377R1058

Nº L 128/6 Jornal Oficial das Comunidades Europeias 24. 5. 77

REGULAMENTO (CEE) Nº 1058/77 DA COMISSÃO

de 18 de Maio de 1977

relativo às características dos azeites e de certos produtos que contêm azeite e que altera a nomenclatura da pauta aduaneira comum no que diz respeito ao azeite

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta o Regulamento nº 136/66/CEE do Conselho, de 22 de Setembro de 1966, que estabelece a organização comum de mercado no sector das matérias gordas (1), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 1707/73 (2), e, nomeadamente, o nº 4 do seu artigo 13º e o nº 3 do seu artigo 18º,

Tendo em conta o Regulamento nº 162/66/CEE do Conselho, de 27 de Outubro de 1966, relativo às trocas de matérias gordas entre a Comunidade e a Grécia (3), e, nomeadamente, os nºs 4 e 9 do seu artigo 3º,

Tendo em conta o Regulamento (CEE) nº 443/72 do Conselho, de 29 de Fevereiro de 1972, relativo aos direitos niveladores aplicáveis ao azeite que foi submetido a um processo de refinação, bem como a certos produtos que contêm azeite (4) e, nomeadamente, o seu artigo 8º,

Considerando que, actualmente, todos os azeites virgens estão incluídos na subposição 15.07 A II a) da pauta aduaneira comum; que, em consequência, está fixado para esses produtos um único direito nivelador; que, a fim de permitir que o direito nivelador sobre a importação atinja o seu objectivo, convém fixá-lo de acordo com os diferentes tipos de azeite virgem e, com este fim, distinguir os azeites de acordo com as suas características fisioquímicas; que, em consequência, é oportuno adaptar a nomenclatura da pauta aduaneira comum;

Considerando que a nomenclatura aduaneira resultante da aplicação do Regulamento nº 136/66/CEE é retomada na pauta aduaneira comum em anexo ao Regulamento (CEE) nº 950/68 (5), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 874/77 (6);

Considerando que, para assegurar o funcionamento correcto do sistema de direitos niveladores aplicáveis à importação de bagaços de azeitona, convém prever um método único para a determinação do teor em óleo desse produtos;

Considerando que o Regulamento (CEE) nº 618/72 da Comissão, de 29 de Março de 1972, relativo às características dos azeites bem como de certos produtos que contêm azeite (7), foi alterado várias vezes, nomeadamente pelo Regulamento (CEE) nº 3366/75 (8); que, tendo em conta as novas alterações a fazer ao referido regulamento, considerou-se oportuno revogá-lo e retomar num novo regulamento o conjunto das disposições;

Considerando que as medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Gestão das Matérias Gordas,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1º

1. Só se considera como azeite, na acepção da subposição 15.07 A da pauta aduaneira comum, o óleo proveniente exclusivamente do tratamento das azeitonas, com exclusão do azeite reesterificado e de qualquer mistura de azeite com óleos de outra natureza.

A verificação da presença de azeite reesterificado ou de óleos de outra natureza efectua-se através dos métodos retomados respectivamente nos Anexos VII e VIII.

2. Pertencem às subposições 15.07 A I a), 15.07 A I b) e 15.07 A I c) da pauta aduaneira comum os óleos que têm as características indicadas nos pontos 1, 2 e 3 do Anexo I. Para a determinação das características acima referidas, utilizam-se os métodos descritos nos Anexos IV, V e VI.

3. Pertencem à subposição 15.07 A II a) da pauta aduaneira comum os óleos que têm as características retomadas no ponto 4 do Anexo I.

4. Não pertencem à subposição 15.17 A da pauta aduaneira comum os produtos da subposição 15.17 que tenham as características indicadas no Anexo II.

Artigo 2º

1. O teor em azeite dos bagaços e outros resíduos da extracção de azeite da subposição 23.04 A é determinada em conformidade com o método que consta do Anexo IX.

(1) JO nº 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.
(2) JO nº L 175 de 29. 6. 1975, p. 5.
(3) JO nº 197 de 29. 10. 1966, p. 3393/66.
(4) JO nº L 54 de 3. 3. 1972, p. 3.
(5) JO nº L 172 de 22. 7. 1968, p. 1.
(6) JO nº L 106 de 29. 4. 1977, p. 20.
(7) JO nº L 78 de 31. 3. 1972, p. 5.
(8) JO nº L 333 de 30. 12. 1975, p. 13.

2. O teor em azeite referido no nº 1 exprime-se em percentagem do seu peso relacionado com o da matéria seca.

Artigo 3º

A pauta aduaneira comum em anexo ao Regulamento (CEE) nº 950/68 passa a ter a seguinte redacção:

1. Os termos «do nº 15.07» da nota complementar 1 do capítulo 15 são substituídos por «da subposição 15.07 D».
2. As notas complementares 2, 3 e 4 do capítulo 15 são substituídas pelas notas complementares 2, 3 e 4 que constam do Anexo III do presente regulamento.
3. A subposição 15.07 A passa a ter a seguinte redacção:

Número da pauta	Descrição	Taxa dos direitos	
		autónomos % ou direito nivelador (P)	convencionais %
1	2	3	4
15.07	A. Azeite:		
	I. Não tratado:		
	a) Azeite virgem	20 (P)	—
	b) Azeite virgem iluminante	20 (P)	—
	c) Outro	20 (P)	—
	II. Outro:		
	a) Obtido por tratamento dos óleos das subposições 15.07 A I a) ou 15.07 A I b), mesmo traçado com azeite virgem	20 (P)	—
	b) Não especificado	20 (P)	—

Artigo 4º

Em todos os actos comunitários em que se faz referência às subposições 15.07 A II ou 15.07 A I a) e b) da pauta aduaneira comum, essas referências devem considerar-se como dizendo respeito, de acordo com as características do produto em causa, respectivamente às subposições 15.07 A I a), b) e c) e 15.07 A II a) e b) da pauta aduaneira comum.

Artigo 5º

É revogado o Regulamento (CEE) nº 618/72 da Comissão.

Artigo 6º

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

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

Feito em Bruxelas em 18 de Maio de 1977.

Pela Comissão

Finn GUNDELACH

Vice-Presidente

ANEXOS

Sumário

		Páginas
ANEXO I:	Características dos azeites	124
ANEXO II:	Produtos da subposição 15.17 A	125
ANEXO III:	Notas complementares 2, 3 e 4 do capítulo 15 da pauta aduaneira comum	125
ANEXO IV:	I. Tratamento da amostra pelo alumínio activado	127
	II. Neutralização e descoloração do azeite em laboratório	127
ANEXO V:	Pesquisa da presença de óleo de bagaço de azeitona nos azeites	129
	A. Método chamado «de Bellier»	129
	B. Método chamado «de Vizern modificado»	129
ANEXO VI:	Pesquisa dos sabões pela evidenciação da alcalinidade	131
ANEXO VII:	Pesquisa da presença dos óleos reesterificados	131
ANEXO VIII:	Pesquisa da presença de outros óleos no azeite: análise da fracção esterólica dos corpos gordos	135
ANEXO IX:	Teor em óleo de bagaço de azeitona	139

ANEXO I

CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES

1. Considera-se como azeite virgem, na acepção da subposição 15.07 A I a) da pauta aduaneira comum, o azeite natural obtido unicamente por processos mecânicos, incluindo a pressão, com exclusão de qualquer mistura com azeite obtido de forma diferente, e que apresente as seguintes características:

   a) Um teor em ácidos gordos livres, expresso em ácido oleico, não superior a 3 %;

   b) Um coeficiente de extinção K_{270} (absorvência sob uma espessura de 1 cm de uma solução a 1 g de óleo para 100 ml no isooctano (2.2.4 trimetilpentano) para o comprimento de onda de 270 nm) não superior a 0,25 e, após tratamento da amostra de óleo sobre alumina activada não superior a 0,11;

   c) Uma variação do coeficiente de extinção próxima de 270 nm não superior a 0,01.

