REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) N.º 299/2013 DA COMISSÃO

de 26 de março de 2013

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

A COMISSÃO EUROPEIA,

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

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

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 [2], define as características químicas e organolépticas dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como os métodos de avaliação dessas características. Esses métodos devem ser atualizados com base no parecer dos peritos químicos e em consonância com o trabalho realizado no Conselho Oleícola Internacional.

(2) Em conformidade com o artigo 113.º, n.º 3, do Regulamento (CE) n.º 1234/2007, compete aos Estados-Membros verificar se os azeites e os óleos de bagaço de azeitona respeitam as normas de comercialização estabelecidas no Regulamento (CEE) n.º 2568/91 e aplicar as sanções adequadas. Os artigos 2.º e 2.º-A do Regulamento (CEE) n.º 2568/91 estabelecem regras precisas para essas verificações de conformidade. Essas regras devem garantir que os azeites e os óleos de bagaço de azeitona respeitam, de facto, as normas de qualidade que se lhes aplicam. As regras em questão devem ser complementadas por uma análise de riscos. Importa definir o termo «azeite comercializado», para efeito das referidas verificações de conformidade.

(3) A experiência adquirida revela um certo risco de fraudes, que não permite tirar plenamente partido da proteção dos consumidores proporcionada pelo Regulamento (CEE) n.º 2568/91. Os detentores de azeite e de óleo de bagaço de azeitona devem, portanto, dispor de registos das entradas e saídas relativos a cada categoria de azeite ou de óleo de bagaço de azeitona. Para evitar burocracias excessivas, sem comprometer os objetivos do registo dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, a recolha de dados não deve ir além do estádio do engarrafamento do azeite ou do óleo de bagaço de azeitona.

(4) Para possibilitar o acompanhamento da aplicação do Regulamento (CEE) n.º 2568/91 e avaliar o resultado das medidas nele previstas, os Estados-Membros devem comunicar à Comissão as normas de execução nacionais e os resultados das verificações de conformidade.

(5) Para prosseguir o processo de harmonização com as normas internacionais do Conselho Oleícola Internacional, é necessário atualizar alguns métodos de análise estabelecidos no Regulamento (CEE) n.º 2568/91. Nessa perspetiva, deve substituir-se o método de análise estabelecido no anexo XVIII desse regulamento por um método mais eficiente. Há ainda que eliminar certas incoerências e imperfeições dos métodos de análise estabelecidos no anexo IX do mesmo regulamento.

(6) É necessário prever um período de transição para que os Estados-Membros possam aplicar as novas regras estabelecidas pelo presente regulamento.

(7) A Comissão desenvolveu, no seu funcionamento interno e nas suas relações com as autoridades intervenientes na política agrícola comum, um sistema de informação que permite gerir eletronicamente documentos e procedimentos. Considera-se que esse sistema permite cumprir as obrigações de comunicação a título do Regulamento (CEE) n.º 2568/91 em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 792/2009 da Comissão, de 31 de agosto de 2009, que estabelece normas pormenorizadas para a notificação pelos Estados-Membros à Comissão de informações e documentos, em aplicação da organização comum dos mercados, do regime dos pagamentos diretos, da promoção dos produtos agrícolas e dos regimes aplicáveis às regiões ultraperiféricas e às ilhas menores do mar Egeu [3].

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

(9) O Comité de Gestão para a Organização Comum dos Mercados Agrícolas não emitiu parecer no prazo fixado pelo seu presidente,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

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

1) O artigo 2.º-A passa a ter a seguinte redação:

«*Artigo 2.º-A*

1. Para efeitos do disposto no presente artigo, entende-se por "azeite comercializado" a quantidade de azeites e de óleos de bagaço de azeitona de um determinado Estado-Membro que nele é consumida ou dele é exportada.

[1] JO L 299 de 16.11.2007, p. 1.
[2] JO L 248 de 5.9.1991, p. 1.
[3] JO L 228 de 1.9.2009, p. 3.

