do Conselho no respeitante à especificação pormenorizada dos elementos a ter em conta pelos prestadores de serviços digitais na gestão dos riscos que se colocam à segurança das redes e dos sistemas de informação, bem como à especificação pormenorizada dos parâmetros para determinar se o impacto de um incidente é substancial**

A COMISSÃO EUROPEIA,

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

Tendo em conta a Diretiva (UE) 2016/1148 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de julho de 2016, relativa a medidas destinadas a garantir um elevado nível comum de segurança das redes e da informação em toda a União <sup>(1)</sup>, nomeadamente o artigo 16.º, n.º 8,

Considerando o seguinte:

- (1) Em conformidade com a Diretiva (UE) 2016/1148, os prestadores de serviços digitais são livres de tomar as medidas técnicas e organizativas que considerem adequadas e proporcionadas para gerir os riscos de segurança que se coloquem às suas redes e aos seus sistemas de informação, desde que essas medidas garantam um nível adequado de segurança e tenham em conta os elementos previstos nessa diretiva.
- (2) Na identificação das medidas técnicas e organizativas adequadas e proporcionadas, os prestadores de serviços digitais devem abordar a questão da segurança da informação de modo sistematizado, com base em análises de risco.
- (3) A fim de garantir a segurança dos sistemas e das instalações, os prestadores de serviços digitais devem aplicar procedimentos de avaliação e de análise, os quais devem incidir na gestão sistematizada das redes e dos sistemas de informação, na segurança física e ambiental, na segurança dos fornecimentos e no controlo dos acessos.
- (4) Ao realizarem uma análise de riscos no âmbito da gestão sistematizada das redes e dos sistemas de informação, os prestadores de serviços digitais devem ser incentivados a identificar riscos específicos e a quantificar a importância dos mesmos, por exemplo identificando ameaças a ativos críticos e o modo como estas podem afetar as atividades e determinando a maneira de melhor as atenuar com base nas capacidades atuais e nos recursos necessários.
- (5) As estratégias de recursos humanos podem abranger a gestão de competências, incluindo aspetos ligados ao desenvolvimento de competências relacionadas com a segurança e à sensibilização. Ao decidir sobre um conjunto adequado de estratégias de segurança operacional, os prestadores de serviços digitais devem ser incentivados a ter em conta aspetos de gestão da mudança, de gestão de vulnerabilidades, de formalização de práticas operacionais e administrativas e de cartografia dos sistemas.
- (6) As estratégias de arquitetura da segurança podem compreender, nomeadamente, a segregação de redes e sistemas, bem como medidas específicas de segurança para operações críticas, como operações de administração. A segregação de redes e sistemas pode permitir que o prestador de serviços digitais distinga elementos como fluxos de dados e recursos informáticos pertencentes a um cliente, grupo de clientes, a ele próprio ou a terceiros.
- (7) As medidas tomadas em termos de segurança física e ambiental devem garantir a proteção das redes e dos sistemas de informação da organização contra danos causados por incidentes como roubo, incêndio, inundação e outros efeitos meteorológicos e cortes de corrente ou de telecomunicações.
- (8) A segurança de fornecimentos como energia elétrica, combustível ou agentes de arrefecimento pode abranger a segurança da cadeia logística, a qual compreende, nomeadamente, a segurança dos terceiros contratantes e subcontratantes e da gestão de uns e outros. Entende-se por rastreabilidade dos fornecimentos críticos a capacidade do prestador de serviços digitais de identificar e registar fontes de fornecimentos desse tipo.
- (9) Os utilizadores de serviços digitais devem compreender as pessoas singulares ou coletivas que são clientes ou subscritores de mercados em linha ou de serviços de computação em nuvem, ou que visitam sítios Web de motores de busca em linha para efetuar pesquisas por palavras-chave.

<sup>(1)</sup> JOL 194 de 19.7.2016, p. 1.