      Esta variação é definida por:

      $$\Delta K = K_m - 0{,}5 (K_{m-4} + K_{m+4})$$

      K_m designa o coeficiente de extinção ao comprimento de onda do máximo da curva de absorção próxima de 270 nm,

      K_{m-4} e K_{m+4} designam os coeficientes de extinção aos comprimentos de onda inferior e superior em 4 nm ao de K_m;

   d) Reacções de Bellier e de Vizern modificada negativas, efectuadas em conformidade com os métodos retomados nas partes A e B do Anexo V;

   e) Uma pesquisa de sabões negativa, efectuada em conformidade com o método descrito no Anexo VI.

2. Considera-se como azeite virgem iluminante, na acepção da subposição 15.07 A I b) da pauta aduaneira comum, seja qual for a sua acidez, o azeite que apresenta as seguintes características:

   a) Um coeficiente de extinção K_{270} superior a 0,25 e, após tratamento da amostra sobre alumina activada não superior a 0,11.

      Óleos que tenham um teor em ácidos gordos livres, expresso em ácido oleico, superior a 3 % podem ter, após passagem sobre alumina activada, um coeficiente de extinção K_{270} superior a 0,11. Nesse caso, após neutralização e descoloração efectuadas em laboratório, em conformidade com o método retomado no Anexo IV, devem ter as seguintes características:

      — um coeficiente de extinção K_{270} não superior a 1,10,

      — uma variação do coeficiente de extinção próximo de 270 nm superior a 0,01 e não superior a 0,16;

   b) Reacções de Bellier e de Vizern modificada negativas, efectuadas em conformidade com os métodos retomados nas partes A e B do Anexo V;

   c) Um pesquisa dos sabões negativa, efectuada em conformidade com o método descrito no Anexo VI.

3. Consideram-se como pertencendo à subposição 15.07 A I c) da pauta aduaneira comum os óleos, nomeadamente os óleos de «bagaço de azeitona», que apresentem as seguintes características:

   a) Um teor em ácidos gordos livres, expresso em ácido oleico, superior a 3 %;

   b) Reacções de Bellier e de Vizern modificada positivas, efectuadas em conformidade com os métodos retomados nas partes A e B do Anexo V;

   c) Uma pesquisa dos sabões negativa, efectuada em conformidade com o método retomado no Anexo VI.

4. Considera-se como pertencente à subposição 15.07 A II a) da pauta aduaneira comum o azeite obtido por tratamento dos óleos das subposições 15.07 A I a) e 15.07 A I b), mesmo traçado com azeite virgem, que apresente as seguintes características:

   a) Um teor em ácidos gordos livres, expresso em ácido oleico, de 3 % no máximo;

   b) Uma pesquisa dos sabões positiva, efectuada em conformidade com o método descrito no Anexo VI,

ou:

— um coeficiente de extinção K_{270} superior a 0,25 e não superior a 1,10 e, após tratamento da amostra de óleo sobre alumina activada, superior a 0,11,

e

— uma variação do coeficiente de extinção próxima de 270 nm superior a 0,01 e não superior a 0,16.

Esta variação é definida por:

$$\Delta K = K_m - 0{,}5 (K_{m-4} + K_{m+4})$$

K_m designa o coeficiente de extinção ao comprimento de onda do máximo da curva de absorção próxima de 270 nm,

K_{m-4} e K_{m+4} designam os coeficientes de extinção aos comprimentos de onda inferior e superior de 4 nm ao de K_m;

c) Reacções de Bellier e de Vizern modificada negativas, efectuadas em conformidade com os métodos retomados nas partes A e B do Anexo V.

ANEXO II

PRODUTOS DA SUBPOSIÇÃO 15.17 A

São excluídos da subposição 15.17 A:

a) Os resíduos provenientes do tratamento das matérias gordas contendo óleo cujo índice de iodo, determinado pelo método de Wijs sem catalisador, seja inferior a 70 ou superior a 100;

b) Os resíduos provenientes do tratamento das matérias gordas contendo óleo cujo índice de iodo esteja compreendido em 70 e 100, mas cuja superfície do vértice, representando o volume de retenção do beta-sitosterol, determinada de harmonia com as disposições indicadas no Anexo VIII, seja menos de 93 % da superfície total dos vértices dos esteróis.

ANEXO III

NOTAS COMPLEMENTARES 2, 3 E 4 DO CAPÍTULO 15 DA PAUTA ADUANEIRA COMUM

2. A. Só se considera como azeite, na acepção da subposição 15.07 A, o óleo proveniente exclusivamente do tratamento das azeitonas, com exclusão do azeite reesterificado e de qualquer mistura de azeite com óleos de outra natureza.

B. Consideram-se como azeites não tratados os óleos definidos nos pontos I, II e III seguintes.

I. Só se considera como azeite virgem, na acepção da subposição 15.07 A I a), o azeite natural obtido exclusivamente por processos mecânicos, incluindo a pressão, com exclusão de qualquer mistura com azeite obtido de forma diferente, e que apresente as seguintes características:

a) Um teor em ácidos gordos livres, expresso em ácido oleico, de 3 % no máximo;

b) Um coeficiente de extinção K_{270} (absorvência sob uma espessura de 1 cm de uma solução a 1 g de óleo para 100 ml no isooctano (2.2.4 trimetilpentano) para o comprimento de onda de 270 nanómetros) não superior a 0,25 e, após tratamento da amostra de óleo sobre alumina activada, não superior a 0,11;

c) Uma variação do coeficiente de extinção próxima de 270 nanómetros não superior a 0,01.

Esta variação é definida por:

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

K_m designa o coeficiente de extinção ao comprimento de onda do máximo da curva de absorção próxima de 270 nanómetros,

K_{m-4} e K_{m+4} designam os coeficientes de extinção aos comprimentos de onda inferior e superior em 4 nanómetros ao de K_m;

d) Reacções de Bellier e de Vizern modificada negativas;

e) Uma pesquisa de sabões negativa.

II. Considera-se como azeite virgem iluminante, na acepção da subposição 15.07 A I b), seja qual for a sua acidez, o azeite que apresente as características seguintes:

a) Um coeficiente de extinção K_{270} superior a 0,25 e, após tratamento da amostra sobre alumínio activado, não superior a 0,11. Óleos que tenham um teor em ácidos gordos livres, expresso em ácido oleico, superior a 3 % podem ter, após passagem sobre alumina activada, um coeficiente de extinção K_{270} superior a 0,11. Nesse caso, após neutralização e descoloração efectuadas em laboratório, em conformidade com o método retomado no Anexo IV, devem ter as seguintes características:

— um coeficiente de extinção K_{270} não superior a 1,10,

— uma variação do coeficiente de extinção próximo de 270 nm superior a 0,01 e não superior a 0,16;

b) Reacções de Bellier e de Vizern modificada negativas;

c) Uma pesquisa de sabões negativa.

III. Consideram-se como produtos da subposição 15.07 A I c) os óleos, nomeadamente os óleos de «bagaços de azeitona», que apresentem as seguintes características:

a) Um teor em ácidos gordos livres, expresso em ácido oleico, superior a 3 %;

b) Reacções de Bellier e de Vizern modificada positivas;

c) Uma pesquisa de sabões negativa.

C. Pertence à subposição 15.07 A II a) o azeite obtido por tratamento dos óleos das subposições 15.07 A I a) e/ou 15.07 A I b), mesmo traçados com azeite virgem, que apresente as seguintes características:

a) Um teor em ácidos gordos livres, expresso em ácido oleico, de 3 % no máximo;

b) Uma pesquisa de sabões positiva

ou:

— um coeficiente de extinção K_{270} superior a 0,25 e não superior a 1,10 e, após tratamento da amostra de óleo sobre alumina activada, superior a 0,11,

e

— uma variação do coeficiente de extinção próxima de 270 nanómetros superior a 0,01 e não superior a 0,16.

