

II

(Actos não legislativos)

REGULAMENTOS

REGULAMENTO (UE) N.º 61/2011 DA COMISSÃO

de 24 de Janeiro de 2011

que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados

A COMISSÃO EUROPEIA,

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

Tendo em conta o Regulamento (CE) n.º 1234/2007 do Conselho, de 22 de Outubro de 2007, que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas (Regulamento «OCM única») ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 113.º, n.º 1, alínea a), e o artigo 121.º, alínea h), em conjugação com o artigo 4.º,

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão ⁽²⁾ define as características físicas e químicas dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como os métodos de análise relacionados. Estes métodos, assim como os valores-limite relativos às características dos azeites e óleos, têm de ser actualizados com base no parecer dos peritos químicos e de ser coerentes com os trabalhos efectuados no âmbito do Conselho Oleícola Internacional.
- (2) Dado que os peritos químicos consideraram, nomeadamente, que o teor de ésteres etílicos de ácidos gordos e de ésteres metílicos de ácidos gordos constitui um parâmetro útil de qualidade dos azeites virgem extra, é adequado incluir valores-limite para esses ésteres, bem como um método de determinação do respectivo teor.
- (3) Para possibilitar um período de adaptação às novas normas e a implantação dos meios necessários à aplicação das mesmas, e para não perturbar as transacções comerciais, as alterações efectuadas pelo presente regulamento devem ser aplicáveis a partir de 1 de Abril de 2011. Pelas mesmas razões, é conveniente prever que os azeites e os óleos de bagaço de azeitona legalmente fabricados e rotulados na União, ou legalmente importados para a mesma e colocados em livre prática, antes da data referida possam ser comercializados até ao esgotamento das existências.

(4) O Regulamento (CEE) n.º 2568/91 deve, portanto, ser alterado em conformidade.

(5) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Gestão para a Organização Comum dos Mercados Agrícolas,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

O Regulamento (CEE) n.º 2568/91 é alterado do seguinte modo:

1) Ao artigo 2.º, n.º 1, é aditado o seguinte travessão:

«— para a 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, o método constante do anexo XX».

2) Ao sumário dos anexos, é aditado o seguinte:

«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».

3) O anexo I é substituído pelo texto do anexo I do presente regulamento.

4) É aditado o anexo XX constante do anexo II do presente regulamento.

Artigo 2.º

Os produtos legalmente fabricados e rotulados na União, ou legalmente importados para a mesma e colocados em livre prática, antes de 1 de Abril de 2011 podem ser comercializados até ao esgotamento das existências.

⁽¹⁾ JO L 299 de 16.11.2007, p. 1.

⁽²⁾ JO L 248 de 5.9.1991, p. 1.

Artigo 3.º

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

O presente regulamento é aplicável a partir de 1 de Abril de 2011.

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

Feito em Bruxelas, em 24 de Janeiro de 2011.

Pela Comissão
O Presidente
José Manuel BARROSO

ANEXO I

«ANEXO I

CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES

Categoria	Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) e ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE)		Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadieno mg/kg ⁽¹⁾	Diferença entre o ECN42 determinado por HPLC e o ECN42 obtido por cálculo teórico	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Exame organoléptico Mediana dos defeitos (Md) (*)	Exame organoléptico Mediana do frutado (Mf) (*)
1. Azeite virgem extra	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg ou 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg e (FAEE/ FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Azeite virgem	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
3. Azeite lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 ⁽³⁾	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 ⁽²⁾	—
4. Azeite refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	—	—	—	> 350 ⁽⁴⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Óleo de bagaço de azeitona	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

⁽¹⁾ Soma dos isómeros - separáveis ou não em coluna capilar.

⁽²⁾ Ou quando a mediana dos defeitos for inferior ou igual a 3,5 e a mediana do frutado igual a 0.

⁽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 se a percentagem de eritrodiol e uvaol for superior a 3,5%.

Categoria	Teor de ácidos ⁽¹⁾						Soma dos isómeros transoleicos (%)	Soma dos isómeros translinoleicos + translinolenicos (%)	Composição esterólica						Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodiol e uvaol (%) (**)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eicosenóico (%)	Beénico (%)	Lignocénico (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	Betasitosterol (%) ⁽²⁾	Delta-7-estigmasterol (%)		
1. Azeite virgem extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Azeite virgem	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Azeite lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Azeite refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

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

⁽²⁾ Soma de: delta-5,23-estigmastadienol + clerosterol + beta-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 se 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 produto seja classificado noutra categoria ou declarado não conforme quanto à sua pureza, para os efeitos do presente regulamento.
- O asterisco (*) associado a determinadas características de qualidade do azeite significa o seguinte:
— no caso do azeite lampante, que os limites correspondentes podem não ser observados simultaneamente;
— no caso dos azeites virgens, que a não observância de um dos limites correspondentes implica uma mudança de categoria, mantendo-se, porém, a classificação numa das categorias de azeites virgens.
- No caso dos óleos de bagaço de azeitona, os limites relativos às características de qualidade assinaladas com dois asteriscos (**) podem não ser observados simultaneamente.»