- (10) No contexto da determinação da importância do impacto de um incidente, os casos referidos no presente regulamento devem ser considerados uma lista não-exaustiva de incidentes com impacto substancial. Importa extrair ensinamentos da execução do presente regulamento e do trabalho do Grupo de Cooperação, no tocante à recolha de informações sobre boas práticas respeitantes a riscos e incidentes, bem como à discussão das formas de comunicação das notificações de incidentes, como referido no artigo 11.º, n.º 3, alíneas i) e m), da Diretiva (UE) 2016/1148. Daí poderão resultar orientações gerais sobre limiares quantitativos de parâmetros de notificação para desencadeamento da obrigação de notificação que incumbe aos prestadores de serviços digitais nos termos do artigo 16.º, n.º 3, da Diretiva (UE) 2016/1148. Caso se justifique, a Comissão poderá também ponderar a revisão dos limiares atualmente estabelecidos no regulamento.
- (11) Para possibilitar que as autoridades competentes sejam informadas de novos riscos potenciais, os prestadores de serviços digitais devem ser incentivados a relatarem voluntariamente todos os incidentes cujas características não eram do seu conhecimento, tais como novas ocorrências, novos vetores de ataque ou novos autores de ameaças, novas vulnerabilidades e novos perigos.
- (12) A aplicabilidade do presente regulamento deve ter início no dia seguinte ao termo do prazo de transposição da Diretiva (UE) 2016/1148.
- (13) As medidas previstas no presente regulamento são conformes com o parecer do Comité de Segurança das Redes e dos Sistemas de Informação referido no artigo 22.º da Diretiva (UE) 2016/1148,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

#### *Artigo 1.º*

##### **Objeto**

O presente regulamento especifica pormenorizadamente os elementos a ter em conta pelos prestadores de serviços digitais na identificação e adoção de medidas destinadas a garantir o nível de segurança das redes e dos sistemas de informação que esses prestadores proporcionam no contexto da oferta de serviços referidos no anexo III da Diretiva (UE) 2016/1148 e especifica pormenorizadamente os parâmetros a ter em conta para determinar se o impacto de um incidente na prestação desses serviços é substancial.

#### *Artigo 2.º*

##### **Elementos de segurança**

1. A segurança dos sistemas e das instalações referida no artigo 16.º, n.º 1, alínea a), da Diretiva (UE) 2016/1148 é a segurança das redes e dos sistemas de informação e do ambiente físico de umas e outros, dela fazendo parte os seguintes elementos:
  - a) A gestão sistematizada das redes e dos sistemas de informação, isto é, a cartografia dos sistemas de informação e o estabelecimento de um conjunto de estratégias adequadas de gestão da segurança da informação, incluindo análises de risco, recursos humanos, segurança operacional, arquitetura de segurança, segurança dos dados, gestão do sistema no ciclo de vida e, se for caso disso, encriptação e a gestão desta;
  - b) A segurança física e ambiental, isto é, a disponibilidade de um conjunto de medidas de proteção da segurança das redes e dos sistemas de informação dos prestadores de serviços digitais contra danos, por meio de uma abordagem global dos riscos que cubra todos os perigos, por exemplo cortes do sistema, erros humanos, ações dolosas e fenómenos naturais;
  - c) A segurança dos fornecimentos, isto é, o estabelecimento e a manutenção de estratégias adequadas para garantir a acessibilidade aos fornecimentos críticos para a prestação dos serviços e, se for caso disso, a rastreabilidade desses fornecimentos;
  - d) O controlo do acesso às redes e aos sistemas de informação, isto é, a disponibilidade de um conjunto de medidas destinadas a garantir que o acesso físico e lógico às redes e aos sistemas de informação, incluindo a segurança administrativa das redes e desses sistemas, é autorizado e restringido com base em requisitos comerciais e de segurança.
2. As medidas tomadas pelos prestadores de serviços digitais relativamente ao tratamento dos incidentes referido no artigo 16.º, n.º 1, alínea b), da Diretiva (UE) 2016/1148 devem compreender:
  - a) Processos e procedimentos de deteção mantidos e ensaiados para garantir uma perceção atempada e adequada de ocorrências anómalas;
  - b) Processos e estratégias de comunicação de incidentes e de identificação de fragilidades e vulnerabilidades nos sistemas de informação do prestador;