2. Os Estados-Membros devem zelar por que as verificações de conformidade sejam efetuadas seletivamente, com base em análises de risco, e com a frequência adequada, a fim de garantir que o azeite comercializado corresponde à categoria declarada.

3. Podem constituir critério de avaliação do risco:

a) A categoria de azeite ou de óleo de bagaço de azeitona, o período de produção, o preço dos azeites ou dos óleos de bagaço de azeitona em relação ao de outros óleos vegetais, as operações de lotação e de embalamento, as instalações e condições de armazenagem, o país de origem, o país de destino, o meio de transporte e o volume do lote;

b) A posição do operador na cadeia de comercialização, o volume e/ou valor comercializado pelo operador, a gama de azeites e de óleos de bagaço de azeitona que o operador comercializa e o tipo de atividade em causa (extração, armazenagem, refinação, lotação, embalamento ou venda a retalho);

c) Conclusões de verificações anteriores, incluindo o número e o tipo de defeitos detetados, a qualidade habitual dos azeites comercializados e o desempenho do equipamento utilizado;

d) A fiabilidade dos sistemas de garantia de qualidade ou de autocontrolo dos operadores, relativos à conformidade com as normas de comercialização;

e) O local da verificação, nomeadamente se é o primeiro ponto de entrada na União, o último ponto de saída da União ou o local onde o azeite ou o óleo de bagaço de azeitona é produzido, embalado, carregado ou vendido ao consumidor final;

f) Qualquer outra informação suscetível de indiciar um risco de não-conformidade.

4. Os Estados-Membros devem estabelecer previamente:

a) Os critérios de avaliação do risco de não-conformidade dos lotes;

b) Com base numa análise de risco, para cada categoria de risco, o número mínimo de operadores ou lotes, e/ou as quantidades mínimas, a submeter à verificação de conformidade.

O número mínimo de verificações de conformidade a efetuar por milhar de toneladas de azeite comercializado no Estado-Membro é de uma por ano.

5. Para verificarem a conformidade, os Estados-Membros devem:

a) Efetuar, por qualquer ordem, as análises previstas no anexo I; ou

b) Seguir a ordem indicada no esquema de tomada de decisão do anexo I-B, até que seja possível tomar uma das decisões nele referidas.».

2) O artigo 3.º passa a ter a seguinte redação:

«Artigo 3.º

Caso se verifique que um azeite ou um óleo de bagaço de azeitona não corresponde à descrição da categoria alegada, o Estado-Membro em causa deve aplicar, sem prejuízo de outras sanções eventuais, sanções efetivas, proporcionadas e dissuasoras, a estabelecer em função da gravidade da irregularidade detetada.

Se as verificações revelarem irregularidades significativas, os Estados-Membros devem aumentar a frequência das verificações efetuadas em relação ao estádio de comercialização, à categoria de azeite ou de óleo de bagaço de azeitona, à origem dos mesmos ou a outros critérios.».

3) É inserido o artigo 7.º-A, com a seguinte redação:

«Artigo 7.º-A

As pessoas singulares ou coletivas e os agrupamentos que, para qualquer finalidade profissional ou comercial, detenham azeite ou óleo de bagaço de azeitona nalgum estádio compreendido entre a extração no lagar e o engarrafamento, inclusive, devem dispor de registos das entradas e saídas relativos a cada categoria de azeite ou de óleo de bagaço de azeitona.

Compete aos Estados-Membros assegurar que a obrigação estabelecida no primeiro parágrafo é devidamente cumprida.».

4) O artigo 8.º passa a ter a seguinte redação:

«Artigo 8.º

1. Compete a cada Estado-Membro comunicar à Comissão as medidas que tomar para dar execução ao presente regulamento e informar a Comissão das alterações eventuais dessas medidas.

