

REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) N.º 1348/2013 DA COMISSÃO**de 16 de dezembro de 2013****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, primeiro parágrafo, alíneas a) e 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 químicas e organolépticas dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona e descreve os métodos a utilizar para as determinar. Esses métodos, assim como os valores-limite relativos às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, devem ser atualizados com base no parecer dos peritos químicos e em consonância com o trabalho realizado no Conselho Oleícola Internacional (COI).
- (2) Para garantir que são aplicadas na União as últimas normas internacionais estabelecidas pelo COI, é necessário atualizar determinados métodos de análise e determinados valores-limite relativos às características dos azeites e óleos de bagaço de azeitona estabelecidos no Regulamento (CEE) n.º 2568/91.
- (3) Devem, portanto, ser adaptados os valores-limite para os estigmastadienos, as ceras, o ácido mirístico e os ésteres alquílicos de ácidos gordos e alterados em conformidade os esquemas de decisão utilizados para verificar se as amostras de azeites ou de óleos de bagaço de azeitona correspondem à categoria declarada. A fim de facilitar o comércio e de garantir a autenticidade dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como para proteger os interesses dos consumidores, é necessário introduzir um esquema de decisão com parâmetros mais restritivos para o campesterol e o delta-7-estigmastenol. É necessário substituir o método de análise relativo à composição e ao teor de esteróis e para determinação do eritrodiol e do uvaol por um método mais fiável, que também abranja os diálcoois triterpénicos. É igualmente necessário reformular a avaliação organoléptica dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona e aditar um método para deteção de outros óleos vegetais nos azeites e nos óleos de bagaço de azeitona.
- (4) Deve ainda adaptar-se em conformidade o método de amostragem de azeites e de óleos de bagaço de azeitona aos novos procedimentos de verificação da conformidade dos mesmos.
- (5) O Regulamento (CEE) n.º 2568/91 deve, portanto, ser alterado em conformidade.
- (6) Para possibilitar um período de adaptação às novas regras e a implantação dos meios necessários à aplicação das mesmas e para não perturbar as transações comerciais, as alterações efetuadas pelo presente regulamento devem ser aplicáveis a partir de 1 de março de 2014. Pelas mesmas razões, é conveniente estabelecer que os azeites e os óleos de bagaço de azeitona legalmente fabricados e rotulados na União, ou legalmente importados para a União e nela colocados em livre prática, antes daquela data possam ser comercializados até ao esgotamento das existências.
- (7) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Gestão 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 passa a ter a seguinte redação:

«Artigo 2.º

1. A determinação das características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona previstas no anexo I é efetuada de acordo com os seguintes métodos de análise:

- a) Para determinação dos ácidos gordos livres, expressos em percentagem de ácido oleico, o método descrito no anexo II;
- b) Para determinação do índice de peróxidos, o método descrito no anexo III;
- c) Para determinação do teor de ceras, o método descrito no anexo IV;
- d) Para determinação da composição e do teor de esteróis e de diálcoois triterpénicos por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar, o método descrito no anexo V;
- e) Para determinação da percentagem de monopalmitato de 2-glicerilo, o método descrito no anexo VII;
- f) Para a análise espectralométrica, o método descrito no anexo IX;
- g) Para determinação da composição de ácidos gordos, o método descrito nos anexos XA e XB;
- h) Para determinação dos solventes halogenados voláteis, o método descrito no anexo XI;

⁽¹⁾ JO L 299 de 16.11.2007, p. 1.

⁽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).

- i) Para avaliação das características organolépticas dos azeites virgens, o método descrito no anexo XII;
- j) Para determinação dos estigmastadienos, o método descrito no anexo XVII;
- k) Para determinação do teor de triacilgliceróis com NCE42, o método descrito no anexo XVIII;
- l) Para determinação do teor de álcoois alifáticos, o método descrito no anexo XIX;
- m) Para determinação do teor de ceras, de ésteres metílicos de ácidos gordos e de ésteres etílicos de ácidos gordos, o método descrito no anexo XX.

O método de análise a utilizar na deteção de outros óleos vegetais nos azeites é o método descrito no anexo XXA.

2. A verificação, pelas autoridades nacionais ou por representantes destas, das características organolépticas de azeites virgens deve ser efetuada por júris de provadores aprovados pelos Estados-Membros.

As características organolépticas de um azeite referido no primeiro parágrafo serão consideradas conformes com a categoria de azeite declarada se um júri aprovado pelo Estado-Membro em causa confirmar a classificação atribuída.

Se o júri não confirmar a categoria declarada no respeitante às características organolépticas, as autoridades nacionais ou os representantes destas farão realizar sem demora, a pedido do interessado, duas contra-análises por outros júris aprovados, das quais pelo menos uma a efetuar por um júri 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, as despesas das contra-análises devem ser imputadas ao interessado.

3. A colheita de amostras para fins de verificação, pelas autoridades nacionais ou por representantes destas, das características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona previstas no n.º 1 deve ser efetuada de acordo com as normas internacionais EN ISO 661, relativa à preparação das amostras para ensaio, e EN ISO 5555, relativa à amostragem. Todavia, por derrogação ao ponto 6.8 da norma EN ISO 5555, no caso dos lotes dos referidos azeites e óleos de bagaço de azeitona em embalagens imediatas, a colheita de amostras deve ser efetuada de acordo com o anexo IA do presente regulamento. No caso dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona a granel cuja amostragem não possa ser realizada de acordo com a norma EN ISO 5555, a amostragem deve ser realizada segundo as instruções da autoridade competente do Estado-Membro.

Sem prejuízo da norma EN ISO 5555 e do capítulo 6 da norma EN ISO 661, as amostras devem ser colocadas, o mais rapidamente possível, ao abrigo da luz e de tempera-

turas elevadas e ser enviadas para análise, ao laboratório, o mais tardar no quinto dia útil após a sua colheita. Caso contrário, as amostras devem ser conservadas de modo a que não se degradem nem deterioresem antes de chegarem ao laboratório, durante o seu transporte ou armazenagem.

4. Para efeitos da verificação prevista no n.º 3, as análises referidas nos anexos II, III, IX, XII e XX, bem como, se for caso disso, as contra-análises exigidas pela legislação nacional, devem, no caso dos produtos embalados, ser efetuadas antes do final do prazo de durabilidade mínima. No caso das amostras de azeites e de óleos de bagaço de azeitona a granel, as referidas análises devem ser efetuadas, o mais tardar, no sexto mês após aquele em que as amostras foram colhidas.

Não se estabelece nenhum prazo para as outras análises previstas no presente regulamento.

Salvo no caso de a colheita da amostra ter ocorrido menos de dois meses antes do final do prazo de durabilidade mínima, se os resultados das análises não corresponderem às características da categoria de azeite ou de óleo de bagaço de azeitona declarada, o interessado deve ser notificado, o mais tardar, um mês antes do final do período previsto no primeiro parágrafo.

5. Para a determinação das características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona pelos métodos previstos no n.º 1, primeiro parágrafo, os resultados analíticos devem ser diretamente comparados com os limites estabelecidos no presente regulamento.»

- 2) O anexo I é substituído pelo texto do anexo I do presente regulamento.
- 3) O anexo I-A é substituído pelo texto do anexo II do presente regulamento.
- 4) O anexo I-B é substituído pelo texto do anexo III do presente regulamento.
- 5) O anexo V é substituído pelo texto do anexo IV do presente regulamento.
- 6) O anexo VI é suprimido.
- 7) O anexo XII é substituído pelo texto do anexo V do presente regulamento.
- 8) É inserido, após o anexo XX, um novo anexo, XXA, constituído pelo texto do anexo VI do presente regulamento.

Artigo 2.º

Os produtos legalmente fabricados e rotulados na União, ou legalmente importados para a União e nela colocados em livre prática, antes de 1 de março de 2014 podem ser comercializados até ao esgotamento das existências.

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 aplicável a partir de 1 de março de 2014.

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

Feito em Bruxelas, em 16 de dezembro de 2013.

Pela Comissão

O Presidente

José Manuel BARROSO

CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES E ÓLEOS DE BAGAÇO DE AZEITONA

Categoria	Ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE) (mg/kg) (*)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxidos (mEq O ₂ /kg) (*)	Ceras (mg/kg) (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadienos ⁽¹⁾ (mg/kg)	Diferença entre o NCE42 determinado por HPLC e o NCE42 obtido por cálculo teórico ⁽²⁾	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ ou K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Exame organoléptico Mediana dos defeitos (Md) (*)	Exame organoléptico Mediana do frutado (Mf) (*)
1. Azeite virgem extra	FAEE ≤ 40 (campanha de 2013-2014) ⁽³⁾ FAEE ≤ 35 (campanha de 2014-2015) FAEE ≤ 30 (campanhas posteriores à de 2014-2015)	≤ 0,8	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 se % de ácido palmítico total >14 %							
2. Azeite virgem	—	≤ 2,0	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 se % de ácido palmítico total >14 %							
3. Azeite lampante	—	> 2,0	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 300 ⁽⁴⁾	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 ⁽⁵⁾	—
					≤ 1,1 se % de ácido palmítico total >14 %							
4. Azeite refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 se % de ácido palmítico total >14 %							

Categoria	Ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE) (mg/kg) (*)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxidos (mEq O ₂ /kg) (*)	Ceras (mg/kg) (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadienos ⁽¹⁾ (mg/kg)	Diferença entre o NCE42 determinado por HPLC e o NCE42 obtido por cálculo teórico ⁽²⁾	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ ou K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Exame organoléptico Mediana dos defeitos (Md) (*)	Exame organoléptico Mediana do frutado (Mf) (*)
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 se % de ácido palmítico total > 14 %							
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	—	—	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350 ⁽⁶⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Óleo de bagaço de azeitona	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

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

⁽²⁾ O azeite ou óleo tem de ser conforme com o método descrito no anexo XXA.

⁽³⁾ Limite aplicável aos azeites produzidos a partir de 1 de março de 2014.

⁽⁴⁾ 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 eritrodíol e uvaol for inferior ou igual a 3,5 %.

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

⁽⁶⁾ 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 eritrodíol e uvaol for superior a 3,5 %.

Categoria	Composição de ácidos gordos ⁽¹⁾						Total dos isómeros transoleicos (%)	Total dos isómeros trans-linoleicos + trans-linolénicos (%)	Composição esterólica						Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodíol e uvaol (%) ^(**)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eicosenóico (%)	Beénico (%)	Lignocérico (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol ⁽²⁾ (%)	Estigmasterol (%)	β-sitosterol aparente ⁽³⁾ (%)	Delta-7-estigmatenol ⁽²⁾ (%)		
1. Azeite virgem extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Azeite virgem	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Azeite lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽⁴⁾
4. Azeite refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5

Categoria	Composição de ácidos gordos ⁽¹⁾						Total dos isómeros transoleicos (%)	Total dos isómeros trans-linoleicos + trans-linolénicos (%)	Composição esterólica						Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodiol e uvaol (%) ^(**)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eicosenóico (%)	Beénico (%)	Lignocérico (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campessterol ⁽²⁾ (%)	Estigmasterol (%)	β-sitosterol aparente ⁽³⁾ (%)	Delta-7-estigmatstenol ⁽²⁾ (%)		
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 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	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁵⁾
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 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	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 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: 7,50-20,00; - palmitoleico: 0,30-3,50; - heptadecanóico: ≤ 0,30; - heptadecenóico: ≤ 0,30; - esteárico: 0,50-5,00; - oleico: 55,00-83,00; - linoleico: 3,50-21,00.

⁽²⁾ Ver o apêndice ao presente anexo.

⁽³⁾ β-Sitosterol aparente: delta-5,23-estigmastadienol + clerosterol + β-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

⁽⁴⁾ 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 %.

⁽⁵⁾ 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 %.

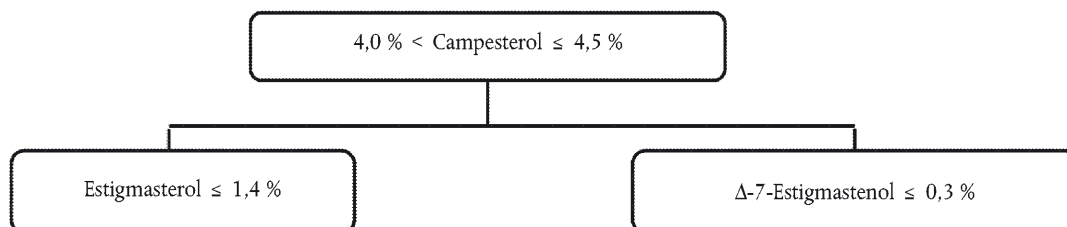
Notas:

- 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 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 assinaladas com dois asteriscos (**) podem não ser observados simultaneamente.

