

**REGULAMENTO (CE) N.º 796/2002 DA COMISSÃO
de 6 de Maio de 2002**

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, e as notas complementares constantes do anexo do Regulamento (CEE) n.º 2658/87 do Conselho relativo à nomenclatura pautal e estatística e à pauta aduaneira comum

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

2568/91 e certos erros existentes no texto do Regulamento (CEE) n.º 2568/91.

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta o Regulamento n.º 136/66/CEE do Conselho, de 22 de Setembro de 1966, que estabelece uma organização comum de mercado no sector das matérias gordas ⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 1513/2001 ⁽²⁾, e, nomeadamente, o seu artigo 35.ºA,

(4) Tendo em vista a harmonização dos processos de preparação dos ésteres metílicos de ácidos gordos para a determinação analítica da composição de ácidos gordos dos azeites e óleos, a evolução técnica dos métodos de análise permite reduzir a dois o número dos métodos actualmente em vigor, referidos no anexo XB, em função da acidez livre do azeite ou óleo.

Tendo em conta o Regulamento (CEE) n.º 2658/87 do Conselho relativo à nomenclatura pautal e estatística e à pauta aduaneira comum ⁽³⁾, com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 578/2002 da Comissão ⁽⁴⁾, e, nomeadamente, o seu artigo 9.º,

(5) Tendo em conta a experiência adquirida, o Conselho Oleícola Internacional elaborou um novo método de avaliação das características organolépticas dos azeites virgens. O método afigura-se mais fiável e mais simples do que o actualmente previsto no anexo XII do Regulamento (CEE) n.º 2568/91. É, portanto, conveniente substituir o método previsto nesse anexo pelo novo método de avaliação organoléptica dos azeites virgens.

Considerando o seguinte:

(1) O 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 ⁽⁵⁾, com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 2042/2001 ⁽⁶⁾, define as características físico-químicas e organolépticas dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona e os métodos de avaliação das mesmas. A partir de 1 de Novembro de 2001, a definição da categoria «óleo de bagaço de azeitona bruto», estabelecida no ponto 4 do anexo do Regulamento n.º 136/66/CEE, prevê a correspondência, com excepção de determinadas características, entre certos óleos obtidos de bagaços de azeitona e os azeites lampantes.

(6) Para a aplicação do novo método de avaliação organoléptica, é necessário prever um processo de arbitragem em caso de não correspondência entre a categoria declarada e a categoria atribuída pelo júri aprovado que efectuar a avaliação.

(2) Para distinguir os óleos obtidos por centrifugação de bagaços de azeitona dos azeites lampantes, e na falta de um parâmetro analítico, é conveniente estabelecer valores-limite relativos aos teores de ceras, de eritrodioleína e de álcoois alifáticos totais, para diferenciar esses produtos, independentemente dos métodos de obtenção respectivos. Para o efeito, é necessário definir um método de determinação do teor de álcoois alifáticos totais.

(7) Para garantir condições para a realização das análises, e devido à dispersão geográfica de certas regiões, é necessário prever um prazo diferente para o envio das amostras ao laboratório depois da colheita das mesmas, em função das condições climatológicas de cada estação. Para a classificação dos azeites, é conveniente precisar que os resultados das análises sejam comparados com os limites previstos no Regulamento (CEE) n.º 2568/91, os quais já têm em conta as margens de repetibilidade e reprodutibilidade dos métodos de análise utilizados.

(3) Esses novos valores-limite tornam necessário alterar a nota complementar 2 do capítulo 15 da Nomenclatura Combinada, constante do anexo I do Regulamento (CEE) n.º 2658/87. É conveniente suprimir, na mesma ocasião, o artigo 15.º e o anexo XIV do Regulamento (CEE) n.º

(8) 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, é conveniente diferir a aplicabilidade das alterações previstas no presente regulamento até 1 de Setembro de 2002 e prever uma derrogação para os azeites e óleos de bagaço de azeitona acondicionados para o comércio a retalho antes dessa data.

⁽¹⁾ JO L 172 de 30.9.1966, p. 3025/66.

⁽²⁾ JO L 201 de 26.7.2001, p. 4.

⁽³⁾ JO L 256 de 7.9.1987, p. 1.

⁽⁴⁾ JO L 97 de 13.4.2002, p. 1.

⁽⁵⁾ JO L 248 de 5.9.1991, p. 1.

⁽⁶⁾ JO L 276 de 19.10.2001, p. 8.

(9) As medidas da competência respectiva previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Gestão das Matérias Gordas e com o parecer do Comité do Código Aduaneiro,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

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

1. No n.º 1 do artigo 2.º:

a) O terceiro travessão passa a ter a seguinte redacção:

«— para a determinação do teor de ceras, o método constante do anexo IV,»;

b) É aditado o seguinte travessão:

«— para a determinação dos teores de álcoois alifáticos, o método constante do anexo XIX,».

2. O n.º 2 do artigo 2.º passa a ter a seguinte redacção:

«2. A verificação, pelas autoridades nacionais ou seus representantes, das características organolépticas dos azeites virgens será efectuada por júris de produtores 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 aprovado não confirmar a declaração no respeitante às características organolépticas da categoria de azeite declarada, as autoridades nacionais ou os seus representantes farão proceder, a pedido do interessado, a duas contra-análises por outros júris aprovados, das quais pelo menos uma será efectuada por um júri aprovado pelo Estado-Membro produtor em causa. As características em questão serão consideradas conformes com as declaradas se as duas contra-análises confirmarem a classificação declarada. Caso contrário, e sem prejuízo das sanções incorridas, as despesas das contra-análises serão imputadas ao interessado.».

3. O n.º 3, segundo parágrafo, do artigo 2.º passa a ter a seguinte redacção:

«Sem prejuízo do disposto na norma EN ISO 5555 e no capítulo 6 da norma EN ISO 661, as amostras devem ser colocadas, o mais rapidamente possível, ao abrigo da luz e de temperaturas elevadas e ser enviadas para análise, ao laboratório, o mais tardar:

- de Outubro a Maio, no décimo dia útil após a colheita,
- de Junho a Setembro, no quinto dia útil após a colheita.».

4. É aditado ao artigo 2.º um n.º 5 com a seguinte redacção:

«5. Para a determinação das características dos azeites pelos métodos previstos no n.º 1, comparar-se-ão directamente os resultados analíticos com os limites previstos no presente regulamento.».

5. São suprimidos os artigos 3.º e 3.ºA.

6. O artigo 3.ºB é renumerado artigo 3.º

7. O n.º 1 do artigo 4.º passa a ter a seguinte redacção:

«1. Para a apreciação e controlo das características organolépticas pelas autoridades nacionais ou representantes destas, os Estados-Membros podem aprovar júris de produtores.

As condições de aprovação serão estabelecidas pelos Estados-Membros, nomeadamente de modo a:

- satisfazer as condições do ponto 4 do anexo XII.
- assegurar que a formação do chefe do júri seja efectuada por um estabelecimento e em condições reconhecidos para o efeito pelo Estado-Membro.
- fazer depender a validade da aprovação dos resultados obtidos no quadro de um sistema de controlo anual instituído pelo Estado-Membro.

Cada Estado-Membro comunicará à Comissão a lista dos júris aprovados e as medidas tomadas em conformidade com o presente número.».

8. É suprimido o artigo 5.º

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

Artigo 2.º

A nota complementar 2 do capítulo 15 da Nomenclatura Combinada constante do anexo I do Regulamento (CEE) n.º 2658/87 é alterada do seguinte modo:

1. No ponto B.I, a alínea a) passa a ter a seguinte redacção:

«a) Um teor de ceras não superior a 300 mg/kg.».