2. Compete igualmente aos Estados-Membros transmitir anualmente à Comissão, até 31 de maio, um relatório sobre a execução do presente regulamento no ano anterior. Devem constar desse relatório, pelo menos, os resultados das verificações de conformidade efetuadas aos azeites e aos óleos de bagaço de azeitona, apresentadas de acordo com o modelo do anexo XXI.

3. As comunicações referidas no presente regulamento devem ser efetuadas em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 792/2009 da Comissão (*).

(*) JO L 228 de 1.9.2009, p. 3.».

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

6) O anexo XVIII é substituído pelo texto do anexo II do presente regulamento.

7) É aditado um novo anexo XXI, constituído pelo texto do anexo III do presente regulamento.

Artigo 2.º

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

O presente regulamento é aplicável a partir de 1 de janeiro de 2014. Todavia, o artigo 8.º, n.º 2, é aplicável com efeitos a partir de 1 de janeiro de 2015.

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

Feito em Bruxelas, em 26 de março de 2013.

Pela Comissão

O Presidente

José Manuel BARROSO

ANEXO I

«ANEXO IX

ANÁLISE POR ESPETROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA

INTRODUÇÃO

A análise espetrofotométrica no ultravioleta pode fornecer indicações sobre a qualidade de uma matéria gorda, o estado de conservação desta e as modificações devidas aos processos tecnológicos a que foi sujeita.

As absorvâncias nos comprimentos de onda especificados no método são devidas à presença de sistemas diénicos e triénicos conjugados. Os valores destas absorvâncias são expressos em termos de extinção específica, $E^{1\,\%}_{1\ cm}$ (extinção de uma solução a 1 % da matéria gorda no solvente prescrito, num percurso ótico de 1 cm), convencionalmente designada por K (coeficiente de extinção).

1. OBJETIVO

O método descreve o processo de realização de análises espetrofotométricas no ultravioleta aos azeites e óleos de bagaço de azeitona indicados no apêndice.

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Dissolve-se a matéria gorda em estudo no solvente estabelecido e determina-se a extinção da solução em relação ao solvente puro, nos comprimentos de onda prescritos. Calculam-se as extinções específicas a partir das leituras espetrofotométricas. Calcula-se a absorvância específica a 232 nm e 268 nm em iso-octano ou a 232 nm e 270 nm em ciclo-hexano, à concentração de 1 g por 100 ml, numa célula de 10 mm.

3. APARELHOS E UTENSÍLIOS

3.1. Espetrofotómetro para medição de extinções no ultravioleta, entre 220 nm e 360 nm, com possibilidade de leitura por unidade nanométrica. Antes da utilização, recomenda-se a verificação, como se indica a seguir, das escalas de comprimento de onda e de absorvância do espetrómetro.

3.1.1. *Escala de comprimento de onda:* Esta verificação pode ser efetuada com material de referência constituído por um filtro ótico de vidro dopado com óxido de hólmio, que possui bandas de absorção distintas. Este material de referência foi concebido para a verificação e calibração das escalas de comprimento de onda de espetrofotómetros do visível e do ultravioleta com largura de banda espetral nominal igual ou inferior a 5 nm. Efetuam-se as medições com o filtro de vidro dopado com óxido de hólmio, no modo de absorvância, em relação a um branco de ar, no intervalo de comprimentos de onda compreendidos entre 640 nm e 240 nm. Para cada largura de banda espetral (0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,00 – 1,50 – 2,00 e 3,00), corrige-se a linha de base com o porta-célula vazio. Os comprimentos de onda correspondentes às diversas larguras de banda espetral figuram no certificado do material de referência a que se refere a norma ISO 3656.

3.1.2. *Escala de absorvância:* Esta verificação pode ser efetuada utilizando um material de referência constituído por quatro soluções de dicromato de potássio em ácido perclórico, seladas em quatro células de quartzo para UV, para medir a linearidade e a exatidão fotométrica de referência no ultravioleta. Efetuam-se as medições com as células cheias de solução de dicromato de potássio (40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml e 100 mg/ml), em relação a um branco de ácido perclórico. Os valores assim corrigidos da absorvância figuram no certificado do material de referência a que se refere a norma ISO 3656.

