

REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) 2019/1604 DA COMISSÃO**de 27 de setembro de 2019****que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como os métodos de análise relacionados**

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 ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 91.º, primeiro parágrafo, alínea d),

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão ⁽²⁾ define as características físico-químicas e organoléticas dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona e descreve os métodos para as determinar.
- (2) Esses métodos, assim como os valores-limite das características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, são atualizados regularmente com base no parecer dos peritos químicos e em consonância com os trabalhos realizados no âmbito do Conselho Oleícola Internacional (COI).
- (3) Para garantir que são aplicadas na União as últimas normas internacionais do COI, é necessário atualizar determinados métodos de análise estabelecidos no Regulamento (CEE) n.º 2568/91.
- (4) Numa perspetiva de coerência com os valores de precisão do método analítico, a norma do COI sofreu alterações no tocante à expressão do limite da acidez livre, do índice de peróxidos, da avaliação organolética (mediana dos defeitos e mediana do atributo «frutado») e da diferença entre o NCE42 determinado por HPLC e o NCE42 obtido por cálculo teórico.
- (5) Em conformidade com o artigo 2.º-A, n.º 5, do Regulamento (CEE) n.º 2568/91, incumbe aos Estados-Membros verificar se as amostras de azeite correspondem à categoria declarada, examinando para o efeito, por qualquer ordem ou pela ordem indicada no esquema de tomada de decisão do anexo I-B desse mesmo regulamento, as características estabelecidas no anexo I daquele regulamento.
- (6) A evolução recente aconselha que se atualizem em conformidade os quadros do anexo I-B do Regulamento (CEE) n.º 2568/91, bem como o apêndice a este anexo. Por outro lado, atendendo ao teor desse anexo, o termo «fluxograma» afigura-se mais adequado do que o termo «esquema de tomada de decisão».
- (7) No anexo XII, ponto 9.4, do Regulamento (CEE) n.º 2568/91, define-se «mediana dos defeitos» como a mediana do defeito a que tenha sido atribuída a intensidade mais elevada. No contexto das contra-análises e dado que a avaliação da conformidade de um azeite ou óleo passa por vários júris, importa esclarecer que a decisão relativa à conformidade das características de um azeite ou óleo com a categoria declarada depende unicamente do valor da mediana do defeito principal, qualquer que seja este.
- (8) O Regulamento (CEE) n.º 2568/91 deve, portanto, ser alterado em conformidade.
- (9) 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 (CEE) n.º 2568/91 é alterado do seguinte modo:

1) O artigo 2.º é alterado do seguinte modo:

a) No n.º 1, a alínea l) passa a ter a seguinte redação:

«l) Para determinação da composição e do teor de esteróis e para a determinação de outros álcoois por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar, o método descrito no anexo XIX»;

⁽¹⁾ JO L 347 de 20.12.2013, p. 671.

⁽²⁾ Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados (JO L 248 de 5.9.1991, p. 1).

b) No n.º 2, o terceiro parágrafo passa a ter a seguinte redação:

«Se o júri não confirmar a categoria declarada no respeitante às características organolépticas, as autoridades nacionais ou os representantes destas farão realizar, sem demora, duas contra-análises, a pedido do interessado, por outros júris aprovados. Pelo menos um dos júris deve ter sido aprovado pelo Estado-Membro produtor. As características em questão serão consideradas conformes com as declaradas se as duas contra-análises confirmarem a classificação declarada. Caso contrário, sejam quais forem os defeitos detetados nas contra-análises, a classificação deve ser declarada não-conforme com as características e as despesas das contra-análises devem ser imputadas ao interessado.»;

2) No artigo 2.º-A, n.º 5, a alínea b) passa a ter a seguinte redação:

«b) Seguir a ordem indicada no fluxograma do anexo I-B, até que seja possível tomar uma das decisões nele referidas.»;

3) O quadro «ANEXOS Sumário» é substituído pelo quadro constante do anexo I do presente regulamento;

4) O anexo I é substituído pelo texto constante do anexo II do presente regulamento;

5) No anexo I-A, o ponto 2.1 passa a ter a seguinte redação:

«2.1. Subdivide-se cada amostra primária em amostras de laboratório de acordo com o ponto 2.5 da norma EN ISO 5555, efetuando-se em seguida as análises pela ordem indicada no fluxograma constante do anexo I-B ou por qualquer outra ordem, aleatória.»;

6) O anexo I-B é substituído pelo texto constante do anexo III do presente regulamento;

7) É suprimido o anexo V;

8) No anexo VII, o ponto 4.2 passa a ter a seguinte redação:

«4.2. *n*-Hexano para cromatografia. Se os valores de precisão obtidos forem semelhantes, pode substituir-se o hexano por iso-octano (2,2,4-trimetilpentano, para cromatografia).»;

9) O anexo XII é alterado em conformidade com o anexo IV do presente regulamento;

10) O anexo XVII é alterado em conformidade com o anexo V do presente regulamento;

11) O anexo XVIII é alterado em conformidade com o anexo VI do presente regulamento;

12) O anexo XIX é substituído pelo texto constante do anexo VII do presente regulamento;

13) No anexo XX, o ponto 4.2 passa a ter a seguinte redação:

«4.2. *n*-hexano de qualidade cromatográfica ou para determinação de resíduos. Se os valores de precisão obtidos forem semelhantes, pode substituir-se o hexano por iso-octano (2,2,4-trimetilpentano, para cromatografia). Os solventes com temperatura de ebulição superior à do *n*-hexano demoram mais tempo a evaporar, embora sejam preferíveis, dada a toxicidade do hexano. É necessário comprovar o grau de pureza; por exemplo, verificando o resíduo, após evaporação, de 100 ml de solvente.»;

ADVERTÊNCIA – Possibilidade de ignição dos vapores. Manter afastado de fontes de calor, faíscas ou chamas descobertas. Assegurar que os frascos são devidamente fechados. Assegurar uma ventilação adequada durante o uso. Evitar a acumulação de vapores e eliminar todas as possíveis fontes de incêndio, como dispositivos de aquecimento e dispositivos elétricos que não sejam constituídos por matérias não-inflamáveis. Pernicioso por inalação, podendo causar danos às células nervosas. Evitar respirar os vapores. Se necessário, utilizar um dispositivo de respiração adequado. Evitar o contacto com os olhos e a pele.

O iso-octano é um líquido inflamável que pode provocar incêndios. É explosivo no ar entre as frações volúmicas de 1,1 % e 6,0 %. É tóxico por ingestão e por inalação. Utilizar um exaustor em bom estado de funcionamento para trabalhar com este solvente.».

Artigo 2.º

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

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

Feito em Bruxelas, em 27 de setembro de 2019.

Pela Comissão
O Presidente
Jean-Claude JUNCKER

ANEXO I

«ANEXOS

RESUMO

Anexo I	Características dos azeites e óleos de bagaço de azeitona
Anexo I-A	Amostragem de azeites e óleos de bagaço de azeitona entregues em embalagens imediatas
Anexo I-B	Fluxogramas para verificação da conformidade de amostras de azeite ou de óleo de bagaço de azeitona com a categoria declarada
Anexo II	Determinação dos ácidos gordos livres, método a frio
Anexo III	Determinação do índice de peróxidos
Anexo IV	Determinação do teor de ceras por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar
Anexo VII	Determinação da percentagem de monopalmitato de 2-glicerilo
Anexo IX	Análise por espectrofotometria no ultravioleta
Anexo X	Determinação dos ésteres metílicos de ácidos gordos por cromatografia em fase gasosa
Anexo XI	Determinação do teor de solventes halogenados voláteis no azeite
Anexo XII	Método do Conselho Oleícola Internacional para a avaliação organolética de azeites virgens
Anexo XV	Teor de óleo do bagaço de azeitona
Anexo XVI	Determinação do índice de iodo
Anexo XVII	Método para a determinação de estigmastadienos em óleos vegetais
Anexo XVIII	Determinação da diferença entre o teor real e o teor teórico de triacilgliceróis com NCE42
Anexo XIX	Determinação da composição esterólica, do teor de esteróis e do teor de compostos alcoólicos por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar
Anexo XX	Método de determinação do teor de ceras, de ésteres metílicos de ácidos gordos e de ésteres etílicos de ácidos gordos por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar
Anexo XXI	Resultados das verificações de conformidade efetuadas aos azeites e aos óleos de bagaço de azeitona referidas no artigo 8.º, n.º 2»

CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES E ÓLEOS DE BAGAÇO DE AZEITONA

Características de qualidade

Categoria	Acidez (%) (*)	Índice de peróxidos (mEq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₆₈ ou K ₂₇₀	Delta-K	Exame organolético		Ésteres etílicos de ácidos gordos (mg/kg)
						Mediana dos defeitos (Md) (*)	Mediana do frutado (Mf)	
1. Azeite virgem extra	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Azeite virgem	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Azeite lampante	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—	—
4. Azeite refinado	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16	—	—	—
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15	—	—	—
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	—	—	—	—	—	—	—	—
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—	—
8. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—	—

(1) A mediana dos defeitos pode ser inferior ou igual a 3,5 se a mediana do frutado for igual a 0,0.

Características de pureza

Categoria	Composição de ácidos gordos ⁽¹⁾						Total dos isómeros <i>trans</i> -oleicos (%)	Total de isómeros dos ácidos <i>trans</i> -linoleico + <i>trans</i> -linolé-nico (%)	Estigmastadienos (mg/kg) ⁽²⁾	Diferença entre o NCE42 determinado por HPLC e o NCE42 obtido por cálculo teórico	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)
	Mirístico (%)	Linolé-nico (%)	Araquídico (%)	Eicosenóico (%)	Beénico (%)	Lignocé-nico (%)					
1. Azeite virgem extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 se ácido palmítico total ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 se ácido palmítico total > 14,00 %
2. Azeite virgem	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 se ácido palmítico total ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 se ácido palmítico total > 14,00 %
3. Azeite lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,9 se ácido palmítico total ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 se ácido palmítico total > 14,00 %
4. Azeite refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 se ácido palmítico total ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 se ácido palmítico total > 14,00 %
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 se ácido palmítico total ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 se ácido palmítico total > 14,00 %
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

⁽¹⁾ Teores de outros ácidos gordos (%): palmítico: 7,50-20,00; palmitoleico: 0,30-3,50; heptadecanóico: ≤ 0,40; heptadecenóico: ≤ 0,60; esteárico: 0,50-5,00; oleico: 55,00-83,00; linoleico: 2,50-21,00.

⁽²⁾ Soma dos isómeros, separáveis ou não em coluna capilar.

Categoria	Composição esterólica						Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodiol e uvaol (%) (**)	Ceras (mg/kg) (**)
	Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol ⁽¹⁾ (%)	Estigmasterol (%)	β -sitosterol aparente ⁽²⁾ (%)	Delta-7-estigmastenol ⁽¹⁾ (%)			
1. Azeite virgem extra	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	<Campesterol	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Azeite virgem	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	<Campesterol	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Azeite lampante	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$ ⁽³⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ ⁽³⁾
4. Azeite refinado	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	<Campesterol	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	<Campesterol	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 2\ 500$	$> 4,5$ ⁽⁴⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ ⁽⁴⁾
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	<Campesterol	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 800$	$> 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Óleo de bagaço de azeitona	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	<Campesterol	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 600$	$> 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

⁽¹⁾ Ver o apêndice ao presente anexo.

⁽²⁾ β -Sitosterol aparente: delta-5,23-estigmastadienol + clerosterol + β -sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

⁽³⁾ Os azeites cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados azeite lampante se o teor de álcoois alifáticos totais for inferior ou igual a 350 mg/kg ou se a percentagem de eritrodiol e uvaol for inferior ou igual a 3,5 %.

⁽⁴⁾ Os óleos cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados óleo de bagaço de azeitona bruto se o teor de álcoois alifáticos totais for superior a 350 mg/kg e a percentagem de eritrodiol e uvaol for superior a 3,5 %.

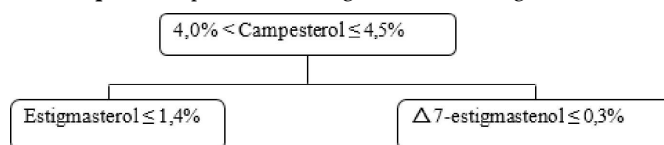
Notas:

- Os resultados das análises devem ser expressos com um número de algarismos significativos idêntico ao previsto para cada característica. Se o algarismo seguinte for superior a 4, o último algarismo significativo deve ser aumentado de uma unidade.
- Basta que uma das características esteja fora dos limites fixados para que o azeite ou óleo seja classificado noutra categoria ou declarado não-conforme, para os efeitos do presente regulamento.
- No caso do azeite lampante, as características de qualidade assinaladas com um asterisco (*) podem diferir simultaneamente dos limites estabelecidos para a categoria correspondente.
- No caso dos óleos de bagaço de azeitona brutos, os valores declarados para as duas características assinaladas com dois asteriscos (**) podem diferir simultaneamente dos limites correspondentes. No caso dos óleos de bagaço de azeitona e dos óleos de bagaço de azeitona refinados, apenas um dos valores declarados pode diferir do limite correspondente.