ANEXO II

«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**1. OBJECTIVO**

Apresenta-se seguidamente o método de determinação do teor de ceras e de ésteres metílicos e etílicos de ácidos gordos de azeites e óleos de bagaço de azeitona. As ceras e os ésteres alquílicos são separados de acordo com o respectivo número de átomos de carbono. O método é recomendado para distinguir azeites de óleos de bagaço de azeitona e para determinar a qualidade dos azeites virgem extra, permitindo a detecção de misturas fraudulentas destes com azeites de qualidade inferior, quer sejam virgens, lampantes ou desodorizados.

2. PRINCÍPIO

Adição ao azeite ou óleo de bagaço de azeitona de padrões internos adequados e fraccionamento por cromatografia com uma coluna de silicagel hidratada. Recuperação da fracção eluída nas condições de ensaio (fracção com polaridade inferior à dos triacilgliceróis) e análise directa por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar.

3. APARELHOS E UTENSÍLIOS**3.1. Erlenmeyer de 25 ml.****3.2. Coluna de vidro** para cromatografia em fase líquida (15 mm de diâmetro interno, 30-40 cm de comprimento), munida de uma torneira adequada.**3.3. Cromatógrafo de fase gasosa** utilizável com coluna capilar, equipado com um sistema de injeção directa na coluna, constituído pelos seguintes componentes:**3.3.1. Forno termostático com programação de temperatura.****3.3.2. Injector** para injeção directa a frio na coluna.**3.3.3. Detector de ionização de chama e conversor-amplificador.****3.3.4. Registador-integrador** (nota 1) para utilização com o conversor-amplificador (3.3.3), com tempo de resposta não superior a 1 s e velocidade do papel variável.

Nota 1: Podem também utilizar-se sistemas informatizados, no caso de os dados cromatográficos serem registados num computador pessoal.

3.3.5. Coluna capilar de sílica fundida (para a análise das ceras e dos ésteres metílicos e etílicos), de 8-12 m de comprimento e 0,25-0,32 mm de diâmetro interno, com revestimento interno de fase líquida (nota 2) numa espessura uniforme de 0,10-0,30 μm .

Nota 2: Para o fim em causa, encontram-se disponíveis no comércio fases líquidas como SE52, SE54, etc.

3.4. Microseringa de 10 μl , munida de agulha de aço cementado, para injeção directa na coluna.**3.5. Vibrador eléctrico.****3.6. Evaporador rotativo.****3.7. Mufla.****3.8. Balança analítica** com sensibilidade de $\pm 0,1$ mg.**3.9. Material de vidro** de uso laboratorial corrente.

4. REAGENTES

- 4.1. **Silicagel** com granulometria de 60-200 µm. Colocar a silicagel na mufla, a 500 °C, durante, pelo menos, 4 h. Deixar arrefecer e adicionar 2 % de água, relativamente à quantidade de silicagel. Agitar bem para homogeneizar e manter no exsiccador durante, pelo menos, 12 h antes de utilizar.

- 4.2. **n-Hexano** de qualidade cromatográfica ou para determinação de resíduos (é necessário comprovar o grau de pureza).

ADVERTÊNCIA – Possibilidade de ignição dos vapores. Manter ao abrigo 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 eléctricos que não sejam constituídos por materiais não-inflamáveis. Nocivo 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.

- 4.3. **Éter etílico de qualidade cromatográfica.**

ADVERTÊNCIA – Altamente inflamável e moderadamente tóxico. Irritante para a pele. Nocivo por inalação. Pode causar danos oculares. Possibilidade de efeitos retardados. Possibilidade de formação de peróxidos explosivos. Possibilidade de ignição dos vapores. Manter ao abrigo 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 eléctricos que não sejam constituídos por materiais não-inflamáveis. Não evaporar à secura ou perto da secura. A adição de água ou de um agente redutor adequado reduz o risco da formação de peróxidos. Não beber. Evitar respirar os vapores. Evitar o contacto prolongado ou repetido com a pele.