Esta variação é definida por:

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

K_m designa o coeficiente de extinção ao comprimento de onda do máximo da curva de absorção próxima de 270,

K_{m-4} e K_{m+4} designam os coeficientes de extinção aos comprimentos de onda inferior e superior em 4 nanómetros ao de K_m;

c) Reacções de Bellier e de Vizern modificada negativas.

3. São excluídos da subposição 15.17 A:

   a) Os resíduos provenientes do tratamento das matérias gordas contendo óleo cujo índice de iodo, determinado pelo método de Wijs sem catalisador, seja inferior a 70 ou superior a 100;

   b) Os resíduos provenientes do tratamento das matérias gordas contendo óleo cujo índice de iodo esteja compreendido entre 70 e 100, mas cuja superfície do vértice, representando o volume de retenção do beta-sitosterol, determinada de harmonia com as disposições indicadas no Anexo VIII, seja menos de 93 % da superfície total dos vértices dos esteróis.

4. Os métodos de análise para a determinação das características dos produtos acima referidos são os previstos respectivamente nos anexos do Regulamento (CEE) nº 1058/77.

ANEXO IV

I. TRATAMENTO DA AMOSTRA PELA ALUMINA ACTIVADA

1. Introduzir 30 g de alumina básica, obtida de acordo com o processo descrito no nº 2, numa coluna de cromatografia com cerca de 35 mm de diâmetro e de 450 mm de comprimento, munida de um tubo de escoamento com cerca de 10 mm de diâmetro.

   Comprimir mecanicamente a alumina, deixando cair lentamente a coluna mantida na vertical, de forma repetida, sobre uma superfície de madeira. Introduzir, na coluna preparada deste modo, 100 ml de uma solução a 10 % de óleo no hexano.

   Recolher o eluato e evaporar o solvente no vácuo a uma temperatura inferior a 25 °C.

   Sobre o óleo obtido desta forma, deve fazer-se imediatamente a determinação do coeficiente de extinção a 270 nm.

2. Obtém-se a alumina básica de actividade Brockmann I (0 % de água) aquecendo durante três horas a 380-400 °C alumina básica (para cromatografia) com uma granulometria compreendida entre 30 µm e 130 µm (80 µm de média). A 100 g deste produto, adicionar 5 ml de água destilada para obter alumina básica de uma actividade Brockmann compreendida entre II e III. Agitar frequentemente e deixar repousar durante uma noite num recipiente hermeticamente fechado.

   Verificação da actividade da alumina

   Introduzir 30 g de alumina básica (obtida da forma acima indicada) numa coluna para cromatografia com cerca de 35 mm de diâmetro e 450 mm de comprimento, fazer passar nessa coluna, nas condições especificadas pelo método, uma mistura de 95 % de azeite virgem com um coeficiente de extinção K_{270} inferior a 0,18 e de 5 % de um óleo de amendoim tratado aquando da refinação pelas terras descolorantes e com um coeficiente de extinção K_{270} não inferior a 4. Se a mistura apresentar um coeficiente de extinção superior a 0,11, a alumina é aceitável. Se a eluição dos treines conjugados sobre essa alumina não se produzir, é necessário utilizar uma alumina mais hidratada, após se ter verificado se satisfaz as exigências do teste anterior.

II. NEUTRALIZAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DO AZEITE EM LABORATÓRIO

A. NEUTRALIZAÇÃO DO ÓLEO

1. **Aparelhagem**

   — copo de 300 ml de forma alta,
   — centrifugadora de laboratório com tubos de 100 ml,
   — copo de 250 ml,
   — balões de 100 ml,
   — frasco para decantar de 1 litro.

2. **Reagentes**

— solução aquosa de hidróxido de sódio a 12 %,
— solução etanólica a 1 % de fenolftaleína,
— hexano puro para análise,
— álcool isopropílico puro para análise.

3. **Modo operatório**

a) *Óleos de acidez expressa em ácido oleico inferior a 30 %*

Introduzir, num copo de 300 ml de forma alta, 50 g de óleo bruto e aquecer a 65 °C em banho-maria. Agitando lentamente, acrescentar uma quantidade de solução de hidróxido de sódio a 12 % correspondente à acidez livre do óleo, com um excesso de 5 %. Continuar a agitar durante cinco minutos, mantendo a temperatura a 65 °C.

Transferir o conjunto para tubos centrifugadores de 100 ml, separar a pasta saponária por centrifugagem. Verter o óleo decantado para um copo de 250 ml e lavar com 50-60 ml de água destilada a ferver eliminando a camada aquosa com a ajuda de um sifão. Repetir as lavagens até à eliminação completa dos vestígios do sabão residual (desaparecimento da coloração rosa com fenolftaleína).

Centrifugar o óleo para eliminar as pequenas quantidades de água residual.

b) *Óleos com acidez expressa em ácido oleico superior a 30 %*

Introduzir, num frasco de decantar de 1 litro, 50 g de óleo bruto, 200 ml de hexano, 100 ml de álcool isopropílico e uma quantidade de solução de hidróxido de sódio a 12 % correspondente à acidez livre do óleo, com um excesso de 0,3 %. Agitar energicamente durante um minuto. Acrescentar 100 ml de água destilada, agitar de novo e deixar repousar.

Após separação das camadas, deixar escoar a camada inferior que contém os sabões. Entre as duas camadas (oleosa por cima e aquosa por baixo) forma-se muitas vezes uma camada intermédia constituída por mucilagens e substâncias insolúveis que deve ser igualmente eliminada.

Proceder em seguida à lavagem da solução hexânica de óleo neutro com porções de 50-60 ml de uma solução de álcool isopropílico/água destilada 1/1 (v/v) até ao desaparecimento da coloração rosa com fenolftaleína. Proceder em seguida à eliminação completa do hexano por destilação no vácuo (por exemplo, pelo evaporador rotativo).

B. DESCOLORAÇÃO DO ÓLEO NEUTRALIZADO

1. **Aparelhagem**

— balão de 250 ml com 3 bocas polidas que permita inserir:
  a) um termómetro graduado em graus e que permita fazer leituras até 90 °C;
  b) um agitador mecânico que gire a 250-300 voltas por minuto equipado para o funcionamento no vácuo;
  c) uma ligação com a bomba de vácuo,
— bomba de vácuo, munida de um manómetro, capaz de dar pressões residuais de 15-30 milibares.

2. **Modo operatório**

Pesar no balão de 3 bocas cerca de 100 g de óleo neutralizado. Inserir o termómetro e o agitador, ligar à bomba de vácuo e aquecer até 90 °C agitando.

Manter esta temperatura, continuando a agitar, até que o óleo a analisar esteja totalmente livre de humidade (cerca de trinta minutos).

Interromper então a vácuo e acrescentar 2 a 3 g de terra activada. Restabelecer o vácuo até à obtenção de uma pressão residual de 15-30 milibares e, ainda a uma temperatura de 90 °C, agitar durante trinta minutos a cerca de 250 voltas por minuto.

Em seguida, filtrar a quente numa estufa termostática (50-60 °C)

ANEXO V

PESQUISA DA PRESENÇA DE ÓLEO DE BAGAÇOS DE AZEITONA NOS AZEITES

A. MÉTODO DITO DE BELLIER

1. **Material**

— balão de 100 ml, munido de um refrigerante com refluxo,

— pipeta de 5 ml graduada em décimos,

— sistema de aquecimento que permita atingir a temperatura de cerca de 80 °C,

— termómetro de 15 a 60 °C.

2. **Reagentes**

— solução hidro-alcoólica de potássio (42,5 g de KOH dissolvidos em 72 ml de água destilada, sendo o volume completado até 500 ml com álcool etílico a 95 °),

— solução de álcool etílico com uma graduação de 70 °,

— solução aquosa de ácido acético 1 + 2 (em volume), ajustada de forma a que 1,5 ml neutralizem exactamente 5 ml da solução hidro-alcoólica de hidróxido de potássio em presença de fenolftaleína.