Apêndice

Esquemas de decisão

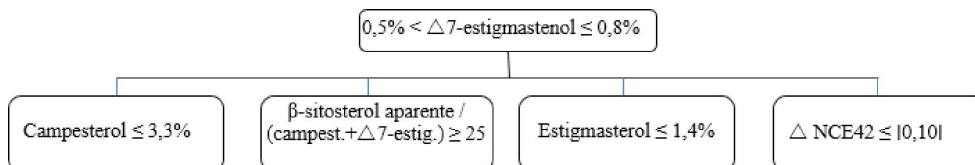
Esquema de decisão relativo ao **campesterol** para azeites virgens e azeites virgens extra:



Os outros parâmetros devem respeitar os limites estabelecidos no presente regulamento.

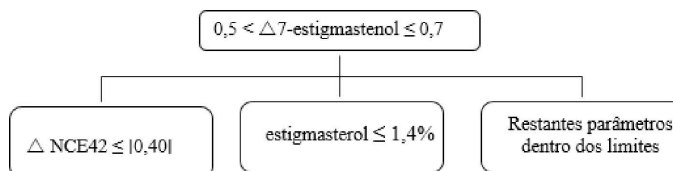
Esquema de decisão relativo ao **delta-7-estigmastenol** para:

— Azeites virgens e azeites virgens extra



Os outros parâmetros devem respeitar os limites estabelecidos no presente regulamento.

— Óleos de bagaço de azeitona (brutos e refinados)



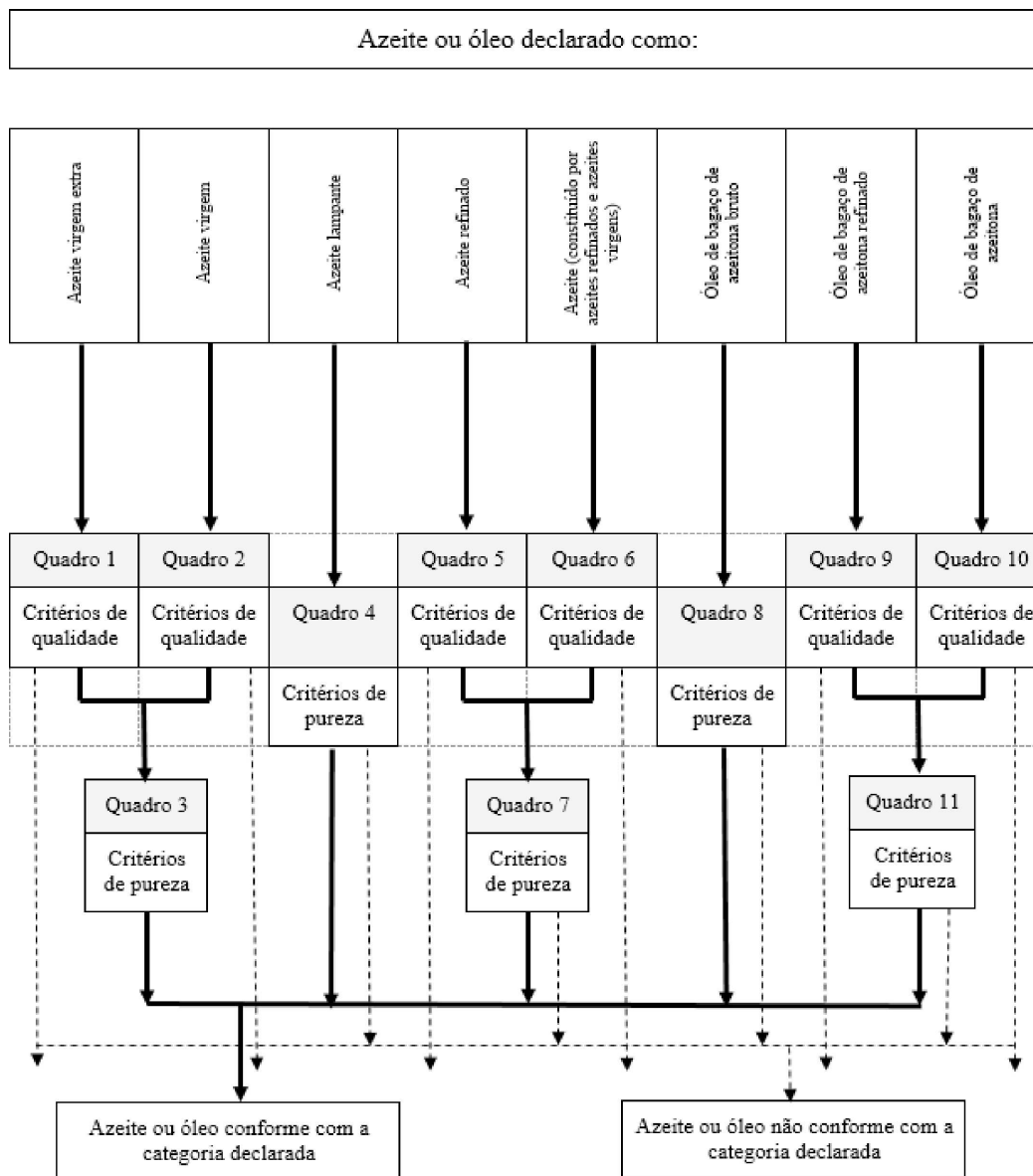
Os outros parâmetros devem respeitar os limites estabelecidos no presente regulamento.»

ANEXO III

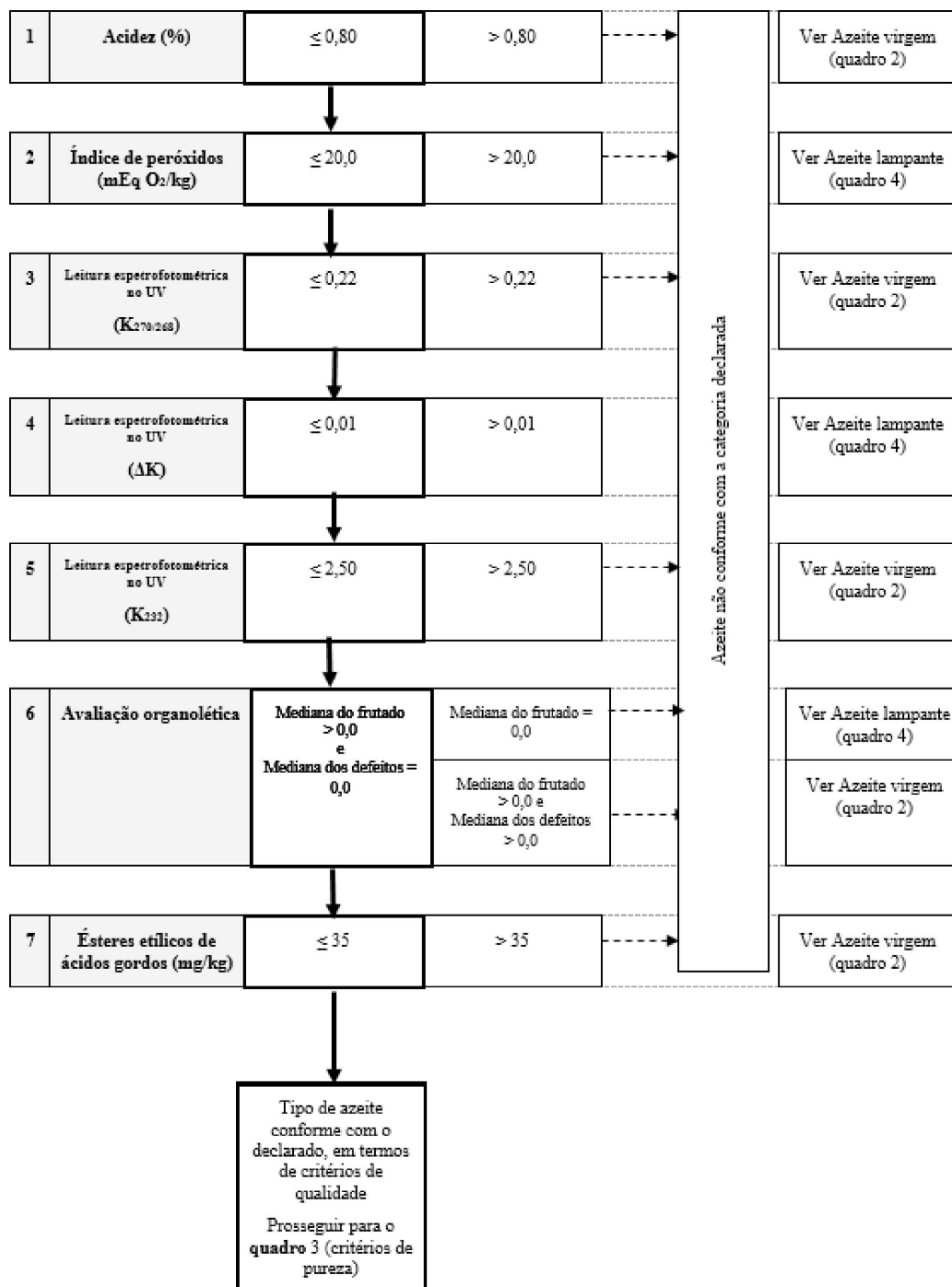
«ANEXO I-B

FLUXOGRAMAS PARA VERIFICAÇÃO DA CONFORMIDADE DE AMOSTRAS DE AZEITE OU DE ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA COM A CATEGORIA DECLARADA