- 4.4. **n-Heptano** de qualidade cromatográfica ou **iso-octano**.

ADVERTÊNCIA – Inflamável. Nocivo por inalação. 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 respirar os vapores. Evitar o contacto prolongado ou repetido com a pele.

- 4.5. **Solução-padrão de araquidato de laurilo** (nota 3) a 0,05 % (m/V) em heptano (padrão interno para as ceras).

Nota 3: Podem também utilizar-se palmitato de palmitilo, estearato de miristilo ou laureato de araquidilo.

- 4.6. **Solução-padrão de heptadecanoato de metilo** a 0,02 % (m/v) em heptano (padrão interno para os ésteres metílicos e etílicos).

- 4.7. **Corante Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftol).**

- 4.8. **Gás vector: hidrogénio ou hélio puros, de qualidade para cromatografia em fase gasosa.**

ADVERTÊNCIA

Hidrogénio. Altamente inflamável, sob pressão. Manter ao abrigo de fontes de calor, faíscas, chamas descobertas ou dispositivos eléctricos que não sejam constituídos por materiais não-inflamáveis. Assegurar que a torneira da garrafa se encontra fechada quando esta não estiver a ser utilizada. Utilizar sempre um redutor de pressão. Reduzir a tensão da mola redutora antes de abrir a torneira da garrafa. Não permanecer em frente da saída da garrafa ao abrir a torneira. Assegurar uma ventilação adequada durante o uso. Não transferir hidrogénio entre garrafas. Não misturar gases na garrafa. Assegurar que as garrafas não possam cair. Manter as garrafas ao abrigo da luz solar e de fontes de calor. Armazenar ao abrigo da corrosão. Não utilizar garrafas danificadas ou sem rótulo.

Hélio. Gás comprimido a alta pressão. Reduz a quantidade de oxigénio respirável. Manter a garrafa fechada. Assegurar uma ventilação adequada durante o uso. Não aceder aos locais de armazenagem se os mesmos não estiverem devidamente ventilados. Utilizar sempre um redutor de pressão. Reduzir a tensão da mola redutora antes de abrir a torneira da garrafa. Não transferir gás entre garrafas. Assegurar que as garrafas não possam cair. Não permanecer em frente da saída da garrafa ao abrir a torneira. Manter as garrafas ao abrigo da luz solar e de fontes de calor. Armazenar ao abrigo da corrosão. Não utilizar garrafas danificadas ou sem rótulo. Não inalar. Utilizar apenas para fins técnicos.

4.9. Gases auxiliares:

- Hidrogénio puro, de qualidade cromatográfica.
- Ar puro, de qualidade para cromatografia em fase gasosa.

ADVERTÊNCIA

Ar. Gás comprimido a alta pressão. Utilizar com precaução na presença de substâncias combustíveis, dado que a temperatura de auto-ignição da maioria dos compostos orgânicos no ar é consideravelmente inferior a altas pressões. Assegurar que a torneira da garrafa se encontra fechada quando esta não estiver a ser utilizada. Utilizar sempre um redutor de pressão. Reduzir a tensão da mola redutora antes de abrir a torneira da garrafa. Não permanecer em frente da saída da garrafa ao abrir a torneira. Não transferir gás entre garrafas. Não misturar gases na garrafa. Assegurar que as garrafas não possam cair. Manter ao abrigo da luz solar e de fontes de calor. Armazenar ao abrigo da corrosão. Não utilizar garrafas danificadas ou sem rótulo. O ar destinado a utilizações técnicas não pode ser utilizado em dispositivos de inalação ou respiratórios.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparação da coluna cromatográfica

Preparar uma suspensão de 15 g de silicagel (4.1) em *n*-hexano (4.2) e introduzi-la na coluna (3.2). Deixar assentar espontaneamente. Completar a operação por recurso a um vibrador eléctrico, de modo a tornar mais homogênea a camada cromatográfica. Fazer passar 30 ml de *n*-hexano para remover eventuais impurezas. Por recurso à balança analítica (3.8), pesar rigorosamente cerca de 500 mg da amostra no erlenmeyer de 25 ml (3.1), adicionando uma quantidade adequada de padrão interno (4.5), em função do teor de ceras previsível (adicionar, por exemplo, 0,1 mg de araquidato de laurilo no caso dos azeites, 0,25-0,50 mg no caso dos óleos de bagaço de azeitona e 0,05 mg de heptadecanoato de metilo no caso dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona (4.6)).