Apêndice

Esquema de decisão

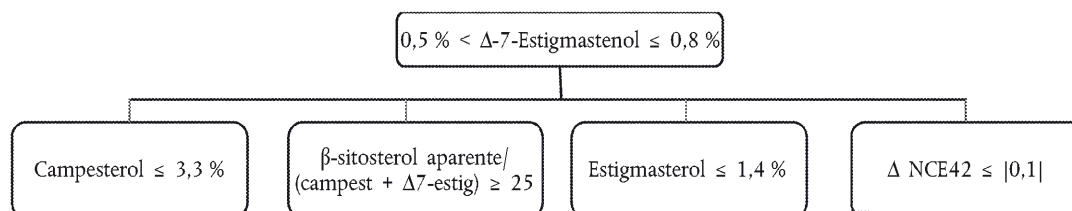
Esquema de decisão relativo ao **campesterol** para azeites virgens e azeites virgens extra:



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

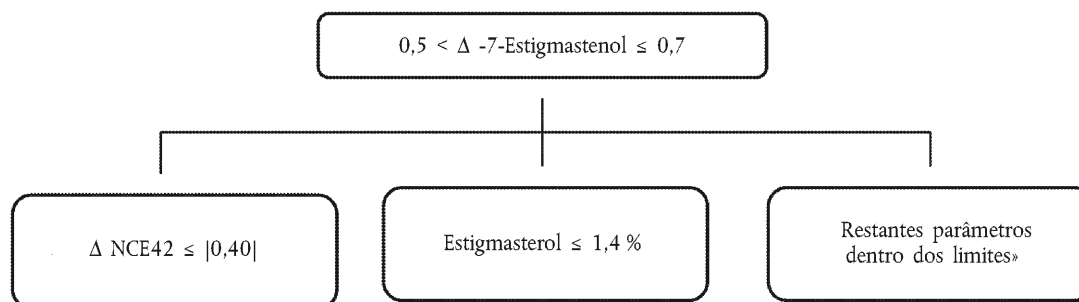
Esquema de decisão relativo ao **delta-7-estigmasterol** para:

— 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)



ANEXO II

«ANEXO I-A

AMOSTRAGEM DE AZEITES E ÓLEOS DE BAGAÇO DE AZEITONA ENTREGUES EM EMBALAGENS IMEDIATAS

O presente método de amostragem é aplicável a lotes de azeite ou óleo de bagaço de azeitona acondicionados em embalagens imediatas. O método de amostragem depende do volume da embalagem imediata (até 5 litros ou superior a 5 litros).

Entende-se por «lote» um conjunto de unidades de venda produzidas, fabricadas e acondicionadas em circunstâncias tais que o azeite ou óleo nelas contido seja considerado homogéneo relativamente a todas as características analíticas. A individualização dos lotes deve respeitar o disposto na Diretiva 2011/91/UE do Parlamento Europeu e do Conselho ⁽¹⁾.

Entende-se por «incremento» a quantidade de azeite ou óleo de uma embalagem imediata, proveniente de um ponto aleatório do lote.

1. COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE PARTIDA**1.1. Embalagens imediatas de volume não superior a 5 litros**

Entende-se por «amostra de partida» de embalagens imediatas de volume não superior a 5 litros o número de incrementos provenientes do lote de acordo com o quadro 1.

Quadro 1

Composição mínima das amostras de partida

Capacidade das embalagens imediatas	Proveniência do azeite ou óleo da amostra de partida
a) Igual ou superior a 1 litro	a) Uma embalagem imediata
b) Inferior a 1 litro	b) Número mínimo de embalagens cuja capacidade total seja de, pelo menos, 1,0 litro

O Estado-Membro pode aumentar, em função das suas necessidades (por exemplo, realização da avaliação organoléptica por um laboratório diferente do que realiza as análises químicas, contra-análises, etc.), o número de embalagens estabelecido no quadro 1 para a amostra de partida.

1.2. Embalagens imediatas de volume superior a 5 litros

Entende-se por «amostra de partida» de embalagens imediatas de volume superior a 5 litros uma parte representativa do total de incrementos, obtida por um processo de redução de acordo com o quadro 2. A amostra de partida é obrigatoriamente constituída por vários exemplos.

Entende-se por «exemplo» da amostra de partida cada embalagem que a compõe.

Quadro 2

Número mínimo de incrementos

Número de embalagens do lote	Número mínimo de incrementos
Até 10	1
Entre 11 e 150	2
Entre 151 e 500	3
Entre 501 e 1 500	4
Entre 1 501 e 2 500	5
> 2 500, por cada 1 000 embalagens	1 incremento suplementar

⁽¹⁾ Diretiva 2011/91/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 13 de dezembro de 2011, relativa às menções ou marcas que permitem identificar o lote ao qual pertence um género alimentício (JO L 334 de 16.12.2011, p. 1).

A fim de reduzir o volume das embalagens imediatas que compõem a amostra, homogeneízam-se os incrementos para preparar a amostra de partida. Vertem-se os diversos incrementos para o mesmo recipiente e homogeneízam-se mexendo o azeite ou óleo, tomando a precaução de evitar ao máximo a incorporação de ar.

Verte-se a amostra de partida assim preparada numa série de embalagens de capacidade não inferior a 1,0 litro, passando cada uma delas a constituir um exemplo da amostra de partida.

O Estado-Membro pode aumentar, em função das suas necessidades (por exemplo, realização da avaliação organoléptica por um laboratório diferente do que realiza as análises químicas, contra-análises, etc.), o número de amostras de partida.

Deve proceder-se ao enchimento de cada embalagem de modo a reduzir ao mínimo a camada de ar superior, após o que se fecha convenientemente a embalagem e se procede à sua selagem, para evitar que possa haver interferências no produto que contém.

Rotulam-se os exemplos assim constituídos para que possam ser corretamente identificados.

2. ANÁLISES E RESULTADOS

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 esquema de decisão constante do anexo IB ou por qualquer outra ordem aleatória.

2.2. Se todos os resultados das análises forem conformes com as características da categoria de azeite ou óleo declarada, todo o lote em causa é declarado conforme.

Se algum resultado das análises não for conforme com as características da categoria de azeite ou óleo declarada, todo o lote em causa é declarado não-conforme.

3. VERIFICAÇÃO DA CATEGORIA DO LOTE

3.1. A fim de verificar a categoria do lote, a autoridade competente pode aumentar o número de amostras de partida, colhidas em diversos pontos do lote, de acordo com o seguinte quadro:

Quadro 3

Número de amostras de partida em função da dimensão do lote

Dimensão do lote (litros)	Número de amostras de partida
Inferior a 7 500	2
Igual ou superior a 7 500 e inferior a 25 000	3
Igual ou superior a 25 000 e inferior a 75 000	4
Igual ou superior a 75 000 e inferior a 125 000	5
Igual ou superior a 125 000	6 + uma por cada 50 000 litros suplementares

Cada incremento componente de uma amostra de partida deve ser colhido numa parte contínua do lote. É necessário anotar a localização de cada amostra de partida e identificá-la inequivocamente.

A constituição de cada amostra de partida deve processar-se conforme se refere nos pontos 1.1 e 1.2.

Em seguida, efetuam-se a cada amostra de partida as análises referidas no artigo 2.º, n.º 1.

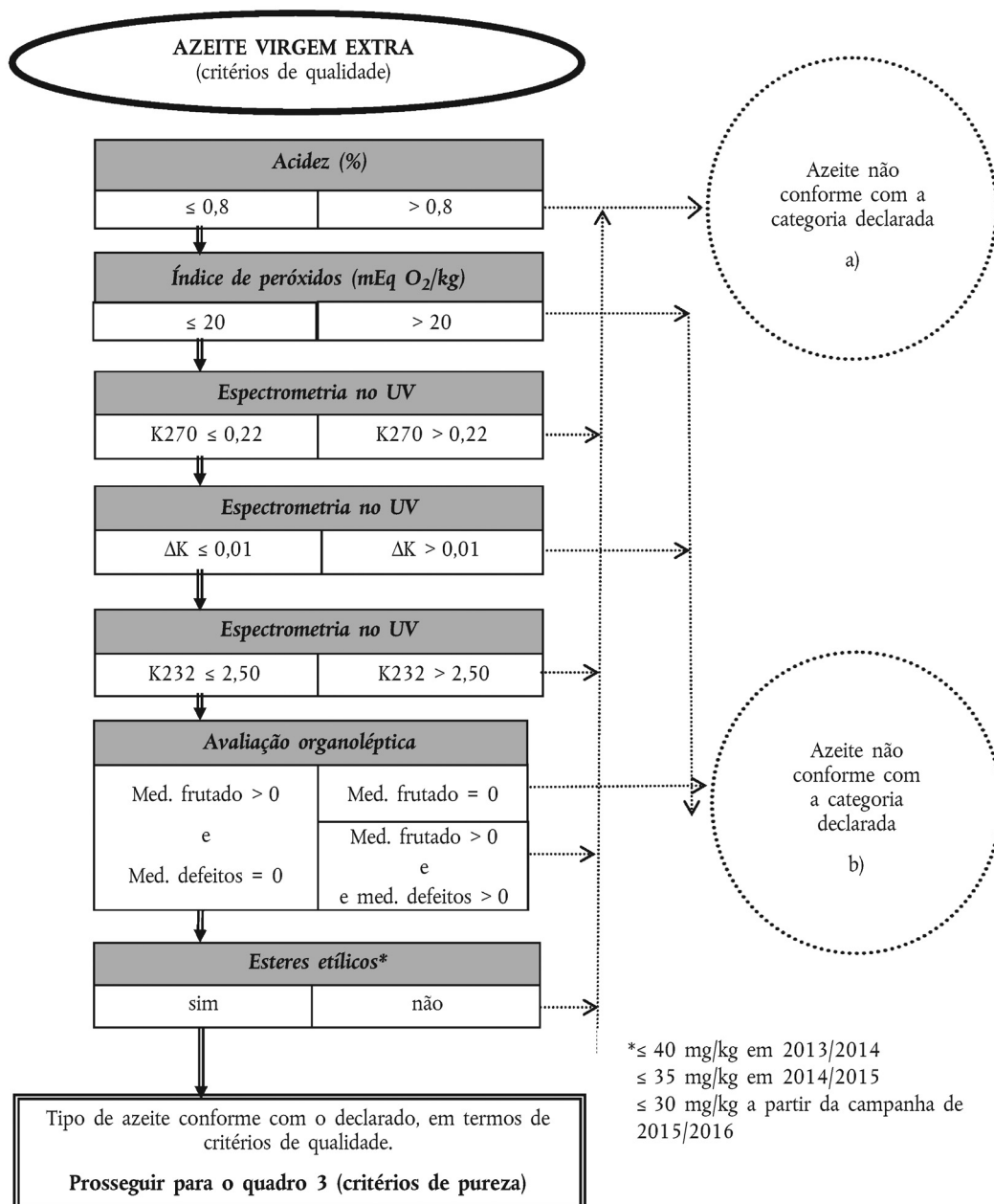
3.2. Se algum dos resultados das análises referidas no artigo 2.º, n.º 1, de uma ou mais amostras de partida não for conforme com as características da categoria de azeite ou óleo declarada, todo o lote amostrado é declarado não-conforme.»