3. **Preparação da amostra**

O óleo é privado de água por decantação e filtragem sobre papel efectuadas a uma temperatura ligeiramente superior ao ponto de fusão de certos constituintes concretos que se tenham separado da matéria gorda fluida.

4. **Modo operatório**

Introduzir no balão cerca de 1 ml de óleo preparado como se indica no nº 3. Acrescentar 5 ml de solução hidro-alcoólica de potássio. Adaptar o refrigerante com refluxo e levar à ebulição durante dez minutos agitando de vez em quando. Deixar arrefecer até à temperatura ambiente. Acrescentar 1,5 ml de solução aquosa de ácido acético e 50 ml de solução de álcool etílico previamente levada à temperatura de 50 °C. Misturar por agitação, introduzir o termómetro e deixar arrefecer, observando o aspecto da solução assim que ela atingir a temperatura de 45 °C. Se se formar um precipitado flocoso a uma temperatura superior a 40 °C, a reacção é positiva. Na ausência de um precipitado flocoso caracterizado, manter o líquido à temperatura ambiente, que deve estar compreendida entre 20 e 22 °C durante pelo menos vinte e quatro horas, e se necessário durante quarenta e oito horas. Observar de novo a solução: a formação de um precipitado flocoso em suspensão no meio do líquido indica igualmente que a reacção é positiva.

Expressão dos resultados

Pesquisa do óleo de bagaços (método de Bellier) positiva ou negativa.

B. MÉTODO DITO DE VIZERN MODIFICADO

O insaponificável do óleo a analisar é isolado e o seu comportamento em solução no álcool a 85 ° é estudado em certas condições.

1. **Material**

— balões de 300 ml de vidro resistente aos alcalinos e munido de um refrigerante de refluxo,

— frascos de decantação de 500 ml ou de 1 000 ml,

— copos de 300 ml e de 250 ml,

— proveta de vidro.

2. **Reagentes**

— solução alcoólica de hidróxido de potássio 2N,

— éter de petróleo,

— álcool etílico a 50 %,

— álcool etílico a 96 % medido com o alcoómetro,

— água oxigenada a 10 volumes,

— álcool etílico a 85 % medido com o alcoómetro.

3. **Modo operatório**

Pesar cerca de 5 g da amostra a analisar num balão de 300 ml. Acrescentar 50 ml da solução alcoólica de hidróxido de potássio 2N. Instalar o refrigerante de refluxo e levar a uma ligeira ebulição. Agitar após uma hora de aquecimento, arrefecer a 30-35 °C e verter para um frasco de decantação utilizando 50 ml de água destilada.

Lavar cuidadosamente o balão com 50 ml de éter de petróleo, repetir a operação várias vezes. Verter o éter de petróleo para um frasco de decantação. Agitar energicamente o conteúdo pouco mais de um minuto. Após decantação, eliminar a fase aquosa vertendo-a para outro frasco de decantação. Acrescentar mais 50 ml de éter de petróleo, agitar energicamente o conteúdo durante pouco mais de um minuto e deixar decantar. A fase aquosa é vertida para um terceiro frasco de decantação à qual se acrescentam mais 50 ml de éter de petróleo. Agitar em seguida energicamente e deixar decantar.

Recolher num frasco de decantação os extractos etéreos provenientes das diferentes extracções do insaponificável e lavar pelo menos três vezes com álcool a 50 % (50 ml de cada vez) até que o líquido de lavagem já não dê reacção alcalina à fenolftaleína.

Filtrar a solução do insaponificável para um copo de 300 ml, lavar o filtro com éter de petróleo e eliminar o solvente por destilação. Acrescentar 10 ml de álcool a 96 ° e após aquecimento moderado (cerca de 40 °C), filtrar para um copo de 100 ml. Lavar o copo de 300 ml com 10 ml de álcool a 96 ° e em seguida filtrar para o segundo copo.

No copo de 100 ml que contêm os extractos alcoólicos do insaponificável, acrescentar 5 ml de água oxigenada a 10 volumes, aquecer em banho-maria até à evaporação completa. Acrescentar ainda 20 ml de álcool a 96 ° e 5 ml de álcool a 96 ° e 5 ml de água axigenada; deixar evaporar de novo completamente.

Retirar o copo do banho-maria e acrescentar 20 ml de álcool a 85 °. Aquecer prudentemente em banho-maria tendo muito cuidado em não provocar perdas de álcool para não diminuir a concentração. Trata-se de um elemento muito importante que não se deve negligenciar.

Filtrar em papel, arrefecer e axaminar o comportamento da solução ao fim de uma hora, e depois de quatro horas. Se, ao fim de uma hora, a solução estiver absolutamente transparente, a análise é negativa, o que quer dizer que não há óleo de bagaços.

Se, ao fim de uma hora, a solução estiver turva, repetir a observação quatro horas depois.

Se, ao fim de quatro horas, a solução ainda estiver turva, mas não apresentar flocos, a análise continua a ser negativa. Em contrapartida, se se observar a formação de flocos, a análise é positiva e encontramo-nos em presença de óleo de bagaços.

Expressão dos resultados

Pesquisa de óleo de bagaços (método de Vizern modificado): positiva ou negativa.

Observações

Os azeites dão uma solução transparente ou no máximo ligeiramente opalina durante todo o ensaio. Os óleos de bagaços puros ou misturados apresentam flocos característicos que ficam em suspensão como pequenas nuvens e que acabam por se depositar ao fim de várias horas de repouso.

ANEXO VI

PESQUISA DOS SABÕES PELA EVIDENCIAÇÃO DA ALCALINIDADE

Princípio do método

Evidenciação dos sabões alcalinos pela acção sobre o azul de bromofenol.

Reagentes

— solução a 0,1 % de azul de bromofenol no etanol a 96 % (v/v),

— acetona acabada de destilar, adicionada de 2 % água (v/v).

A acetona a 2 % de água deve apresentar uma coloração amarela ou amarelo esverdeado em presença de algumas gotas da solução de azul de bromofenol.

Material

Tubo de ensaio de 150 mm × 15 mm.

Modo operatório

Introduzir no tubo de ensaio 10 ml de acetona e 1 gota de solução de bromofenol. A solução deveria ficar amarela. Senão, enxaguar o tubo e a rolha com acetona até ao desaparecimento da coloração azul. Introduzir 10 g de óleo no tubo, obturar com uma rolha limpa, agitar e deixar repousar. Se a camada superior de acetona ficar azulada, significa a presença de sabão.

Expressão dos resultados

Os resultados são expressos como positivos ou negativos.

ANEXO VII

PESQUISA DA PRESENÇA DE ÓLEOS REESTERIFICADOS

Este método tem por finalidade determinar, nos óleos e nas gorduras, a composição da fracção dos ácidos gordos que são esterificados na posição 2 (posição B, ou posição interna) do glicerol, contendo os azeites reesterificados mais ácido palmítico na posição B do que os azeites não reesterificados.

Princípio

Este método baseia-se na hidrólise parcial e específica dos triglicéridos pela lipase pancreática com formação preferencial de mono-2 glicéridos. Esta hidrólise leva a uma mistura composta, para além de triglicéridos não hidrolisados, dos diglicéridos, dos mono-2 glicéridos e dos ácidos gordos livres. Essa mistura é fraccionada por cromatografia numa camada fina e os monoglicéridos são isolados. Esses monoglicéridos são metanolizados, e os esteres metílicos obtidos são analisados por cromatografia em fase gasosa.

O produto analisado deve ser considerado como tendo-lhe sido acrescentado óleo reesterificado quando a percentagem de ácido palmítico verificado na posição 2 dos triglicéridos é superior a 2 %.