Transferir a amostra preparada para a coluna cromatográfica com o auxílio de duas porções de 2 ml de *n*-hexano (4.2).

Deixar fluir o solvente até 1 mm acima da camada de silicagel e fazer passar em seguida mistura *n*-hexano/éter etílico (99:1). Recolher 220 ml a um caudal aproximado de 15 gotas em cada 10 segundos. (**Esta fracção contém os ésteres metílicos e etílicos e as ceras**). (nota 4) (nota 5).

Nota 4: A mistura de n-hexano/éter etílico (99:1) deve ser preparada diariamente.

Nota 5: Com o objectivo de verificar visualmente se as ceras são eluídas de forma adequada, pode adicionar-se à solução-amostra 100 µl de corante Sudan I a 1 %.

O tempo de retenção do corante situa-se entre os tempos de retenção das ceras e dos triacilgliceróis. Assim, deve suspender-se a eluição quando o corante atinge a base da coluna cromatográfica, dado todas as ceras terem então sido eluídas.

Evaporar as fracções resultantes num evaporador rotativo, até à remoção quase total do solvente. Remover os últimos 2 ml com uma corrente de azoto ligeira. Recolher a fracção que contém os ésteres metílicos e etílicos e diluir com 2-4 ml de *n*-heptano ou iso-octano.

5.2. Análise por cromatografia em fase gasosa

5.2.1. Operações preliminares

Instalar a coluna no cromatógrafo de fase gasosa (3.3), ligando uma das extremidades ao sistema de injeção directa na coluna e a outra extremidade ao detector. Efectuar uma verificação do sistema cromatográfico (operacionalidade dos circuitos de gases, eficiência do detector e do registador, etc.).

Se a coluna for utilizada pela primeira vez, é aconselhável proceder ao seu condicionamento. Para o efeito, passar um ligeiro fluxo gasoso pela coluna, ligando o cromatógrafo de seguida. Aumentar a temperatura gradualmente de forma a atingir 350 °C após cerca de 4 h.

Manter esta temperatura durante, pelo menos, 2 h, regulando seguidamente o aparelho para as condições de trabalho (regular o caudal de gás, acender a chama, ligar ao registador electrónico - ponto 3.3.4 -, regular a temperatura do forno para a coluna, regular o detector, etc.). Registrar o sinal obtido, com uma sensibilidade pelo menos dupla da sensibilidade prevista para a execução da análise. A linha de base deve ser linear, sem qualquer pico ou desvio.

A ocorrência de um desvio linear negativo indica que as ligações da coluna não foram efectuadas de modo correcto; a ocorrência de um desvio positivo indica que a coluna não foi condicionada de forma correcta.

5.2.2. *Escolha das condições de trabalho para a determinação das ceras e dos ésteres metílicos e etílicos (nota 6).*

As condições de trabalho são, em geral, as seguintes:

— Temperatura da coluna:

20 °C/min 5 °C/min

80 °C no início (1') — 140 °C — 335 °C (20')

— Temperatura do detector: 350 °C.

— Quantidade injectada: 1 µl de solução de *n*-heptano (2-4 ml).

— Gás vector: hélio ou hidrogénio, à velocidade linear óptima para o gás seleccionado (ver o apêndice A).

— Sensibilidade dos instrumentos: adequada ao cumprimento das condições atrás referidas.

Nota 6: Atendendo à elevada temperatura final, é admissível um desvio positivo, mas que não deverá exceder 10 % da escala.

Estas condições podem ser alteradas em função das características da coluna e do cromatógrafo, tendo em vista a separação total das ceras e dos ésteres metílicos e etílicos dos ácidos gordos e uma resolução satisfatória dos picos (ver as figuras 2, 3 e 4), bem como a obtenção de um tempo de retenção de 18 ± 3 minutos para o padrão interno (araquidato de laurilo). O pico mais representativo correspondente às ceras deverá elevar-se a pelo menos 60% da escala, devendo o pico correspondente ao padrão interno para os ésteres metílicos e etílicos (heptadecanoato de metilo) atingir a totalidade da escala.

Os parâmetros de integração dos picos devem ser determinados de modo a obter uma estimativa correcta das áreas dos picos pertinentes.

5.3. **Execução da análise**

Efectuar uma toma de 10 µl de solução com a microseringa de 10 µl, puxando o êmbolo até esvaziar a agulha. Introduzir a agulha no sistema de injeção e, decorridos 1-2 s, injectar rapidamente a amostra. Retirar cuidadosamente a agulha decorridos cerca de 5 s.