2. No ponto B.I, o ponto 4 da alínea g) passa a ter a seguinte redacção:

«4. Características organolépticas com mediana de defeitos superior a 6, de acordo com o anexo XII do Regulamento (CEE) n.º 2568/91.».

3. No ponto B.II, a alínea g) passa a ter a seguinte redacção:

«g) Características organolépticas com mediana de defeitos igual ou inferior a 6, de acordo com o anexo XII do Regulamento (CEE) n.º 2568/91.».

4. No ponto D, a alínea b) passa a ter a seguinte redacção:

«b) Um teor de eritrodiol e uvaol superior a 4,5.».

Artigo 3.º

O presente regulamento entra em vigor no sétimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

No caso dos azeites e óleos de bagaço de azeitona acondicionados para o comércio a retalho, o presente regulamento é aplicável a partir de 1 de Setembro de 2002.

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

Feito em Bruxelas, em 6 de Maio de 2002.

Pela Comissão
Franz FISCHLER
Membro da Comissão

ANEXO

1. No sumário dos anexos do Regulamento (CEE) n.º 2568/91:
 - a) É suprimido o anexo XIV: Notas complementares 2, 3 e 4 do capítulo 15 da Nomenclatura Combinada.
 - b) É aditado o seguinte título: «Anexo XIX: Método de determinação dos teores de álcoois alifáticos».
2. O anexo I é substituído pelos seguintes quadros e texto:

CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES E ÓLEOS DE BAGAÇO DE AZEITONA

Categoria	Acidez (%) (*)	Índice de peróxidos meq O ₂ /kg (*)	Solventes halogenados mg/kg (*) (1)	Ceras mg/kg (**)	Ácidos saturados na posição 2 dos triglicéridos (%)	Estigmastadienos mg/kg (2)	Diferença entre o ECN42 determinado por HPLC e o ECN 42 obtido por cálculo teórico	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ após passagem por alumina (3)	Delta K (*)	Exame organoléptico Mediana dos defeitos (Md) (*)	Exame organoléptico Mediana do frutado (Mf) (*)
1. Azeite virgem extra	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Azeite virgem	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Azeite virgem corrente	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 6,0 (4)	—
4. Azeite virgem lampante	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 300 (5)	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	Md > 6	—
5. Azeite refinado	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Azeite	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Óleo de bagaço de azeitona bruto	> 0,5 (**)	—	—	> 350 (6)	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

(1) Limite máximo para os compostos halogenados totais detectados com um detector de captura electrónica. Para os compostos detectados individualmente, o limite máximo é 0,10 mg/kg.

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

(3) Para verificar a presença de óleos refinados, quando K₂₇₀ exceder o limite da categoria correspondente haverá que proceder à determinação K₂₇₀ após passagem alumina.

(4) Se a mediana do frutado for 0, a mediana dos defeitos deve ser inferior ou igual a 2,5.

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

(6) Os óleos cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg serão 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 %.

Categoria	Teor de ácidos						Soma dos isómeros trans-oleicos (%)	Soma dos isómeros translinoleicos e translinolénicos (%)	Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	Betasitosterol (%) ⁽¹⁾	Delta-7-estigmasterol (%)	Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodiol e uvaol (%) ^(**)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eicosenóico (%)	Beénico (%)	Linhocé-rico (%)										
1. Azeite virgem extra	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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	≤ 0,9	≤ 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 virgem corrente	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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
4. Azeite virgem lampante	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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 ⁽²⁾
5. Azeite refinado	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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. Azeite	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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
7. Óleo de bagaço de azeitona bruto	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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 ⁽³⁾
8. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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
9. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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⁾ Soma de delta-5,23-estigmastadieno + closterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

⁽²⁾ Os azeites cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg serão considerados azeite lampante se o teor de álcoois alifáticos totais for inferior ou igual a 350 mg/kg a percentagem de eritrodiol e uvaol for inferior ou igual a 3,5.

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

Notas:

- a) 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.
- b) 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.
- c) O asterisco (*) associado a determinadas características de qualidade do azeite significa o seguinte:
 — no caso do azeite virgem lampante, que os limites correspondentes (excepto o relativo ao K₂₃₂) podem não ser observados simultaneamente,
 — no caso dos outros azeites, que não a observância de um dos limites correspondentes implica uma mudança de categoria, mantendo-se, porém, a classificação numa das categorias de azeite virgem.
- d) No caso dos óleos de bagaço de azeitona, os limites relativos às características assinaladas com dois asteriscos (**) podem não ser observados simultaneamente.»

3. O anexo XB é substituído pelo seguinte anexo:

«ANEXO XB

PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DOS ÁCIDOS GORDOS DO AZEITE E DO ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA

São recomendados os dois métodos seguintes para a preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos do azeite e do óleo de bagaço de azeitona.

MÉTODO A: Transesterificação a frio por meio de uma solução metanólica de hidróxido de potássio

MÉTODO B: Metilação a quente por meio de uma solução metanólica de metóxido de sódio, seguida de uma esterificação em meio ácido

A escolha de um ou outro método dependerá do parâmetro analítico a determinar e da categoria do azeite ou óleo, tal como se descreve a seguir:

- a) Determinação da diferença entre o teor real e o teor teórico de triglicéridos com NCE 42 (Δ NCE42):
 - o método A será aplicado às amostras de todas as categorias de azeite e óleo de bagaço, depois da purificação do azeite ou óleo por passagem numa coluna de sílica-gel;
- b) Determinação da composição de ácidos gordos:
 - o método A será aplicado directamente às amostras de azeites e óleos de bagaço das seguintes categorias:
 - azeites virgens com acidez livre inferior a 3,3 %.
 - azeite refinado,
 - azeite (lote de azeites virgens com azeite refinado),
 - óleo de bagaço de azeitona refinado,
 - óleo de bagaço de azeitona (lote de azeites virgens com óleo de bagaço de azeitona refinado),
 - o método B será aplicado directamente às amostras de azeites e óleos de bagaço das seguintes categorias:
 - azeite virgem com acidez livre superior a 3,3 %,
 - óleo de bagaço de azeitona bruto;
- c) Determinação dos isómeros *trans* de ácidos gordos:
 - o método A será aplicado directamente às amostras de azeites e óleos de bagaço das seguintes categorias:
 - azeites virgens com acidez livre inferior a 3,3 %,
 - azeite refinado,
 - azeite (lote de azeites virgens com azeite refinado),
 - óleo de bagaço de azeitona refinado,
 - óleo de bagaço de azeitona (lote de azeites virgens com óleo de bagaço de azeitona refinado),
 - o método B será aplicado às amostras de azeites e óleos de bagaço das seguintes categorias, depois da purificação do azeite ou óleo por passagem numa coluna de sílica-gel:
 - azeite virgem com acidez livre superior a 3,3 %,
 - óleo de bagaço de azeitona bruto.

PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE AZEITE OU ÓLEO

Se necessário, purificar as amostras por passagem do azeite ou óleo por uma coluna de sílica-gel, utilizando hexano/óxido dietílico (87: 13, v/v) como solvente de eluição, conforme descrito no método IUPAC 2.507.

Como processo alternativo, pode recorrer-se a uma extracção em fase sólida com cartuchos de sílica-gel. Para o efeito, colocar um cartucho de sílica-gel (1 g, 6 ml) num aparelho de eluição sob vazio e lavar com 6 ml de hexano. Cessar a aplicação de vazio, para evitar a secagem da coluna. Introduzir, em seguida, na coluna uma solução de azeite ou óleo (cerca de 0,12 g) em 0,5 ml de hexano e reduzir a pressão, para que a solução penetre na sílica; eluir com 10 ml de hexano/óxido dietílico (87: 13 v/v) sob vazio. Homogeneizar a totalidade dos eluatos e dividir em dois volumes semelhantes. Evaporar um dos volumes até à secura, num evaporador rotativo, sob pressão reduzida, à temperatura ambiente. Dissolver o resíduo em 1 ml de heptano. A solução obtida está pronta para a análise dos ácidos gordos por cromatografia em fase gasosa. Evaporar o segundo volume e dissolver o resíduo em 1 ml de acetona, para a análise dos triglicéridos por HPLC, se necessário.

MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DOS ÁCIDOS GORDOS

1. Método A: Transesterificação a frio por meio de uma solução metanólica de hidróxido de potássio

1.1. Aplicação

Este método rápido é aplicável aos azeites e óleos de bagaço de azeitona cujo teor de ácidos gordos livres seja inferior a 3,3 %. Os ácidos gordos livres não são esterificados pelo hidróxido de potássio. Os ésteres etílicos de ácidos gordos transesterificam mais lentamente do que os ésteres glicéricos e a metilação pode ser apenas parcial.

1.2. Princípio

Formação dos ésteres metílicos por transesterificação numa solução metanólica de hidróxido de potássio, como fase intermédia antes da saponificação (ponto 5 do método ISO 5509: 2000; ponto 5 do método IUPAC 2.301).

1.3. Reagentes

Metanol com teor de humidade não superior a 0,5 % (m/m).

Heptano para cromatografia.

Solução metanólica aproximadamente 2 N de hidróxido de potássio: dissolver 11,2 g de hidróxido de potássio em 100 ml de metanol.

1.4. Material

Tubo de ensaio com tampa de rosca e junta de PTFE, com 5 ml de capacidade.

Pipetas graduadas ou automáticas de 2 ml e 0,2 ml.

1.5. Técnica

Num tubo de ensaio com tampa de rosca de 5 ml, pesar cerca de 0,1 g da amostra de azeite ou óleo de bagaço. Juntar 2 ml de heptano e agitar. Juntar 0,2 ml da solução metanólica 2 N de hidróxido de potássio, tapar com a tampa com junta de PTFE, fechar bem e agitar energeticamente durante 30 segundos. Deixar repousar até que a parte superior da solução fique límpida. Decantar a camada superior, que contém os ésteres metílicos. A solução de heptano está pronta para ser injectada no cromatógrafo. É aconselhável manter a solução no frigorífico até ao momento da análise cromatográfica. Não é recomendável guardar a solução durante mais de 12 horas.

2. Método B: Metilação a quente por meio de uma solução metanólica de metóxido de sódio, seguida de uma esterificação em meio ácido**2.1. Aplicação**

O método é aplicável aos azeites e óleos de bagaço de azeitona cujo teor de ácidos gordos livres seja superior a 3,3 %.

2.2. Princípio

Neutralização dos ácidos gordos livre e metanólise alcalina dos glicéridos, seguida de uma esterificação dos ácidos gordos em meio ácido (ponto 4.2 do método IUPAC n.º 2.301).

2.3. Reagentes

— Heptano para cromatografia.

— Metanol com teor de humidade não superior a 0,05 % (m/m).

— Solução metanólica 0,2 N de metóxido de sódio: dissolver 5 g de sódio em 1 000 ml de metanol (a preparação pode ser feita a partir de soluções comerciais).

— Solução metanólica a 0,2 % de fenolftaleína.

— Solução metanólica 1 N de ácido sulfúrico: juntar 3 ml de ácido sulfúrico a 96 % a 100 ml de metanol.

— Solução aquosa saturada de cloreto de sódio.

2.4. Material

— Balão volumétrico de 50 ml, de fundo plano e gargalo longo e estreito com esmerilado.

— Refrigerante de refluxo. Refrigerante de ar (1 m de comprimento) com junta de esmerilado.

— Regularizador de ebulição.

— Funil de vidro.

2.5. Técnica

Deitar 0,25 g da amostra de azeite ou óleo num balão volumétrico de 50 ml com esmerilado. Com o funil, juntar 10 ml da solução metanólica 0,2 N de metóxido de sódio e o regularizador de ebulição. Adaptar o refrigerante de refluxo, agitar e levar à ebulição. A solução deve ficar límpida ao fim de cerca de 10 minutos e a reacção estará praticamente terminada ao fim de cerca de 15 minutos. Retirar o balão da fonte de calor, aguardar o final do refluxo, retirar o refrigerante e juntar duas gotas da solução de fenolftaleína. Juntar alguns mililitros da solução metanólica 1 N de ácido sulfúrico, até ficar incolor, e, em seguida, mais 1 ml. Adaptar o refrigerante e levar de novo à ebulição, mantendo-a durante cerca de 20 minutos. Retirar o balão da fonte de calor e arrefecê-lo em água corrente. Retirar o refrigerante, juntar 20 ml da solução saturada de cloreto de sódio e agitar. Juntar 5 ml de heptano, tapar o balão e agitar energeticamente durante 15 segundos.

Deixar decantar até à separação completa das duas fases. Juntar de novo uma parte da solução saturada de cloreto de sódio, até que a fase aquosa atinja a parte inferior do gargalo do balão. A camada superior contida no gargalo é a que contém os ésteres metílicos. A solução obtida está pronta para ser injectada no cromatógrafo de fase gasosa.

Precaução: A metilação pelo método B deve ser efectuada debaixo de um exaustor em aspiração.

2.6. Alternativas à metilação pelo método B

2.6.1. Método C

2.6.1.1. Princípio

Tratamento da matéria gorda a analisar com uma solução metanólica de cloreto de hidrogénio, numa ampola fechada, a 100 °C.

2.6.1.2. Material

- Ampola de vidro espesso com cerca de 5 ml de capacidade (altura de 40 mm a 45 mm e diâmetro de 14 mm a 16 mm).
- Pipetas graduadas de 1 ml e 2 ml.

2.6.1.3. Reagentes

Solução a 2 % de cloreto de hidrogénio em metanol, preparada a partir de cloreto de hidrogénio gasoso e de metanol anidro (Nota 1).

Hexano para cromatografia.

Nota 1: Podem utilizar-se soluções comerciais de cloreto de hidrogénio em metanol. Podem preparar-se facilmente no laboratório pequenas quantidades de cloreto de hidrogénio gasoso modificando a solução comercial ($d = 1,18$) por adição de algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Dado que o metanol absorve rapidamente o cloreto de hidrogénio, é aconselhável tomar todas as precauções habituais na dissolução (por exemplo, introduzir o gás com o auxílio de um pequeno funil em posição invertida, que mergulhe muito ligeiramente no metanol). Podem preparar-se com antecedência quantidades importantes de soluções metanólicas de cloreto de hidrogénio, que se conservam perfeitamente no escuro em frascos com tampa de vidro. Este reagente também pode ser preparado por dissolução de cloreto de acetilo em metanol anidro.

2.6.1.4. Técnica

- Deitar na ampola de vidro 0,2 g da matéria gorda — previamente seca com sulfato de sódio e filtrada — e 2 ml da solução metanólica de cloreto de hidrogénio. Fechar a ampola.
- Mergulhar a ampola num banho a 100 °C e mantê-la a essa temperatura durante 40 minutos.
- Arrefecer a ampola numa corrente de ar, abri-la e juntar 2 ml de água destilada e 1 ml de hexano.
- Centrifugar e extrair a fase do hexano, que se encontra pronta a utilizar.

2.6.2. Método D

2.6.2.1. Princípio

Aquecimento da matéria gorda a analisar, sob refluxo, com metanol, hexano e ácido sulfúrico. Extração dos ésteres metílicos obtidos, com éter de petróleo.