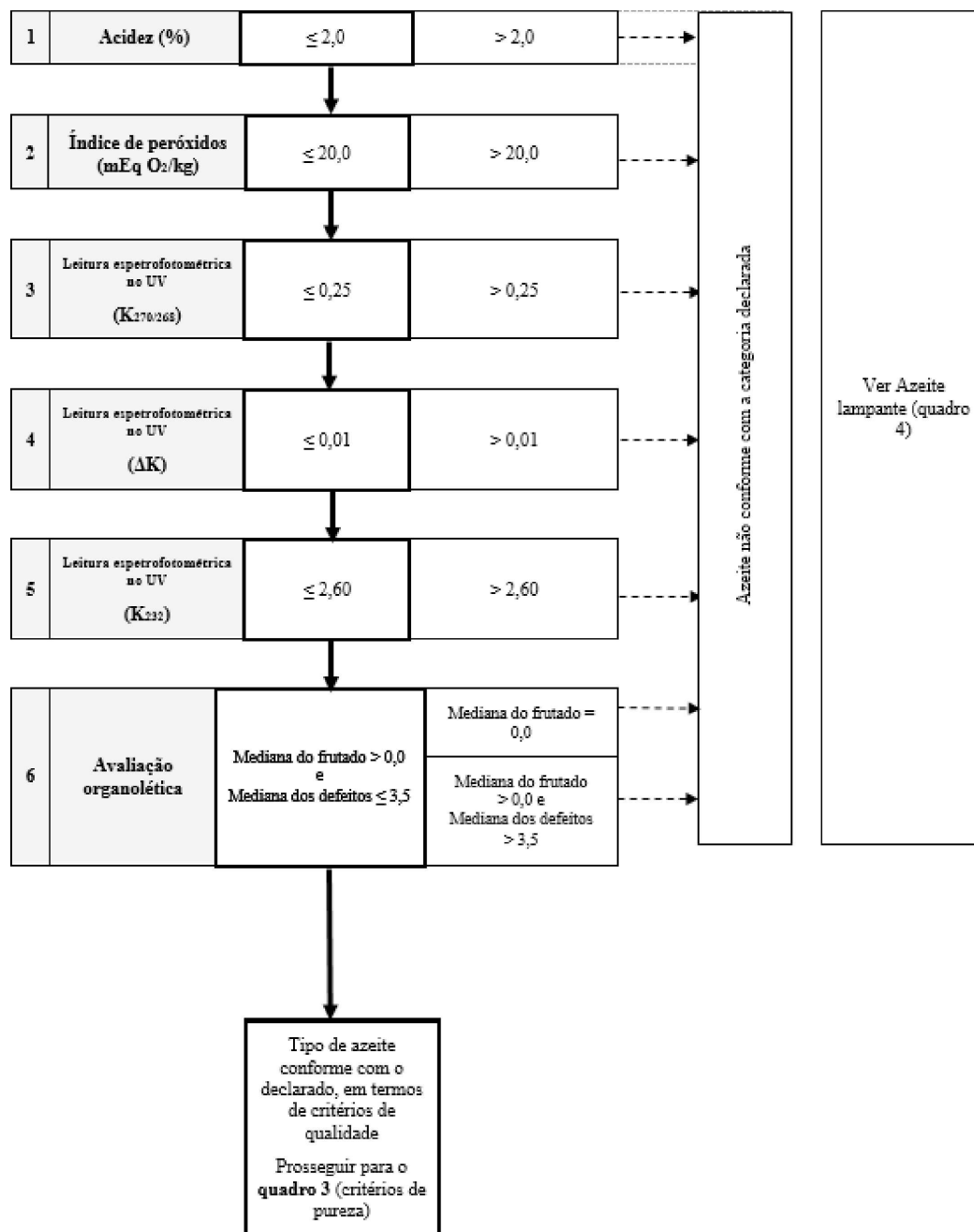
Quadro geral



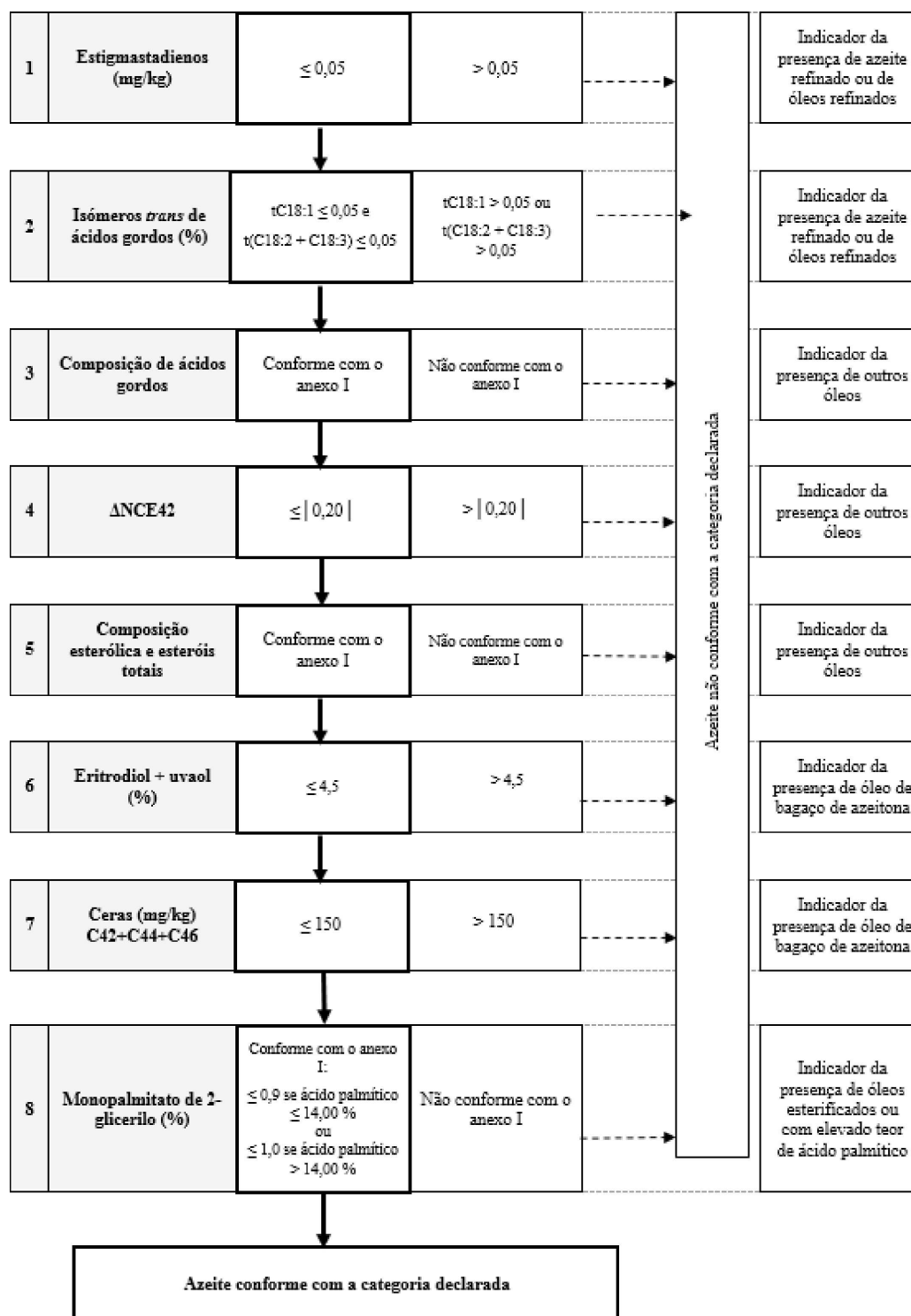
Quadro 1 – Azeite virgem extra – Critérios de qualidade



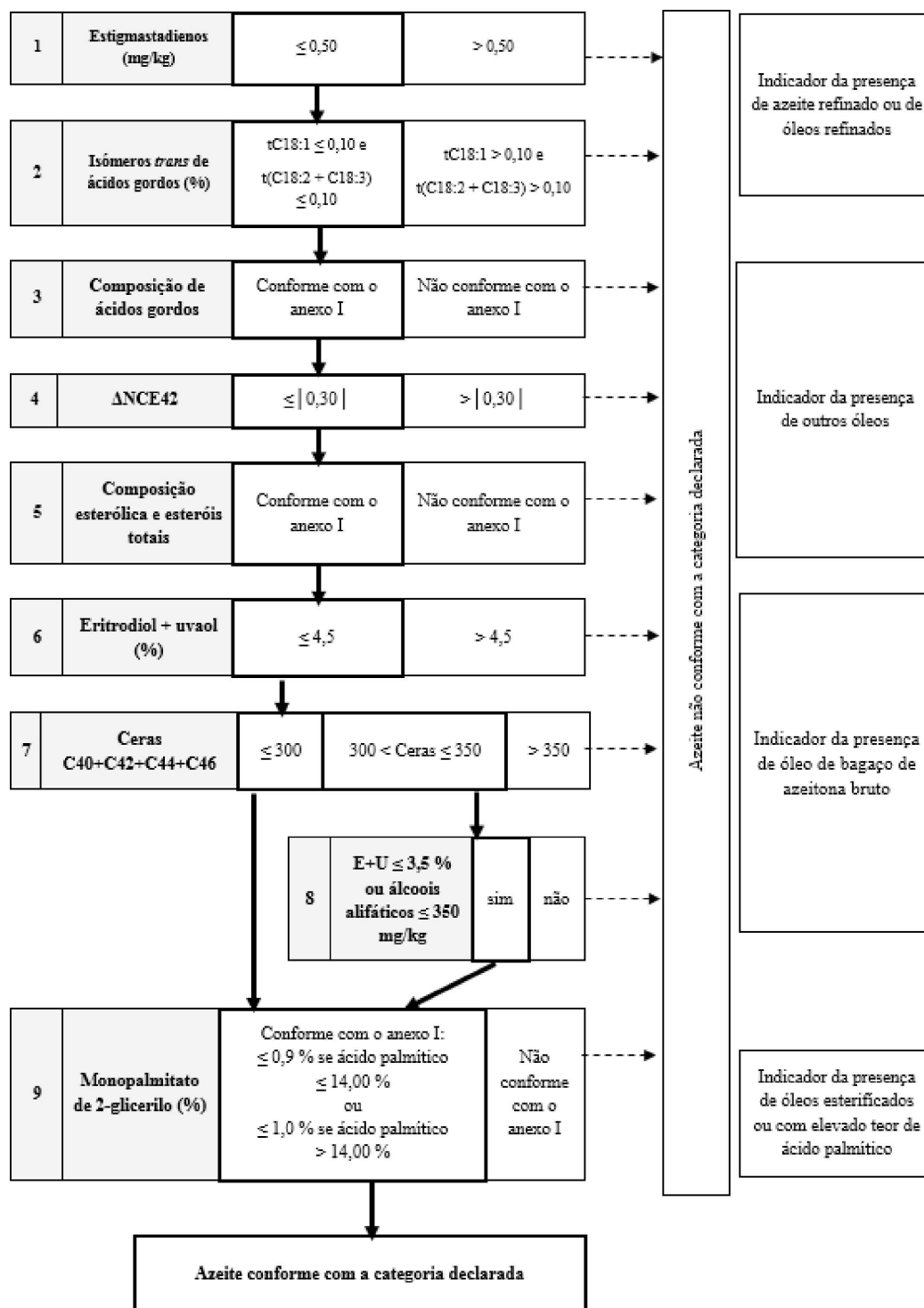
Quadro 2 – Azeite virgem – Critérios de qualidade



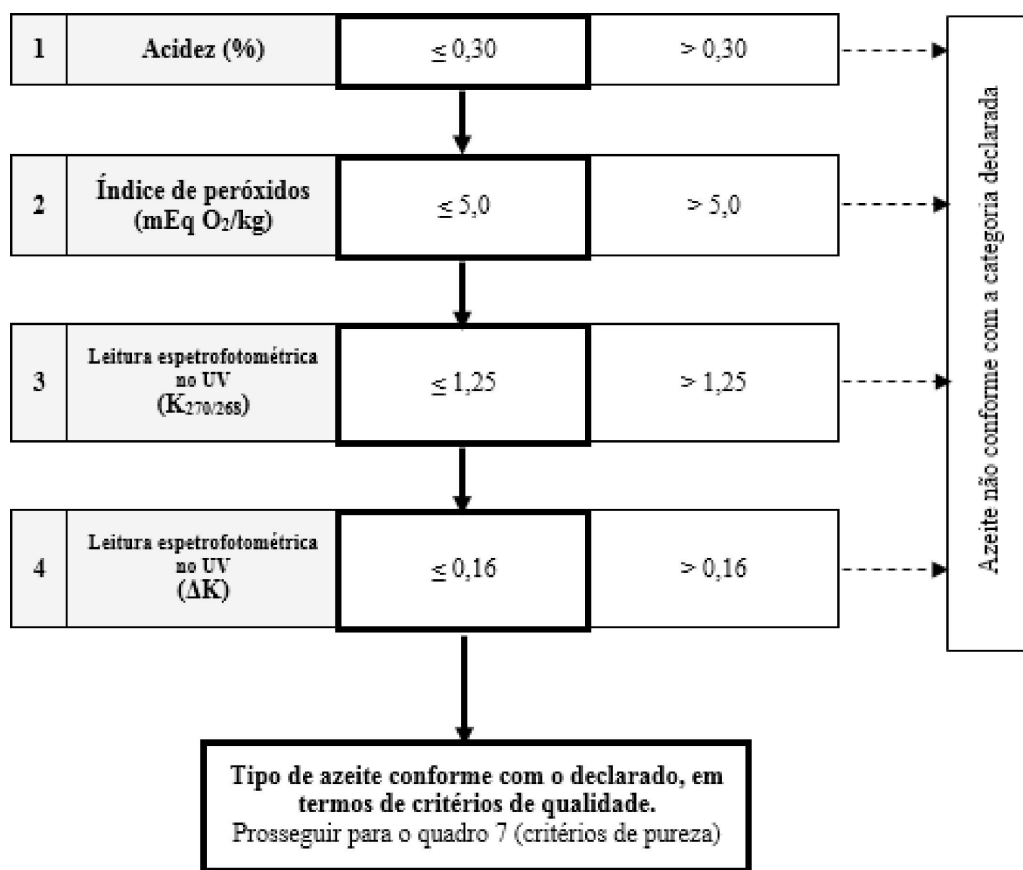
Quadro 3 – Azeite virgem extra e azeite virgem – Critérios de pureza



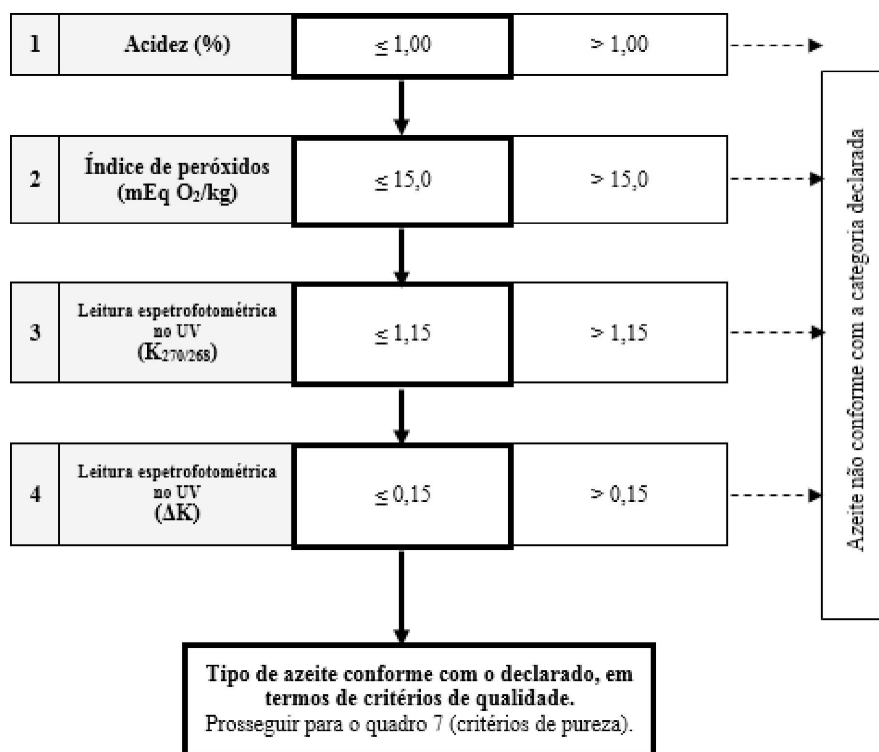
Quadro 4 – Azeite lampante – Critérios de pureza