- c) Reações conformes com procedimentos estabelecidos e comunicação dos resultados das medidas tomadas;
- d) Avaliação da gravidade do incidente, documentando os conhecimentos extraídos da análise do incidente e das informações pertinentes recolhidas que possam servir de provas e de apoio a um processo de aperfeiçoamento contínuo.
3. A gestão da continuidade das atividades referida no artigo 16.º, n.º 1, alínea c), da Diretiva (UE) 2016/1148 é a capacidade de uma organização de, após um incidente perturbador, manter ou, se for caso disso, restabelecer a prestação de serviços a níveis aceitáveis predefinidos. Deve incluir:
- a) O estabelecimento e a utilização de planos de contingência baseados numa análise de impacto nas atividades, destinados a assegurar a continuidade dos serviços fornecidos pelo prestador de serviços digitais, a avaliar e ensaiar periodicamente, por exemplo por meio de exercícios;
- b) Capacidades de recuperação de desastres, a avaliar e ensaiar periodicamente, por exemplo por meio de exercícios.
4. O acompanhamento, a auditoria e os testes realizados referidos no artigo 16.º, n.º 1, alínea d), da Diretiva (UE) 2016/1148 devem compreender o estabelecimento e a manutenção de estratégias nos seguintes domínios:
- a) A realização de uma sequência planeada de observações ou medições, para avaliar se as redes e os sistemas de informação estão a funcionar como pretendido;
- b) Inspeções e verificações destinadas a avaliar se uma norma ou um conjunto de orientações está a ser seguido, se os registos são exatos e se os objetivos de eficiência e eficácia estão a ser atingidos;
- c) Um processo destinado a evidenciar falhas nos mecanismos de segurança das redes e dos sistemas de informação, que protege os dados e mantém a funcionalidade pretendida. Este processo deve incluir os processos técnicos e o pessoal que participam no fluxo operacional.
5. As normas internacionais referidas no artigo 16.º, n.º 1, alínea e), da Diretiva (UE) 2016/1148 são normas aprovadas por um organismo internacional de normalização, como referido no artigo 2.º, n.º 1, alínea a), do Regulamento (UE) n.º 1025/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho <sup>(1)</sup>. Em conformidade com o artigo 19.º da Diretiva (UE) 2016/1148, podem igualmente ser utilizadas normas e especificações europeias ou internacionalmente aceites, assim como normas nacionais, aplicáveis à segurança das redes e dos sistemas de informação.
6. Os prestadores de serviços digitais devem assegurar que dispõem de documentação adequada que permita à autoridade competente verificar a conformidade com os elementos de segurança estabelecidos nos n.ºs 1, 2, 3, 4 e 5.

### Artigo 3.º

#### **Parâmetros a ter em conta para determinar se o impacto de um incidente é substancial**

1. O prestador de serviços digitais deve estar em condições de estimar, relativamente ao número de utilizadores afetados pelo incidente, nomeadamente de utilizadores que dependem do serviço para prestarem os seus próprios serviços, referido no artigo 16.º, n.º 4, alínea a), da Diretiva (UE) 2016/1148:
- a) O número de pessoas singulares e de pessoas coletivas com as quais foi celebrado um contrato de prestação do serviço que foram afetadas; ou
- b) O número de utilizadores que utilizaram o serviço que foram afetados, com base, designadamente, em dados de tráfego anteriores.
2. A «duração do incidente» referida no artigo 16.º, n.º 4, alínea b), é o período compreendido entre a perturbação da correta prestação do serviço, em termos de disponibilidade, autenticidade, integridade e confidencialidade, e o momento do restabelecimento do serviço.
3. Relativamente à distribuição geográfica, no que se refere à zona afetada pelo incidente, referida no artigo 16.º, n.º 4, alínea c), da Diretiva (UE) 2016/1148, o prestador de serviços digitais deve estar em condições de identificar se o incidente afeta a prestação dos seus serviços em Estados-Membros específicos.
4. Deve medir-se o nível de gravidade da perturbação do funcionamento do serviço referido no artigo 16.º, n.º 4, alínea d), da Diretiva (UE) 2016/1148 relativamente a uma ou mais das seguintes características afetadas pelo incidente: disponibilidade, autenticidade, integridade, confidencialidade dos dados ou dos serviços conexos.