2.6.2.2. Material

- Tubo de ensaio de cerca de 20 ml, equipado com um refrigerante de refluxo a ar com cerca de 1 m de comprimento, com junta esmerilada.
- Pipeta graduada de 5 ml.
- Ampola de decantação de 50 ml.
- Provetas de 10 ml e 25 ml.
- Tubo de ensaio de fundo cónico de 15 ml.

2.6.2.3. Reagentes

- Reagente de metilação: mistura de metanol anidro, hexano e ácido sulfúrico concentrado ($d = 1,84$) nas proporções de 75:25:1, em volume.

- Éter de petróleo 40 °C-60 °C.
- Sulfato de sódio anidro.

2.6.2.4. Técnica

Introduzir 0,1 g de azeite ou óleo no tubo de 20 ml e juntar 5 ml do reagente de metilação.

Adaptar o refrigerante de refluxo e manter em ebulição durante 30 minutos num banho de água (Nota 2).

Transferir quantitativamente a mistura para uma ampola de decantação de 50 ml, com 10 ml de água destilada e 10 ml de éter de petróleo. Agitar vigorosamente e aguardar a separação de fases. Separar a fase aquosa e lavar duas vezes a camada etérea com 20 ml de água destilada. Deitar na ampola de decantação uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro, agitar, deixar repousar durante alguns minutos e filtrar, recolhendo o filtrado num tubo de fundo cónico de 15 ml.

Evaporar o solvente num banho de água, sob corrente de azoto.

Nota 2: Para regular a ebulição, colocar uma vareta de vidro no tubo e limitar a temperatura do banho a 90 °C.

3. **Parâmetros de precisão**

A avaliação estatística da precisão dos métodos A e B encontra-se publicada no método COI/T.20/DOC n.º 24 do Conselho Oleícola Internacional.

RECOMENDAÇÕES PARA A ANÁLISE DE ÉSTERES DOS ÁCIDOS GORDOS DO AZEITE E DO ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

1. **Técnica**

Análise das soluções de ésteres de ácidos gordos em hexano por cromatografia em fase gasosa em conformidade com a norma ISO 5508, em coluna capilar (50 m × 0,25 mm ou 0,32 mm de diâmetro interno) revestida de cianopropilsilicone, tal como indicado na determinação dos isómeros *trans* dos ácidos gordos (COI/T.20/Doc. n.º 17).

Representa-se na figura 1 o perfil cromatográfico típico de um óleo de bagaço de azeitona com ésteres metílicos e etílicos de ácidos gordos e isómeros *trans* de ésteres metílicos.

2. **Cálculos**

2.1. Para determinar a composição de ácidos gordos e o ΔNCE42, devem ser tidos em conta os seguintes ácidos gordos:

Mirístico (C14: 0).

Palmítico (C16: 0). Soma das áreas dos picos correspondentes aos ésteres metílicos e etílicos.

Palmitoleico (C16: 1). Soma das áreas dos picos correspondentes aos isómeros ω⁹ e ω⁷ do éster metílico.

Heptadecanóico (C17: 0).

Heptadecenóico (C17: 1).

Esteárico (C18: 0).

Oleico (C18: 1). Soma das áreas dos picos correspondentes aos isómeros ω⁹ e ω⁷ do éster metílico, do éster etílico e dos isómeros *trans* do éster metílico.

Linoleico (C18: 2). Soma das áreas dos picos correspondentes aos ésteres metílicos e etílicos e aos isómeros *trans* do éster metílico.

Araquídico (C20: 0).

Linolénico (C18: 3). Soma das áreas do éster metílico e dos isómeros *trans* do éster metílico.

Eicosenóico (C20: 1).

Beénico (C22: 0).

Linhocérico (C24: 0).

A esqualeno não é tido em conta no cálculo da área total.

2.2. Para calcular a percentagem de *trans*-C18: 1, utilizar-se-á o pico correspondente aos ésteres metílicos deste ácido gordo. Para calcular a soma [*trans*-C18: 2 + *trans*-C18: 3], adicionar-se-ão todos os picos correspondentes aos isómeros *trans* desses dois ácidos gordos. Para calcular a área total, ter-se-ão em conta todos os picos mencionados em 2.1 (ver COI/T.20/Doc. n.º 17).

O cálculo da percentagem de cada ácido gordo será efectuado pela seguinte fórmula:

$$\% X = (\text{área } X \times 100) / (\text{área total})$$

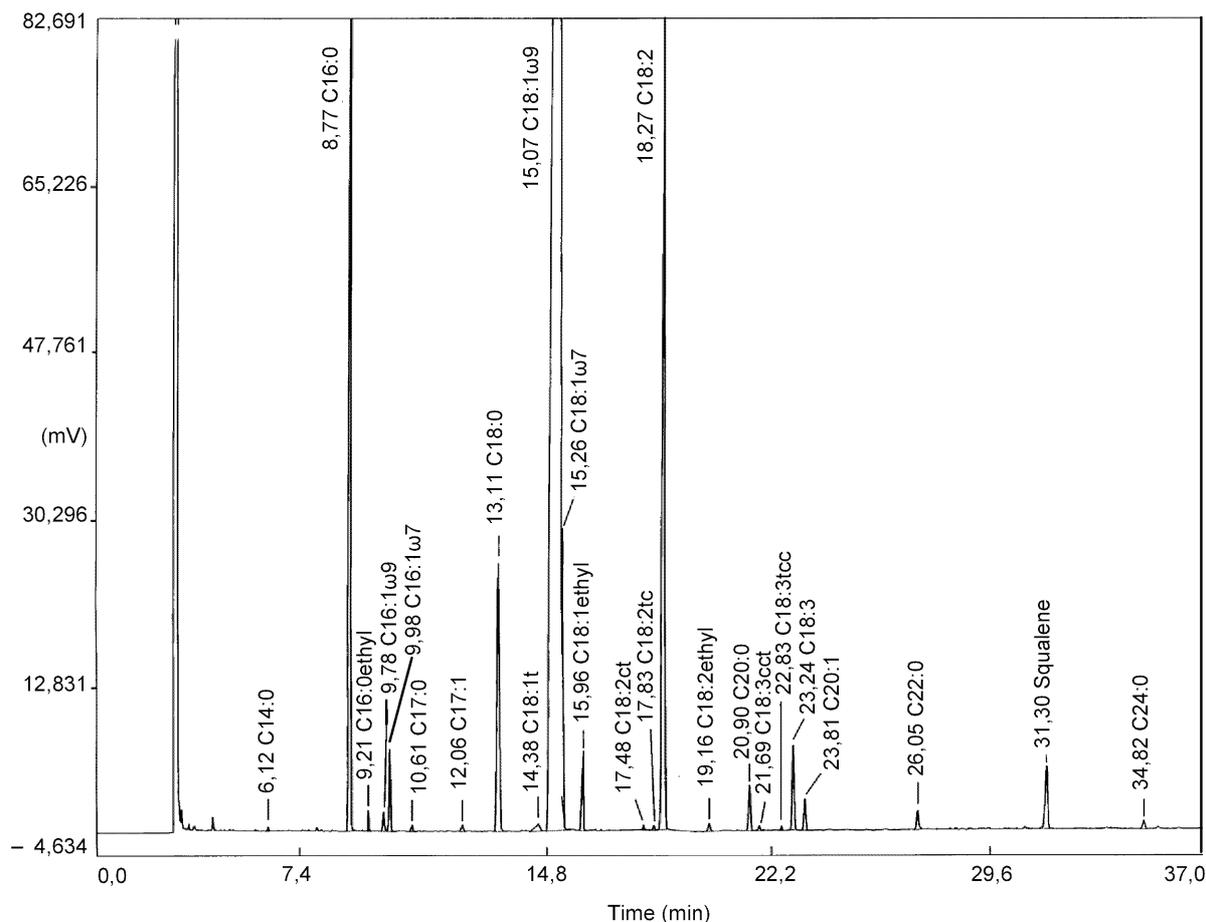


Figura 1: Perfil cromatográfico de um óleo de bagaço de azeitona, obtido pelo método de metilação a frio. Salvo indicação em contrário, os picos cromatográficos correspondem aos ésteres metílicos.»