3.2. Células retangulares de quartzo, com tampa, com percurso ótico de 1 cm. Não devem apresentar diferenças entre elas superiores a 0,01 unidades de extinção nas leituras efetuadas com água ou outro solvente apropriado.

3.3. Balões aferidos de 25 ml.

3.4. Balança analítica com a aproximação de 0,0001 g.

4. REAGENTES

Salvo indicação em contrário, utilizar unicamente reagentes de qualidade analítica reconhecida.

Solventes: iso-octano (2,2,4-trimetilpentano), para as medições a 232 nm e 268 nm, ou ciclo-hexano, para as medições a 232 nm e 270 nm, de absorvância inferior a 0,12 a 232 nm e inferior a 0,05 a 250 nm, comparativamente a água destilada, medidas numa célula de 10 mm.

5. TÉCNICA

5.1. A amostra a analisar deve estar perfeitamente homogénea e isenta de impurezas em suspensão. Os óleos (líquidos à temperatura ambiente) filtram-se com papel de filtro a uma temperatura próxima de 30 °C; as gorduras (sólidas) homogeneízam-se e filtram-se a uma temperatura não superior a 10 °C acima da sua temperatura de fusão.

5.2. Pesa-se rigorosamente, num balão aferido de 25 ml, com a aproximação de 1 mg, cerca de 0,25 g da amostra, preparada de acordo com o ponto anterior, completando o volume com o solvente prescrito e homogeneizando. Deve obter-se uma solução perfeitamente límpida. No caso de a solução apresentar opalescência ou turvação, filtra-se rapidamente com papel de filtro.

5.3. Enche-se uma célula de quartzo com a solução obtida e medem-se as extinções, usando como referência o solvente utilizado, num comprimento de onda adequado compreendido entre 232 nm e 276 nm.

Os valores de extinção registados devem estar compreendidos entre 0,1 e 0,8. Caso contrário, repetem-se as medições utilizando soluções mais concentradas ou mais diluídas, consoante o caso.

NOTA: Pode não ser necessário medir a absorvância em todo o intervalo de comprimentos de onda.

6. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

6.1. As extinções específicas (coeficientes de extinção) registadas nos diversos comprimentos de onda calculam-se pela seguinte fórmula:

$$K_\lambda = \left(\frac{E_\lambda}{c \cdot s} \right)$$

em que:

K_λ = extinção específica no comprimento de onda λ,

E_λ = extinção medida no comprimento de onda λ,

c = concentração da solução, em g/100 ml,

s = espessura das células de quartzo, em cm.

Os resultados são arredondados às centésimas.

6.2. **Variação da extinção específica (ΔK)**

A análise espetrofotométrica dos azeites e óleos de bagaço de azeitona de acordo com o método oficial previsto na legislação da União compreende igualmente a determinação da variação do valor absoluto da extinção específica (ΔK), dada por:

$$\Delta K = |K_m - \left(\frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2} \right)|$$

em que K_m representa a extinção específica no comprimento de onda m, dependendo este comprimento de onda de absorção máxima do solvente utilizado (270 nm no caso do ciclo-hexano e 268 nm no caso do iso-octano).

Apêndice

CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES E ÓLEOS DE BAGAÇO DE AZEITONA