1. **Material**

— frasco de decantar de 500 ml,

— coluna de vidro para cromatografia de 13 mm de diâmetro interior e de 400 mm de comprimento, equipada com uma placa de vidro calcinado e uma torneira,

— balão de 250 ml de boca larga,

— balão de 100 ml,

— tubo de centrifugadora de 10 ml, com rolha polida,

— seringa hipodérmica de 1 ml, equipada com uma agulha fina,

— balão de 25 ml, com refrigerante de ar com cerca de 1 m de comprimento com um apel de ligação polido,

— copo de 50 ml,
— boreta de 5 ml, graduada em 1/20 ml,
— expositor para cromatografia em camada fina, com placas de vidro de 20 × 20 cm,
— micro-seringa que deite gotas de 3-4 µl,
— tina de revelação para cromatografia em camada fina,
— evaporador rotativo,
— estufa regulável a 103 °C ± 2 °C,
— termóstato regulável entre 30 °C e 45 °C a ± 0,5 °C,
— agitador eléctrico vibrante que permita uma agitação enérgica do tubo da centrifugadora,
— pulverisador para cromatografia em camada fina,
— lâmpada ultravioleta para o exame das placas cromatográficas,
— agitador de laboratório, de tipo adequado para a dispersão e a mistura de materiais heterogéneos,
— pH-metro,
— agitador a hélice
— cronómetro.

2. **Reagentes**

— solução aquosa de hidróxido de sódio a 12 % (m/v),
— solução a 1 % (m/v) de fenolftaleína no etanol a 95 % (v/v),
— óxido dietílico, isento de peróxidos,
— álcool isopropílico, ou álcool etílico a 95 % (v/v), para análises,
— alumina activada para cromatografia neutra, com um grau de actividade Brockmann I, recentemente activada durante duas horas a 260 °C e conservada num dessecador,
— hexano ou, na sua ausência, éter de petróleo (Eb = 30-50 °C), para cromatografia,
— ácido fórmico al 98 % (m/m) no mínimo,
— lipase pancreática com uma actividade conveniente (nota 1, nota 2),
— solução tampão: solução aquosa 1 M de tris-hydroximetil-aminometano levado a pH 8 pelo ácido clorídrico 6 N (controlo potenciométrico)
— solução aquosa a 0,1 % (m/v) de colato de sódio (qualidade enzimática),
— solução de ácido clorídrico 6 N,
— solvente de ampliação: hexano (ou, na sua ausência, éter de petróleo)/óxido dietílico/ácido fórmico 70/30/1 (v/v/v),
— solução aquosa de goma arábica a 10 % (m/v)
— solução aquosa de cloreto de cálcio ($CACl_2$) a 22 % (m/v),
— solução alcoólica a 0,2 % (m/v) de dicloro-2'-7' fluoresceína, ligeiramente alcalinizado por adição de uma gota de hidróxido de sódio 1N por 100 ml,
— sílica em pó, com aglomerante, com qualidade para cromatografia em camada fina,
— solução aquosa de colato de colato de sódio a 20 % (m/v),
— solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 N,
— óleo vegetal neutralizado.

3. **Preparação da amostra**

Amostra com uma acidez inferior a 3 %: neutralização directa sobre alumina de acordo com 3.2.

Amostra de actividade superior a 3 %: neutralização pelos alcalis em presença de solvente de acordo com 3.1, e depois passagem sobre alumina de acordo com 3.2.

3.1. *Neutralização pelos alcalis em presença de solvente*

Verter para um frasco de decantar de 500 ml cerca de 10 g de óleo bruto, 100 ml de hexano ou, na sua ausência, de éter de petróleo, 50 ml de álcool isopropílico ou de álcool etílico a 95°, algumas gotas da solução de fenolftaleína e uma quantidade da solução de hidróxido de sódio a 12 % correspondente à acidez livre do óleo, mais um excedente de 0,3 %. Agitar energicamente durante um minuto; acrescentar 50 ml de água destilada, agitar de novo e deixar repousar.

Após decantação, eliminar a camada inferior que contém os sabões. Eliminar as eventuais camadas intermédias (mucilagens e substâncias insolúveis), lavar a solução hexânica do óleo neutralizado com porções sucessivas 25 ou 30 ml de uma solução de álcool isopropílico, ou etílico, e de água destilada 1-1 (v/v) até ao desaparecimento da coloração rosada da fenolftaleína.

Eliminar a maior parte do hexano por destilação no vácuo, e secar o óleo a 30-40 °C no vácuo com a ajuda de uma corrente de azoto puro até à eliminação total do solvente.

3.2. *Passagem sobre alumina*

Preparar uma suspensão de 15 g de alumina activada em 50 ml de hexano ou, na sua ausência, de éter de petróleo, e verter, agitando, para uma coluna de vidro para cromatografia. Regularizar a repartição de alumina e deixar correr o selvente até 1-2 mm acima do nível superior do absorvente. Verter cuidadosamente para a coluna uma solução preparada cerca de quinze minutos antes por dissolução de 5 g de óleo em 25 ml de hexano ou, na sua ausência, de éter de petróleo, e recolher a totalidade do líquido que sai da coluna para um balão de 100 ml.

Eliminar a maior parte do solvente por destilação no vácuo, depois secar o óleo a 30-40 °C no vácuo com a ajuda de uma corrente de azoto puro até à eliminação total do solvente.

4. **Preparação das cromatoplacas**

Colocar, num balão de 250 ml de boca larga, 30 g de sílica em pó com aglomerante e 60 ml de água destilada, e agitar até obter uma papa bastante homogénea. Desgaseificar mantendo sob o vácuo da bomba injectora de água durante um minuto.

Espalhar nas condições normais a papa sobre as placas com a espátula regulando a espessura da camada a 0,25 mm.

A quantidade de papa acima referida é suficiente para a preparação de 5 placas 20 × 20 cm.

Deixar secar as placas ao ar durante cerca de quinze minutos e, em seguida, secá-las numa estufa a 103 °C ± 2 °C durante duas horas.

Conservar as placas assim preparadas num dessecador.

5. **Modo operatório**

5.1. *Hidrólise pela lipase pancreática*

Pesar, no tubo da centrifugadora de cerca de 10 ml, 0,1 g da amostra preparada.

Acrescentar 20 mg de lipase e 2 ml de solução tampão. Agitar cuidadosamente e com precaução, depois acrescentar 0,5 ml da solução de colato de sódio a 0,1 % e 0,2 ml da solução de cloreto de cálcio. Fechar o tubo com a rolha polida, agitar com cuidado (evitando molhar a rolha) e pôr imediatamente o tubo no termóstato, regulado a 40 °C ± 0,5 °C agitando exactamente durante 1 minuto.

Retirar o tubo do termóstato e agitar energicamente durante exactamente dois minutos.

Arrefecer imediatamente sob uma corrente de água; acrescentar 1 ml de ácido clorídrico 6 N e 1 ml de óxido dietílico. Tapar e agitar energicamente. Deixar repousar e retirar a fase orgânica superior com a ajuda de uma seringa.

5.2. *Separação dos monoglicéridos por cromatografia em camada fina*

Depositar o extracto sobre a placa cromatográfica a cerca de 1,5 cm da borda inferior em linha contínua e uniforme a fim de obter uma linha de partida o mais fina possível.

Introduzir a placa na tina de revelação bem saturada e revelar com o solvente de revelação até cerca de 1 cm da borda superior. A revelação da placa deve fazer-se à temperatura de cerca de 20 °C.

Secar a placa ao ar à temperatura da tina e pulverizar a solução com dicloro-2'-7' fluoresceína. Delimitar a faixa dos monoglicéridos (Rf = 0,035 mais ou menos) sob uma luz ultravioleta, recuperá-los com a ajuda de uma espátula metálica (evitando retirar os componentes que ficaram na linha de partida) e recolher a sílica no balão de metilação de 25 ml.