4. O anexo XII é substituído pelo seguinte anexo:

«ANEXO XII

EXAME ORGANOLÉPTICO DOS AZEITES VIRGENS

1. OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

O presente método tem por objectivo estabelecer os critérios necessários à avaliação das características organolépticas dos azeites virgens, na acepção do ponto 1 do anexo do Regulamento 136/66/CEE, e descrever o processo de classificação a utilizar para o efeito.

O método descrito só é aplicável na classificação de azeites virgens em função da existência de um frutado e da intensidade dos defeitos, determinadas por um grupo de provadores seleccionados e formados e constituídos em júri em conformidade com o ponto 4.

2. GENERALIDADES

No respeitante ao vocabulário geral de base, à sala de provas, à metodologia geral e ao copo de prova dos azeites, são recomendadas as prescrições do Conselho Oleícola Internacional.

3. VOCABULÁRIO ESPECÍFICO

3.1. Atributos positivos

Frutado: conjunto das sensações olfactivas dependentes da variedade de azeitona e características dos azeites provenientes de frutos sãos e frescos, verdes ou maduros, por via directa ou retronasal.

Amargo: gosto característico dos azeites obtidos de azeitonas verdes ou em fase precoce de maturação.

Picante: sensação táctil de picadas, característica dos azeites produzidos no início da campanha, principalmente a partir de azeitonas ainda verdes.

3.2. Atributos negativos

Tulha: "flavour" característico dos azeites obtidos de azeitonas amontoadas num estado avançado de fermentação anaeróbia.

Mofo/húmido: "flavour" característico dos azeites obtidos de azeitonas atacadas por bolores e leveduras devido à armazenagem dos frutos durante vários dias em condições húmidas.

Borra: "flavour" característico dos azeites que permaneceram em contacto com as matérias decantadas nos depósitos e reservatórios.

Avinhado-avinagrado: "flavour" característico de certos azeites que lembra o vinho ou o vinagre. Deve-se, fundamentalmente, a um processo fermentativo das azeitonas, que leva à formação de ácido acético, acetato de etilo e etanol.

Metálico: "flavour" que lembra os metais. É característico dos azeites que permaneceram prolongadamente em contacto com superfícies metálicas durante os processos de trituração, malaxagem, prensagem ou armazenagem.

Ranço: "flavour" dos azeites que sofreram um processo de oxidação.

Cozido ou queimado: "flavour" característico dos azeites devido a um aquecimento excessivo e/ou prolongado 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.

Lubrificantes: "flavour" dos azeites que lembra o gasóleo, massas consistentes ou óleos minerais.

Água-ruça: "flavour" adquirido pelos azeites devido a contacto prolongado com as água-ruças.

Salmoura: "flavour" dos azeites obtidos de azeitonas conservadas em salmoura.

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.

Terra: "flavour" dos azeites obtidos de azeitonas colhidas com terra ou lamacentas e não lavadas.

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 atribuída à formação de 2,6-nonadienal.

4. JÚRI

O júri será nomeado pelo Estado-Membro e constituído por um chefe e oito a 12 provadores. Todavia, na campanha de 2001/2002, o número de provadores pode ser inferior a oito.

O chefe do júri terá recebido uma formação sólida e será um perito experiente nos diferentes tipos de azeite. O chefe será o responsável pelo júri, pela sua organização e funcionamento, pela preparação, codificação e apresentação das amostras aos provadores e pela recolha e tratamento estatístico dos dados.

O chefe do júri seleccionará os provadores e supervisionará a formação e a prestação dos mesmos, para que se mantenham num nível de aptidão adequado.

Os provadores para os exames organolépticos de azeites serão escolhidos e formados em função da sua capacidade de distinção de amostras similares, em conformidade com o guia do Conselho Oleícola Internacional para a selecção, formação e supervisão dos provadores qualificados de azeite virgem.

Os júris comprometer-se-ão a participar nos exames organolépticos previstos num plano nacional, comunitário ou internacional de controlo periódico e harmonização dos critérios de percepção. Devem, além disso, fornecer anualmente ao Estado-Membro em causa todos os elementos relativos à composição dos mesmos e ao número de exames efectuados como júri aprovado.

5. EXAME ORGANOLÉPTICO E MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO

5.1. Utilização da folha de perfil pelo provador

A folha de perfil a utilizar pelos provadores figura no apêndice A do presente método.

Cada provador membro do júri deve cheirar e, em seguida, provar ⁽¹⁾ o azeite examinado, contido no copo de prova, para analisar as percepções olfactivas, gustativas, tácteis e cinestésicas. Deve, a seguir, inscrever na folha de perfil a intensidade que julga corresponder a cada atributo negativo e positivo.

Se forem detectados atributos negativos não indicados na folha de perfil, devem ser mencionados na rubrica "outros", empregando o termo ou termos que os descrevam com mais precisão entre os definidos no ponto 3.2 do presente método.

5.2. Utilização dos dados pelo chefe do júri

O chefe do júri recolherá as folhas de perfil preenchidas pelos provadores e verificará as intensidades atribuídas. Se for detectada alguma anomalia, solicitará ao provador que reveja a folha de perfil respectiva e, se necessário, que repita o exame.

O chefe do júri pode introduzir os dados de cada provador num programa informático conforme com o método de cálculo estatístico da mediana constante do apêndice B. A introdução dos dados respeitantes a uma amostra será efectuada com base numa matriz de 10 colunas — correspondentes aos 10 atributos sensoriais — e n linhas — correspondentes aos n provadores do júri.

Se um atributo negativo for inscrito na rubrica "outros" por pelo menos 50 % dos membros do júri, o chefe do júri efectuará o cálculo da mediana desse atributo e procederá à classificação correspondente.

No caso das análises efectuadas no âmbito de verificações de conformidade com normas, ou de contra-análises, o chefe do júri providenciará para que o exame organoléptico do azeite seja efectuado em triplicado, com pelo menos um dia de intervalo. A mediana dos atributos será calculada a partir do conjunto dos dados das folhas de perfil dos três exames.

5.3. Classificação dos azeites

O azeite será classificado de acordo com as denominações seguintes, em função da mediana dos defeitos e da mediana do atributo "frutado". Entende-se por "mediana dos defeitos" a mediana do atributo negativo a que tenha sido atribuída a intensidade mais elevada. O valor do coeficiente de variação robusto para esse atributo negativo deve ser igual ou inferior a 20 %.

- a) *Azeite virgem extra*: mediana dos defeitos igual a 0 e mediana do frutado superior a 0;
- b) *Azeite virgem*: mediana dos defeitos superior a 0 e inferior ou igual a 2,5 e mediana do frutado superior a 0;
- c) *Azeite virgem corrente*: mediana dos defeitos superior a 2,5 e inferior ou igual a 6,0; ou mediana dos defeitos inferior ou igual a 2,5 e mediana do frutado igual a 0;
- d) *Azeite virgem lampante*: mediana dos defeitos superior a 6,0.

A partir de 1 de Novembro de 2003 as categorias c) e d) são, porém, substituídas pela seguinte categoria:

- c) *Azeite lampante*: mediana dos defeitos superior a 2,5; ou mediana dos defeitos inferior ou igual a 2,5 e mediana do frutado igual a 0.

5.4. Casos especiais

Se a mediana de um atributo positivo diverso do frutado for superior a 5,0, o chefe do júri assiná-lo-á no certificado de análise do azeite.