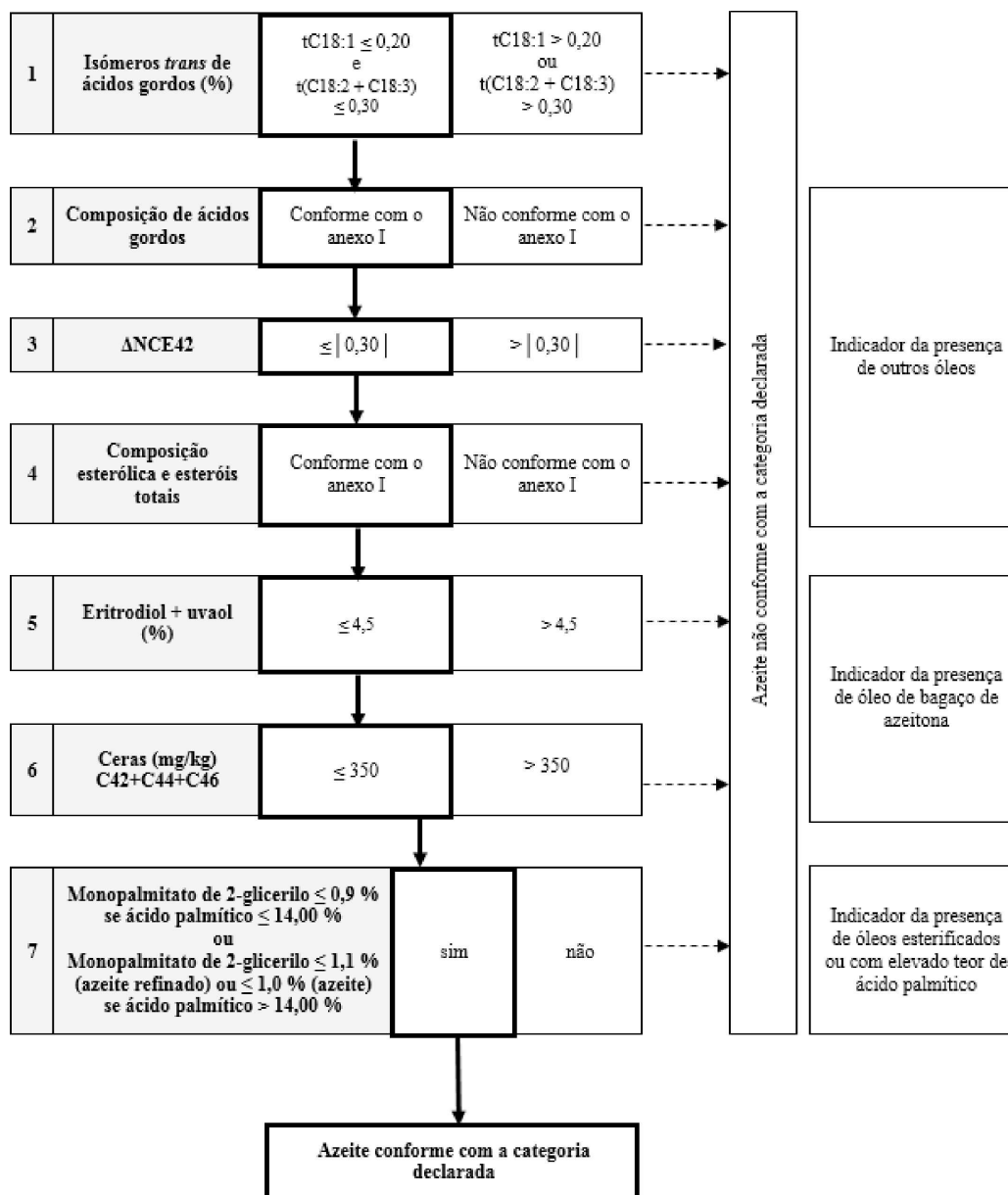
Quadro 5 – Azeite refinado – Critérios de qualidade



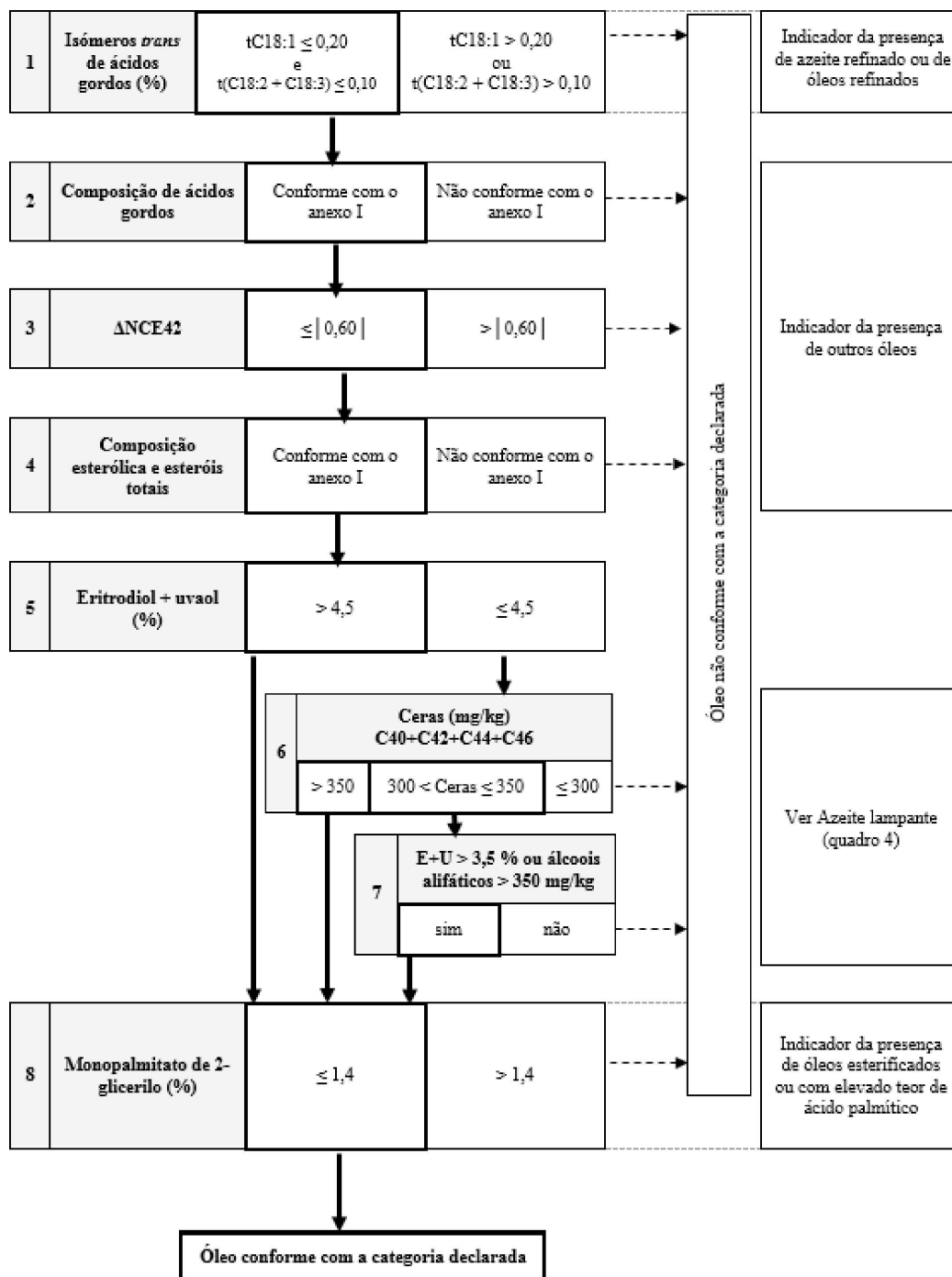
Quadro 6 – Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens) – Critérios de qualidade



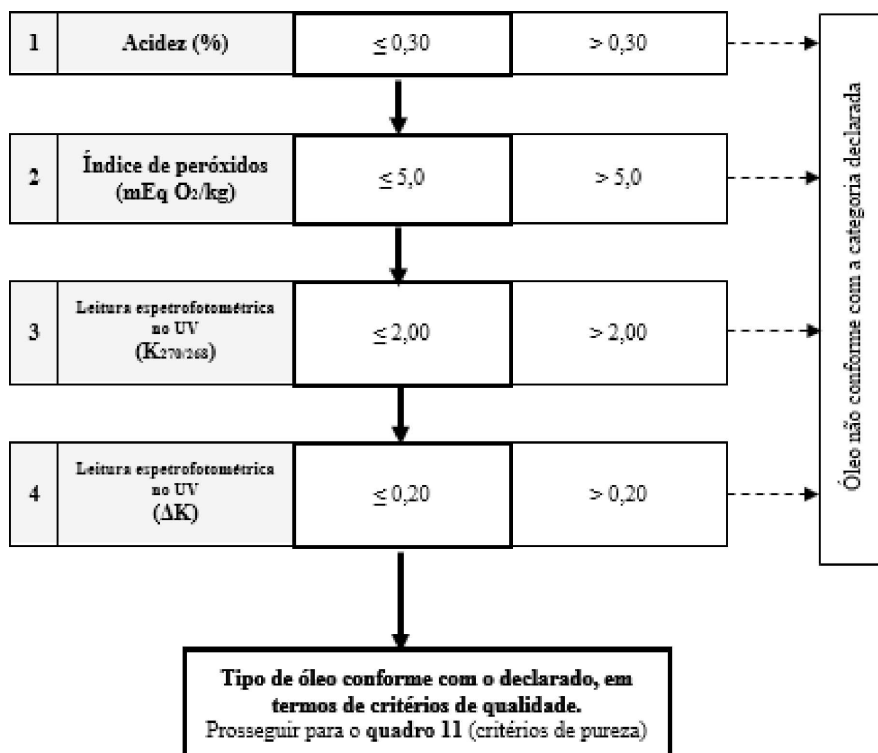
Quadro 7 – Azeite refinado e azeite constituído por azeites refinados e azeites virgens – Critérios de pureza



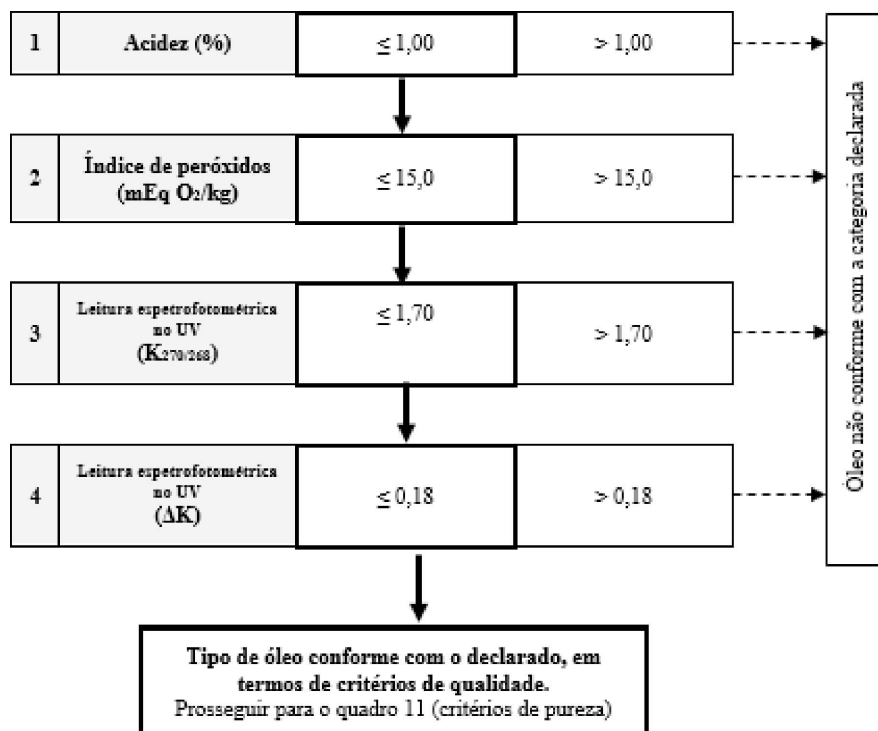
Quadro 8 – Óleo de bagaço de azeitona bruto – Critérios de pureza.