<sup>(1)</sup> Regulamento (UE) n.º 1025/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2012, relativo à normalização europeia, que altera as Diretivas 89/686/CEE e 93/15/CEE do Conselho e as Diretivas 94/9/CE, 94/25/CE, 95/16/CE, 97/23/CE, 98/34/CE, 2004/22/CE, 2007/23/CE, 2009/23/CE e 2009/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga a Decisão 87/95/CEE do Conselho e a Decisão n.º 1673/2006/CE do Parlamento Europeu e do Conselho (JO L 316 de 14.11.2012, p. 12).

5. O prestador de serviços digitais deve estar em condições de concluir, relativamente à extensão do impacto nas atividades económicas e societárias referida no artigo 16.º, n.º 4, alínea e), da Diretiva (UE) 2016/1148, com base em indicações como a natureza das suas relações contratuais com o cliente ou, se for caso disso, o número potencial de utilizadores afetados, se o incidente causou perdas materiais ou não-materiais significativas aos utilizadores, nomeadamente em termos de saúde, proteção ou danos patrimoniais.

6. Para efeitos dos n.ºs 1, 2, 3, 4 e 5, não pode ser exigido aos prestadores de serviços digitais que recolham informações adicionais às quais não tenham acesso.

#### Artigo 4.º

##### **Incidentes com impacto substancial**

1. Considera-se que um incidente tem impacto substancial caso se verifique alguma das seguintes situações:

- a) O serviço prestado pelo prestador de serviços digitais esteve indisponível durante mais de 5 000 000 horas-utilizador, designando o termo «hora-utilizador» um utilizador afetado na União durante 60 minutos;
- b) Resultou do incidente uma perda de integridade, autenticidade ou confidencialidade dos dados armazenados, transmitidos ou tratados ou dos serviços conexos oferecidos ou acessíveis através de redes e de sistemas de informação do prestador de serviços digitais, tendo sido afetados mais de 100 000 utilizadores da União;
- c) O incidente gerou um risco de segurança pública, proteção pública ou morte;
- d) O incidente provocou danos materiais superiores a 1 000 000 EUR a, pelo menos, um utilizador na União.

2. A Comissão pode rever os limiares estabelecidos no n.º 1, com base nas boas práticas recolhidas pelo Grupo de Cooperação no exercício das tarefas deste nos termos do artigo 11.º, n.º 3, da Diretiva (UE) 2016/1148 e nas discussões previstas na alínea m) desse número.

#### Artigo 5.º

##### **Entrada em vigor**

1. O presente regulamento entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.
2. A aplicabilidade do presente regulamento inicia-se a 10 de maio de 2018.

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

Feito em Bruxelas, em 30 de janeiro de 2018.

Pela Comissão  
O Presidente  
Jean-Claude JUNCKER

# DECISÕES

## DECISÃO (UE) 2018/152 DO CONSELHO

de 29 de janeiro de 2018

**que nomeia um suplente do Comité das Regiões, proposto pela República Federal da Alemanha**

O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia, nomeadamente o artigo 305.º,

Tendo em conta a proposta do Governo alemão,

Considerando o seguinte:

- (1) Em 26 de janeiro de 2015, 5 de fevereiro de 2015 e 23 de junho de 2015, o Conselho adotou as Decisões (UE) 2015/116 <sup>(1)</sup>, (UE) 2015/190 <sup>(2)</sup> e (UE) 2015/994 <sup>(3)</sup>, que nomeiam os membros e suplentes do Comité das Regiões para o período compreendido entre 26 de janeiro de 2015 e 25 de janeiro de 2020.
- (2) Vagou um lugar de suplente do Comité das Regiões na sequência do termo do mandato de Anke SPOORENDONK,