ANEXO III

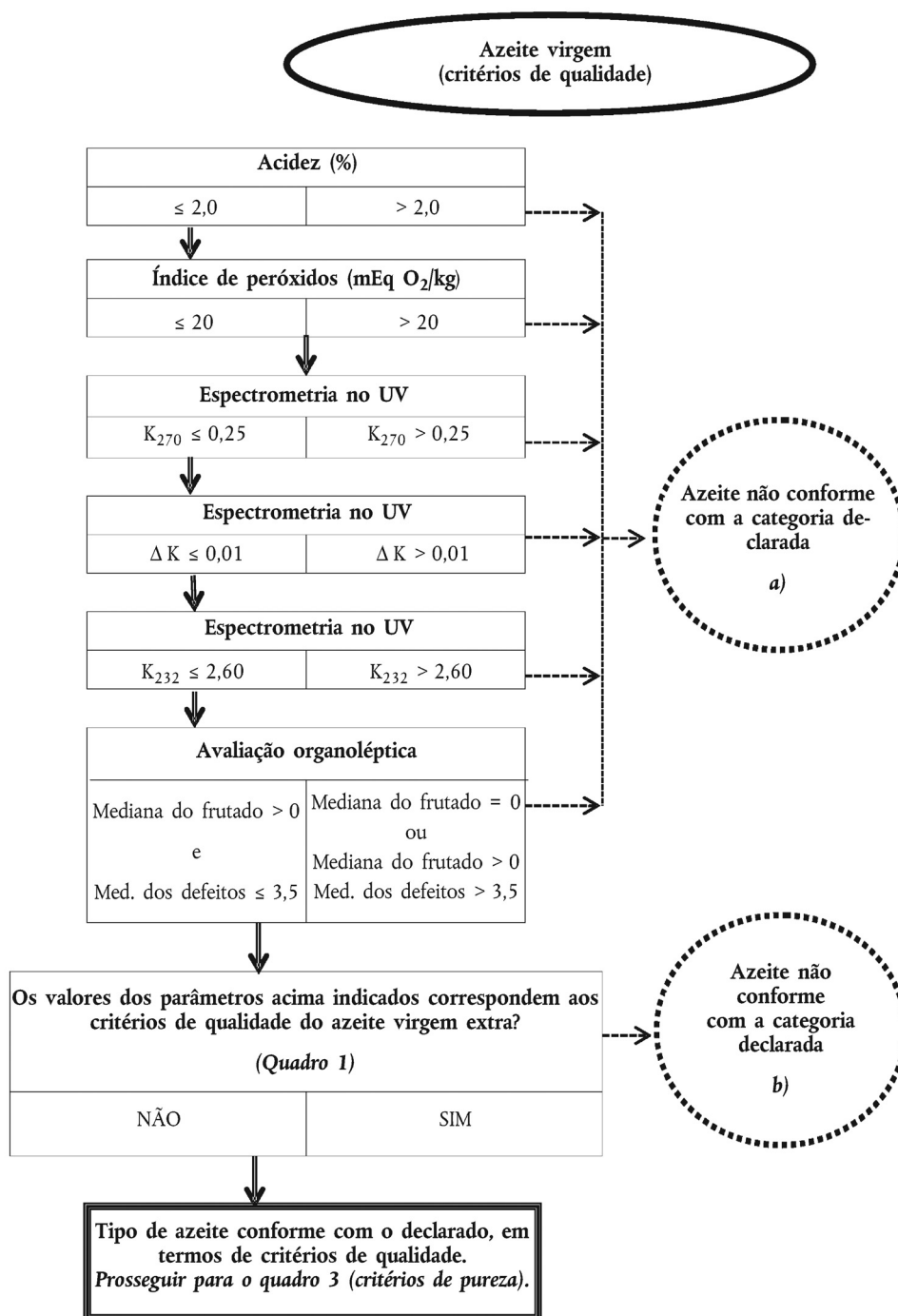
«ANEXO IB

ESQUEMA DE DECISÃO PARA VERIFICAÇÃO DA CONFORMIDADE DE UMA AMOSTRA DE AZEITE COM A CATEGORIA DECLARADA

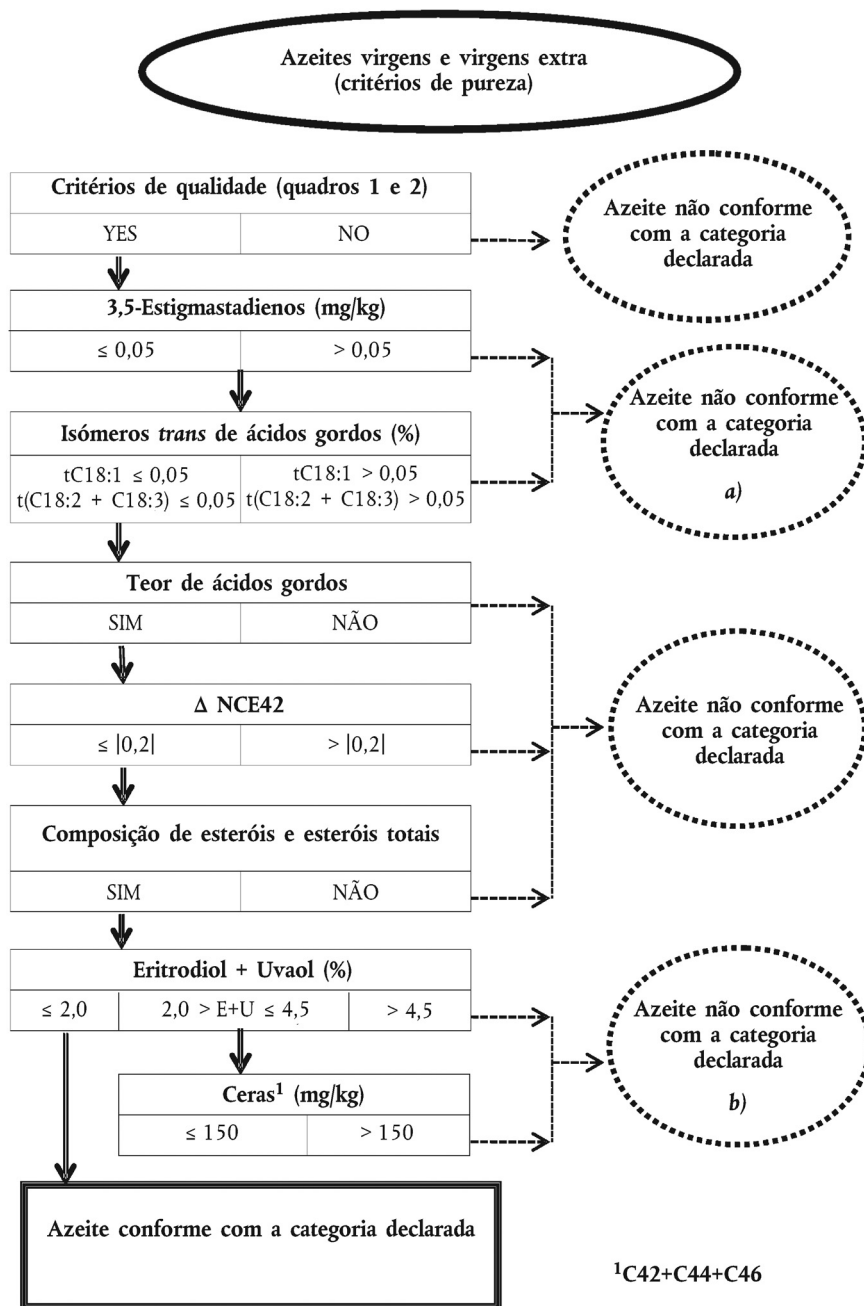
Quadro 1



Quadro 2



Quadro 3



Apêndice 1

Correspondência entre os anexos do presente regulamento e as análises referidas no esquema de decisão

— Acidez	Anexo II	Determinação dos ácidos gordos livres, método a frio
— Índice de peróxidos	Anexo III	Determinação do índice de peróxidos
— Espetrometria no UV	Anexo IX	Análise por espectrofotometria no ultravioleta
— Avaliação organoléptica	Anexo XII	Avaliação organoléptica de azeites virgens
— Ésteres etílicos	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
— 3,5-Estigmastadienos	Anexo XVII	Método para determinação dos estigamastadienos em óleos vegetais
— Isómeros <i>trans</i> de ácidos gordos	Anexo XA e	Análise por cromatografia em fase gasosa de ésteres metílicos de ácidos gordos
	Anexo XB	Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos
— Teor de ácidos gordos	Anexo XA e	Análise por cromatografia em fase gasosa de ésteres metílicos de ácidos gordos
	Anexo XB	Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos
— ΔNCE42	Anexo XVIII	Determinação do teor de triacilgliceróis com NCE42 (diferença entre o teor obtido por HPLC e o teor teórico)
— Composição de esteróis e esteróis totais — Eritrodiol e uvaol	Anexo V	Determinação da composição e do teor de esteróis e de diálcoois triterpénicos por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar
— Ceras	Anexo IV	Determinação do teor de ceras por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar
— Álcoois alifáticos	Anexo XIX	Determinação dos teores de álcoois alifáticos por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar
— Ácidos gordos saturados na posição 2	Anexo VII	Determinação da percentagem de monopalmitato de 2-glicerilo»

ANEXO IV

«ANEXO V

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E DO TEOR DE ESTERÓIS E DE DIÁLCOIS TRITERPÉNICOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM COLUNA CAPILAR**1. OBJETIVO**

O método descreve um processo de determinação do teor de esteróis e de diálcoois triterpénicos, individuais e totais, de azeites e óleos de bagaço de azeitona.

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Saponificação do azeite ou óleo, adicionado de α -colestanol como padrão interno, com hidróxido de potássio em solução etanólica; em seguida, extração com éter etílico do insaponificável.

Separação da fração esterólica e de diálcoois triterpénicos, do extrato insaponificável, por cromatografia em camada fina realizada em placas de sílica-gel alcalinizadas. Conversão da fração recuperada do sílica-gel em éteres trimetilsilílicos. Análise dos éteres por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar.

3. APARELHOS E UTENSÍLIOS

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

- 3.1. Balão de 250 ml 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. Equipamento completo para cromatografia em camada fina, com placas de vidro de 20 cm × 20 cm.
 - 3.5. Lâmpada de ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm ou 366 nm.
 - 3.6. Microseringas de 100 µl e 500 µl.
 - 3.7. 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 altura, adequado para filtração sob vácuo, com junta esmerilada macho.
 - 3.8. Frasco de kitasato de 50 ml com junta esmerilada fêmea, adaptável ao cadinho de fundo filtrante (3.7).
 - 3.9. Tubo de centrifugação de fundo cónico, de 10 ml, com tampa de vidro hermética.
 - 3.10. Cromatógrafo de fase gasosa adequado ao funcionamento com coluna capilar, dotado de um sistema de divisão de fluxo («split»), constituído por:
 - 3.10.1. Forno termostatzado para a coluna, que permita manter a temperatura desejada com a aproximação de $\pm 1^\circ\text{C}$;
 - 3.10.2. Câmara de injeção de temperatura regulável, com elemento vaporizador de vidro persilanizado e sistema de divisão de fluxo;
 - 3.10.3. Detetor de ionização de chama;
 - 3.10.4. Sistema de aquisição de dados adequado para o detetor de ionização de chama (3.10.3.), com possibilidade de integração manual.
 - 3.11. 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.
 - 3.12. Microseringa de 10 µl para cromatografia em fase gasosa, com agulha cementada, adequada para o sistema de injeção com divisão de fluxo.
 - 3.13. Exsicador com dicloreto de cálcio.
- 4. REAGENTES**
- 4.1. Hidróxido de potássio a 85 % (ou de título superior).

- 4.2. Solução etanólica aproximadamente 2 N 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 (4.11). 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 N 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 (4.11).
- 4.5. Sulfato de sódio anidro para análises.
- 4.6. 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).
- 4.7. Tolueno para cromatografia.
- 4.8. Acetona para cromatografia.
- 4.9. *n*-Hexano para cromatografia.
- 4.10. Éter etílico para cromatografia.
- 4.11. Etanol para análises.
- 4.12. Acetato de etilo para análises.
- 4.13. Solução de referência para cromatografia em camada fina: colesterol ou fitoesteróis e solução a 5 % de eritrodiol em acetato de etilo (4.12).
- 4.14. Solução etanólica a 0,2 % de 2,7-diclorofluoresceína. Adicionar algumas gotas da solução alcoólica 2 N de hidróxido de potássio (4.2) para tornar a solução ligeiramente básica.
- 4.15. Piridina anidra para cromatografia (ver a nota 5).
- 4.16. Hexametildissilazano para análises.
- 4.17. Trimetilclorossilano para análises.
- 4.18. Soluções-amostra dos éteres trimetilsilílicos dos esteróis:
- A preparar no momento da utilização a partir dos esteróis e do eritrodiol provenientes dos azeites ou óleos que os contêm.
- 4.19. α -Colesterol de pureza superior a 99 % (a verificar por análise cromatográfica em fase gasosa).
- 4.20. Solução padrão interno a 0,2 % (m/v) de α -colestanol em acetato de etilo (4.12).
- 4.21. Solução a 10 g/l de fenoltaleína em etanol (4.11).
- 4.22. Gás vetor: hidrogénio ou hélio para cromatografia em fase gasosa.
- 4.23. Gases auxiliares: hidrogénio, hélio, nitrogénio e ar para cromatografia em fase gasosa.
- 4.24. Mistura 65:35 (v/v) de *n*-hexano (4.9) e éter etílico (4.10).
- 4.25. Reagente de sililação, constituído por uma mistura 9:3:1 (v/v/v) de piridina, hexametildissilazano e trimetilclorossilano.
5. TÉCNICA
- 5.1. Preparação do extrato insaponificável
- 5.1.1. Introduzir num balão de 250 ml (3.1), por meio de uma microseringa de 500 μ l (3.6), um volume da solução padrão interno de α -colestanol (4.20) que contenha uma quantidade de colestanol correspondente a cerca de 10 % do teor de esteróis da amostra. Por exemplo, para 5 g de amostra, adicionar 500 μ l de solução de α -colestanol (4.20), caso se trate de azeite, e 1 500 μ l, caso se trate de óleo de bagaço de azeitona. Evaporar em banho-maria com uma corrente ligeira de nitrogénio até à secura, arrefecer o balão e, em seguida, pesar exatamente $5 \pm 0,01$ g de amostra seca e filtrada para o mesmo balão.