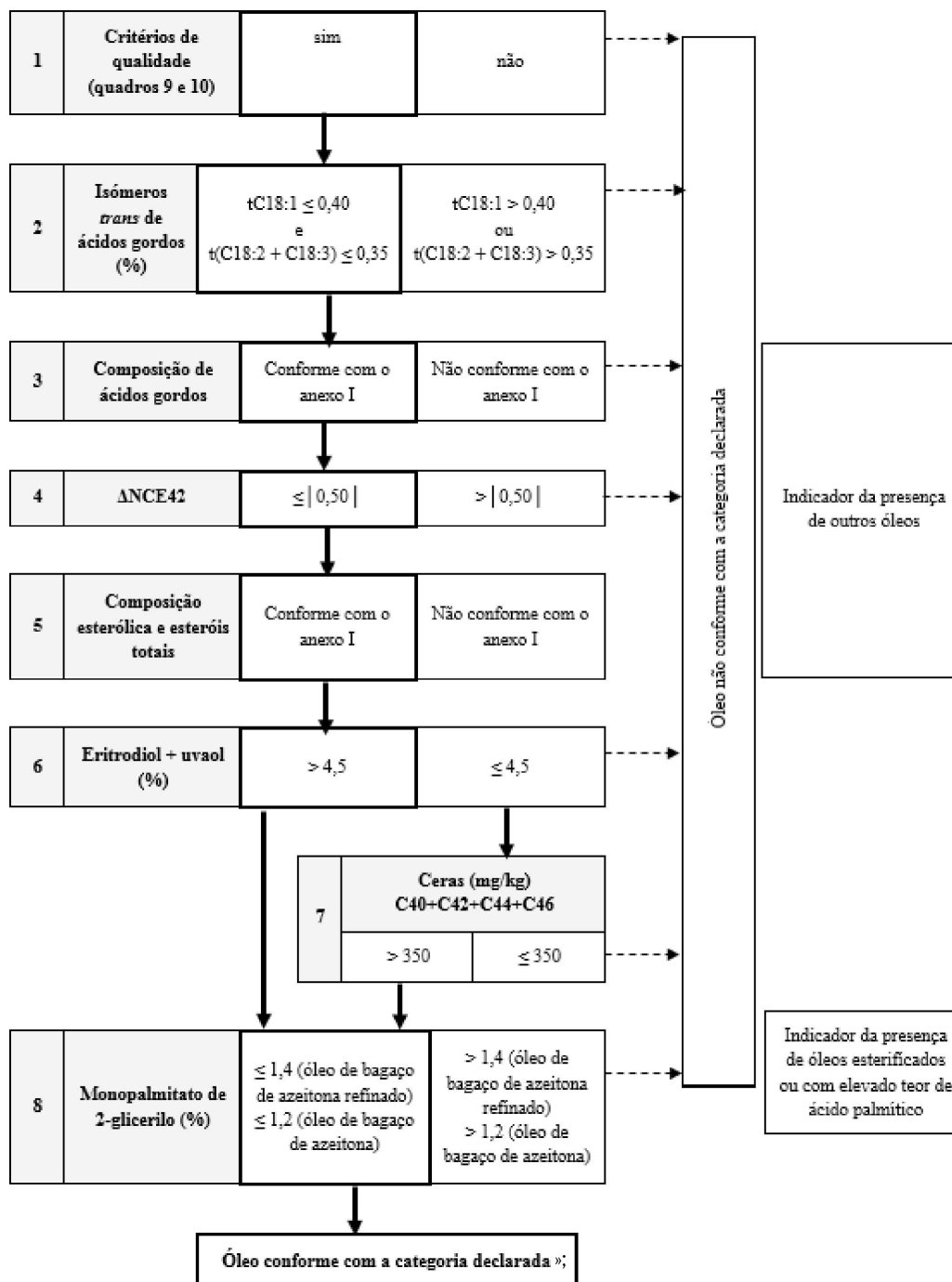
Quadro 9 – Óleo de bagaço de azeitona refinado – Critérios de qualidade.



Quadro 10 – Óleo de bagaço de azeitona – Critérios de qualidade.



Quadro 11 – Óleo de bagaço de azeitona refinado e óleo de bagaço de azeitona – Critérios de pureza



ANEXO IV

O anexo XII é alterado do seguinte modo:

1) O ponto 3.3 passa a ter a seguinte redação:

«3.3. Terminologia facultativa para efeitos de rotulagem

Se lhe for solicitado, o presidente do júri pode certificar que os azeites avaliados satisfazem as definições e intervalos correspondentes apenas aos termos seguintes, em função da intensidade e perceção dos atributos:

Atributos positivos (frutado, amargo e picante), em função da intensidade de perceção:

- Intenso: se a mediana do atributo em causa for superior a 6,0;
- Médio: se a mediana do atributo em causa for superior a 3,0 e igual ou inferior a 6,0;
- Suave: se a mediana do atributo em causa for igual ou inferior a 3,0.

<i>Frutado</i>	Conjunto das sensações olfativas dependentes da variedade de azeitona, por via direta e/ou retro-nasal, características de azeites provenientes de frutos são e frescos, sem predominância de frutado verde ou maduro.
<i>Frutado verde</i>	Conjunto das sensações olfativas dependentes da variedade de azeitona, por via direta e/ou retro-nasal, que lembram frutos verdes, características de azeites provenientes de frutos verdes são e frescos.
<i>Frutado maduro</i>	Conjunto das sensações olfativas dependentes da variedade de azeitona, por via direta e/ou retro-nasal, que lembram frutos maduros, características de azeites provenientes de frutos são e frescos.
<i>Equilibrado</i>	Azeite sem desequilíbrios, entendendo-se por “equilíbrio” a sensação olfato-gustativa e tátil dos azeites cuja mediana do atributo “amargo” e cuja mediana do atributo “picante” não excedam em mais de 2,0 pontos a mediana do atributo “frutado”.
<i>Doce</i>	Azeite cuja mediana do atributo “amargo” e cuja mediana do atributo “picante” sejam iguais ou inferiores a 2,0.

Lista dos termos em função da intensidade de perceção:

Termos sujeito à apresentação de um certificado de exame organolético	Mediana do atributo
Frutado	—
Frutado maduro	—
Frutado verde	—
Frutado suave	$\leq 3,0$
Frutado médio	$3,0 < \text{mediana} \leq 6,0$
Frutado intenso	$> 6,0$
Frutado maduro suave	$\leq 3,0$
Frutado maduro médio	$3,0 < \text{mediana} \leq 6,0$
Frutado maduro intenso	$> 6,0$
Frutado verde suave	$\leq 3,0$
Frutado verde médio	$3,0 < \text{mediana} \leq 6,0$
Frutado verde intenso	$> 6,0$

Termos sujeito à apresentação de um certificado de exame organolético	Mediana do atributo
Amargo suave	$\leq 3,0$
Amargo médio	$3,0 < \text{mediana} \leq 6,0$
Amargo intenso	$> 6,0$
Picante suave	$\leq 3,0$
Picante médio	$3,0 < \text{mediana} \leq 6,0$
Picante intenso	$> 6,0$
Azeite equilibrado	A mediana do atributo “amargo” e a mediana do atributo “picante” não excedem em mais de 2,0 pontos a mediana do atributo “frutado”.
Azeite doce	A mediana do atributo “amargo” e a mediana do atributo “picante” são iguais ou inferiores a 2,0.»;

2) O ponto 9.4 passa a ter a seguinte redação:

«9.4. Classificação do azeite

Classificam-se azeites nas categorias seguintes em função da mediana dos defeitos e da mediana do atributo “frutado”. Entende-se por “mediana dos defeitos” a mediana do defeito a que tenha sido atribuída a intensidade mais elevada. A mediana dos defeitos e a mediana do atributo “frutado” são expressas com uma casa decimal.

Classifica-se o azeite por comparação do valor da mediana dos defeitos e da mediana do atributo “frutado” com os intervalos de referência a seguir indicados. Dado que foram estabelecidos tendo em conta o erro do método, os limites dos intervalos são considerados absolutos. O recurso a programas informáticos permite visualizar a classificação num quadro de dados estatísticos ou num gráfico.

- a) Azeite virgem extra: mediana dos defeitos igual a 0,0 e mediana do atributo “frutado” superior a 0,0;
- b) Azeite virgem: mediana dos defeitos superior a 0,0, mas não superior a 3,5, e mediana do atributo “frutado” superior a 0,0;
- c) Azeite virgem lampante: mediana dos defeitos superior a 3,5, ou mediana dos defeitos igual ou inferior a 3,5 e mediana do atributo “frutado” igual a 0,0.

Nota 1: Se a mediana do atributo “amargo” e/ou a mediana do atributo “picante” for superior a 5,0, o presidente do júri deve assinalá-lo no certificado de análise do azeite.

No caso das avaliações efetuadas no âmbito de verificações de conformidade, realiza-se um exame. No caso de contra-análises, realiza-se a avaliação em duplicado, em duas sessões de prova. Os resultados da análise em duplicado devem ser estatisticamente homogéneos (ver o ponto 9.5). Se tal não suceder, a amostra deve ser reanalisada duas vezes. Calcula-se o valor final da mediana de cada atributo de classificação a partir da média das duas medianas correspondentes.»

ANEXO V

O anexo XVII é alterado do seguinte modo:

1) O ponto 5.1 passa a ter a seguinte redação:

«5.1. Hexano ou mistura de alcanos com intervalo de ebulição 65 °C a 70 °C, destilada numa coluna de retificação. Se os valores de precisão obtidos forem semelhantes, pode substituir-se o hexano por iso-octano (2,2,4-trimetilpentano, para cromatografia). Pode verificar-se o resíduo, após evaporação, de 100 ml de solvente. Os solventes com temperatura de ebulição superior à do *n*-hexano demoram mais tempo a evaporar, embora sejam preferíveis, dada a toxicidade do hexano.»;

2) É aditado o seguinte texto ao ponto 6.3.3:

«Nota 10: Se a concentração de estigmastadienos exceder 4 mg/kg e for necessário determiná-los quantitativamente, o método a aplicar obrigatoriamente é o do Conselho Oleícola Internacional para determinação de esterenos.»

ANEXO VI

O anexo XVIII é alterado do seguinte modo:

1) O ponto 4.2.1 passa a ter a seguinte redação:

«4.2.1. Éter de petróleo, 40 °C-60 °C, para cromatografia ou hexano. Se os valores de precisão obtidos forem semelhantes, pode substituir-se o hexano por iso-octano (2,2,4-trimetilpentano, para cromatografia). Os solventes com temperatura de ebulição superior à do *n*-hexano demoram mais tempo a evaporar, embora sejam preferíveis, dada a toxicidade do hexano.»;

2) É aditado um ponto 4.2.12, com a seguinte redação:

«4.2.12. Heptano para cromatografia. Pode substituir-se o heptano por iso-octano (2,2,4-trimetilpentano, para cromatografia).»

ANEXO VII

«ANEXO XIX

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ESTERÓLICA, DO TEOR DE ESTERÓIS E DO TEOR DE COMPOSTOS ALCOÓLICOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM COLUNA CAPILAR

1. OBJETIVO

Este método descreve um processo de determinação do teor, individual e total, de compostos alcoólicos de azeites, de óleos de bagaço de azeitona e de misturas de azeites e óleos de bagaço de azeitona.

Os compostos alcoólicos dos azeites e óleos de bagaço de azeitona compreendem álcoois alifáticos, esteróis e diálcoois triterpénicos.

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Saponificação do azeite ou óleo, adicionado de α -colestanol e 1-icosanol como padrões internos, com hidróxido de potássio em solução etanólica; em seguida, extração com éter etílico do insaponificável.

Separação, do insaponificável, das diversas frações de compostos alcoólicos, por cromatografia de camada fina numa placa de sílica-gel alcalinizada (método de referência) ou por HPLC numa coluna de sílica-gel. Conversão da fração recuperada do sílica-gel em éteres trimetilsilílicos. Análise dos éteres por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar.

PARTE I**PREPARAÇÃO DO EXTRATO INSAPONIFICÁVEL**

1. OBJETIVO

Descreve-se a preparação e extração do insaponificável de azeites ou óleos de bagaço de azeitona.

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Saponificação de uma toma de ensaio, levando-a à ebulição sob refluxo com uma solução etanólica de hidróxido de potássio. Extração com éter dietílico do insaponificável.

3. APARELHOS E UTENSÍLIOS

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

3.1. Balão de 250 ml de fundo redondo, equipado com um condensador de refluxo com juntas esmeriladas;

3.2. Ampola de decantação de 500 ml;

3.3. Balões de 250 ml;

3.4. Microseringas de 100 μ l e 500 μ l;

3.5. Cadinho cilíndrico de fundo filtrante com porosidade G3 (poros de 15 μ m a 40 μ m), de aproximadamente 2 cm de diâmetro e 5 cm de profundidade, adequado para filtração sob vácuo, com junta esmerilada macho;

3.6. Balão de erlenmeyer de 50 ml com junta esmerilada fêmea, adaptável ao cadinho de fundo filtrante (3.5);

3.7. Tubo de centrifugação de fundo cónico, de 10 ml, com tampa de vidro hermética;

3.8. Exsicador de dicloreto de cálcio.

4. REAGENTES

4.1. Hidróxido de potássio a 85 % (ou de título superior).

- 4.2. Solução etanólica aproximadamente 2 M de hidróxido de potássio.
Dissolver, com arrefecimento, 130 g de hidróxido de potássio (4.1) em 200 ml de água destilada e completar o volume até um litro com etanol (4.7). Esta solução conserva-se em garrafas de vidro escuro bem fechadas, durante, no máximo, dois dias.
- 4.3. Éter etílico para análises.
- 4.4. Sulfato de sódio anidro para análises.
- 4.5. Acetona para cromatografia.
- 4.6. Éter etílico para cromatografia.
- 4.7. Etanol para análises.
- 4.8. Acetato de etilo para análises.
- 4.9. Padrão interno α -colestanol de pureza superior a 99 % (a verificar por análise cromatográfica em fase gasosa).
- 4.10. Solução de padrão interno a 0,2 % (m/v) de α -colestanol em acetato de etilo (4.8).
- 4.11. Solução a 10 g/l de fenoltaleína em etanol (4.7).
- 4.12. Solução a 0,1 % (m/v) de 1-eicosanol em acetato de etilo (padrão interno).