	Categoria	Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) e ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxidos mEq 02/kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadieno mg/kg (1)	Diferença entre o NCE42 determinado por HPLC e NCE42 obtdo por cálculo teórico	K_{232} (*)	K_{270} (*) 'K 270 ou K 268 (5)'	Delta-K(*) (5)	Exame organolético Mediana dos defeitos (Md) (*)	Exame organolético Mediana do frutado (Mf) (*)
1.	Azeite virgem extra	Σ FAME + FAEE ≤75 mg/kg ou 75 mg/kg <Σ FAME + FAEE ≤150 mg/kg e (FAEE/FAME) ≤1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 % 1,0 se % de ácido palmítico total > 14%	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2.	Azeite virgem	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14% ≤ 1,0 se % de ácido palmítico total > 14%	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
3.	Azeite lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % de ácido palmítico total > 14%	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
4.	Azeite refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % de ácido palmítico total > 14%	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5.	Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 se % de ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % de ácido palmítico total > 14%	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6.	Óleo de bagaço de azeitona bruto	—	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7.	Óleo de bagaço de azeitona refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8.	Óleo de bagaço de azeitona		≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Soma dos isómeros, separáveis ou não em coluna capilar.
(2) Ou quando a mediana dos defeitos for inferior ou igual a 3.5 e a mediana do frutado igual a 0.
(3) Os azeites cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300mg/kg e 350 mg/kg são considerados azeite lampante se o teor de álcoois alifáticos totais for inferior ou igual a 350 mg/kg ou se a percentagem de eritrodiol e uvaol for inferior ou igual a 3,5%.
(4) Os óleos cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300mg/kg e 350 mg/kg são considerados óleo de bagaço de azeitona bruto se o teor de álcoois alifáticos totais for superior a 350 mg/kg e se a percentagem de eritrodiol e uvaol for superior a 3,5%.
(5) K 270 if solvant is cyclohexane, K 268 if solvant is iso octane.»

ANEXO II

«ANEXO XVIII

DETERMINAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE O TEOR REAL E O TEOR TEÓRICO DE TRIACILGLICERÓIS COM NCE42

1. OBJETIVO

Determinação da diferença absoluta entre os valores experimentais de triacilgliceróis com número de átomos de carbono equivalente 42, determinados no azeite ou óleo por cromatografia de alta eficiência em fase líquida ($NCE42_{HPLC}$), e o valor teórico de triacilgliceróis com número de átomos de carbono equivalente 42 ($NCE42_{teórico}$), calculado a partir da composição de ácidos gordos.

2. DOMÍNIO DE APLICAÇÃO

O presente método é aplicável aos azeites e óleos de bagaço de azeitona. O método é aplicável à pesquisa de pequenas quantidades de óleos de sementes (ricos em ácido linoleico) em todas as categorias de azeites e óleos de bagaço de azeitona.

3. PRINCÍPIO

Nos azeites e óleos de bagaço de azeitona genuínos, o teor de triacilgliceróis com NCE42 determinado por HPLC e o teor teórico de triacilgliceróis com NCE42 (calculado a partir da composição de ácidos gordos determinada por cromatografia gás-líquido) equivalem-se, dentro de certos limites. Diferenças superiores às adotadas para cada categoria de azeite ou óleo de bagaço de azeitona indicam que o azeite ou óleo de bagaço de azeitona em questão contém óleos de sementes.

4. MÉTODO

O método de cálculo do teor teórico de triacilgliceróis com NCE42 e da diferença entre este e o valor obtido por HPLC assenta essencialmente na coordenação de dados analíticos obtidos por outros métodos. Podem distinguir-se três etapas: determinação da composição de ácidos gordos por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar; cálculo da composição teórica de triacilgliceróis com NCE42; determinação do teor de triacilgliceróis com NCE42 por HPLC.

4.1. **Aparelhos e utensílios**

4.1.1. Balões de fundo redondo de 250 ml e 500 ml.

4.1.2. Copos de 100 ml.

4.1.3. Coluna de vidro para cromatografia com 21 mm de diâmetro interno, 450 mm de comprimento, torneira e extremidade superior cónica (fêmea) normalizada.

4.1.4. Funis separadores de 250 ml com extremidade inferior cónica (macho) normalizada, adaptável à parte superior da coluna.