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

- 5.1.2. Juntar 50 ml de solução etanólica 2 N de hidróxido de potássio (4.2) e um pouco de pedra-pomes, montar o condensador de refluxo e aquecer em banho-maria até uma ligeira ebulição, até que se produza a saponificação (a solução fica límpida). Continuar a aquecer durante 20 minutos, juntar 50 ml de água destilada no alto do condensador, retirar este e arrefecer o balão a cerca de 30 °C.
- 5.1.3. 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 (4.10) 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 (4.10).

Nota 2: As eventuais emulsões podem ser eliminadas juntando pequenas quantidades de etanol (4.11).

- 5.1.4. 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 fenolftaleína (4.21).

Uma vez eliminada a água de lavagem, filtrar através de sulfato de sódio anidro (4.5) para um balão de 250 ml previamente tarado. Lavar a ampola de decantação e o filtro com pequenas quantidades de éter etílico (4.10).

- 5.1.5. Evaporar o solvente por destilação sob vácuo, a 30 °C, num evaporador rotativo. Adicionar 5 ml de acetona e eliminar completamente o solvente volátil com uma ligeira corrente de ar. Secar o resíduo numa estufa a 103±2 °C, durante 15 minutos. Arrefecer num exsiccador e pesar com a aproximação de 0,1 mg.

- 5.2. Separação da fração esterólica e de diálcoois triterpénicos (eritrodiol + uvaol)

- 5.2.1. Preparação das placas alcalinizadas para cromatografia em camada fina: mergulhar as placas com sílica-gel (4.6) cerca de 4 cm, durante 10 segundos, na solução etanólica 0,2 N 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 (3.13) até à utilização (devem utilizar-se no prazo de 15 dias).

Nota 3: A utilização de placas de sílica-gel alcalinizadas para a separação da fração esterólica torna desnecessário o tratamento da fração insaponificável com alumina. Deste modo, todos os compostos de natureza ácida (ácidos gordos e outros) ficam retidos na linha de partida e a banda de esteróis fica nitidamente separada da banda de álcoois alifáticos e triterpénicos.

- 5.2.2. Introduzir a mistura de hexano e éter etílico (4.24) na câmara de revelação das placas (nota 4), 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 a que se estabeleça o equilíbrio líquido/vapor. Podem colocar-se nas superfícies internas da câmara folhas de papel de filtro que mergulham 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 4: 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.

- 5.2.3. Preparar uma solução aproximadamente a 5 % do extrato insaponificável (5.1.5) em acetato de etilo (4.12) e, com a microseringa de 100 µl, depositar na placa cromatográfica (5.2.1), 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 2-3 µl da solução de referência (4.13), a fim de identificar a banda de esteróis e de diálcoois triterpénicos após a revelação.

- 5.2.4. Colocar a placa na câmara de revelação, preparada de acordo com o ponto 5.2.2. A temperatura ambiente deve ser mantida entre 15 °C e 20 °C (nota 5). 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 5: Temperaturas mais elevadas podem dificultar a separação.

5.2.5. Nebulizar a placa, ligeira e uniformemente, com a solução de 2,7-diclorofluoresceína (4.14) e deixar a secar. Quando a placa é observada à luz ultravioleta, a banda de esteróis e de diálcoois triterpénicos pode ser identificada pelo alinhamento com a mancha obtida para a solução de referência (4.13). Delimitar a banda com um lápis preto ao longo da margem de fluorescência (ver uma placa de cromatografia em camada fina na figura 3).

5.2.6. Raspar, com uma espátula metálica, o sílica-gel da zona delimitada. Introduzir a matéria retirada, finamente triturada, no cadinho filtrante (3.7). Juntar 10 ml de acetato de etilo (4.12) quente, misturar cuidadosamente com a espátula metálica e filtrar sob vácuo. Recolher o filtrado no frasco de kitasato (3.8) 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 frasco de kitasato 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 (3.9), previamente tarado, e evaporar até à secura, aquecendo ligeiramente, numa ligeira corrente de nitrogénio. Deitar algumas gotas de acetona (4.8) e evaporar novamente até à secura.

O resíduo contido no tubo é constituído pela fração esterólica e de diálcoois triterpénicos.

5.3. Preparação dos éteres trimetilsilílicos

5.3.1. No tubo de centrifugação que contém a fração esterólica e de diálcoois triterpénicos, juntar o reagente de sililação (4.25) (nota 6), na proporção de 50 µl por miligrama de esteróis e de diálcoois triterpénicos, 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 acetonitrilo.

5.3.2. Tapar o tubo de centrifugação 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.

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. Nesse caso, a análise tem de ser repetida (apenas se for utilizado hexametil-dissilazano/trimetilclorossilano).

5.4. Análise por cromatografia em fase gasosa

5.4.1. Operações preliminares, condicionamento da coluna capilar.

5.4.1.1. Instalar a coluna (3.11) 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.).

5.4.1.2. 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 funcionamento (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 uma 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.

5.4.2. Escolha das condições de funcionamento

5.4.2.1. As condições de funcionamento são as seguintes:

- temperatura da coluna: 260 °C ± 5 °C;
- temperatura do injetor: 280-300 °C;
- temperatura do detetor: 280-300 °C;
- velocidade linear do gás vetor: hélio, 20-35 cm/s; hidrogénio, 30-50 cm/s;

- Divisão de fluxo («split»): de 1/50 a 1/100;
- sensibilidade instrumental: 4 a 16 vezes a atenuação mínima;
- sensibilidade de registo: 1 a 2 mV em toda a escala;
- quantidade de substância injetada: 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 pico do β-sitosterol: 20 minutos ± 5 minutos;
- pico do campesterol: para o azeite (teor médio de 3 %), 20 ± 5 % da escala; para o óleo de soja (teor médio de 20 %), 80 ± 10 % da escala;
- 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 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.

5.4.3. Técnica analítica

- 5.4.3.1. Com a microseringa de 10 µl, tomar 1 µl de hexano, aspirar 0,5 µl de ar e, em seguida, 0,5-1 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.

- 5.4.3.2. Proceder ao registo até à eluição completa dos éteres trimetilsilílicos dos diálcoois triterpénicos presentes. A linha de base deve continuar a corresponder às condições exigidas (ponto 5.4.1.2).

5.4.4. Identificação dos picos

Identificam-se individualmente os picos com base nos tempos de retenção, por comparação com misturas de éteres trimetilsilílicos de esteróis e de diálcoois triterpénicos, cromatografadas nas mesmas condições (ver o apêndice).

A ordem de eluição dos esteróis e dos diálcoois triterpénicos é a seguinte: colesterol, brassicasterol, ergosterol, 24-metilenocolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ7-campesterol, Δ5,23-estigmastadienol, clerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-estigmastadienol, Δ7-estigmastenol, Δ7-avenasterol, eritrodiol e uvaol.

O quadro 1 mostra os tempos de retenção do β-sitosterol para colunas SE-52 e SE-54.

As figuras 1 e 2 apresentam cromatogramas típicos de determinados azeites.

5.4.5. Avaliação quantitativa

- 5.4.5.1. Recorrendo ao sistema de computação, calcular a área dos picos do α-colestanol e dos esteróis e 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 igual a 1 o coeficiente de resposta para o α-colestanol.

- 5.4.5.2. Calcula-se a concentração de cada esteroide, em mg/kg de matéria gorda, do seguinte modo:

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

em que:

A_x = área do pico do esteroide x, 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 para a determinação, em gramas.

6. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

- 6.1. Exprime-se a concentração de cada esterol em mg/kg de matéria gorda e a soma das concentrações respetivas como «esteróis totais».

Exprime-se a concentração de cada esterol, do eritrodiol e do uvaol com uma casa decimal.

A concentração de esteróis totais é expressa sem casas decimais.

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

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

em que:

A_x = área do pico do esterol x;

ΣA = soma das áreas dos picos de todos os esteróis.

- 6.3. β -Sitosterol aparente: $\Delta 5,23$ -stigmastadienol + closterol + β -sitosterol + sitostanol + $\Delta 5$ -avenasterol + $\Delta 5,24$ -stigmastadienol.

- 6.4. Cálculo da percentagem de eritrodiol e uvaol:

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

em que:

ΣA = soma das áreas dos picos de todos os esteróis, em unidades do sistema de computação;

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

Uv = área do pico do uvaol, em unidades do sistema de computação.

Apêndice

Determinação da velocidade linear do gás

Injetam-se 1 a 3 µl de metano (ou propano) no cromatógrafo de fase gasosa, regulado para as condições de funcionamento normais, e cronometra-se o tempo gasto pelo gás para percorrer a coluna, entre o momento da injeção e o da saída do pico (tM).

A velocidade linear, em cm/s, é dada por L/tM , sendo L o comprimento da coluna, em centímetros, e tM o tempo cronometrado, em segundos.

Quadro 1

Tempos de retenção relativos dos esteróis

Pico	Identificação		Tempos de retenção relativos	
			Coluna SE 54	Coluna SE 52
1	Colesterol	Δ^5 -Colesten- 3β -ol	0,67	0,63
2	Colestanol	5α -Colestan- 3β -ol	0,68	0,64
3	Brassicasterol	(24S)-24-Metil- $\Delta^5,22$ -colestadien- 3β -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	(24S)-24-Metil- $\Delta^5,7,22$ -colestatrien- 3β -ol	0,78	0,76
4	24-Metilenocolesterol	24-Metileno- $\Delta^5,24$ -colestadien- 3β -ol	0,82	0,80
5	Campesterol	(24R)-24-Metil- Δ^5 -colestén- 3β -ol	0,83	0,81
6	Campestanol	(24R)-24-Metilcolestán- 3β -ol	0,85	0,82
7	Estigmasterol	(24S)-24-Etil- $\Delta^5,22$ -colestadien- 3β -ol	0,88	0,87
8	Δ^7 -Campesterol	(24R)-24-Metil- Δ^7 -colestén- 3β -ol	0,93	0,92
9	$\Delta^5,23$ -Estigmastadienol	(24R,S)-24-Etil- $\Delta^5,23$ -colestadien- 3β -ol	0,95	0,95
10	Clerosterol	(24S)-24-Etil- $\Delta^5,25$ -colestadien- 3β -ol	0,96	0,96
11	β -Sitosterol	(24R)-24-Etil- Δ^5 -colestén- 3β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-Etilcolestán- 3β -ol	1,02	1,02
13	Δ^5 -Avenasterol	(24Z)-24-Etilideno- Δ -colestén- 3β -ol	1,03	1,03
14	$\Delta^5,24$ -Estigmastadienol	(24R,S)-24-Etil- $\Delta^5,24$ -colestadien- 3β -ol	1,08	1,08
15	Δ^7 -Estigmastenol	(24R,S)-24-Etil- Δ^7 -colestén- 3β -ol	1,12	1,12
16	Δ^7 -avenasterol	(24Z)-24-Etilideno- Δ^7 -colestén- 3β -ol	1,16	1,16
17	Eritrodiol	5α -Olean-12-en- $3\beta,28$ -diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ^{12} -Ursen- $3\beta,28$ -diol	1,52	1,52

Figura 1

Cromatograma de cromatografia em fase gasosa da fração esterólica e de diálcoois triterpénicos de um azeite lampante (com padrão interno)

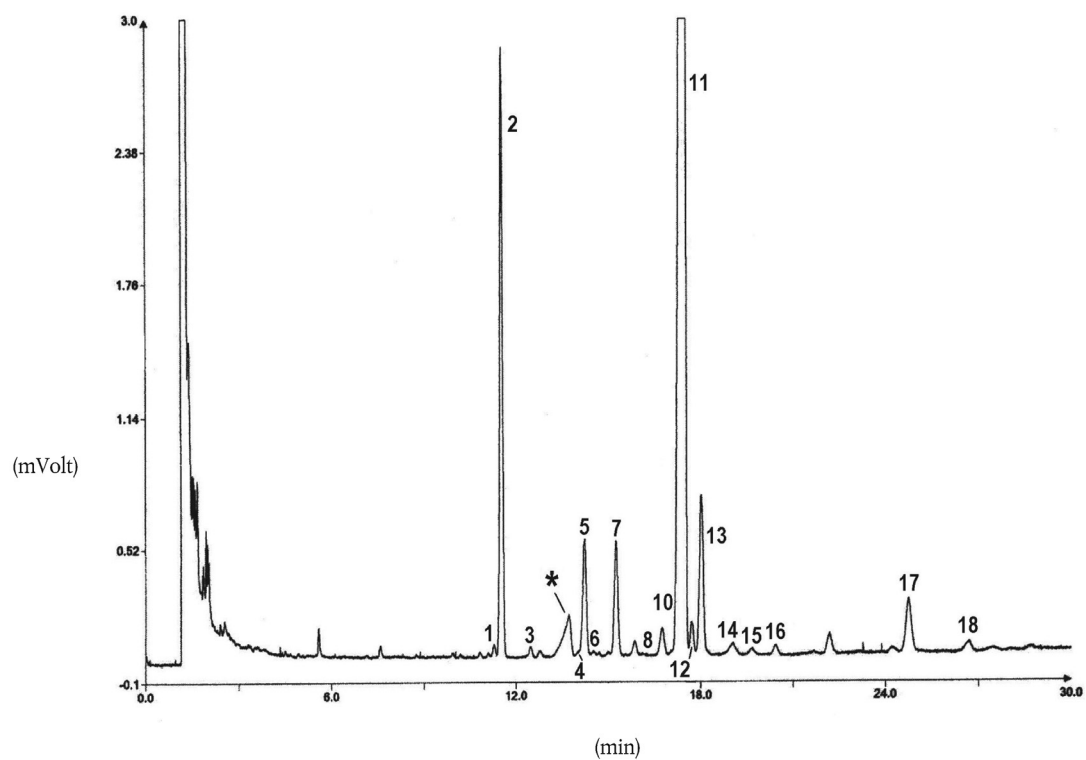


Figura 2

Cromatograma de cromatografia em fase gasosa da fração esterólica e de diálcoois triterpénicos de um azeite refinado (com padrão interno)