⁽¹⁾ Poderá não provar se detectar certos atributos negativos extremamente intensos, caso em que anotar essa circunstância excepcional na folha de perfil.

APÊNDICE A

Folha de perfil
(para o provador)

PERCEPÇÃO DOS DEFEITOS	INTENSIDADE
Tulha	
Mofo/húmido	
Avinhado/avinagrado	
Borra	
Metálico	
Ranço	
Outros (especificar)	
PERCEPÇÃO DOS ATRIBUTOS POSITIVOS	
Frutado	
Amargo	
Picante	

Nome do provadorCódigo da amostraData

APÊNDICE B

MÉTODO DE CÁLCULO DA MEDIANA E DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA

Mediana

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

A mediana é 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 inferior ou igual a 0,5 e, simultaneamente, de a probabilidade (P) de os valores da distribuição (X) serem inferiores ou iguais a X_m ser superior ou igual a 0,5. Outra definição considera 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

$$S = \frac{1,25 \text{ IQR}}{1,35 \sqrt{N}}$$

Para se obter uma estimativa fiável da variabilidade em redor da mediana, torna-se necessário estimar o desvio-padrão robusto de Stuart e Kendall. A fórmula do desvio-padrão assintótico S depende de N e de IQR. N é o número de observações e IQR é o intervalo interquartilico, isto é, a estimativa robusta da variabilidade dos dados considerados (o intervalo interquartilico encerra exactamente 50 % dos casos de uma distribuição de probabilidade). O cálculo do intervalo interquartilico efectua-se determinando a dimensão do desvio 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 inferior ou igual a um determinado centésimo e, simultaneamente, de a probabilidade (P) de os valores da distribuição serem inferiores ou iguais a X_{pc} ser superior ou igual a esse centésimo. O centésimo indica a fracção considerada da distribuição. No caso da mediana, essa fracção é de 50/100.

$$\text{Percentil} = [P (X < X_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge P (X \leq X_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Por outras palavras, o percentil é o valor de distribuição correspondente a uma área determinada, traçada a partir da 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.

Coefficiente de variação percentual robusto

$$\text{CVR} = \frac{S}{Me} 100$$

O CVR representa um número puro, adimensional, que indica a percentagem de variabilidade da série de números analisada relativamente ao valor Me da mediana. Por esse motivo, este coeficiente é muito útil para verificar a fiabilidade dos membros do júri.

Intervalos de confiança a 95 % da mediana

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

$$\text{I.C. Superior} = Me + (c.S)$$

$$\text{I.C. Inferior} = Me - (c.S)$$

em que, no caso do intervalo de confiança de 0,95, c é igual a 1,96.

A classificação será efectuada por comparação dos valores da mediana com os intervalos de referência determinados no ponto 5.3 do método. O programa informático permite visualizar a classificação num quadro de dados estatísticos ou num gráfico.»

5. É suprimido o anexo XIV.
6. É aditado um anexo XIX com o seguinte texto:

«ANEXO XIX

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁLCOOIS ALIFÁTICOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA EM COLUNA CAPILAR**1. OBJECTIVO**

O método descreve um processo de determinação dos teores de álcoois alifáticos, individuais e totais, das matérias gordas.

2. PRINCÍPIO

Saponificação da matéria gorda, adicionada de 1-icosanol como padrão interno, com uma solução etanólica de hidróxido de potássio; extracção do insaponificável com éter etílico. Separação da fracção alcoólica, do extracto insaponificável, por cromatografia em camada fina de sílica-gel básico; transformação dos álcoois separados no sílica-gel em éteres trimetilsilílicos e análise destes por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar.

3. APARELHOS E UTENSÍLIOS

- 3.1. Balão de 250 ml de fundo redondo, equipado com um refrigerante de refluxo com juntas esmeriladas.
- 3.2. Ampola de decantação de 500 ml.
- 3.3. Balões de 250 ml de fundo redondo.
- 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 366 nm ou 254 nm.
- 3.6. Microseringas de 100 µl e 500 µl.
- 3.7. Cadinho filtrante, com filtro de porosidade G3 (poros de 15 µm a 40 µm), cerca de 2 cm de diâmetro e cerca de 5 cm de altura, próprio para filtração sob vazio, com junta esmerilada macho 12/21.
- 3.8. *Kitasato* de 50 ml com junta esmerilada fêmea 12/21, adaptável ao cadinho filtrante (3.7).
- 3.9. Tubo de fundo cónico, de 10 ml, com rolha hermética.
- 3.10. Cromatógrafo de fase gasosa adequado para colunas capilares, com sistema de fraccionamento, constituído por:
 - 3.10.1. Bloco (forno) termostaticado para a coluna, que permita manter a temperatura desejada com uma precisão de cerca de 1 °C.
 - 3.10.2. Câmara de injeção de temperatura regulável, com elemento vaporizador de vidro silanizado.
 - 3.10.3. Detector de ionização de chama e conversor-amplificador.
 - 3.10.4. Registador-integrador próprio para funcionar com o conversor-amplificador, com tempo de resposta não superior a 1 s e velocidade do papel variável.
- 3.11. Coluna capilar de vidro ou de sílica fundida, com 20 m a 30 m de comprimento e 0,25 mm a 0,32 mm de diâmetro interno, revestida interiormente com um filme líquido uniforme de SE-52 ou SE-54 ou equivalente, de espessura compreendida entre 0,10 µm e 0,30 µm.
- 3.12. Microseringa de 10 µl para cromatografia em fase gasosa, com agulha cementada.
- 3.13. Balança de precisão com 1 mg de sensibilidade (leituras em décimas de miligrama).

4. REAGENTES

- 4.1. Solução etanólica aproximadamente 2 N de hidróxido de potássio: dissolver, com arrefecimento, 130 g de hidróxido de potássio (pureza mínima: 85 %) em 200 ml de água destilada; completar o volume até um litro com etanol. A solução conserva-se em garrafas de vidro escuro bem fechadas.
- 4.2. Éter etílico puro, *pro analyse*.
- 4.3. Sulfato de sódio anidro puro, *pro analyse*.

- 4.4. Placas de vidro revestidas de sílica-gel, sem indicador de fluorescência, com 0,25 mm de espessura (disponíveis no comércio prontas a utilizar).
- 4.5. Solução etanólica 0,2 N de hidróxido de potássio: dissolver 13 g de hidróxido de potássio em 20 ml de água destilada; completar o volume até um litro com etanol.
- 4.6. Benzeno para cromatografia (ver 5.2.2).
- 4.7. Acetona para cromatografia (ver 5.2.2).
- 4.8. Hexano para cromatografia (ver 5.2.2).
- 4.9. Éter etílico para cromatografia (ver 5.2.2).
- 4.10. Clorofórmio para cromatografia.
- 4.11. Solução de referência para a cromatografia em camada fina: solução a 0,5 % de colesterol ou fitosterol em clorofórmio.
- 4.12. Solução etanólica a 0,2 % de 2',7'-diclorofluoresceína. Adicionar algumas gotas da solução alcoólica 2 N de hidróxido de potássio para tornar a solução ligeiramente básica.
- 4.13. Piridina anidra para cromatografia.
- 4.14. Hexametildissilazano.
- 4.15. Trimetilclorossilano.
- 4.16. Solução-padrão de éteres trimetilsilílicos dos álcoois alifáticos C₂₀ a C₂₈. A preparar, a partir de misturas de álcoois puros, no momento da utilização.
- 4.17. Solução a 0,1 % (m/v) de 1-eicosanol em clorofórmio (padrão interno).
- 4.18. Gás vector: hidrogénio ou hélio puros, para cromatografia em fase gasosa.
- 4.19. Gás auxiliar: azoto puro, para cromatografia em fase gasosa.