5. TÉCNICA

Introduzir num balão de 250 ml (3.1), por meio de uma microsseringa de 500 μ l (3.4), um volume da solução padrão interno de α -colestanol (4.10) e um volume da solução padrão interno de 1-eicosanol (4.12) cujas quantidades de colestanol e de eicosanol correspondam a cerca de 10 % do teor de álcoois e do teor de esteróis da amostra. Por exemplo, para 5 g de amostra de azeite, adicionar 500 μ l de solução de α -colestanol (4.10) e 250 μ l de solução de 1-eicosanol (4.12). Caso se trate de óleo de bagaço de azeitona, adicionar 1500 μ l de solução de α -colestanol (4.10) e 1500 μ l de solução de 1-eicosanol (4.12). Evaporar em banho-maria com uma corrente ligeira de azoto até à secura, arrefecer o balão e, em seguida, pesar exatamente $5 \pm 0,01$ g da amostra filtrada e seca para o mesmo balão.

Nota 1: No caso das matérias gordas vegetais e animais que contenham quantidades consideráveis de colesterol, pode observar-se um pico com tempo de retenção igual ao do pico do colestanol. Nesse caso, é necessário analisar a fração esterólica em duplicado, com e sem padrão interno.

Juntar 50 ml de solução etanólica 2 M de hidróxido de potássio (4.2) e um pouco de pedra-pomes, montar o condensador de refluxo e aquecer até ligeira ebulição, até que se produza a saponificação (a solução fica límpida). Continuar a aquecer durante 20 minutos, juntar 50 ml de água destilada pela parte de cima do condensador, retirar este e arrefecer o balão a cerca de 30 °C.

Transferir quantitativamente o conteúdo do balão para uma ampola de decantação de 500 ml (3.2), utilizando diversas vezes água destilada (50 ml). Juntar cerca de 80 ml de éter etílico (4.6) e agitar energicamente durante cerca de 60 segundos. Libertar a pressão de vez em quando, invertendo a ampola e retirando a tampa. Deixar em repouso até à separação completa das duas fases (nota 2). Em seguida, separar a fase saponificada, tão completamente quanto possível, para outra ampola de decantação. Proceder a duas outras extrações análogas da fase hidroalcoólica, utilizando de cada vez 60-70 ml de éter etílico (4.6).

Nota 2: As eventuais emulsões podem ser eliminadas juntando pequenas quantidades de etanol (4.7).

Reunir os três extratos etéreos numa ampola de decantação que já contenha 50 ml de água. Prosseguir a lavagem com água (50 ml), até a água deixar de produzir uma coloração rosada por adição de uma gota de solução de fenoltaleína (4.11). Uma vez eliminada a água de lavagem, filtrar através de sulfato de sódio anidro (4.4) para um balão de 250 ml previamente tarado. Lavar a ampola de decantação e o filtro com pequenas quantidades de éter etílico (4.6).

Evaporar o solvente por destilação sob vácuo, a 30 °C, num evaporador rotativo. Adicionar 5 ml de acetona (4.5) e eliminar completamente o solvente volátil com uma ligeira corrente de azoto. Secar o resíduo numa estufa a $103 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, durante 15 minutos. Arrefecer num exsiccador e pesar com a aproximação de 0,1 mg.

PARTE 2
SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES ALCÓOLICAS

1. OBJETIVO

Fracionamento do extrato insaponificável, preparado conforme se explicou na parte 1, nos diversos compostos alcoólicos: álcoois alifáticos, esteróis e diálcoois triterpénicos (eritrodiol e uvaol).

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Fracionamento do extrato insaponificável por cromatografia de camada fina em meio alcalino (método de referência), revelação das placas e raspagem e extração das bandas correspondentes. Como método alternativo de separação, pode utilizar-se HPLC em coluna de sílica-gel com detetor de UV, recolhendo-se as diversas frações. Os álcoois alifáticos e os álcoois triterpénicos, por um lado, e os esteróis e os diálcoois triterpénicos, por outro, são isolados conjuntamente.

3. APARELHOS E UTENSÍLIOS

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

- 3.1. Equipamento completo para análise por cromatografia em camada fina, com placas de vidro de 20 cm × 20 cm;
- 3.2. Lâmpada de ultravioleta de comprimento de onda de 366 nm ou 254 nm;
- 3.3. Microsseringas de 100 µl e 500 µl;
- 3.4. Cadinho cilíndrico de fundo filtrante com porosidade G3 (poros de 15 µm a 40 µm), de aproximadamente 2 cm de diâmetro e 5 cm de profundidade, adequado para filtração sob vácuo, com junta esmerilada macho;
- 3.5. Balão de erlenmeyer de 50 ml com junta esmerilada fêmea, adaptável ao cadinho de fundo filtrante (3.4);
- 3.6. Tubo de centrifugação de fundo cónico, de 10 ml, com tampa de vidro hermética;
- 3.7. Exsicador de dicloreto de cálcio;
- 3.8. Equipamento de HPLC, constituído por:
 - 3.8.1. Bomba binária;
 - 3.8.2. Injetor manual ou automático, equipado com circuito de injeção de 200 µl;
 - 3.8.3. Desgasificador em linha;
 - 3.8.4. Detetor UV-VIS ou IV;
- 3.9. Coluna para HPLC (25 cm × 4 mm de diâmetro interno), com enchimento de sílica gel 60 (granulometria de 5 µm);
- 3.10. Filtro para seringa, de 0,45 µm;
- 3.11. Balão de erlenmeyer de 25 ml.

4. REAGENTES

- 4.1. Hidróxido de potássio a 85 % (ou de título superior).
- 4.2. Solução etanólica aproximadamente 2 M de hidróxido de potássio.

Dissolver, com arrefecimento, 130 g de hidróxido de potássio (4.1) em 200 ml de água destilada e completar o volume até um litro com etanol (4.9). Esta solução conserva-se em garrafas de vidro escuro bem fechadas, durante, no máximo, dois dias.
- 4.3. Éter etílico para análises.
- 4.4. Solução etanólica aproximadamente 0,2 M de hidróxido de potássio.

Dissolver 13 g de hidróxido de potássio (4.1) em 20 ml de água destilada e completar o volume até um litro com etanol (4.9).
- 4.5. Placas de vidro (20 cm x 20 cm) revestidas de uma camada de sílica-gel, sem indicador de fluorescência, com 0,25 mm de espessura (disponíveis no comércio prontas a utilizar).
- 4.6. Acetona para cromatografia.

- 4.7. *n*-Hexano para cromatografia.
 - 4.8. Éter etílico para cromatografia.
 - 4.9. Etanol para análises.
 - 4.10. Acetato de etilo para análises.
 - 4.11. Solução de referência para a cromatografia em camada fina: solução a 5 % de colesterol, fitoesteróis, álcoois e eritrodiol em acetato de etilo (4.10).
 - 4.12. Solução etanólica a 0,2 % de 2,7-diclorofluoresceína. Adicionar algumas gotas da solução alcoólica 2 M de hidróxido de potássio (4.2) para tornar a solução ligeiramente básica.
 - 4.13. Mistura 65:35 (v/v) de *n*-hexano (4.7) e éter etílico (4.8).
 - 4.14. Fase móvel para a HPLC: mistura 1:1 (v/v) de *n*-hexano (4.7) e éter etílico (4.8).
5. MÉTODO DE REFERÊNCIA: SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS ALCOÓLICOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA EM PLACAS ALCALINIZADAS

Preparação das placas alcalinizadas para cromatografia em camada fina: imergir as placas com sílica-gel (4.5) cerca de 4 cm, durante 10 segundos, na solução etanólica 0,2 M de hidróxido de potássio (4.4); deixar secar durante duas horas numa câmara de exaustão e colocar numa estufa, a 100 °C, durante uma hora.

Retirar as placas da estufa e conservar num exsiccador com cloreto de cálcio (3.7) até à utilização (devem utilizar-se no prazo de 15 dias).

Introduzir a mistura de hexano e éter etílico (4.13) na câmara de revelação das placas (nota 3), até uma altura de aproximadamente 1 cm. Fechar a câmara com uma tampa adequada e deixar em repouso durante, pelo menos, meia hora, num local fresco, de modo que se estabeleça o equilíbrio líquido/vapor. Podem colocar-se nas superfícies internas da câmara folhas de papel de filtro que mergulhem no eluente. Esta precaução permite reduzir o tempo de revelação em cerca de um terço e obter uma eluição mais uniforme e regular dos componentes.

Nota 3: A fim de obter condições de eluição perfeitamente reprodutíveis, a mistura de revelação deve ser mudada em cada ensaio. Também pode utilizar-se um solvente constituído por uma mistura 50:50 (v/v) de *n*-hexano e éter etílico.

Preparar uma solução aproximadamente a 5 % do extrato insaponificável, preparado como se explicou na parte 1, em acetato de etilo (4.10) e, com a microsseringa de 100 µl (3.3), depositar na placa cromatográfica (4.5), a aproximadamente 2 cm do bordo inferior, 0,3 ml da solução supracitada, numa linha contínua, fina e uniforme. No alinhamento da linha de partida, depositar 2 µl a 3 µl da solução de referência (4.11), a fim de identificar a banda de esteróis, diálcoois triterpénicos e álcoois após a revelação.

Colocar a placa na câmara de revelação (3.1). A temperatura ambiente deve ser mantida entre 15 °C e 20 °C (nota 4). Tapar imediatamente a câmara e deixar eluir até que a frente de solvente chegue a cerca de 1 cm do bordo superior da placa. Retirar a placa da câmara de revelação e evaporar o solvente numa corrente de ar quente, ou deixando a placa sob um exaustor durante alguns momentos.

Nota 4: Temperaturas mais elevadas podem dificultar a separação.

Nebulizar a placa, ligeira e uniformemente, com a solução de 2,7-diclorofluoresceína (4.12) e deixar a secar. Quando a placa é observada à luz ultravioleta (3.2), as bandas dos esteróis, diálcoois triterpénicos e álcoois podem ser identificadas pelo alinhamento com as manchas obtidas para a solução de referência (4.11). Delimitar as bandas com um lápis preto ao longo das margens de fluorescência (ver a placa de cromatografia em camada fina na figura 1).

Raspar, com uma espátula metálica, o sílica-gel da zona delimitada. Introduzir a matéria retirada, finamente triturada, no cadinho de fundo filtrante (3.4). Juntar 10 ml de acetato de etilo (4.10) quente, misturar cuidadosamente com a espátula metálica e filtrar (se necessário sob vácuo). Recolher o filtrado no balão de erlenmeyer (3.5) ligado ao cadinho de fundo filtrante.

Lavar o resíduo no cadinho três vezes com éter etílico (4.3) (cerca de 10 ml de cada vez) e recolher o filtrado no balão de erlenmeyer adaptado ao cadinho de fundo filtrante. Evaporar o filtrado até se obter um volume de 4-5 ml. Transferir a solução residual para um tubo de centrifugação de 10 ml (3.6), previamente tarado, e evaporar até à secura, aquecendo suavemente, numa ligeira corrente de azoto. Deitar algumas gotas de acetona (4.6) e evaporar novamente até à secura. O resíduo contido no tubo é constituído pela fração esterólica e de diálcoois triterpénicos ou pela fração de álcoois e álcoois triterpénicos.

6. SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS ALCOÓLICOS POR HPLC

Dissolver em 3 ml da fase móvel (4.14) o extrato insaponificável obtido como se explicou na parte 1, filtrar a solução com um filtro para seringas (3.10) e guardar.

Injetar no equipamento de HPLC (3.8) 200 µl da solução filtrada do insaponificável.

Efetuar a separação por HPLC ao caudal de 0,8 ml/min, descartando o eluído dos primeiros cinco minutos e recolhendo em seguida o eluído em balões de erlenmeyer de 25 ml (3.11), entre os 5 e os 10 minutos de eluição os álcoois alifáticos e álcoois triterpénicos e entre os 11 e os 25 minutos de eluição os esteróis, o eritrodíol e o uvaol (nota 5).

Pode monitorizar-se a separação com um detetor de UV, ao comprimento de onda de 210 nm, ou com um detetor de índice de refração (ver a figura 6).

Evaporar as frações até à secura e prepará-las em seguida para a análise cromatográfica.

Nota 5: Dado que o éter etílico pode aumentar a pressão, é necessário regular cuidadosamente a pressão da bomba do equipamento HPLC, adaptando o fluxo de modo a manter a pressão sob controlo.

PARTE 3

ANÁLISE DAS FRAÇÕES ALCOÓLICAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

1. OBJETIVO

Esta parte fornece orientações gerais para a aplicação de um método cromatográfico em fase gasosa com coluna capilar na determinação da composição qualitativa e quantitativa dos compostos alcoólicos isolados pelo método descrito na parte 2.

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Conversão das frações obtidas a partir do extrato insaponificável por cromatografia em camada fina ou HPLC em éteres trimetilsilílicos e análise destes por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar, com injetor de divisão de fluxo e detetor de ionização por chama.

3. APARELHOS E UTENSÍLIOS

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

- 3.1. Tubo de centrifugação de fundo cónico, de 10 ml, com tampa de vidro hermética;
- 3.2. Cromatógrafo de fase gasosa adequado para colunas capilares, dotado de um sistema de injeção com divisão de fluxo ("split"), constituído por:
 - 3.2.1. Forno termostaticado para a coluna, que permita manter a temperatura desejada com a aproximação de ± 1 °C;
 - 3.2.2. Unidade de injeção de temperatura regulável, com elemento vaporizador de vidro persilanizado e sistema de divisão de fluxo;
 - 3.2.3. Detetor de ionização por chama;
 - 3.2.4. Sistema de aquisição de dados adequado para o detetor de ionização por chama (3.10.3.), com possibilidade de integração manual;
- 3.3. Coluna capilar de sílica fundida, com 20-30 m de comprimento e 0,25-0,32 mm de diâmetro interno, revestida interiormente com uma camada de difenil (5 %) – dimetil (95 %) polissiloxano (fase estacionária SE-52, SE-54 ou equivalente), de espessura uniforme compreendida entre 0,10 µm e 0,30 µm;
- 3.4. Microseringa de 10 µl para cromatografia em fase gasosa, com agulha cementada, adequada para o sistema de injeção com divisão de fluxo.