4.1.5. Vareta de vidro com 600 mm de comprimento.

4.1.6. Funil de vidro com 80 mm de diâmetro.

4.1.7. Balões aferidos de 50 ml.

4.1.8. Balões aferidos de 20 ml.

4.1.9. Evaporador rotativo.

4.1.10. Cromatógrafo de HPLC com controlo termostático da temperatura da coluna.

4.1.11. Seringas de injeção para tomas de 10 µl.

4.1.12. Detetor: refratómetro diferencial. A sensibilidade mínima é de 10^{-4} unidades de índice de refração em toda a escala.

4.1.13. Coluna: tubo de aço inoxidável de 250 mm de comprimento e 4,5 mm de diâmetro interno com um enchimento de partículas de sílica de 5 µm de diâmetro e 22 % a 23 % de carbono, na forma de octadecilsilano.

4.1.14. *Software* de tratamento de dados.

4.1.15. Frasquinhos com cerca de 2 ml, tampa de enroscar e septo revestido de Teflon.

4.2. **Reagentes**

Os reagentes devem ser de qualidade analítica. Os solventes de eluição devem estar isentos de gases e podem ser reutilizados várias vezes sem prejuízo para as separações.

4.2.1. Éter de petróleo, 40 °C-60 °C, para cromatografia ou hexano.

4.2.2. Éter etílico destilado recentemente, isento de peróxidos.

4.2.3. Solvente de eluição para purificação do azeite, ou óleo, por cromatografia em coluna: mistura a 87:13 (v/v) de éter de petróleo e éter etílico.

4.2.4. Sílica-gel com granulometria de 70 a 230 mesh, tipo Merck 7734, com teor de água normalizado de 5 % (m/m).

4.2.5. Fibra de vidro.

4.2.6. Acetona para HPLC.

4.2.7. Acetonitrilo ou propionitrilo para HPLC.

4.2.8. Solvente de eluição para HPLC: mistura de acetonitrilo e acetona numa proporção a ajustar consoante a separação pretendida (começar com uma mistura 50:50) ou propionitrilo.

4.2.9. Solvente de solubilização: acetona.

4.2.10. Triacilgliceróis de referência: podem utilizar-se triacilgliceróis existentes no mercado (tripalmitina, trioleína, etc.), caso em que os tempos de retenção serão representados em função do número de átomos de carbono equivalente, ou, em alternativa, cromatogramas de referência obtidos para o óleo de soja, para uma mistura 30:70 de óleo de soja e azeite e para azeite puro (ver as notas 1 e 2 e as figuras 1 a 4).

4.2.11. Coluna de extração de fase sólida com 1 g de fase de sílica e volume de 6 ml.

4.3. **Preparação das amostras**

Dado que há várias substâncias interferentes que podem gerar falsos positivos, as amostras devem ser sempre purificadas de acordo com o método IUPAC 2507, utilizado na determinação de compostos polares em gorduras de fritura.

4.3.1. *Preparação da coluna cromatográfica*

Encher a coluna (4.1.3) com cerca de 30 ml de solvente de eluição (4.2.3). Introduzir um pouco de fibra de vidro (4.2.5), empurrando-a até ao fundo da coluna com a vareta (4.1.5).

Preparar, num copo de 100 ml, uma suspensão de 25 g de sílica-gel (4.2.4) em 80 ml da mistura de eluição (4.2.3). Transferir a suspensão para a coluna utilizando o funil de vidro (4.1.6).

Para garantir a transferência completa do sílica-gel para a coluna, lavar várias vezes o copo com a mistura de eluição e transferir o líquido de lavagem para a coluna.

Abrir a torneira da coluna e deixar escoar o solvente de eluição até que o nível deste desça até 1 cm acima do leito de sílica-gel.

4.3.2. *Cromatografia em coluna*

Num balão aferido de 50 ml (4.1.7), pesar, com a aproximação de 0,001 g, 2,5 g ± 0,1 g de azeite ou óleo filtrado, homogeneizado e, se necessário, desidratado.

Diluir com cerca de 20 ml de solvente de eluição (4.2.3). Se necessário, aquecer ligeiramente para facilitar a dissolução. Arrefecer até à temperatura ambiente e completar o volume com solvente de eluição.