Efectuar o registo até à eluição completa das ceras ou dos estigmastadienos, consoante a fracção em análise.

A linha de base deve satisfazer sempre as condições requeridas.

5.4. **Identificação dos picos**

Identificar os picos com base nos tempos de retenção, comparando-os com os tempos de retenção de misturas conhecidas de ceras, analisadas nas mesmas condições. Os ésteres alquílicos são identificados com base em misturas de ésteres metílicos e etílicos dos principais ácidos gordos presentes no azeite (ácidos palmítico e oleico).

A figura 1 apresenta um cromatograma característico das ceras de um azeite virgem. As figuras 2 e 3 apresentam cromatogramas de dois azeites extra virgem vendidos a retalho, num dos casos com os respectivos ésteres metílicos e etílicos e, no outro, sem eles. A figura 4 apresenta cromatogramas característicos de um azeite virgem extra de qualidade superior e do mesmo azeite após a adição de 20 % de um azeite desodorizado.

5.5. **Análise quantitativa das ceras**

Com o auxílio do integrador, determinar a área dos picos correspondentes ao padrão interno (araquidato de laurilo) e aos ésteres alifáticos C₄₀-C₄₆.

Determinar o teor total de ceras, expresso em mg/kg de gordura, através do somatório das várias ceras, por recurso à seguinte fórmula:

$$\text{Ceras, mg/kg} = \frac{(\Sigma A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

sendo:

A_x = área do pico correspondente a um determinado éster, calculada por via informática

A_s = área do pico correspondente ao padrão interno (araquidato de laurilo), calculada por via informática

m_s = massa de padrão interno (araquidato de laurilo) adicionada, em miligramas;

m = massa da toma de amostra para a determinação, em gramas.

5.5.1. *Análise quantitativa dos ésteres metílicos e etílicos*

Com o auxílio do integrador, determinar a área dos picos correspondentes ao padrão interno (heptadecanoato de metilo), aos ésteres metílicos dos ácidos gordos C₁₆ e C₁₈ e aos ésteres etílicos dos mesmos ácidos gordos.

Determinar o teor de cada éster alquílico, expresso em mg/kg de gordura, por recurso à seguinte fórmula:

$$\text{Ester, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

sendo:

A_x = área do pico correspondente a um determinado éster C₁₆ ou C₁₈, calculada por via informática

A_s = área do pico correspondente ao padrão interno (heptadecanoato de metilo), calculada por via informática

m_s = massa de padrão interno (heptadecanoato de metilo) adicionada, em miligramas;

m = massa da toma de amostra para a determinação, em gramas.

6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Apresentar a soma dos teores das várias ceras de C₄₀ a C₄₆ (*nota 7*), em miligramas por quilograma de gordura.

Apresentar a soma dos teores dos ésteres metílicos e dos ésteres etílicos de C₁₆ a C₁₈, bem como o total de ambos.