4. REAGENTES

- 4.1. Piridina anidra para cromatografia.
- 4.2. Hexametildissilazano para análises.
- 4.3. Trimetilclorossilano para análises.

- 4.4. Soluções-amostra dos éteres trimetilsilílicos dos esteróis: a preparar no momento da utilização a partir dos esteróis e do eritrodíol provenientes dos azeites ou óleos que os contenham.
 - 4.5. Solução-padrão de éteres trimetilsilílicos dos álcoois alifáticos C20 a C28: a preparar, a partir de misturas de álcoois puros, no momento da utilização.
 - 4.6. Gás vetor: hidrogénio ou hélio, para cromatografia em fase gasosa.
 - 4.7. Gases auxiliares: hidrogénio, hélio, azoto e ar, para cromatografia em fase gasosa.
 - 4.8. Reagente de sililação, constituído por uma mistura 9:3.1 (v/v/v) de piridina, hexametildissilazano e trimetilclorossilano.
 - 4.9. *n*-Hexano para cromatografia.
5. PREPARAÇÃO DOS ÉTERES TRIMETILSILÍLICOS

No tubo de centrifugação (3.1) que contém a fração alcoólica, juntar o reagente de sililação (4.8) (nota 6), na proporção de 50 µl por miligrama de compostos alcoólicos, evitando qualquer absorção de humidade (nota 7).

Nota 6: Existem no comércio soluções prontas a utilizar. Estão igualmente disponíveis outros reagentes de sililação, como o bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + 1 % de trimetilclorossilano, a diluir num volume igual de piridina anidra. Pode substituir-se a piridina por igual quantidade de acetoneitrilo.

Nota 7: A ligeira opalescência eventualmente formada é normal e não provoca interferências. A formação de um floculado branco ou o aparecimento de uma coloração rosa indicam a presença de humidade ou deterioração do reagente. Nessa eventualidade, a análise tem de ser repetida (apenas se for utilizado hexametildissilazano/trimetilclorossilano).

Tapar o tubo de centrifugação (3.1) e agitar cuidadosamente (sem virar) até à solubilização completa dos compostos. Deixar repousar durante, pelo menos, 15 minutos à temperatura ambiente e depois centrifugar durante alguns minutos. A solução límpida está pronta a ser analisada por cromatografia em fase gasosa.

6. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

6.1. Operações preliminares, condicionamento da coluna capilar

Instalar a coluna (3.3) no cromatógrafo de fase gasosa, ligando a extremidade de entrada à câmara de injeção com divisão de fluxo e a extremidade de saída ao detetor.

Efetuar as verificações gerais da unidade de cromatografia em fase gasosa (hermeticidade do circuito dos gases, eficácia do detetor, eficácia do sistema de divisão de fluxo e do sistema de registo etc.).

Se a coluna for utilizada pela primeira vez, é aconselhável condicioná-la. Para isso, faz-se passar um ligeiro fluxo gasoso pela coluna, liga-se a unidade de cromatografia em fase gasosa e aquece-se gradualmente, até atingir uma temperatura pelo menos 20 °C acima da temperatura de trabalho (nota 8). Mantém-se essa temperatura durante, pelo menos, duas horas. Em seguida, leva-se toda a unidade às condições de trabalho (regulação do fluxo gasoso e da divisão de fluxo, inflamação da chama, ligação ao sistema de computação, regulação da temperatura da coluna, do detetor e do injetor etc.) e regista-se o sinal com sensibilidade pelo menos duas vezes superior à pretendida para a análise. O traçado da linha de base obtida deve ser linear, sem qualquer pico ou desvio. Um desvio retilíneo negativo indica hermeticidade imperfeita das ligações da coluna; se for positivo, indica condicionamento inadequado da mesma.

Nota 8: A temperatura de condicionamento deve ser sempre inferior, em pelo menos 20 °C, à temperatura máxima especificada para a fase estacionária utilizada.

6.2. Condições de trabalho

Otimizar o programa de temperatura e o fluxo do gás vetor de modo a obter cromatogramas semelhantes aos ilustrados nas figuras 3 a 6.

Os seguintes parâmetros foram experimentados e revelaram-se úteis:

6.2.1. Álcoois alifáticos

Programação da temperatura do forno	180 °C (8 min.) → 260 °C (gradiente de 5 °C/min.) → 260 °C (15 min)
Temperatura do injetor	280 °C
Temperatura do detetor	290 °C
Velocidade linear do gás vetor	hélio: 20-30 cm/s; hidrogénio: 30-50 cm/s
Divisão de fluxo ("split"):	1:50 a 1:100
Volume injetado	0,5-1 µl de solução de éteres trimetilsilílicos

6.2.2. Esteróis e diálcoois triterpénicos

Programação da temperatura do forno	260 °C ± 5 °C, condições isotérmicas
Temperatura do injetor	280 °C a 300 °C
Temperatura do detetor	280 °C a 300 °C
Velocidade linear do gás vetor	hélio: 20-30 cm/s; hidrogénio: 30-50 cm/s
Divisão de fluxo ("split"):	1:50 a 1:100
Volume injetado	0,5-1 µl de solução de éteres trimetilsilílicos

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

- tempo de retenção do álcool C26: 18 minutos ± 5 minutos;
- pico do álcool C22: 80 % ± 20 % da escala completa, no caso do azeite, e 40 % ± 20 % da escala completa, no caso do óleo de bagaço de azeitona;
- tempo de retenção do pico do β-sitosterol: 20 minutos ± 5 minutos;
- pico do campesterol do azeite (teor médio de 3 %): 20 % ± 5 % da escala completa;
- separação de todos os esteróis presentes. É necessário que, além de se apresentarem separados, os picos apresentem também resolução completa, ou seja, o traçado do pico deve voltar à linha de base antes do arranque do pico seguinte. No entanto, é tolerada uma resolução incompleta, desde que o pico a TRR 1,02 (sitostanol) seja quantificável segundo a perpendicular.

6.3. Técnica analítica

Com a microsseringa de 10 µl (3.4), tomar 1 µl de hexano, aspirar 0,5 µl de ar e, em seguida, 0,5 µl a 1 µl da solução da amostra. Puxar um pouco mais o êmbolo da seringa, para que a agulha fique vazia. Introduzir a agulha através da membrana do injetor e, transcorridos 1 s a 2 s, injetar rapidamente. Passados cerca de 5 s, retirar a agulha devagar. Também pode utilizar-se um injetor automático.

Efetuar o registo até à eluição completa dos éteres trimetilsilílicos dos compostos alcoólicos presentes. A linha de base deve continuar a corresponder às condições de trabalho respetivas (6.2.1 ou 6.2.2).

6.4. Identificação dos picos

Identificam-se individualmente os picos com base nos tempos de retenção, por comparação com as misturas de éteres trimetilsilílicos de, respetivamente, álcoois alifáticos e álcoois triterpénicos, uma, e esteróis e diálcoois triterpénicos, a outra, cromatografadas nas mesmas condições. A figura 3 ilustra um cromatograma da fração de álcoois alifáticos e álcoois triterpénicos; a figura 2 o cromatograma correspondente à fração de esteróis e diálcoois triterpénicos.

A ordem de eluição dos álcoois alifáticos é a seguinte: C20-ol (P.I.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol e C28-ol.

A ordem de eluição dos esteróis e dos diálcoois triterpénicos é a seguinte: colesterol, brassicasterol, ergosterol, 24-metilenocolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ 7-campesterol, Δ 5,23-estigmastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ 5-avenasterol, Δ 5,24-estigmastadienol, Δ 7-estigmastenol, Δ 7-avenasterol, eritrodíol e uvaol.

6.5. Determinação quantitativa

Recorrendo ao sistema de aquisição de dados, calcula-se a área dos picos do 1-eicosanol e dos álcoois alifáticos C22, C24, C26 e C28. Considera-se o coeficiente de resposta para o 1-eicosanol igual a 1.

Recorrendo ao sistema de computação, calcula-se a área dos picos do α -colestanol, dos esteróis e dos diálcoois triterpénicos. Não se consideram os eventuais picos de compostos não incluídos na lista do quadro 1 (não se efetua o cálculo para o ergosterol). Considera-se o coeficiente de resposta para o α -colestanol igual a 1.

Calcula-se a concentração de cada composto alcoólico, em mg/kg de matéria gorda, do seguinte modo:

$$\text{Composto alcoólico } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

em que:

A_x = área do pico do composto alcoólico x, em unidades do sistema de computação;

A_s = área do pico do 1-eicosanol/ α -colestanol, em unidades do sistema de computação;

m_s = massa de 1-eicosanol/ α -colestanol adicionada, em miligramas;

m = massa da toma de amostra utilizada na determinação, em gramas.

7. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Exprime-se a concentração de cada álcool alifático ou triterpénico em mg/kg de matéria gorda e a soma das concentrações respetivas como "teor total de álcoois alifáticos". O teor total corresponde à soma de C22, C24, C26 e C28.

Exprime-se a concentração de cada composto alcoólico com uma casa decimal.

A concentração de esteróis totais é expressa sem casas decimais.

Calcula-se a percentagem de cada esterol a partir da relação entre a área do pico respetivo e a soma das áreas dos picos de esteróis.

$$\text{Esterol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

em que:

A_x = área do pico do esterol x;

ΣA = soma das áreas dos picos de esteróis.

β -sitosterol aparente: Δ 5,23-estigmastadienol + clerosterol + β -sitosterol + sitostanol + Δ 5-avenasterol + Δ 5,24-estigmastadienol.

Cálculo da percentagem de eritrodiol e uvaol:

$$\text{Eritrodiol} + \text{uvaol} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

em que:

A_{Er} = área do pico do eritrodiol, em unidades do sistema de computação;

A_{Uv} = área do pico do uvaol, em unidades do sistema de computação;

ΣA_T = soma das áreas dos picos dos esteróis, do eritrodiol e do uvaol, em unidades do sistema de computação.

Além do cálculo da percentagem relativa de cada esterol e diálcool triterpénico e da concentração total de esteróis, calculam-se a concentração de eritrodiol, a concentração de uvaol e a soma destas concentrações, em mg/kg de matéria gorda, por aplicação das seguintes expressões:

$$\text{Eritrodiol} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Uvaol} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

em que:

A_{Er} = área do pico do eritrodiol, em unidades do sistema de computação;

A_{Uv} = área do pico do uvaol, em unidades do sistema de computação;

A_s = área do pico do α -colestanol, em unidades do sistema de computação;

m_s = massa de α -colestanol adicionada, em miligramas;

m = massa da toma de amostra utilizada na determinação, em gramas.

—

Apêndice

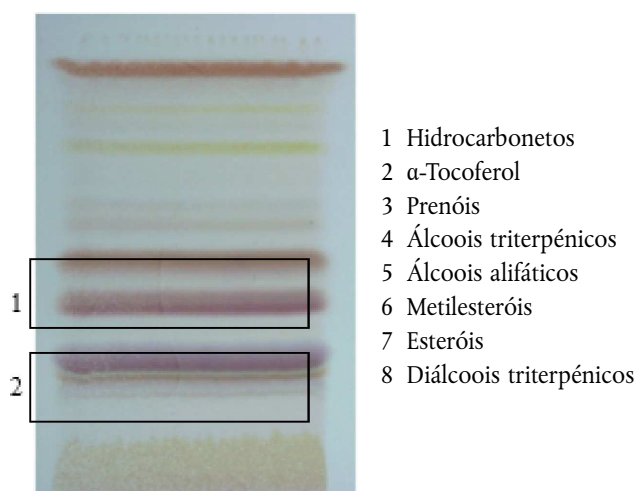


Figura 1 – Placa de cromatografia em camada fina da fração insaponificável de um óleo de bagaço de azeitona eluída duas vezes com uma mistura 65:35 de hexano e éter dietílico, revelada com H_2SO_4 (50 %) e aquecida. As bandas a raspar são as delimitadas pelos retângulos: 1 designa as bandas dos álcoois alifáticos e 2 as dos esteróis e dos diálcoois triterpénicos.