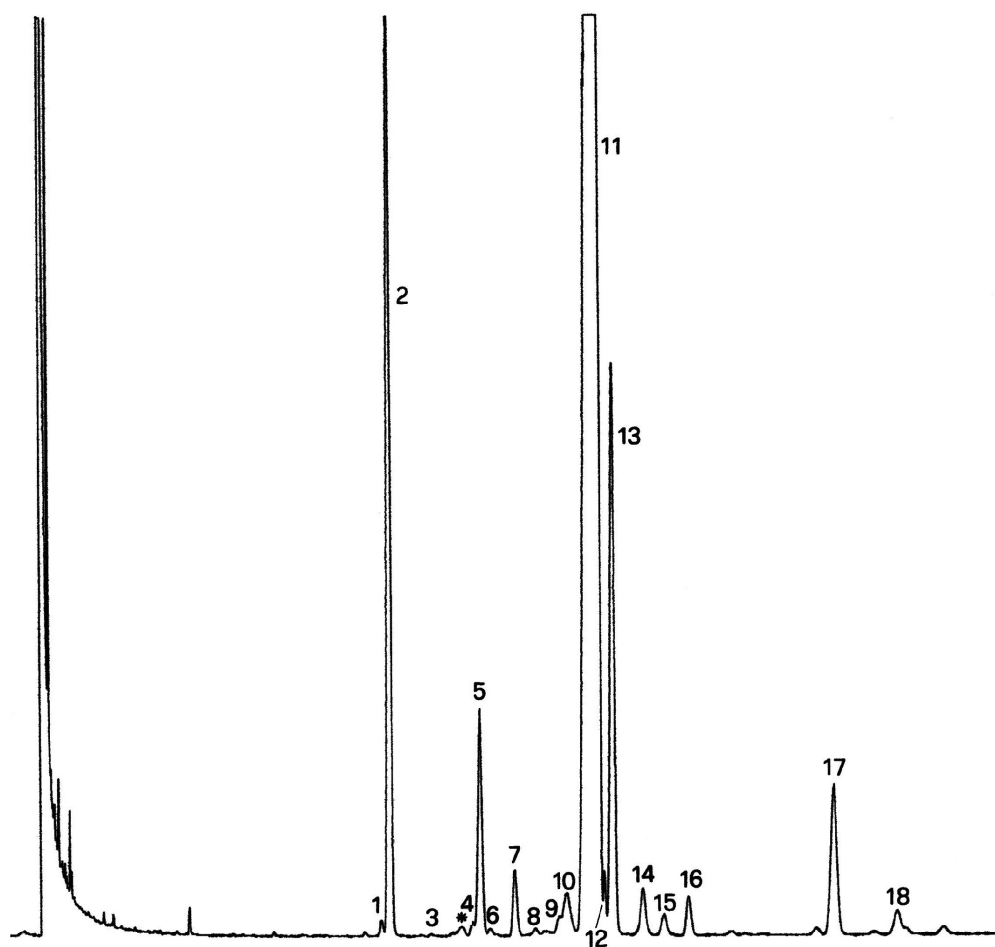
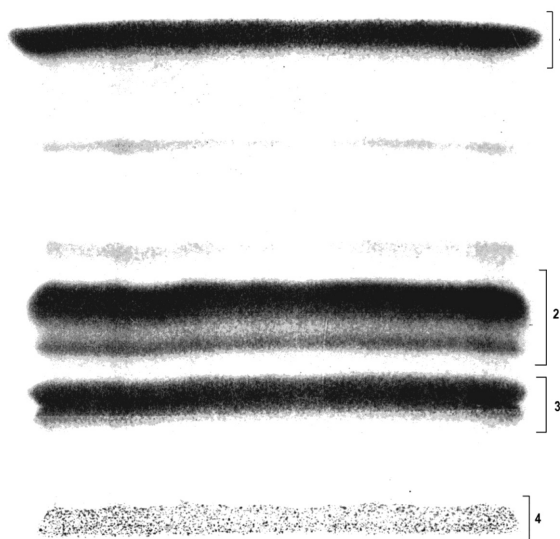


Figura 3

Placa de cromatografia em camada fina de um óleo de bagaço de azeitona, com indicação da zona a raspar para determinação dos esteróis e dos diálcoois triterpénicos



- 1 – Esqualeno.
- 2 – Álcoois triterpénicos e alifáticos.
- 3 – Esteróis e diálcoois triterpénicos.
- 4 – Zona de partida e ácidos gordos livres.»

—

ANEXO V

«ANEXO XII

MÉTODO DO CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL PARA A AVALIAÇÃO ORGANOLÉPTICA DE AZEITES VIRGENS**1. OBJETIVO E DOMÍNIO DE APLICAÇÃO**

O presente método internacional visa estabelecer o procedimento de avaliação das características organolépticas dos azeites virgens, na aceção do anexo XVI, ponto 1, do Regulamento (CE) n.º 1234/2007, bem como o método de classificação desses azeites com base em tais características. Inclui igualmente indicações relativas a determinados aspetos facultativos de rotulagem.

O método descrito só é aplicável aos azeites virgens e à classificação ou rotulagem dos mesmos em função da intensidade dos defeitos detetados e do frutado, determinada por um júri constituído por um grupo de provadores selecionados, treinados e supervisionados.

O método inclui igualmente indicações relativas a determinados aspetos facultativos de rotulagem.

Remete-se para a última versão disponível das normas do COI referidas neste anexo.

2. VOCABULÁRIO BÁSICO GERAL DOS EXAMES ORGANOLÉPTICOS

Ver a norma *IOC/T.20/Doc. No 4 «Sensory Analysis: General Basic Vocabulary»*.

3. VOCABULÁRIO ESPECÍFICO**3.1. Atributos negativos**

Tulha/Borra: «Flavour» característico dos azeites obtidos de azeitonas amontoadas ou armazenadas em condições que as colocaram num estado avançado de fermentação anaeróbia ou dos azeites que permaneceram em contacto, nos depósitos e reservatórios subterrâneos, com matérias decantadas que tenham também sofrido um processo de fermentação anaeróbia.

Mofo-húmido-terra: «Flavour» característico dos azeites obtidos de azeitonas atacadas por bolores e leveduras devido à armazenagem dos frutos durante vários dias em condições húmidas ou dos azeites obtidos de azeitonas colhidas com terra ou lama que não foram lavadas.

Avinhado-avinagrado-ácido-azedo: «Flavour» característico de certos azeites que lembra o vinho ou o vinagre. Deve-se, fundamentalmente, a um processo fermentativo aeróbio das azeitonas ou de restos de pasta de azeitona em capachos que não foram lavados corretamente, que leva à formação de ácido acético, acetato de etilo e etanol.

Ranço: «Flavour» dos azeites que sofreram um processo de oxidação intenso.

Azeitona queimada (madeira húmida): «Flavour» característico dos azeites extraídos de azeitonas que congelaram na oliveira.

3.2. Outros atributos negativos

Cozido ou «Flavour» característico dos azeites devido a aquecimento excessivo e/ou prolongado

Queimado durante a obtenção dos mesmos, principalmente durante a termomalaxagem da pasta, se esta for realizada em condições térmicas inadequadas.

Feno-madeira: «Flavour» característico de certos azeites provenientes de azeitonas secas.

Encorpado: Sensação bucotáctil densa e pastosa produzida por certos azeites velhos.

Lubrificantes: «Flavour» dos azeites que lembra o gasóleo, massas consistentes ou óleos minerais.

Água-ruça: «Flavour» adquirido pelos azeites devido a contacto prolongado com águas-ruças que sofreram processos de fermentação.

Salmoura: «Flavour» dos azeites obtidos de azeitonas conservadas em salmoura.

Metálico: «Flavour» que lembra os metais e é característico dos azeites que permaneceram prolongadamente em contacto com superfícies metálicas durante os processos de trituração, malaxagem, prensagem ou armazenagem.

Esparto: «Flavour» característico dos azeites obtidos de azeitonas prensadas em capachos de esparto novos. Pode variar consoante se trate de capachos fabricados de esparto verde ou de esparto seco.

Gafa: «Flavour» dos azeites obtidos de azeitonas fortemente atacadas por larvas da mosca da oliveira (*Bactrocera oleae*).

Pepino: «Flavour» dos azeites característico de um acondicionamento hermético excessivamente prolongado, nomeadamente em latas. É atribuído à formação de 2,6-nonadienal.

3.3. Atributos positivos

Frutado: Conjunto das sensações olfativas dependentes da variedade de azeitona, por via direta e/ou retronasal, características dos azeites provenientes de frutos são e frescos, verdes ou maduros.

Amargo: Gosto elementar característico dos azeites obtidos de azeitonas verdes ou em fase precoce de maturação, sentido pelas papilas caliciformes que constituem o V lingual.

Picante: Sensação tátil de picadas em toda a cavidade bucal, em especial na garganta, característica dos azeites produzidos no início da campanha, principalmente a partir de azeitonas ainda verdes.

3.4. 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 aos adjetivos 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,
- *Médio*: se a mediana do atributo em causa estiver compreendida entre 3 e 6,
- *Suave*: se a mediana do atributo em causa for inferior a 3.

Frutado: Conjunto das sensações olfativas dependentes da variedade de azeitona, por via direta e/ou retronasal, características dos azeites provenientes de frutos são e frescos, sem predominância de frutado verde ou maduro.

Frutado verde: Conjunto das sensações olfativas por via direta e/ou retronasal que lembram frutos verdes, dependentes da variedade de azeitona, características dos azeites provenientes de frutos verdes são e frescos.

Frutado maduro: Conjunto das sensações olfativas por via direta e/ou retronasal que lembram frutos maduros, dependentes da variedade de azeitona, características dos azeites provenientes de frutos são e frescos.

Equilibrado: Azeite sem desequilíbrios, entendendo-se por «desequilíbrio» a sensação olfacto-gustativa e tátil dos azeites cuja mediana do atributo «amargo» e/ou cuja mediana do atributo «picante» seja(m) superior(es) em dois pontos à mediana do atributo «frutado».

Doce: Azeite cujas medianas do atributo «amargo» e do atributo «picante» sejam inferiores ou iguais a 2.

4. COPO PARA PROVA DE AZEITES

Ver a norma IOC/T.20/Doc. No 5, «Glass for Oil Tasting».

5. SALA DE PROVA

Ver a norma IOC/T.20/Doc. No 6, «Guide for the Installation of a Test Room».

6. ACESSÓRIOS

Acessórios necessários em cada cabina de prova para que os provadores possam exercer a sua função corretamente (devem estar ao alcance do provador):

- copos normalizados para as amostras, numerados em código, tapados com um vidro de relógio e mantidos a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- folha de perfil (figura 1) em papel (ou informatizada, desde que satisfaça os requisitos), juntamente com instruções de utilização, se necessário,
- esferográfica ou tinta indelével,
- bandejas com rodela de maçã e/ou água, água gaseificada e/ou biscoitos,
- copo de água à temperatura ambiente,
- folha recapitulativa das regras gerais enunciadas nos pontos 8.4 e 9.1.1,
- cuspidores.

7. PRESIDENTE DO JÚRI E PROVADORES

7.1. Presidente do júri

O presidente do júri deve ter recebido uma formação adequada e ser conhecedor e um perito experiente nos tipos de azeite que se lhe deparem na função. É o elemento central do júri, sendo responsável pela organização e pelo funcionamento deste.

O trabalho do presidente do júri exige formação de base nos instrumentos dos exames organolépticos, sentidos apurados para estes exames e a capacidade de os preparar, organizar e realizar meticolosamente, assim como habilidade e paciência para planear e realizar os exames segundo bases científicas.