5. TÉCNICA

5.1. Preparação do insaponificável

- 5.1.1. Introduzir no balão de 250 ml de fundo redondo, com a microsseringa de 500 µl, um volume da solução a 0,1 % de 1-eicosanol em clorofórmio (4.17) que contenha uma quantidade de 1-eicosanol correspondente a cerca de 10 % do teor de álcoois alifáticos da alíquota da amostra a tomar para a determinação. Por exemplo, para uma toma de 5 g de amostra, juntar 250 µl da solução a 0,1 % de 1-eicosanol, se se tratar de azeite, ou 1 500 µl, se se tratar de óleo de bagaço de azeitona.

Evaporar em corrente de azoto até à secura e, em seguida, pesar quantitativamente uma toma de 5 g de amostra seca e filtrada para o mesmo balão.

- 5.1.2. Juntar 50 ml da solução etanólica 2 N de hidróxido de potássio e adaptar o refrigerante de refluxo; aquecer em banho-maria até ebulição ligeira, mantendo sob agitação contínua até se produzir a saponificação (a solução fica límpida). Continuar o aquecimento durante 20 minutos, juntar 50 ml de água destilada (pela parte superior do refrigerante), retirar o refrigerante 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, utilizando várias porções de água destilada, num total de aproximadamente 50 ml. Juntar cerca de 80 ml de éter etílico, agitar energeticamente durante cerca de 30 s e deixar que a separação se faça (nota 1).

Separar a fase aquosa (inferior), recolhendo-a noutra ampola de decantação. Efectuar mais duas extracções da fase aquosa, da mesma forma, utilizando de cada vez 60 ml a 70 ml de éter etílico.

Nota 1: As eventuais emulsões podem ser eliminadas juntando, com um esguicho, uma pequena quantidade de álcool etílico ou metílico.

- 5.1.4. Reunir os extractos etéreos numa ampola de decantação e lavar com água destilada (50 ml de cada vez), até reacção neutra da água de lavagem.

Eliminar a água de lavagem, secar com sulfato de sódio anidro e filtrar para um balão de 250 ml previamente tarado, lavando a ampola e o filtro com pequenas quantidades de éter etílico e recolhendo o líquido de lavagem no balão.

- 5.1.5. Destilar o éter até restar apenas uma pequena quantidade e, em seguida, levar à secura sob vazio ligeiro ou em corrente de azoto; completar a secagem em estufa a 100 °C durante cerca de 15 minutos e pesar após arrefecimento em exsiccador.

5.2. Separação da fracção alcoólica

- 5.2.1. Preparação das placas básicas: imergir completamente as placas de sílica-gel (4.4), durante 10 s, na solução etanólica 0,2 N de hidróxido de potássio (4.5); retirar as placas e deixá-las secar bem, debaixo de um exaustor, durante duas horas; em seguida, colocar as placas na estufa, a 100 °C, durante uma hora.

Retirar as placas da estufa e conservá-las num exsicador com cloreto de cálcio até ao momento da utilização (devem ser utilizadas no prazo de 15 dias).

Nota 2: A utilização de placas de sílica-gel básico para a separação da fracção alcoólica torna desnecessário o tratamento do insaponificável com alumina. Deste modo, todos os compostos ácidos (ácidos gordos e outros) ficam retidos na linha de partida. As bandas dos álcoois alifáticos e dos álcoois terpénicos ficam nitidamente separadas da banda dos esteróis.

- 5.2.2. Introduzir na cuba de revelação uma mistura 65/35 (v/v) de hexano e éter etílico até cerca de 1 cm de altura (*).

Fechar a cuba com uma tampa adequada e deixar em repouso durante, pelo menos, meia hora, para que se estabeleça o equilíbrio líquido-vapor. Podem fixar-se nas superfícies internas da cuba folhas de papel de filtro mergulhadas no eluente; esta precaução permite reduzir o tempo de revelação em cerca de um terço e obter uma eluição mais uniforme dos componentes.

Nota 3: Para que as condições de eluição sejam perfeitamente reprodutíveis, a mistura deve ser mudada em cada ensaio.

- 5.2.3. Preparar uma solução aproximadamente 5 % do insaponificável (5.1.5) em clorofórmio e, com a microsseringa de 100 µl, depositar na placa cromatográfica (5.2.1), a aproximadamente 2 cm do bordo, 0,3 ml dessa solução, numa linha contínua, o mais fina e uniforme possível. No alinhamento da linha de partida depositar, numa das extremidades da placa, 2 µl a 3 µl da solução de referência de álcoois alifáticos (4.11), para identificação da banda dos álcoois alifáticos no final da revelação.

- 5.2.4. Colocar a placa na cuba de revelação, preparada como descrito em 5.2.2. A temperatura ambiente deve ser mantida entre 15 °C e 20 °C. Tapar imediatamente a cuba e deixar eluir até que a frente de solvente chegue a cerca de 1 cm do bordo superior da placa.

Retirar a placa da cuba de revelação e evaporar o solvente numa corrente de ar quente ou secar a placa debaixo de um exaustor durante algum tempo.

- 5.2.5. Pulverizar a placa, ligeira e uniformemente, com a solução de 2',7'-diclorofluoresceína e observar à luz ultravioleta. Identificar a banda dos álcoois alifáticos pelo alinhamento com a banda obtida com a solução de referência; com um lápis preto, delimitar o conjunto constituído pela banda dos álcoois alifáticos e pela banda imediatamente superior, correspondente aos álcoois terpénicos.

Nota 4: A banda dos álcoois alifáticos e a banda dos álcoois terpénicos são agrupadas tendo em vista uma possível migração de alguns álcoois alifáticos para a banda dos álcoois terpénicos.

- 5.2.6. Raspar com uma espátula metálica o sílica-gel da zona delimitada. Introduzir o material retirado, finamente triturado, no cadinho filtrante (3.7), juntar 10 ml de clorofórmio quente, misturar cuidadosamente com a espátula metálica e filtrar sob vácuo; recolher o filtrado no kitasato (3.8) ligado ao cadinho filtrante.

Lavar o resíduo do cadinho filtrante, por três vezes, com éter etílico (cerca de 10 ml de cada vez) e recolher de novo o filtrado no kitasato adaptado ao cadinho. Evaporar o filtrado até obter um volume de 4 ml a 5 ml, transferir a solução residual para o tubo de 10 ml (3.9), previamente tarado, e levar à secura por aquecimento suave sob ligeira corrente de azoto; juntar algumas gotas de acetona, voltar a levar à secura e colocar durante cerca de 10 minutos na estufa, a 105 °C; deixar arrefecer em exsicador e pesar.

O resíduo contido no tubo é constituído pela fracção alcoólica.

5.3. Preparação dos éteres trimetilsilílicos

- 5.3.1. No tubo que contém a fracção alcoólica, juntar o reagente de sililação, constituído por uma mistura 9 + 3 + 1 (v/v/v) de piridina, hexametildissilazano e trimetilclorossilano (nota 5), na proporção de 50 µl por miligrama de álcoois alifáticos, evitando qualquer absorção de humidade (nota 6).

Nota 5: Existem no comércio soluções prontas a utilizar; encontram-se também outros reagentes silanizantes, como o bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + 1 % de trimetilclorossilano, a diluir num volume igual de piridina anidra.

Nota 6: 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 deve ser repetida.

- 5.3.2. Tapar o tubo e agitar cuidadosamente (sem virar) até à solubilização completa dos álcoois alifáticos. Deixar repousar durante, pelo menos, 15 minutos, à temperatura ambiente, e depois centrifugar durante alguns minutos; a solução límpida está pronta para ser analisada por cromatografia em fase gasosa.