Com uma pipeta aferida, introduzir 20 ml desta solução na coluna preparada conforme descrito no ponto 4.3.1. Abrir a torneira e eluir o solvente até atingir o nível do enchimento de sílica-gel.

Proceder em seguida a uma eluição com 150 ml de solvente (4.2.3), regulando o caudal para aproximadamente 2 ml/minuto (de modo que os 150 ml passem pela coluna em 60 a 70 minutos).

Recolher o eluído num balão de fundo redondo de 250 ml (4.1.1), previamente tarado em estufa, e pesar com exatidão. Eliminar o solvente a pressão reduzida num evaporador rotativo (4.1.9) e pesar o resíduo, com o qual se preparará a solução destinada à análise por HPLC e à preparação dos ésteres metílicos.

No caso das categorias azeite virgem extra, azeite virgem, azeite comum, azeite refinado e azeite, a recuperação da amostra depois da passagem na coluna deve ser, pelo menos, de 90 %; no caso do azeite lampante e dos óleos de bagaço de azeitona, deve ser, no mínimo, de 80 %.

4.3.3. *Purificação por extração em fase sólida*

Ativar a coluna de extração em fase sólida com enchimento de sílica passando, sob vácuo, 6 ml de hexano (4.2.3), tendo o cuidado de evitar a secagem.

Pesar 0,12 g, com a aproximação de 0,001 g, num frasquinho de 2 ml (4.1.15), e dissolver com 0,5 ml de hexano (4.2.3).

Transferir esta solução para a coluna de extração em fase sólida e eluir sob vácuo com 10 ml de mistura a 87:13 (v/v) de hexano e éter dietílico (4.2.3).

Evaporar a fração recolhida até à secura, num evaporador rotativo (4.1.9), sob pressão reduzida, à temperatura ambiente. Dissolver o resíduo em 2 ml de acetona (4.2.6), para a análise dos triacilgliceróis.

4.4. **Análise por HPLC**

4.4.1. *Preparação das amostras para a análise cromatográfica*

Preparar uma solução a 5 % da amostra a analisar pesando uma toma de 0,5 g ± 0,001 g da mesma num balão aferido de 10 ml e completando o volume até 10 ml com o solvente de solubilização (4.2.9).

4.4.2. *Técnica*

Preparar o sistema cromatográfico para ser utilizado. Proceder à sua purga total por bombagem de solvente de eluição (4.2.8) ao caudal de 1,5 ml/minuto. Aguardar até ser obtida uma linha de base estável.

Injetar 10 µl de amostra, preparada conforme descrito no ponto 4.3.

4.4.3. *Cálculos e expressão dos resultados*

Utilizar o método da normalização das áreas dos picos, isto é, considerar que a soma das áreas dos picos correspondentes aos triacilgliceróis com NCE42 a NCE52 é igual a 100 %.

A percentagem relativa de cada triacilglicerol calcula-se pela seguinte fórmula:

% do triacilglicerol = área do pico × 100/soma das áreas dos picos

Os resultados devem ter, pelo menos, duas casas decimais.

Ver as notas 1 e 4.

4.5. **Cálculo da composição de triacilgliceróis (percentagem molar) a partir dos dados obtidos para a composição de ácidos gordos (percentagem correspondente a cada área)**

4.5.1. *Determinação da composição de ácidos gordos*

Determina-se a composição de ácidos gordos com base na norma ISO 5508, utilizando uma coluna capilar e preparando os ésteres metílicos de acordo com o COI/T.20/Doc. No 24.

4.5.2. *Ácidos gordos tidos em conta nos cálculos*

Agrupam-se os acilgliceróis em função do número de átomos de carbono equivalente (NCE), com base nas equivalências entre este parâmetro e os ácidos gordos a seguir indicadas. Só são tidos em conta os ácidos gordos com 16 ou 18 átomos de carbono, os únicos com interesse no caso dos azeites e óleos de bagaço de azeitona. Normalizam-se estes ácidos gordos a 100 %.