O presidente do júri é o único responsável pela seleção, formação e supervisão dos provadores, para que estes mantenham um nível de aptidão adequado. É, portanto, responsável pela avaliação dos provadores, que deve ser sempre objetiva e para a qual deve estabelecer procedimentos próprios baseados na experimentação, bem como critérios fundamentados de aceitação e rejeição. Ver a norma *IOC/T.20/Doc. No 14, «Guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil tasters»*.

O presidente do júri é responsável pelo desempenho do júri e, portanto, pela avaliação por este efetuada, da qual deve apresentar provas fiáveis e objetivas. Compete-lhe estar sempre em condições de demonstrar que o método e os provadores estão sob controlo. É recomendável proceder a uma calibração periódica do júri (*IOC/T.20/Doc. No 14, § 5*).

O presidente do júri é o principal responsável pela manutenção de registos do funcionamento do júri, que devem ser sempre rastreáveis. Os registos devem respeitar as exigências de segurança e qualidade estabelecidas nas normas internacionais de exames organolépticos e salvaguardar o anonimato das amostras em todas as circunstâncias.

O presidente do júri é responsável pela inventariação dos utensílios e equipamentos necessários para satisfazer as especificações do presente método, bem como pela adequada limpeza e manutenção dos mesmos, cabendo-lhe conservar prova escrita disso e da observância das condições estabelecidas para a realização das provas.

Compete ao presidente do júri a receção das amostras e a armazenagem das mesmas no laboratório, antes e depois de examinadas. Cabe-lhe garantir que as amostras se mantêm anónimas e são adequadamente armazenadas, devendo estabelecer por escrito os procedimentos necessários para salvaguardar a rastreabilidade e a garantia do processo.

É igualmente responsável pela preparação e codificação das amostras e pela apresentação destas aos provadores segundo um plano de provas adequado, consentâneo com o protocolo preestabelecido, bem como pela recolha e tratamento estatístico dos dados obtidos pelos provadores.

Compete igualmente ao presidente do júri definir e redigir qualquer outro procedimento necessário para complementar o presente método e para assegurar o correto funcionamento do júri.

Compete-lhe ainda procurar maneiras de comparar os resultados do seu júri com os resultados obtidos por outros júris que analisam azeites virgens, para se certificar de que o primeiro está a funcionar corretamente.

O presidente do júri tem o dever de motivar os provadores, incentivando o interesse, a curiosidade e o espírito de competição entre eles. Para isso, recomenda-se vivamente que assegure um intercâmbio fluido de informação com os provadores, mantendo-os informados acerca das tarefas que a estes compete desempenhar, assim como dos resultados obtidos. Deve ainda garantir que a sua opinião não é conhecida e evitar que determinados provadores, que assumam um papel de liderança, condicionem os restantes sobrepondo-lhes os seus critérios.

O presidente do júri deve convocar os provadores com antecedência suficiente e responder a todas as perguntas relativas à realização dos exames, mas deve abster-se de fazer transparecer qualquer opinião sua sobre as amostras.

7.2. Provadores

As pessoas que assumam a função de provadores em exames organolépticos de azeites devem fazê-lo voluntariamente, com todas as consequências que daí advêm em termos de obrigações e da ausência de remuneração. É, portanto, recomendável que os interessados apresentem uma candidatura escrita. Os candidatos devem ser selecionados, formados e supervisionados pelo presidente do júri em função das aptidões que revelem para distinguir amostras semelhantes. Importa ter presente que o rigor dos provadores melhora com formação.

Os provadores devem comportar-se como efetivos observadores sensoriais, pondo de parte os seus gostos pessoais e dando conta unicamente das sensações que sintam. Para isso, devem trabalhar em silêncio, relaxados e sem pressas, concentrando-se ao máximo, em termos sensoriais, na amostra que estão a provar.

Para cada exame, são necessários 8 a 12 provadores. É prudente manter uma reserva de provadores, para acautelar eventuais ausências.

8. CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES

8.1. Apresentação da amostra

As amostras de azeite a examinar devem ser apresentadas em copos de prova normalizados conformes com a norma *IOC/T.20/Doc. No 5, «Glass for oil tasting»*.

Cada copo deve conter 14 ml a 16 ml de azeite – ou 12,8 g a 14,6 g, se as amostras forem pesadas – e ser tapado com um vidro de relógio.

Cada copo deve ser marcado com um código constituído por algarismos ou por uma combinação alfanumérica, em qualquer dos casos aleatória, recorrendo a um sistema de marcação inodoro.

8.2. Temperatura de realização dos exames e temperatura das amostras

As amostras de azeite a provar devem permanecer nos copos durante todo o exame à temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foi escolhida esta temperatura porque se torna mais fácil apreciar diferenças organolépticas do que à temperatura ambiente e porque, a temperaturas mais baixas, os compostos odoríferos peculiares dos azeites se volatilizam pouco, ao passo que a temperaturas mais elevadas se formam os compostos voláteis peculiares dos óleos aquecidos. Relativamente ao método a seguir para aquecer as amostras no copo, ver a norma *IOC/T.20/Doc. No 5, «Glass for Oil Tasting»*.

A temperatura da sala de provas deve estar compreendida entre 20°C e 25°C (ver a norma *IOC/T.20/Doc. No 6*).

8.3. Períodos para a realização das provas

O período da manhã é o melhor para provar azeites. Está demonstrado que, ao longo do dia, há períodos ótimos de percepção de sabores e odores. Antes das refeições, aumenta a sensibilidade olfativa e gustativa, que diminui a seguir.

Todavia, este critério não deve ser levado ao extremo de a fome distrair os provadores, ao ponto de diminuir a capacidade discriminatória destes. Recomenda-se, portanto, que as sessões de prova decorram entre as 10h00 e as 12h00.

8.4. Regras gerais de conduta dos provadores

Segue-se uma série de recomendações relativamente à conduta dos provadores no exercício da sua atividade.

Uma vez convocados pelo presidente do júri para participar num exame organoléptico, os provadores devem poder comparecer à hora marcada e respeitar as seguintes condições:

- Não devem fumar nem beber café pelo menos nos 30 minutos que antecedem o exame.
- Não devem ter utilizado nenhum perfume, produto cosmético ou sabonete cuja fragrância possa persistir até ao exame. Devem utilizar um sabonete não perfumado para lavar as mãos, enxaguando-as e secando-as em seguida, tantas vezes quantas as necessárias para eliminar qualquer odor.
- Não devem comer pelo menos na hora que precede o exame.
- No caso de se sentirem em condições físicas deficientes, nomeadamente se os sentidos do olfato ou do paladar estiverem afetados, ou se sofrerem de algum problema psicológico que os impeça de se concentrarem no exame, devem abster-se de realizar as provas e devem informar disso o presidente do júri.
- Respeitadas estas condições, cada provador deve ocupar disciplinada e silenciosamente o seu lugar na cabina que lhe foi destinada.
- Devem ler cuidadosamente as instruções constantes da folha de perfil e não devem começar a examinar a amostra enquanto não estiverem totalmente preparados para o fazer (devem estar relaxados e sem pressas). Se a algum provador surgir alguma dúvida, deve o mesmo esclarecê-la em privado com o presidente do júri.
- Devem permanecer em silêncio durante o exame.
- Os telemóveis devem estar permanentemente desligados, para não afetarem a concentração e o trabalho dos outros provadores.

9. AVALIAÇÃO ORGANOLÉPTICA E CLASSIFICAÇÃO DE AZEITES VIRGENS

9.1. Técnica de prova

- 9.1.1. Os provadores devem pegar no copo, tapado com o vidro de relógio, e incliná-lo cuidadosamente, rodando-o em seguida completamente, nesta posição, a fim de molhar o mais possível do interior do copo. A seguir, devem retirar o vidro de relógio e cheirar a amostra, inspirando lenta e profundamente, para avaliar o azeite. O exame olfativo não deve prolongar-se por mais de 30 segundos. Se o provador não chegar a uma conclusão nesse período, deve descansar um pouco antes de recommear.

Uma vez efetuado o exame olfativo, os provadores devem passar à avaliação das sensações bucais (conjunto das sensações retronasais olfativas, gustativas e táteis). Para isso, devem sorver aproximadamente 3 ml de azeite. É muito importante distribuir o azeite por toda a cavidade bucal, desde a parte anterior da boca e da língua, passando pelos lados da boca, até à parte posterior, incluindo o palato e a garganta. Com efeito, é sabido que a intensidade da perceção dos sabores e das sensações táteis depende da zona da língua, do palato e da garganta.

Importa sublinhar ser essencial que uma quantidade suficiente de azeite se espalhe muito lentamente sobre a parte posterior da língua até ao palato e à garganta, ao mesmo tempo que o provador se concentra na avaliação da ordem pela qual surgem os estímulos amargo e picante. Se não proceder deste modo, ambos os estímulos podem passar despercebidos em alguns azeites ou então o estímulo picante pode fazer com que o amargor passe despercebido.

A inalação breve de pequenos volumes de ar sucessivos pela boca permite ao provador não apenas espalhar bem a amostra pela boca toda, mas também sentir os compostos voláteis odoríferos por via retronasal, ao forçar a utilização desse canal.

Deve ter-se em conta a sensação tátil picante, recomendando-se para isso que o azeite seja engolido.

- 9.1.2. Ao efetuar uma avaliação organoléptica de um azeite virgem, recomenda-se que, em cada sessão, não sejam avaliadas mais de QUATRO AMOSTRAS e que não se realizem mais de três sessões no mesmo dia, para evitar o efeito de contraste que poderia produzir-se ao provar de imediato outras amostras.

Uma vez que a sucessão de provas gera fadiga ou uma perda de sensibilidade causada pelas amostras anteriores, é necessário utilizar um produto que elimine da boca os restos do azeite da prova anterior.

Recomenda-se a utilização de uma pequena rodela de maçã, a qual, uma vez mastigada, pode ser eliminada para o cuspidor. Em seguida, lavar a boca com um pouco de água à temperatura ambiente. Entre o termo de uma sessão e o início da seguinte devem passar, pelo menos, 15 minutos.

9.2. Utilização da folha de perfil pelos provadores

A folha de perfil a utilizar pelos provadores constitui a figura 1 do presente anexo.

Cada provador do júri deve cheirar e depois provar ⁽¹⁾ o azeite em causa. Em seguida, cada provador deve inscrever a intensidade com que sente cada atributo negativo ou positivo na escala de 10 cm que figura na folha de perfil que lhe foi fornecida.

Se um provador detetar algum atributo negativo não previsto na secção 4, deve indicar esse atributo na rubrica «outros», utilizando o termo ou termos que mais rigorosamente o descreva(m).

9.3. Utilização dos dados pelo presidente do júri

O presidente do júri deve recolher as folhas de perfil preenchidas por cada provador e verificar as intensidades imputadas aos diferentes atributos. Se detetar alguma anomalia, deve solicitar ao provador que reveja a folha de perfil e, se necessário, que repita o exame.

O presidente do júri deve introduzir os dados de cada provador num programa informático como o previsto na norma *IOC/T.20/Doc. No 15*, tendo em vista o cálculo estatístico dos resultados do exame, baseados no cálculo das medianas. Ver a secção 9.4 e o apêndice do presente anexo. A introdução dos dados respeitantes a cada amostra deve ser efetuada por recurso a uma matriz de nove colunas – correspondentes aos nove atributos sensoriais – e n linhas – correspondentes aos n provadores do júri.

Se, pelo menos, 50 % dos provadores detetarem um defeito e o inscreverem na rubrica «outros», o presidente do júri deve calcular a mediana desse defeito e determinar a classificação correspondente.

O valor do coeficiente de variação robusto que define a classificação (defeito com a maior intensidade e atributo frutado) deve ser igual ou inferior a 20 %

Caso contrário, o presidente do júri deve repetir a avaliação da amostra em causa noutra sessão de prova.

Se isto ocorrer com frequência, é recomendável que o presidente do júri faculte aos provadores formação adequada (*IOC/T.20/Doc. No 14, § 5*) e que utilize o índice de repetibilidade e o índice de desvio para aferir do desempenho do júri (*IOC/T.20/Doc. No 14, § 6*).

9.4. Classificação do azeite

O azeite é classificado 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.

⁽¹⁾ Os provadores podem não provar o azeite se detetarem algum atributo negativo extremamente intenso por meios olfativos diretos, caso em que registarão essa circunstância excecional na folha de perfil.

Classifica-se um 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 os limites dos intervalos foram estabelecidos tendo em conta o erro do método, são considerados absolutos. Os programas informáticos permitem visualizar a classificação num quadro de dados estatísticos ou num gráfico.

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

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.