(*) Em determinados casos, pode ser necessário utilizar uma mistura 95/5 (v/v) de benzeno e acetona para obter uma boa separação de bandas.

5.4. Análise por cromatografia em fase gasosa

5.4.1. Operações preliminares, condicionamento da coluna

5.4.1.1. Instalar a coluna no cromatógrafo de fase gasosa, ligando a extremidade de entrada ao injector, ligado ao sistema de fraccionamento, e a extremidade da saída ao detector. Efectuar uma verificação geral do conjunto de cromatografia em fase gasosa (hermeticidade dos circuitos gasosos, eficácia do detector, eficácia do sistema de fraccionamento e do sistema de registo, etc.).

5.4.1.2. Se a coluna for utilizada pela primeira vez, é aconselhável proceder ao seu condicionamento. Para o efeito, passar um ligeiro fluxo gasoso pela coluna. Ligar, em seguida, o conjunto de cromatografia em fase gasosa e aquecer gradualmente, até atingir uma temperatura pelo menos 20 °C superior à temperatura de trabalho (nota 7). Manter essa temperatura durante, pelo menos, duas horas; em seguida, pôr o conjunto nas condições de funcionamento (regulação do fluxo gasoso e da relação de fraccionamento, ignição da chama, ligação ao registador electrónico, regulação da temperatura do forno da coluna, do detector e do injector, etc.) e registar o sinal com uma sensibilidade pelo menos dupla da prevista para a realização da análise. O traçado da linha de base obtida deve ser linear, sem qualquer pico ou desvio. Um desvio rectilíneo negativo indica hermeticidade imperfeita das ligações da coluna; se for positivo, indica condicionamento insuficiente da mesma.

Nota 7: A temperatura de condicionamento deve ser sempre pelo menos 20 °C inferior à temperatura máxima prevista para a fase líquida utilizada.

5.4.2. Escolha das condições de funcionamento

5.4.2.1. Seguem-se condições indicativas de funcionamento:

- temperatura da coluna: inicialmente, isotérmica durante 8 minutos a 180 °C; depois, programada a 5 °C/minuto até 260 °C; em seguida, 15 minutos a 260 °C,
- temperatura do vaporizador: 280 °C,
- temperatura do detector: 290 °C,
- velocidade linear do gás vector: hélio, 20 cm/s a 35 cm/s; hidrogénio, 30 cm/s a 50 cm/s,
- relação de fraccionamento (*splitting*): de 1/50 a 1/100,
- sensibilidade instrumental: 4 a 16 vezes a atenuação mínima,
- sensibilidade de registo: 1 a 2 mV (escala completa),
- velocidade do papel: 30 cm/hora a 60 cm/hora,
- quantidade de substância injectada: 0,5 µl a 1 µl de solução de TMSE.

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

- tempo de retenção do álcool C₂₆: 18 minutos ± 5 minutos,
- pico do álcool C₂₂: 80 % ± 20 % da escala completa, no caso do azeite, e 40 % ± 20 % da escala completa no caso dos óleos de sementes.

5.4.2.2. Para verificar as condições referidas, efectuar várias injeções da mistura-padrão de TMSE dos álcoois e ajustar as condições de funcionamento até obter os melhores resultados.

5.4.2.3. Os parâmetros de integração dos picos devem ser fixados de modo a obter uma avaliação correcta das áreas dos picos considerados.

5.4.3. Execução da análise

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 µl a 1 µl da solução da amostra; puxar um pouco mais o êmbolo da seringa, para que a agulha fique vazia. Introduzir a agulha através da membrana da câmara de injeção e, transcorridos 1 s a 2 s, injectar rapidamente; passados cerca de 5 s, retirar a agulha devagar.

5.4.3.2. Efectuar o registo até à eluição completa dos TMSE de álcoois alifáticos presentes. A linha de base deve continuar a corresponder às condições exigidas (5.4.1.2).

5.4.4. Identificação dos picos

A identificação de cada pico é efectuada com base nos tempos de retenção e por comparação com a mistura-padrão de TMSE de álcoois alifáticos, analisada nas mesmas condições.

A figura 1 mostra um cromatograma da fracção alcoólica de um azeite virgem.

5.4.5. Avaliação quantitativa

5.4.5.1. Efectuar, com o integrador, o cálculo da área dos picos do 1-eicosanol e dos álcoois alifáticos C_{22} , C_{24} , C_{26} e C_{28} .

5.4.5.2. O teor de cada álcool alifático, em mg/1 000 g de matéria gorda, é calculado do seguinte modo:

$$\text{Álcool } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

em que:

A_x = área do pico do álcool x

A_s = área do pico do 1-eicosanol

m_s = massa de 1-eicosanol adicionada, em miligramas

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

6. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

O teor de cada álcool alifático é expresso em mg/1 000 g de matéria gorda e a sua soma como álcoois alifáticos totais.

APÊNDICE

Determinação da velocidade linear do gás

No cromatógrafo de fase gasosa, regulado para condições de funcionamento normais, injectar 1 µl a 3 µl de metano (ou propano) e cronometrar o tempo gasto pelo gás para percorrer a coluna, entre o momento da injeção e o da saída do pico (t_M).

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

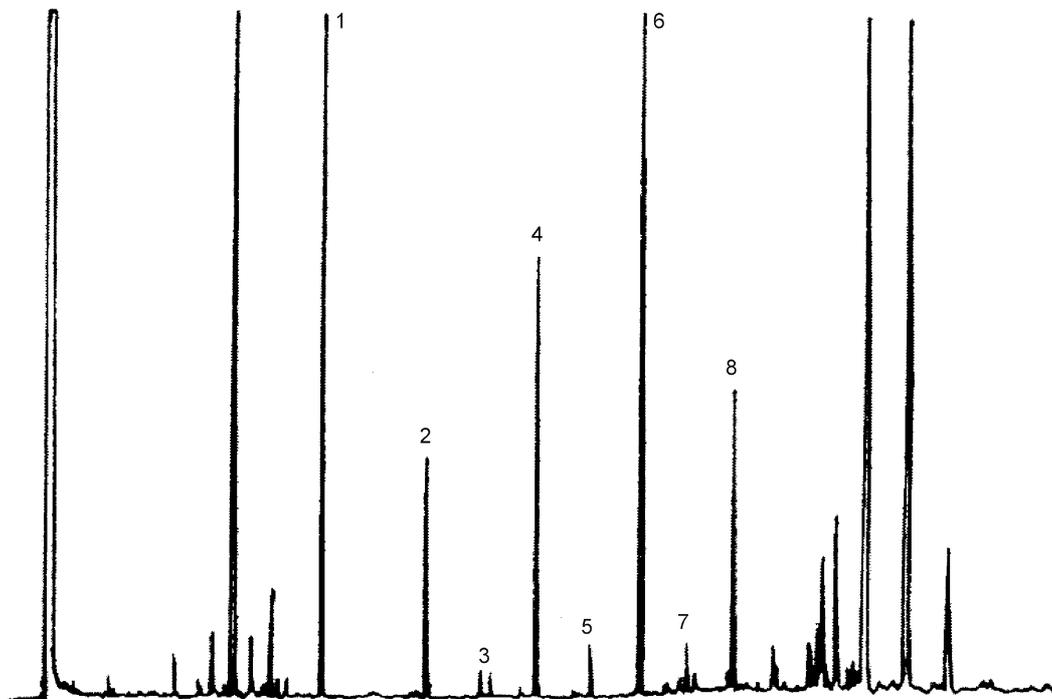


Figura 1: Cromatograma da fracção alcoólica de um azeite virgem

1 = Eicosanol	5 = Pentacosanol
2 = Docosanol	6 = Hexacosanol
3 = Tricosanol	7 = Heptacosanol
4 = Tetracosanol	8 = Octacosanol