Transformar os monoglicéridos em esteres metílicos, tratando directamente nas condições do método geral de preparação dos metiles esteres dos ácidos ordos indicados no ponto 7.3 a sílica anteriormente recolhida, depois proceder à cromatografia em fase gasosa dos esteres de acordo com o método indicado no ponto 7.4.

Determinar na mesma amostra a composição dos ácidos gordos totais, cuja comparação com a dos ácidos gordos na posição 2 é útil para a interpretação dos resultados obtidos.

6. **Expressão dos resultados**

Calcular a composição dos ácidos gordos na posição 2 em % com um número decimal (nota 3).

7. **Notas**

7.1. *Controlo da actividade lipásica*

Preparar uma emulsão de óleo agitando, num misturado adequado durante cerca de 10 minutos, uma mistura constituída por 165 ml da solução de goma arábica a 10 %, 15 g de gelo picado e 20 ml de um óleo previamente neutralizado.

Num copo de 50 ml, pôr sucessivamente 10 ml da emulsão acima referida, 0,3 ml de solução de colato de sódio a 20 % e 20 ml de água destilada.

Colocar o copo num termóstato regulado a 37 °C ± 0,5 °C e introduzir no copo os eléctrodos de um pH-metro e um agitador de hélice.

Com uma boreta de 5 ml, acrescentar gota a gota uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N até à obtenção de um pH de 8,5.

Acrescentar um volume adequado de uma suspensão de pó de lipase na água (ver adiante). Quando o pH-metro indicar um pH de 8,3, pôr o cronómetro em funcionamento e acrescentar a solução de hidróxido de sódio 0,1 N ao ritmo necessário para manter o pH no valor de 8,3. Anotar todos os minutos o volume de solução alcalina consumido.

Registar os dados obtidos num esquema de eixos de coordenadas, indicando em abcissas os tempos e em ordenadas os ml de solução alcalina consumida para manter o pH constante. Deve obter-se um gráfico linear.

A suspensão de lipase referida no parágrafo precedente é uma suspensão a 1 % em peso na água. Tomar para cada ensaio a quantidade necessária dessa suspensão para que, em cerca de quatro ou cinco minutos, seja consumido 1 ml de solução alcalina. Normalmente, este resultado obtém-se com 1 a 5 mg de pó.

A unidade lipase é definida como a quantidade de enzima que liberta 10 micro-equivalentes de ácido por minuto.

Actividade A do pó utilizado, medida em unidade lipase por mg:

$$A = \frac{V \times 10}{m}$$

V = número de ml de solução de hidróxido de sódio 0,1 N por minuto, calculado a partir do gráfico,

m = massa da amostra de pó tomada para análise, em mg.

A lipase utilizada deve ter uma actividade compreendida entre 0,8 e 2 unidades lipase por mg.

7.2. *Preparação da lipase*

Existem no comércio lipases com uma actividade lipásica satisfatória. É igualmente possível prepará-la no laboratório da seguinte forma:

Arrefecer a 0 °C 5 kg de pâncreas fresco de porco, limpos da gordura sólida e do tecido conjuntivo que os envolve, e triturá-los numa trituradora para obter uma pasta fluida. Agitar essa pasta a frio durante quatro a seis horas com 2,5 l de acetona anidra, depois centrifugar. Extrair o resíduo mais três vezes com o mesmo volume de acetona, duas vezes com uma mistura acetona-óxido dietílico 1/1 (v/v), e duas vezes com óxido dietílico.

Secar o resíduo durante quarenta e oito horas no vácuo para obter um pó estável que deve ser conservado no refrigerador.

7.3. *Preparação dos esteres metílicos de ácidos gordos*

De acordo com o método descrito no ponto II do Anexo VI do Regulamento (CEE) nº 72/77 da Comissão, de 13 de Janeiro de 1977, que altera o Regulamento (CEE) nº 1470/68 relativo à colheita e à redução das amostras bem como à determinação do teor em óleo, em impurezas e em humidade das sementes oleaginosas (1).

7.4. *Cromatografia em fase gasosa dos esteres metílicos de ácidos gordos*

De acordo com o método descrito no ponto III do Anexo VI do Regulamento (CEE) nº 72/77.

---

(1) JO nº L 12 de 15. 1. 1977, p. 11.

ANEXO VIII

PESQUISA DA PRESENÇA DE OUTROS ÓLEOS NO AZEITE: ANÁLISE DA FRACÇÃO ESTERÓLICA DOS CORPOS GORDOS

Princípio

Análise por cromatografia em fase gasosa dos esteróis preparados por cromatografia sobre camadas finas a partir do insaponificável seco com precaução.

Aparelhagem

1. Aparelhagem para a cromatografia sobre camada fina, compreendendo em particular quatro placas de vidro de 20 × 20 × 0,4 cm, duas de 20 × 5 × 0,4 cm e uma micro-seringa de 0,1 ml,
2. Copo de laboratório de 50 ml,
3. Filtros porosos, porosidade 3, diâmetro 15 mm,
4. Balão de 100 ml,
5. Proveta de centrifugadora, de fundo cónico, de 10 ml, munida de uma rolha polida,
6. Pipetas graduadas de 1 ml,
7. Aparelho de cromatografia em fase gasosa, equipado com um detector de ionização de chama com um injector de prata ou de vidro ou sistema de injecção directa na coluna e ligado a um registador,
8. Coluna de cromatografia em fase gasosa, de vidro ou aço inoxidável em U ou espiral, de 1 a 2 m de comprimento e 3 a 4 mm de diâmetro interior, fase estacionária de goma de silicone [tipo metil (1)] estável até pelo menos 300 °C, impregnando a uma taxa de 2 a 4 % uma terra de diátomes calcinada, lavada com ácidos e silanizada, com granulometria 80/100 ou 100/120 mesh,

   Observação: Como certos tipos de aço inoxidável podem provocar resultados erróneos por deterioração de esteróis, recomenda-se o vidro.
9. Micro-seringa que possa fornecer doses que atinjam 5 ou 10 µl.

Reagentes

1. Cloroformo para cromatografia,
2. Benzeno para cromatografia,
3. Heptano,
4. Gel de sílica (por exemplo Kieselgel G),
5. Solução de referência para a cromatografia sobre placa constituída de colesterol a 5 % no cloroformo,
6. Acetona para cromatografia,
7. Solução a 0,1 % no álcool etílico absoluto de sal sódico de 2'7' diclorofluoresceína,
8. Piridina,
9. Hexametildisilazana,
10. Trimetil clorosilane,
11. Solução para o teste de sensibilidade: 1 mg de colesterol por ml de n-pentano,
12. Solução para o teste da resolução dos vértices: 0,9 mg de fitosteróis de óleo de colza e 0,1 mg de colesterol por ml de n-pentano. Os esteróis devem ser acabados de preparar de acordo com o procedimento descrito na parte B do modo operatório,
13. Solução para o teste de referência: 1 mg de fitosteróis de óleo de girassol por ml de n-pentano, acabado de preparar como se descreve na parte B do modo operatório.

Preparação das placas para cromatografia

Colocar em ordem, sobre o mostrador, uma placa 20 × 5 × 0,4 cm, quatro placas 20 × 20 × 0,4 cm e uma placa 20 × 5 × 0,4 cm.

(1) Por exemplo SE 30.

Colocar, num balão de 500 ml de boca larga, 40 g de gel de sílica e cerca de 80 ml de água. Agitar com uma varinha de vidro, eventualmente com um agitador mecânico de vidro até se obter uma suspensão homogénea. Eliminar os gases eventuais fazendo o vácuo com a ajuda de uma bomba injectora de água durante um minuto pelo menos. Colocar em seguida a suspensão sobre o mostrador, regulando a espessura a 0,5 mm e cobrir uniformemente as placas. Deixar secar as placas ao ar durante cerca de quinze minutos e secar em seguida numa estufa a 105 °C durante duas horas. Conservar as placas assim preparadas num dessecador no vácuo.