ADOTOU A PRESENTE DECISÃO:

### Artigo 1.º

É nomeada para o Comité das Regiões, na qualidade de suplente, pelo período remanescente do mandato, a saber, até 25 de janeiro de 2020:

— Sabine SÜTTERLIN-WAACK, *Ministerin für Justiz, Europa, Verbraucherschutz und Gleichstellung des Landes Schleswig-Holstein.*

### Artigo 2.º

A presente decisão entra em vigor na data da sua adoção.

Feito em Bruxelas, em 29 de janeiro de 2018.

*Pelo Conselho*

*O Presidente*

R. PORODZANOV

---

<sup>(1)</sup> Decisão (UE) 2015/116 do Conselho, de 26 de janeiro de 2015, que nomeia membros e suplentes do Comité das Regiões para o período compreendido entre 26 de janeiro de 2015 e 25 de janeiro de 2020 (JO L 20 de 27.1.2015, p. 42).

<sup>(2)</sup> Decisão (UE) 2015/190 do Conselho, de 5 de fevereiro de 2015, que nomeia membros e suplentes do Comité das Regiões para o período compreendido entre 26 de janeiro de 2015 e 25 de janeiro de 2020 (JO L 31 de 7.2.2015, p. 25).

<sup>(3)</sup> Decisão (UE) 2015/994 do Conselho, de 23 de junho de 2015, que nomeia membros e suplentes do Comité das Regiões para o período compreendido entre 26 de janeiro de 2015 e 25 de janeiro de 2020 (JO L 159 de 25.6.2015, p. 70).

**RETIFICAÇÕES**

**Retificação do Regulamento (UE) 2017/1084 da Comissão, de 14 de junho de 2017, que altera o Regulamento (UE) n.º 651/2014 no que se refere aos auxílios às infraestruturas portuárias e aeroportuárias, aos limiares de notificação para os auxílios a favor da cultura e da conservação do património e para os auxílios a infraestruturas desportivas e recreativas multifuncionais, bem como aos regimes de auxílio regional ao funcionamento nas regiões ultraperiféricas e que altera o Regulamento (UE) n.º 702/2014 no que se refere ao cálculo dos custos elegíveis**

(«Jornal Oficial da União Europeia» L 156 de 20 de junho de 2017)

No artigo 1.º, ponto 11), na parte introdutória do n.º 4 do artigo 15.º substituído:

*onde se lê:* «Nas regiões ultraperiféricas, os regimes de auxílio regional ao funcionamento devem compensar os custos adicionais de funcionamento suportados nessas regiões em consequência direta de uma ou várias das desvantagens permanentes referidas no artigo 349.º do Tratado, sempre que os beneficiários exerçam a sua atividade económica numa região ultraperiférica, e desde que o montante anual de auxílio por beneficiário a título de todos os regimes de auxílio ao funcionamento implementados ao abrigo do presente regulamento não exceda nenhuma das seguintes percentagens:»,

*deve ler-se:* «Nas regiões ultraperiféricas, os regimes de auxílio regional ao funcionamento devem compensar os custos adicionais de funcionamento suportados nessas regiões em consequência direta de uma ou várias das desvantagens permanentes referidas no artigo 349.º do Tratado, sempre que os beneficiários exerçam a sua atividade económica numa região ultraperiférica, e desde que o montante anual de auxílio por beneficiário a título de todos os regimes de auxílio ao funcionamento implementados ao abrigo do presente regulamento não exceda uma das seguintes percentagens:»,

---











ISSN 1977-0774 (edição eletrónica)  
ISSN 1725-2601 (edição em papel)



**Serviço das Publicações da União Europeia**  
2985 Luxemburgo  
LUXEMBURGO

**PT**