Quadro I – Tempos de retenção relativos dos esteróis

Pico	Identificação		Tempos de retenção relativos	
			Coluna SE 54	Coluna SE 52
1	Colesterol	Δ^5 -Colesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	Colestanol	5 α -Colestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brassicasterol	[24S]-24-Metil- $\Delta^5,22$ -colestadien-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-Metil- $\Delta^5,7,22$ -colestatrien-3 β -ol	0,78	0,76
4	24-Metilenocolesterol	24-Metileno- $\Delta^5,24$ -colestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	Campesterol	[24R]-24-Metil- Δ^5 -colestén-3 β -ol	0,83	0,81
6	Campestanol	[24R]-24-Metilcolestén-3 β -ol	0,85	0,82
7	Estigmasterol	[24S]-24-Etil- $\Delta^5,22$ -colestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ^7 -Campesterol	[24R]-24-Metil- Δ^7 -colestén-3 β -ol	0,93	0,92
9	$\Delta^5,23$ -Estigmastadienol	[24R,S]-24-Etil- $\Delta^5,23$ -colestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	Clerosterol	[24S]-24-Etil- $\Delta^5,25$ -colestadien-3 β -ol	0,96	0,96

Pico	Identificação		Tempos de retenção relativos	
			Coluna SE 54	Coluna SE 52
11	β -Sitosterol	[24R]-24-etil- Δ 5-colesten-3 β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-Etilcoleston-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ 5-Avenasterol	[24Z]-24-Etilideno- Δ 7-colesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ 5,24-Estigmastadienol	[24R,S]-24-Etil- Δ 5,24-colestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ 7-Estigmastenol	[24R,S]-24-Etil- Δ 7-colesten-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ 7-Avenasterol	[24Z]-24-Etilideno- Δ 7-colesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	Eritrodiol	5 α -Olean-12-eno-3 β ,28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-Urseno-3 β ,28-diol	1,52	1,52

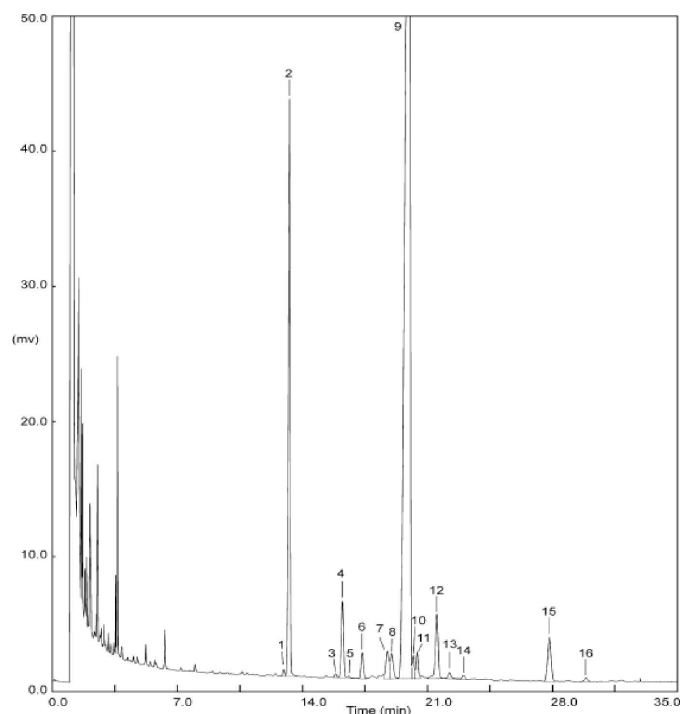


Figura 2 – Traçado de cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização por chama dos esteróis e dos diálcoois triterpénicos de um azeite refinado (tempo em minutos). (1) Colesterol, (2) α -colestanol (P.I.), (3) 24-metilenocolesterol, (4) campesterol, (5) campestanol, (6) estigmasterol, (7) Δ 5,23-estigmastadienol, (8) clerosterol, (9) β -sitosterol, (10) sitostanol, (11) Δ 5-avenasterol, (12) Δ 5,24-estigmastadienol, (13) Δ 7-estigmastenol, (14) Δ 7-avenasterol, (15) eritrodiol, (16) uvaol.

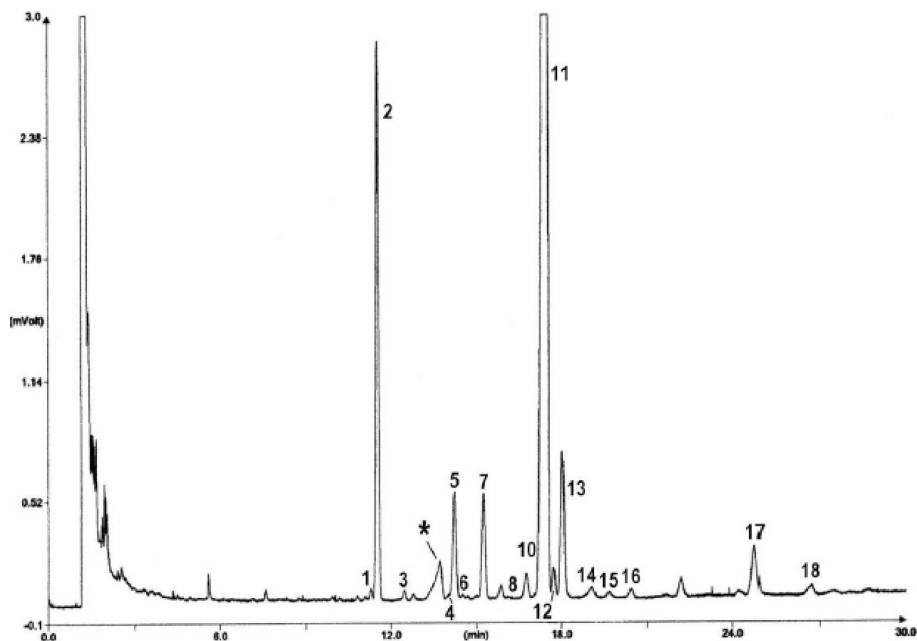


Figura 3 – Traçado de cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização por chama dos esteróis e dos diálcoois triterpénicos de um azeite lampante. (1) Colesterol, (2) α -colestanol, (3) brassicasterol, (4) 24-metilenocolesterol, (5) campesterol, (6) campestanol, (7) estigmasterol, (8) Δ^7 -campesterol, (9) $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol, (10) clerosterol, (11) β -sitosterol, (12) sitostanol, (13) Δ^5 -avenasterol, (14) $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol, (15) Δ^7 -estigmasterol, (16) Δ^7 -avenasterol, (17) eritrodíol, (18) uvaol.

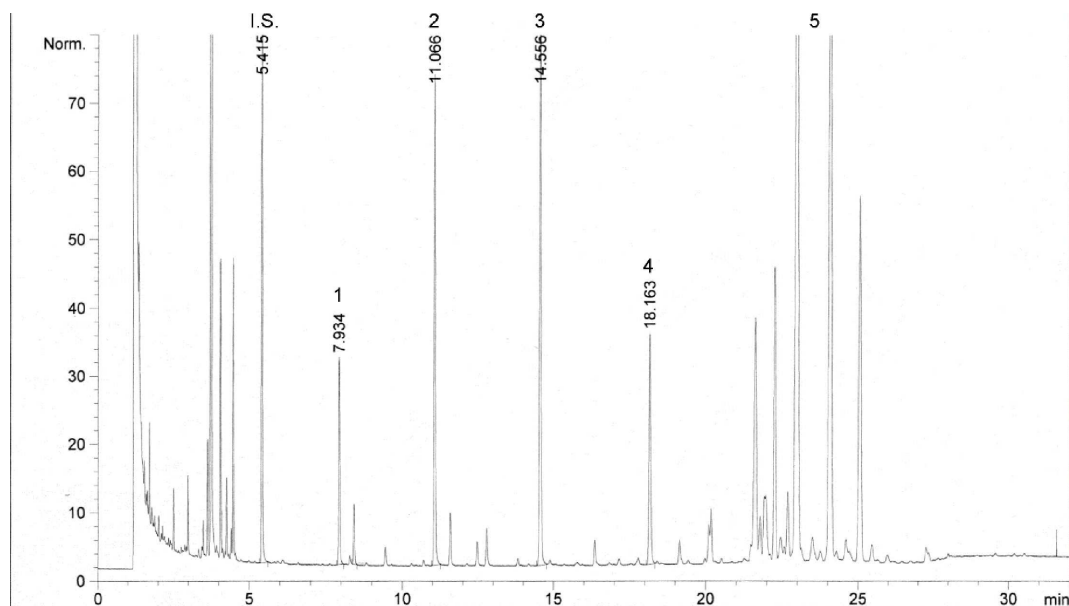


Figura 4 – Traçado de cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização por chama dos álcoois alifáticos e dos álcoois triterpénicos de um azeite. (I.S. – padrão interno) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) álcoois triterpénicos.

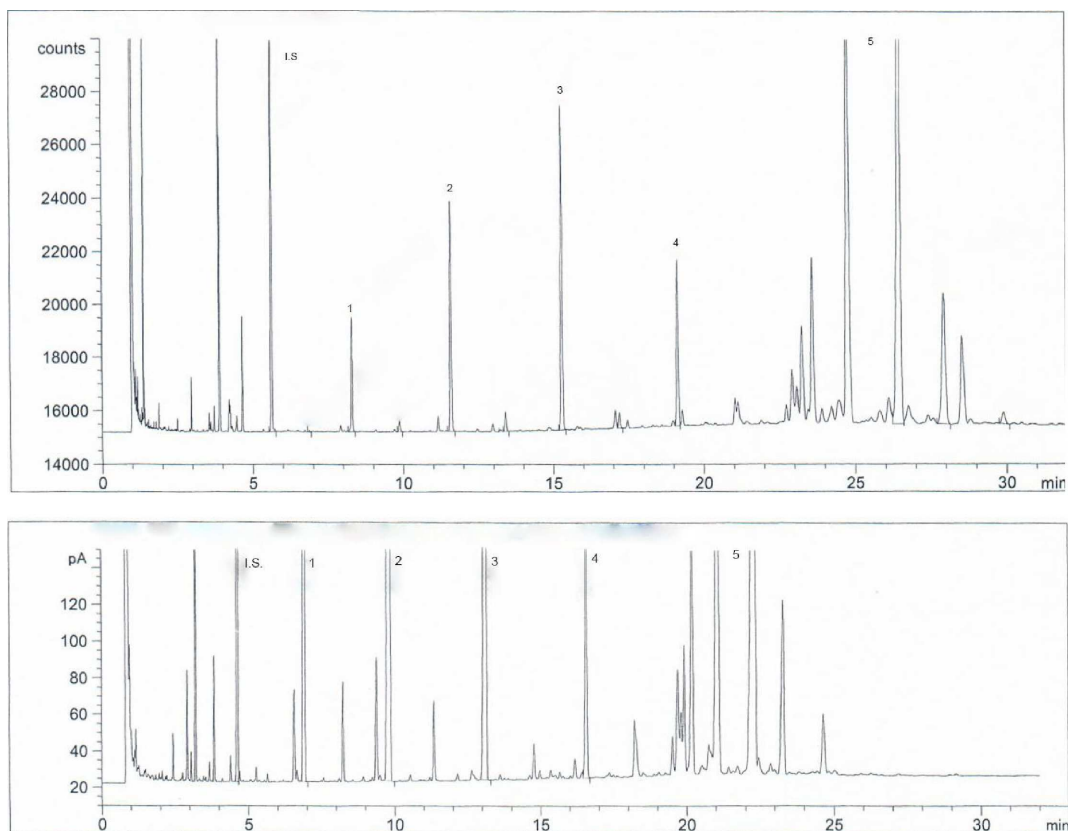


Figura 5 – Traçado de cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização por chama dos álcoois alifáticos e dos álcoois triterpénicos de um azeite refinado e de um azeite de segunda centrifugação. (I.S. – padrão interno) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) álcoois triterpénicos.

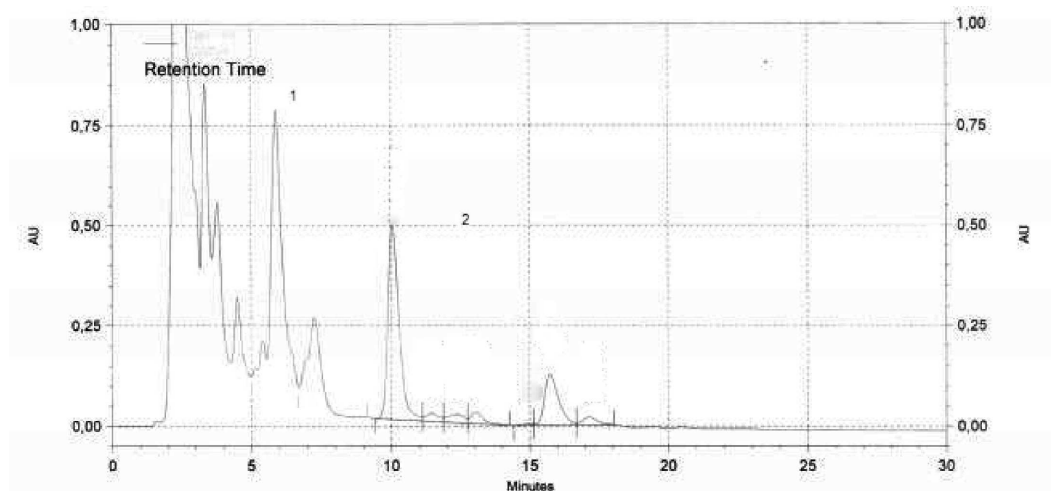


Figura 6 – Traçado HPLC da fração insaponificável de um azeite separada por HPLC, utilizando um detetor UV (tempo de retenção em minutos). (1) Álcoois alifáticos e álcoois triterpénicos (2) Esteróis e diálcoois triterpénicos.»