MODO OPERATÓRIO

A. Preparação do insaponificável

Introdução

Designam-se pelo nome de insaponificável as substâncias solúveis na matéria gorda, que, após saponificação, são insolúveis na água e solúveis no solvente utilizado para a dosagem. Compreende os constituintes naturais das matérias gordas (esteróis, álcoois, hidrocarboretos), bem como as substâncias orgânicas não voláteis a 100 °C (óleos minerais) estranhas às matérias gordas que podem eventualmente conter. Como solvente, utiliza-se o éter de petróleo ou então o óxido de etil. É preciso ter em consideração que os resultados com os dois solventes são, na maioria dos casos, diferentes e que se encontram teores em % mais elevadas com o óxido de etil. Para o azeite, tendo em conta as condições climáticas em que se encontra a maioria dos laboratórios de análises, o éter de petróleo foi reconhecido como o solvente a empregar.

Método com éter de petróleo

Material

— balão de cerca de 150 ml que possa ser adaptado a um refrigerante de refluxo,

— frascos de decantação de cerca de 500 ml,

— estufa regulada a 103 °C ± 2 °C.

Reagentes

— solução etanólica de KOH cerca de 2 N no etanol a 95 % (v/v). O reagente não deverá ser mais escuro do que a cor amarela da palha nova,

— éter de petróleo que destile entre 40 e 60 °C, que possua um índice de bromo inferior a 1, isento de resíduo.

Modo operatório

Pesar exactamente com uma diferença de 0,01 g cerca de 5 g de matéria gorda no balão. Acrescentar 50 ml da solução etanólica de KOH cerca de 2 N. Adaptar ao refrigerante de refluxo. Aquecer durante uma hora por meio de ebulição ligeira. Parar o aquecimento. Acrescentar pela parte de cima do refrigerante cerca de 50 ml de água destilada e agitar.

Verter após arrefecimento para um frasco de decantação e enxaguar o balão várias vezes, com cerca de 50 ml de éter de petróleo no total.

Agitar energicamente durante um minuto.

Deixar repousar até separação completa de duas fases e recolher a solução saponária num outro frasco de decantação. Se se formar, por excepção, uma emulsão, destruí-la por adição de pequenas quantidades de etanol ou de solução concentrada de hidróxido de potássio.

Retirar a extracção de solução saponária mais duas vezes com cerca de 50 ml de éter de petróleo de cada vez.

Reunir as 3 fracções etéreas num mesmo frasco, lavá-las três vezes com cerca de 50 ml de etanol a 50 % (v/v).

Pela parte de cima do frasco, verter, por várias vezes se necessário, quantitativamente a solução de éter de petróleo num balão de 250 ml graduado (efectuando pequenas enxaguadelas do frasco com éter de petróleo).

O solvente elimina-se aquecendo-se prudentemente no vácuo, os resíduos secam-se a uma temperatura inferior a 50 °C no vácuo, a fim de evitar oxidações indesejáveis.

B. **Separação da fracção esterólica por cromatografia sobre camada fina**

Introduzir na tina de amplição a mistura heptano n/acetona 85/15 ou benzol/acetona 95/5 (v/v) até à altura de cerca de 1 cm; fechar com a tampa e deixar repousar durante pelo menos três horas de forma a que o equilíbrio líquido/vapor se estabeleça. Aconselha-se igualmente fixar nas superfícies interiores da câmara tiras de papel filtro que mergulhem no eluente. Esta precaução oferece a vantagem de reduzir de cerca de um terço a duração de migração da face do líquido e de fazer eluir os componentes de forma mais uniforme.

Preparar entretanto uma solução a 5 % de insaponificável extraído com éter de petróleo no cloroformo. Recolher aproximadamente 0,3 ml desta solução e depositá-la com a micro-seringa de 0,1 ml sobre a placa cromatográfica a cerca de 1,5 cm do bordo inferior, em faixa contínua e uniforme de forma a obter uma linha de partida o mais fina possível. De acordo com a técnica habitual, depositar numa extremidade da placa alguns ml da solução de referência que contém colesterol a fim de identificar o Rf da fracção esterólica.

Colocar a placa na tina de ampliação preparada da forma acima indicada. À temperatura ambiente deve ser de 20 °C aproximadamente. Fechar com a tampa e ampliar até que a face do solvente tenha chegado a cerca de 1 cm do bordo superior da placa. Retirar a placa da câmera de ampliação e deixar evaporar o solvente numa corrente de azoto quente.

Revelar vaporizando uniformemente e com cuidado a solução alcoólica de sal sódico da 2'7' diclorofluoresceína sobre a placa. Examinando a placa à ultravioleta, determina-se a posição dos esteróis graças ao alinhamento com a mancha de colesterol proveniente da solução de referência. Recuperar raspando com uma espátula metálica a faixa de esteróis. Introduzir o gel de sílica separado num copo de 50 ml com 15 ml de cloroformo quente, agitar e verter a totalidade de gel de sílica para um filtro poroso e filtrar.

Lavar três vezes o filtro de cada vez com uma porção de 15 ml de cloroformo quente, recolhendo o filtrado num balão de 100 ml.

Evaporar a solução clorofórmica até 4 a 5 ml e vertê-la na proveta para centrifugadora munida de uma rolha polida, previamente pesada. Secar, evaporando o solvente através de um aquecimento ligeiro numa corrente de azoto e pesar a fracção esterólica assim obtida.

C. **Análise cromatográfica em fase gasosa dos esteróis**

1. *Preparação dos trimetilsileteres (TMSE)*

Para cada mg de esterol, acrescentar na proveta 0,02 ml de reagente para a silanização, composto de uma mistura de piridina-hexametilazana-trimetilclorosilana 9/3/1 (v/v/v), tendo o cuidado de evitar qualquer vestígio de humidade. Colocar a proveta num dessecador durante cerca de trinta minutos, depois fechar, centrifugar durante alguns minutos. Retirar, para a análise a praticar em seguida, a solução restante.

2. *Condições da análise por cromatografia em fase gasosa*

Temperatura da coluna: 220 a 250 °C.

Temperatura do sistema de injecção se for aquecido separadamente: 20 a 40 °C acima da temperatura da coluna. Consumo do azoto: 50 a 60 ml por minuto. Desligar o detector e equilibrar as novas colunas nestas condições durante dezasseis a vinte e quatro horas. Ligar o detector, acender a chama e regular os consumos de hidrogénio, de oxigénio ou de ar de forma a obter uma altura de chama e uma sensibilidades adequadas. Pôr o registador a funcionar e deixar o papel correr a uma velocidade adequada; acrescentar o zero e o atenuador. Se a linha de base for estável, o aparelho está pronto a ser utilizado.

3. *Teste de sensibilidade*

Recolher 5 ml da solução do teste de sensibilidade, evaporar o solvente, tratar como indicado em 1; injectar 0,1 a 0,2 µl da solução assim preparada (TMSE). Só deve surgir no cromatograma um vértice de colesterol.

Regular o atenuador de forma a utilizar aproximadamente toda a escala do registador.

4. *Teste de resolução dos vértices*

Recolher 5 ml da solução preparada para o teste de resolução.

Evaporar o solvente, tratar como indicado em 1.

Injectar 0,1 a 0,2 µl da solução assim preparada (TMSE).

Os vértices de colesterol, de brassicasterol, de campesterol e de 6-sitosterol devem surgir no cromatograma. Medir as distâncias de retenção (distância do ponto de injecção ao ponto de altura máxima do vértice) dos vértices, d_{CH} para o colesterol, d_B para o brassicasterol, d_C para o campesterol e d_S para o 6-sitosterol e as larguras na base dos vértices (comprimento de retenção entre as intersecções com a linha de base das tangentes nos pontos de inflexão situados nos lados anterior e posterior do vértice) ω_{CH} para o colesterol e ω_B para o brassicasterol. A resolução dos vértices expressa pela seguinte fórmula.

$$PR = 2\,\frac{(d_B - d_{CH})}{\omega_B + \omega_{CH}}$$

deve ser pelo menos igual 1.