Figura 1

FOLHA DE PERFIL DE AZEITES VIRGENS

Intensidade de perceção de defeitos		
Tulha/borra (*)		
Mofo/húmido/terra (*)		
Avinhado/avinagrado		
Ácido/azedo (*)		
Azeitona queimada (madeira húmida)		
Ranço		
Outros atributos negativos:		
Descritor:	Metálico ☐ Feno ☐ Gafa ☐ Encorpado ☐ Salmoura ☐ Cozido ou queimado ☐ Água-ruça ☐ Esparto ☐ Pepino ☐ Lubrificantes ☐	
(*) Riscar o que não interessar.		
Intensidade de perceção de atributos positivos		
Frutado		
	Verde ☐	Maduro ☐
Amargo		
Picante		
Nome do provador:		Código do provador:
Código da amostra:	Assinatura:	

Apêndice

Método de cálculo da mediana e dos intervalos de confiança

Mediana

$$Me = [p(X < x_m) \leq 1/2 \wedge p(X \leq x_m) \geq 1/2]$$

Define-se «mediana» como o número real X_m caracterizado pelo facto de a probabilidade (p) de os valores da distribuição (X) serem inferiores a esse número (X_m) ser igual ou inferior a 0,5 e, simultaneamente, de a probabilidade (p) de os valores da distribuição (X) serem iguais ou inferiores a X_m ser igual ou superior a 0,5. Uma definição mais prática é ser a mediana o percentil 50 de uma distribuição de números ordenados por ordem crescente. Por outras palavras, a mediana representa o valor central de uma série ordenada de números ímpares ou a média dos dois valores centrais de uma série ordenada de números pares.

Desvio-padrão robusto

Para se obter uma estimativa fiável da variabilidade em redor da mediana, torna-se necessário estimar o desvio-padrão robusto de Stuart e Kendall (4). A fórmula do desvio-padrão robusto assintótico, isto é, a estimativa robusta da variabilidade dos dados considerados, em que N é o número de observações e IQR é o intervalo interquartil, que abrange exatamente 50 % dos casos de uma distribuição de probabilidade, é a seguinte:

$$s^* = \frac{1,25 \times \text{IQR}}{1,35 \times \sqrt{N}}$$

Para calcular o intervalo interquartil, determina-se a grandeza da diferença entre o percentil 75 e o percentil 25.

$$\text{IQR} = \text{percentil 75} - \text{percentil 25}$$

O percentil é o valor X_{pc} caracterizado pelo facto de a probabilidade (p) de os valores da distribuição serem inferiores a X_{pc} ser igual ou inferior a um determinado centésimo e, simultaneamente, de a probabilidade (p) de os valores da distribuição serem iguais ou inferiores a X_{pc} ser igual ou superior a esse centésimo. O centésimo indica o quantil considerado da distribuição. No caso da mediana, o quantil é de 50/100.

$$\text{percentil} = [p(X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p(X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Para efeitos práticos, o percentil é o valor de distribuição correspondente a uma área determinada, delimitada pela curva de distribuição ou de densidade. A título de exemplo, o percentil 25 representa o valor de distribuição correspondente a uma área igual a 0,25 ou 25/100.

Neste método, determinam-se os percentis com base nos valores reais que figuram na matriz de dados (método de cálculo informatizado de percentis).

Coefficiente de variação percentual robusto

O CVr% é um número adimensional que indica a percentagem de variabilidade da série de números analisada. É, por isso, muito útil para verificar a fiabilidade dos membros de um júri.

$$CV_r = \frac{s^*}{Me} \times 100$$

Intervalos de confiança a 95 % da mediana

Os intervalos de confiança a 95 % (valor do erro de primeira espécie igual a 0,05 ou 5 %) representam o intervalo no qual o valor da mediana poderia variar, na hipótese de a experiência poder ser repetida um número infinito de vezes. Na prática, este intervalo indica o intervalo de variabilidade do ensaio nas condições de trabalho consideradas, na hipótese de aquele poder ser repetido muitas vezes. Tal como o CVr%, este intervalo ajuda a avaliar a fiabilidade do ensaio.

$$IC_{superior} = Me + (c \times s^*)$$

$$IC_{inferior} = Me - (c \times s^*)$$

em que, no caso do intervalo de confiança a 95 %, c é igual a 1,96.

A norma IOC/T 20/Doc. No 15 apresenta um exemplo da folha de cálculo no seu anexo I.

Referências

- 1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL. SYSTAT Inc.
 - 2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
 - 3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
 - 4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
 - 5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. *The American Statistician*, 32, (2), 12-16.
 - 6) IOC/T.28/Doc. No 1, Setembro de 2007, Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005.
 - 7) IOC/T.20/Doc. No 14.
 - 8) IOC/T.20/Doc. No 15.
 - 9) ISO/IEC 17025:05.»
-

ANEXO VI

«ANEXO XXA

MÉTODO PARA DETECÇÃO DE OUTROS ÓLEOS EM AZEITES**1. OBJETIVO**

O presente método é utilizado para detetar a presença de outros óleos vegetais em azeites. É possível detetar a presença em azeites de óleos vegetais com elevado teor de ácido linoleico (óleos de soja, de colza, de girassol, etc.) e de alguns óleos vegetais com elevado teor de ácido oleico (óleo de avelã, óleo de girassol com teor elevado de ácido oleico e óleo de bagaço de azeitona). O nível detetado depende de que outro óleo se trata e também da variedade de azeitona. No caso do óleo de avelã, é normal detetar teores compreendidos entre 5 % e 15 %. O método não serve para identificar o óleo detetado; apenas indica se o azeite é genuíno ou não.

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Purificação do azeite por extração em fase sólida com cartuchos de sílica-gel. Determinação da composição de triacilgliceróis por cromatografia em fase líquida de alta resolução (HPLC) com inversão de fases, utilizando um detetor de índice de refração e, como fase móvel, propionitrilo. Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) do azeite purificado, por metilação com uma solução fria de KOH em metanol (anexo XB), e análise dos ésteres por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar, utilizando colunas de elevada polaridade (anexo XA). Cálculo da composição teórica de triacilgliceróis a partir da composição de ácidos gordos, recorrendo a um programa informático e admitindo como hipótese uma repartição aleatória dos ácidos gordos nas posições 1,3 e 2 do triacilglicerol, com restrições para os ácidos gordos saturados na posição 2. Este método de cálculo constitui uma modificação do processo descrito no anexo XVIII. Cálculo de vários algoritmos matemáticos a partir das composições teórica e experimental (por HPLC) de triacilgliceróis e comparação dos valores resultantes com os de uma base de dados constituída a partir de azeites genuínos.

3. UTENSÍLIOS E REAGENTES**3.1. Para a purificação do azeite**

- 3.1.1. Balões de erlenmeyer de 25 ml.
- 3.1.2. Tubos de vidro de 5 ml com tampa de enroscar e as tampas correspondentes, com junta de PTFE.
- 3.1.3. Cartuchos de sílica-gel de 1 g (6 ml) para extração em fase sólida (por exemplo, da Waters, Massachusetts, E.U.A.).
- 3.1.4. *n*-Hexano para análises.
- 3.1.5. Mistura solvente 87:13 (v/v) de hexano e éter dietílico.
- 3.1.6. *n*-Heptano para análises.
- 3.1.7. Acetona para análises.

3.2. Para a análise dos triacilgliceróis por HPLC

- 3.2.1. Microseringas (50 µl) e agulhas para injeção no cromatógrafo de HPLC.
- 3.2.2. Propionitrilo superpuro ou para HPLC (por exemplo, da ROMIL, Cambridge, Reino Unido), utilizado como fase móvel.
- 3.2.3. Coluna para HPLC (25 cm × 4 mm de diâmetro interno), com enchimento de fase RP-18 (granulometria de 4 µm).

3.3. Para a preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos

(ver o anexo XB)

- 3.3.1. Metanol com teor de humidade não superior a 0,5 %.
- 3.3.2. Heptano para análises.
- 3.3.3. Solução metanólica 2 N de hidróxido de potássio. Dissolver 1,1 g de hidróxido de potássio em 10 ml de metanol.
- 3.3.4. Tubos de vidro de 5 ml com tampa de enroscar e as tampas correspondentes, com junta de PTFE.

3.4. Para a análise dos ésteres metílicos dos ácidos gordos por cromatografia em fase gasosa

(Ver no anexo XA o método de determinação dos ácidos gordos insaturados *trans* por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar.)

- 3.4.1. Microseringas (5 µl) e agulhas para injeção no cromatógrafo de fase gasosa.
- 3.4.2. Hidrogénio ou hélio (gás vetor).

- 3.4.3. Hidrogénio e oxigénio para o detetor de ionização de chama.
- 3.4.4. Hidrogénio ou hélio (gás vetor auxiliar).
- 3.4.5. Coluna capilar de sílica fundida (50-60 m × 0,25-0,30 mm de diâmetro interno), revestida com um filme de 0,20-0,25 µm de espessura de fase de cianopropilpolisiloxano ou cianopropilfenilsiloxano (SP-2380 ou similar).
- 4. APARELHOS
 - 4.1. Aparelho de vácuo para extração em fase sólida.
 - 4.2. Evaporador rotativo.
 - 4.3. Equipamento de HPLC, com os seguintes componentes:
 - 4.3.1. Desgasificador para a fase móvel.
 - 4.3.2. Válvula de injeção Rheodyne com circuito de 10 µl.
 - 4.3.3. Bomba de alta pressão.
 - 4.3.4. Forno termostatzado para a coluna de HPLC, capaz de manter temperaturas inferiores à temperatura ambiente (15-20 °C), por exemplo do tipo Peltier.
 - 4.3.5. Detetor de índice de refração.
 - 4.3.6. Sistema computadorizado de aquisição de dados dotado de um programa de integração.
 - 4.4. Equipamento para cromatografia em fase gasosa com coluna capilar descrito no anexo XA, com os seguintes componentes:
 - 4.4.1. Injetor com divisão de fluxo («split»).
 - 4.4.2. Detetor de ionização de chama.
 - 4.4.3. Forno com temperatura programável.
 - 4.4.4. Sistema computadorizado de aquisição de dados dotado de um programa de integração.
 - 4.5. Computador com o programa EXCEL da Microsoft.

5. TÉCNICA ANALÍTICA

5.1. Purificação do azeite

Colocar um cartucho de sílica-gel para extração em fase sólida num aparelho de eluição sob vácuo e lavar sob vácuo com 6 ml de hexano. Cessar a aplicação de vácuo, para evitar a secagem da coluna, e colocar um balão de erlenmeyer por debaixo do cartucho. Introduzir, em seguida, na coluna, trabalhando sob vácuo, uma solução de azeite (cerca de 0,12 g) em 0,5 ml de hexano, fazendo-a penetrar na coluna e eluindo-a em seguida com 10 ml da mistura solvente 87:13 (v/v) de hexano e éter dietílico (3.1.5). Homogeneizar o solvente eluído e transferir cerca de metade do volume para outro balão de erlenmeyer. Evaporar separadamente ambas as soluções até à secura, num evaporador rotativo, sob pressão reduzida, à temperatura ambiente. Para a análise dos triacilgliceróis, dissolver um dos resíduos em 1 ml de acetona (ver o ponto 5.2, primeiro parágrafo), transferindo depois o líquido resultante para um dos tubos de vidro de 5 ml com tampa de enroscar. Dissolver o outro resíduo em 1 ml de *n*-heptano e transferir o líquido resultante para outro tubo de vidro de 5 ml, destinado à preparação dos ésteres metílicos de ácidos gordos.

Nota: Pode purificar-se o azeite utilizando uma coluna de sílica-gel conforme é descrito no método 2.507 da IUPAC.

5.2. Análise dos triacilgliceróis por HPLC

Preparar o sistema de HPLC, mantendo a coluna a 20 °C e utilizando propionitrilo como fase móvel, ao caudal de 0,6 ml/minuto. Quando a linha de base estiver estável, injetar e eluir solvente. Se a linha de base estiver instável entre os 12 e os 25 minutos, utilizar outro tipo de acetona ou uma mistura 25:75 de propionitrilo e acetona para dissolver a amostra.

Nota: Alguns tipos de acetona geram perturbações na região referida da linha de base.

Injetar uma alíquota de 10 µl da solução de azeite purificado em acetona (5 %). Cada eluição demora cerca de 60 minutos. Ajustar a temperatura do forno e/ou o caudal de modo a obter um cromatograma semelhante ao ilustrado na figura 1, no qual a trilinoleína (pico 1) elui aos 15,5 minutos e há boa separação dos pares LLL-OLLn (picos 1 e 2) e OLL-OLLn (picos 4 e 5).

A altura do pico 2 (OLLn+PoLL) deve atingir, pelo menos, 3 % da escala.