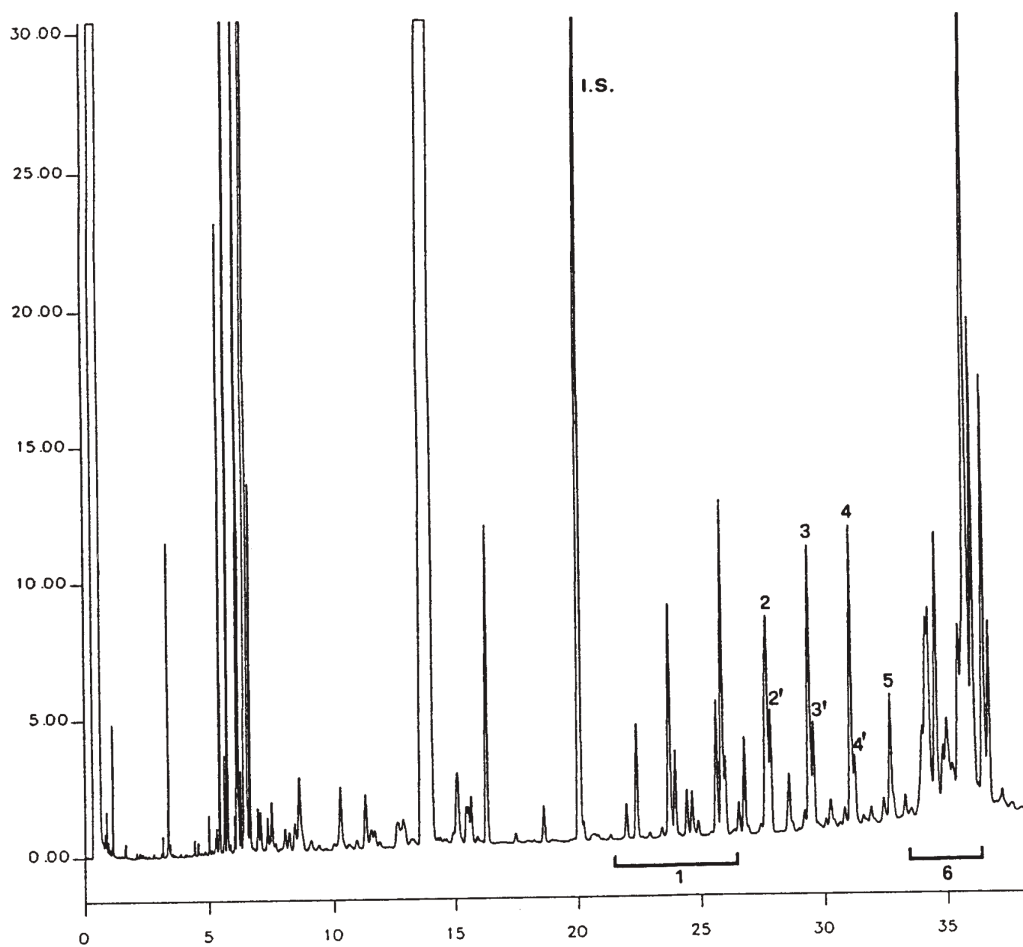
Os resultados devem ser expressos com a aproximação de 1 mg/kg.

Nota 7: Os componentes a quantificar dizem respeito aos picos correspondentes aos ésteres C₄₀ - C₄₆ com número par de átomos de carbono, como se exemplifica no cromatograma das ceras de um azeite que consta da figura anexa. Para fins de identificação, em caso de desdobramento do éster C₄₆, recomenda-se a análise da fracção de ceras de um óleo de bagaço de azeitona, no qual o pico correspondente ao éster C₄₆ se distingue pela sua predominância.

Apresentar a relação entre ésteres etílicos e ésteres metílicos.

Figura 1

Exemplo de cromatograma de fase gasosa da fracção de ceras de um azeite (*)



Picos com tempos de retenção compreendidos entre 5 e 8 min correspondentes aos ésteres metílicos e etílicos dos ácidos gordos

Legenda:

I.S. = Araquidato de laurilo

1 = Ésteres diterpénicos

2+2' = Ésteres C₄₀

3+3' = Ésteres C₄₂

4+4' = Ésteres C₄₄

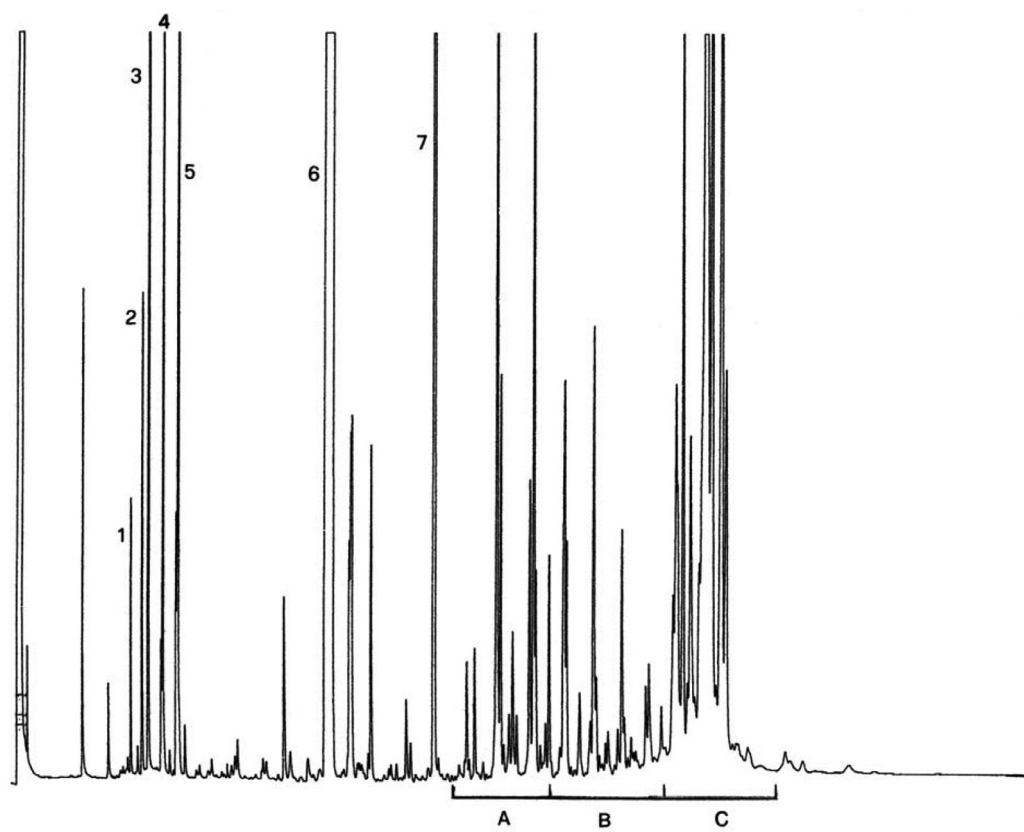
5 = Ésteres C₄₆

6 = Ésteres de esteróis e de álcoois triterpénicos

(*) O cromatograma não deve apresentar quaisquer picos significativos (correspondentes a triacilgliceróis) após a eluição dos ésteres de esteróis.

Figura 2

Ésteres metílicos, ésteres etílicos e ceras num azeite virgem

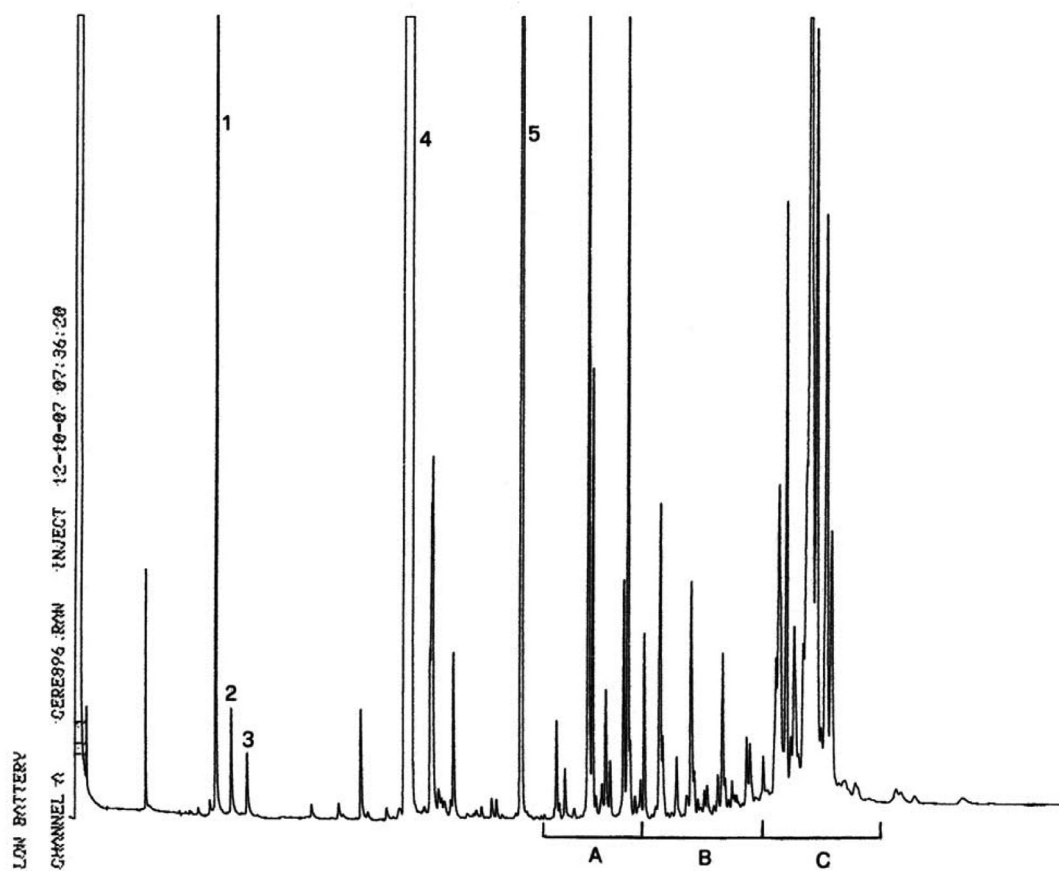


Legenda:

- 1 – Ésteres metílicos C_{16}
- 2 – Ésteres etílicos C_{16}
- 3 – Padrão interno (heptadecanoato de metilo)
- 4 – Ésteres metílicos C_{18}
- 5 – Ésteres etílicos C_{18}
- 6 – Esqualeno
- 7 – Padrão interno (araquidato de laurilo)
- A – Ésteres diterpénicos
- B – Ceras
- C – Ésteres de esteróis e ésteres triterpénicos

Figura 3

Ésteres metílicos, ésteres etílicos e ceras num azeite virgem extra

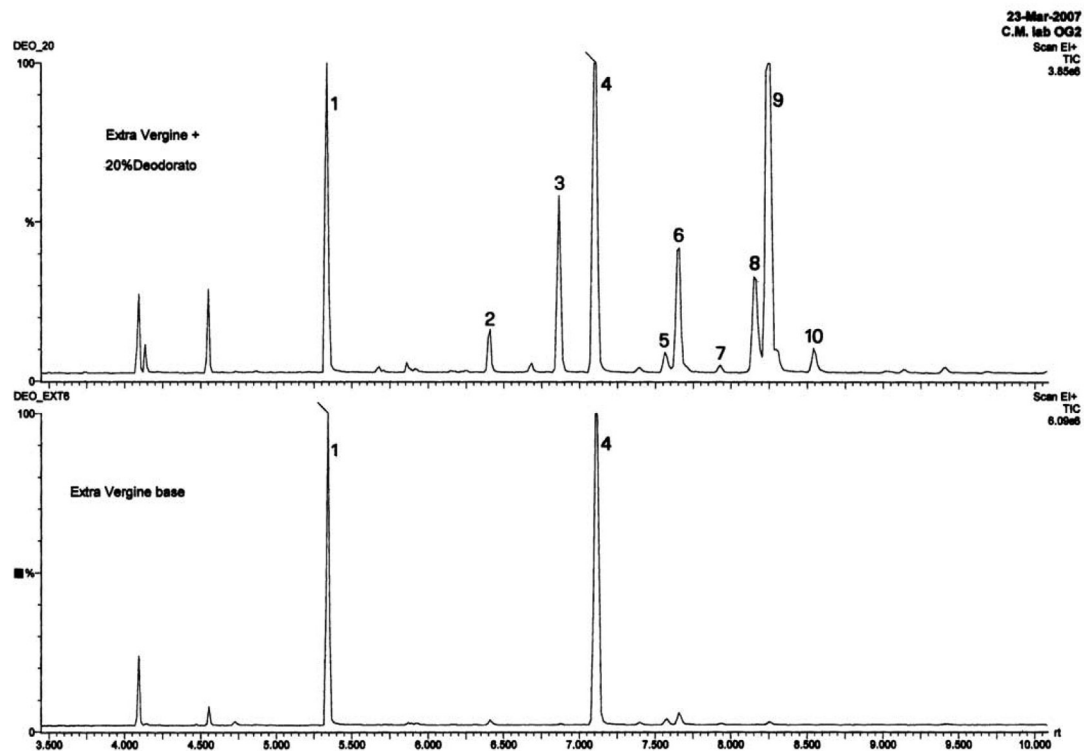


Legenda:

- 1 – Padrão interno (heptadecanoato de metilo)
- 2 – Ésteres metílicos C_{18}
- 3 – Ésteres etílicos C_{18}
- 4 – Esqualeno
- 5 – Padrão interno (araquidato de laurilo)
- A – Ésteres diterpénicos
- B – Ceras
- C – Ésteres de esteróis e ésteres triterpénicos

Figura 4

Parte do cromatograma de um azeite virgem extra e do mesmo azeite após a adição de azeite desodorizado



Legenda:

- 1 – Padrão interno (miristato de metilo)
- 2 – Palmitato de metilo
- 3 – Palmitato de etilo
- 4 – Padrão interno (heptadecanoato de metilo)
- 5 – Linoleato de metilo
- 6 – Oleato de metilo
- 7 – Estearato de metilo
- 8 – Linoleato de etilo
- 9 – Oleato de etilo
- 10 – Estearato de etilo

*Apêndice A***Determinação da velocidade linear do gás**

Injectar 1 a 3 μl de metano (ou propano) no cromatógrafo de fase gasosa, regulado para as condições normais de trabalho, e medir o tempo necessário para o gás percorrer a coluna, desde o momento da injeção até ao registo do respectivo pico (t_M).

A velocidade linear, expressa em cm/s , é dada por L/t_M , sendo L o comprimento da coluna, expresso em centímetros, e t_M o tempo de retenção, expresso em segundos.»