Calcular os tempos de retenção relativos (colesterol = 1,00) para o brassicasterol, o campesterol e o 6-sitosterol.

5. *Teste de referência*

Recolher 5 ml da solução do teste de referência, evaporar o solvente tratar como indicado em 1, injectar 0,1 a 0,2 µl da solução assim preparada (TMSE). Os vértices de campesterol, de estigmastenol, de 6-sitosterol e Δ 7 estigmastenol devem surgir no cromatograma.

Medir as distâncias de retenção dos vértices d_C para o compesterol, d_{ST} para o estigmastenol, d_S para 6-sitosterol e $d_{ST} - 7$ para o Δ 7 estigmastenol.

Calcular os tempos de retenção relativos que são aproximadamente:

colesterol:	1,0,
brassicasterol:	1,1,
campesterol:	1,3,
estigmasterol:	1,4,
6-sitosterol:	1,6 (1).
Δ 7 estigmastenol	1,8 (2).

6. *Análise*

Injectar 0,1 a 0,2 µl da solução TMSE dos esteróis a analisar e registar o cromatograma.

D. **Expressão dos resultados**

Para a interpretação da composição da fracção esterólica analisada, não se devem ter em conta cumes com tempos de retenção diferentes dos determinados experimentalmente para os 6 esteróis acima referidos.

O teor em % em 6-sitisterol é dado pela fórmula:

$$\frac{\text{Área do vértice do 6-sitosterol}}{\text{Soma das áreas dos seis vértices de esteróis}} \times 100$$

O conteúdo em 6-sitosterol não deve ser inferior a 93 % em relação à composição em % dos esteróis totais.

---

(1) Se outros esteróis tiverem, como o Δ 5 avenasterol, nestas condições, o mesmo volume de retenção que o 6-sitosterol, são contados como 6-sitosterol.

(2) Se outros esteróis tiverem, nestas condições, o mesmo volume de retenção que o Δ 7 estigmastenol, são contados como Δ 7 estigmastenol.

ANEXO IX

TEOR EM ÓLEO DOS BAGAÇOS DE AZEITONA

Material

— aparelho de extracção adequado munido de um balão de 200 a 250 ml,

— banho de aquecimento eléctrico (banho de areia, banho de água, etc.) ou placa de aquecer,

— balança analítica,

— estufa regulada a 80 °C no máximo,

— estufa com aquecimento eléctrico munido de um dispositivo de termorregulação regulado a 103 °C ± 2 °C que permita realizar uma insuflação de ar ou uma pressão reduzida,

— triturador mecânico fácil de limpar e que permita a trituração sem aquecimento e sem diminuição sensível do seu teor em água e em óleo,

— cartucho de extracção e algodão hidrófilo ou papel filtro, isentos de produtos extraíveis com hexano,

— dessecador,

— peneira com orifícios de 1 mm de diâmetro,

— pedra-pomos em pequenos grãos, previamente seca.

Reagente

n-hexano técnico cujo resíduo na evaporação completa deve ser inferior a 0,002 g por 100 ml.

MODO OPERATÓRIO

Preparação da amostra para análise

Triturar a amostra para laboratório, se necessário, num triturador mecânico previamente bem limpo a fim de o reduzir em partículas que possam atravessar completamente a peneira.

Utilizar cerca de um vigésimo da amostra para perfazer a limpeza do triturador, deitar essa parte fora, triturar o restante, recolhê-lo, misturá-lo com cuidado e analisar sem demora.

Tomada de ensaio

Pesar, com uma margem de 0,01 g, logo após o final da trituração, aproximadamente 10 g de amostra para análise.

Preparação do cartucho de extracção

Colocar a tomada de ensaio no cartucho e tapá-lo com o tampão de algodão hidrófilo. No caso de ser ter utilizado um papel filtro, embalar a moedura nesse papel.

Pré-secagem

Se o bagaço estiver muito húmido (teor em água e em matérias voláteis superior a 10 %), efectuar uma pré-secagem colocando durante um espaço de tempo conveniente o cartucho cheio (ou o papel filtro) na estufa aquecida a 8 °C no máximo, para reduzir o teor em água e em matérias voláteis a menos de 10 %.

Preparação do balão

Pesar, com uma margem de 1 mg, o balão que contém 1 a 2 grãos de pedra-pomos, previamente seco na estufa a 103 °C ± 2 °C e depois arrefecido durante pelo menos uma hora num dessecador.

Primeira extracção

Colocar no aparelho de extracção o cartucho (ou o papel filtro) que contém a tomada de ensaio. Verter para o balão a quantidade necessária de hexano. Adaptar o balão ao aparelho de extracção e colocar o conjunto sobre um banho com aquecimento eléctrico. Conduzir o aquecimento em condições tais que o consumo do refluxo seja pelo menos de três gotas por segundo (ebulição moderada, não tumultuosa).

Após quatro horas de extracção, deixar arrefecer, tirar o cartucho do aparelho de extracção e colocá-lo numa corrente de ar a fim de eliminar a maior parte do solvente que o impregna.

Segunda extracção

Despejar o cartucho no microtriturador e triturar o mais fino possível. Voltar a colocar quantitativamente a mistura no cartucho e esta no aparelho de extracção.

Recomeçar a extracção ainda durante duas horas utilizando o mesmo balão que contém a primeira extracção.

A solução obtida no balão de extracção deve ser límpida. Se o não for, filtrá-la em papel filtro lavando várias vezes o primeiro balão e o papel filtro com hexano. Recolher o filtrado e o solvente de lavagem num segundo balão previamente seco e pesado com uma margem de 1 mg.

Eliminação do solvente e pesagem do extracto

Expulsar, por destilação sobre banho de aquecimento eléctrico, a maior parte do solvente. Eliminar os últimos vestígios de solvente aquecendo o balão na estufa a 103 °C ± 2 °C durante 20 minutos. Facilitar esta eliminação, quer insuflando ar de vez em quando ou de preferência um gás inerte, quer actuando sob pressão reduzida.

Deixar arrefecer o balão num dessecador durante pelo menos uma hora, e pesá-lo com uma margem de 1 mg.

Voltar a aquecer durante 10 minutos nas mesmas condições, arrefecer no dessecador e pesar.

A diferença entre os resultados destas duas pesagens deve ser inferior ou igual a 10 mg. Se não, voltar a aquecer durante períodos de dez minutos seguidos do arrefecimento e da pesagem, até que a diferença de massa seja no máximo igual a 10 mg. Ter em consideração a última pesagem do balão.

Efectuar duas determinações na mesma amostra para análise.

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Modo de cálculo e fórmula

a) O extracto expresso em percentagem em massa do produto tal como se apresenta é igual a:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_c}$$

em que: S é a percentagem em massa de extracto do produto tal como se apresenta,

m_c é a massa, em gramas, da tomada de ensaio,

m_1 é a massa, em gramas, do extracto após secagem.

Tomar como resultado a média aritmética das duas determinações, se as condições de repetibilidade estiverem preenchidas.

Exprimir o resultado com uma única decimal.

b) O extracto é reduzido à matéria seca utilizando a seguinte fórmula:

$$S \times \frac{100}{100-U} = \text{extracto em \% gordo/seco}$$

em que:

S é a percentagem em massa do extracto do produto tal como se apresenta (ver alínea a)),

U é o seu teor em água e em matérias voláteis.

Repetibilidade

A diferença entre os resultados das duas determinações, efectuadas simultaneamente ou rapidamente uma após a outras pelo mesmo analista, não deve ser superior a 0,2 g de extracto com hexano para 100 g de amostra.

No caso contrário, repetir a análise com outras duas tomadas de ensaio. Se ainda desta vez a diferença ultrapassar 0,2 g, tomar como resultado a média aritmética das quatro determinações efectuadas.