5.3. Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos

Adicionar 0,1 ml da solução metanólica 2 N de hidróxido de potássio à solução de azeite purificado em 1 ml de *n*-heptano. Tapar o tubo e enroscar bem a tampa. Agitar o tubo vigorosamente durante 15 segundos e deixar decantar até a camada superior ficar límpida (5 minutos). A solução de *n*-heptano está pronta para ser injetada no cromatógrafo de fase gasosa. Esta solução pode permanecer à temperatura ambiente durante 12 horas, no máximo.

5.4. Análise dos ésteres metílicos dos ácidos gordos por cromatografia em fase gasosa

O processo a utilizar é o descrito no método para determinação dos ácidos gordos insaturados *trans* (ver o anexo XA).

Regular a temperatura do forno do sistema de cromatografia em fase gasosa a 165 °C. Recomenda-se que a temperatura do forno seja mantida a 165 °C durante 10 minutos e que depois seja elevada para 200 °C, à razão de 1,5 °C/minuto. Para minimizar a formação de ácidos gordos *trans*, recomenda-se que a temperatura do injetor se situe entre 220 °C and 250 °C (ver o anexo XA). A temperatura do detetor deve ser de 250 °C. Como gás vetor, utilizar hidrogénio ou hélio, devendo a pressão na cabeça da coluna ser de aproximadamente 130 kPa. Trabalhar no modo com divisão de fluxo («split»), sendo o volume a injetar de 1 µl.

O perfil cromatográfico obtido deve ser semelhante ao ilustrado na figura 2. É importante prestar especial atenção à separação dos ácidos C18:3 dos ácidos C20:1 (o pico C18:3 tem de preceder o pico C20:1). Para o conseguir, é necessário otimizar a temperatura inicial e/ou a pressão na cabeça da coluna. Para minimizar a separação dos ácidos palmítico e palmitoleico, ajustar as condições do injetor – temperatura, divisão de fluxo e volume injetado.

Para quantificar os isómeros *trans*, a altura do pico C20:0 deve corresponder a cerca de 20 % da escala. Se o pico C18:0 surgir distorcido, diminuir a quantidade de amostra.

6. INTEGRAÇÃO DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS

6.1. Cromatograma de HPLC

A figura 1 mostra um cromatograma HPLC típico dos triacilgliceróis de um azeite purificado. Para a integração das áreas dos picos, é necessário traçar três linhas de base: a primeira entre o início do pico 1 e o final do pico 3; a segunda entre o início do pico 4 e o vale antes do pico 8; a terceira entre o vale que precede o pico 8 e o final do pico 18.

A área total (AT) é o somatório das áreas de todos os picos (identificados ou não) do pico 1 ao pico 18. A percentagem correspondente a cada pico é calculada do seguinte modo:

$$\text{TAG}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Os resultados (em percentagem) são arredondados às centésimas.

6.2. Cromatograma de cromatografia em fase gasosa

A figura 2 mostra um cromatograma de cromatografia em fase gasosa de ésteres alquílicos de ácidos gordos obtidos a partir de um azeite purificado. Calcular as percentagens dos seguintes ácidos gordos:

Palmítico:	P (C16:0)	=	éster metílico + éster etílico
Esteárico:	S (C18:0)	=	éster metílico
Palmitoleico:	Po (C16:1)	=	soma dos ésteres metílicos dos dois isómeros <i>cis</i>
Oleico:	O (C18:1)	=	soma dos ésteres metílicos dos dois isómeros <i>cis</i> + éster etílico + isómeros <i>trans</i>
Linoleico:	L (C18:2)	=	éster metílico + éster etílico + isómeros <i>trans</i>
Linolénico:	Ln (C18:3)	=	éster metílico + isómeros <i>trans</i>
Araquídico:	A (C20:0)	=	éster metílico
Eicosenoico (gondoi- co);	G (C20:1)	=	éster metílico

Podem não aparecer ésteres etílicos e ésteres com isomeria *trans* no cromatograma.

A área total (AT) é a soma de todos os picos do cromatograma de C14:0 a C24:0, exceto o correspondente ao esqualeno. A percentagem correspondente a cada pico é calculada do seguinte modo:

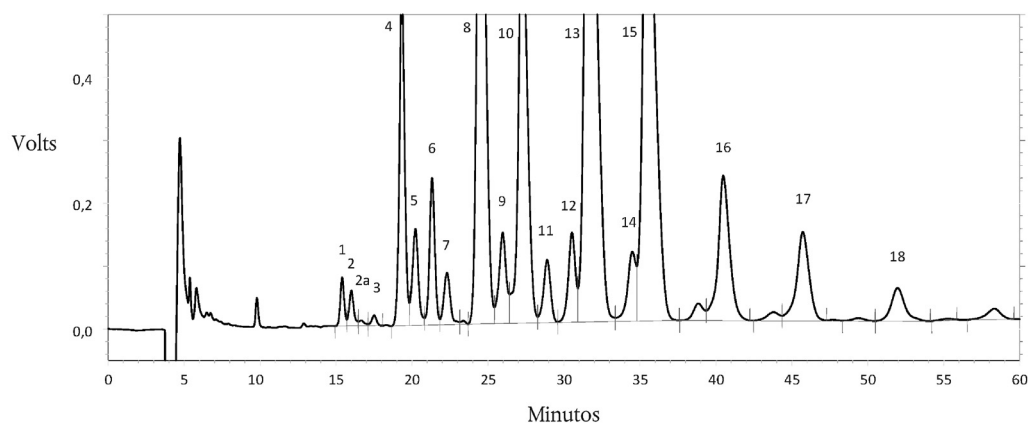
$$\text{AG}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Os resultados são arredondados às centésimas.

Os programas informáticos normalizam automaticamente os dados a 100 ao efetuarem os cálculos, pelo que não é necessário fazê-lo.

Figura 1

Cromatograma de HPLC dos triacilgliceróis de um azeite virgem «Chamlali». Principais componentes dos picos cromatográficos



- 1: LLL; 2: OLLn+PoLL; 3: PLLn; 4: OLL; 5: OOLn+PoOL;
 6: PLL+PoPoO; 7: POLn+PPoPo+PPoL; 8: OOL+LnPP; 9: PoOO;
 10: SLL+PLO; 11: PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; 12: PLP;
 13: OOO+PoPP; 14: SOL; 15: POO; 16: POP; 17: SOO;
 18: POS+SLS.

Quadro 1

Dados de repetibilidade da determinação dos triacilgliceróis de azeites virgens por HPLC numa coluna à temperatura de 20 °C, utilizando propionitrilo como fase móvel

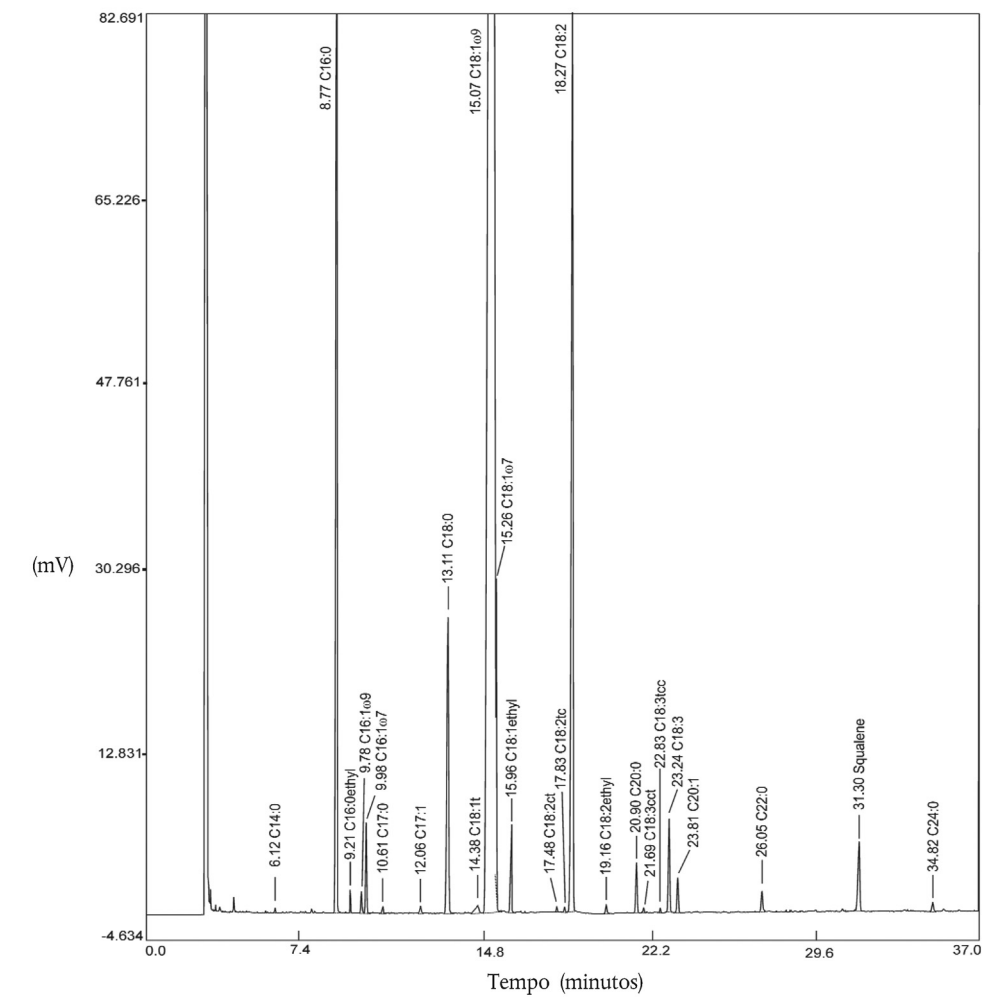
NCE	Picos da HPLC	Triacilgliceróis	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
			Média (%)	DPR _r (%)	Média (%)	DPR _r (%)	Média (%)	DPR _r (%)	Média (%)	DPR _r (%)	Média (%)	DPR _r (%)
42	1	LLL	0,020	7,23	0,066	5,18	0,095	4,10	0,113	0,95	0,34	1,05
	2	OLLn + PoLL	0,085	7,44	0,24	1,78	0,26	2,25	0,35	2,02	0,50	2,83
	3	PLLn	0,023	15,74	0,039	5,51	0,057	5,62	0,082	4,35	0,12	6,15
44	4	OLL	0,47	1,52	1,53	0,42	2,62	0,98	3,35	1,05	4,37	1,13
	5	OOLn + PoOL	1,07	2,01	1,54	0,46	1,61	0,71	1,72	1,07	1,77	2,40
	6	PLL + PoPoO	0,11	12,86	0,24	4,37	0,65	1,32	1,35	0,73	2,28	1,24
	7	POLn + PpoPo + PpoL	0,42	5,11	0,49	2,89	0,55	2,01	0,85	1,83	1,09	1,96
46	8	OOL + LnPP	6,72	0,63	8,79	0,31	11,21	0,42	13,25	0,33	15,24	0,23
	9	PoOO	1,24	2,86	1,49	0,95	1,63	0,85	2,12	0,45	2,52	0,56
	10	SLL + PLO	2,70	0,65	4,05	0,70	6,02	0,65	9,86	0,53	11,53	0,31
	11	PoOP + SpoL + SOLn + SpoPo	0,64	4,42	0,69	3,02	0,79	1,23	1,53	0,89	1,70	1,66

NCE	Picos da HPLC	Triacilgliceróis	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
			Média (%)	DPR _r (%)	Média (%)	DPR _r (%)	Média (%)	DPR _r (%)	Média (%)	DPR _r (%)	Média (%)	DPR _r (%)
48	12+13	OOO + PLP + PoPP	49,60	0,07	48,15	0,06	42,93	0,06	33,25	0,10	24,16	0,06
	14	SOL	0,82	1,72	0,92	1,56	1,05	1,32	1,25	1,05	1,60	1,77
	15	POO	22,75	0,25	21,80	0,20	21,05	0,30	20,36	0,35	20,17	0,14
50	16	POP	3,05	0,46	4,56	0,42	4,98	0,52	5,26	0,41	5,57	0,38
	17	SOO	6,87	0,21	5,56	0,33	4,86	0,43	4,12	0,72	3,09	0,69
	18	POS + SLS	1,73	1,23	1,65	1,10	1,54	0,99	1,49	1,10	1,41	1,00

n = Três replicados.
DPR_r = Desvio-padrão relativo da repetibilidade.

Figura 2

Cromatograma de cromatografia em fase gasosa de ésteres alquílicos de ácidos gordos obtidos a partir de óleo de bagaço de azeitona por transesterificação com uma solução metanólica fria de hidróxido de potássio



7. DETEÇÃO DE OUTROS ÓLEOS EM AZEITES

A norma *IOC/T.20/Doc. No 25* descreve, no seu anexo I, o método de cálculo a utilizar para a deteção de outros óleos em azeites, o qual se baseia na comparação de algoritmos matemáticos com uma base de dados constituída a partir de azeites genuínos.»