Ácido gordo	Abreviatura	Peso molecular (PM)	NCE
Ácido palmítico	P	256,4	16
Ácido palmitoleico	Po	254,4	14
Ácido esteárico	S	284,5	18
Ácido oleico	O	282,5	16
Ácido linoleico	L	280,4	14
Ácido linolénico	Ln	278,4	12

4.5.3. *Conversão em moles da percentagem correspondente a cada área para todos os ácidos gordos (1)*

$$\text{moles de P} = \frac{\%\text{ da área de P}}{\text{PM de P}} \qquad \text{moles de S} = \frac{\%\text{ da área de S}}{\text{PM de S}} \qquad \text{moles de Po} = \frac{\%\text{ da área de Po}}{\text{PM de Po}}$$

$$\text{moles de O} = \frac{\%\text{ da área de O}}{\text{PM de O}} \qquad \text{moles de L} = \frac{\%\text{ da área de L}}{\text{PM de L}} \qquad \text{moles de Ln} = \frac{\%\text{ da área de Ln}}{\text{PM de Ln}}$$

4.5.4. *Normalização das moles de ácidos gordos a 100 % (2)*

$$\%\ \text{molar de P}\ (1,2,3) = \frac{\text{moles de P} * 100}{\text{moles de (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\%\ \text{molar de S}\ (1,2,3) = \frac{\text{moles de S} * 100}{\text{moles de (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\%\ \text{molar de Po}\ (1,2,3) = \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles de (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\%\ \text{molar de O}\ (1,2,3) = \frac{\text{moles de O} * 100}{\text{moles de (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\%\ \text{molar de L}\ (1,2,3) = \frac{\text{moles de L} * 100}{\text{moles de (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\%\ \text{molar de Ln}\ (1,2,3) = \frac{\text{moles de Ln} * 100}{\text{moles de (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

O resultado indica a percentagem molar de cada ácido gordo em todas as posições (1, 2 e 3) dos triacilgliceróis.

Calcula-se a seguir o somatório dos ácidos gordos saturados P e S (AGS) e dos ácidos gordos insaturados Po, O, L e Ln (AGI) (3):

% molar de AGS = % molar de P + % molar de S

% molar de AGI = 100 - % molar de AGS

4.5.5. *Cálculo da composição de ácidos gordos na posição 2 e nas posições 1 e 3 dos triacilgliceróis*

Distribuem-se os ácidos gordos por três grupos do seguinte modo: um grupo para a posição 2 e dois grupos idênticos para as posições 1 e 3, com coeficientes diferentes para os ácidos saturados (P e S) e insaturados (Po, O, L e Ln).

4.5.5.1. Ácidos gordos saturados na posição 2 [P(2) e S(2)] (4):

% molar de P(2) = molar de P (1,2,3) * 0,06

% molar de S(2) = % molar de S (1,2,3) * 0,06

4.5.5.2. Ácidos gordos insaturados na posição 2 [Po(2), O(2), L(2) e Ln(2)] (5):

$$\%\ \text{molar de Po}(2) = \frac{\%\ \text{molar de Po}(1,2,3)}{\%\ \text{molar de AGI}} * (100 - \%\ \text{molar de P}(2) - \%\ \text{molar de S}(2))$$

$$\%\ \text{molar de O}(2) = \frac{\%\ \text{molar de O}(1,2,3)}{\%\ \text{molar de AGI}} * (100 - \%\ \text{molar de P}(2) - \%\ \text{molar de S}(2))$$

$$\%\ \text{molar de L}(2) = \frac{\%\ \text{molar de L}(1,2,3)}{\%\ \text{molar de AGI}} * (100 - \%\ \text{molar de P}(2) - \%\ \text{molar de S}(2))$$

$$\%\ \text{molar de Ln}(2) = \frac{\%\ \text{molar de Ln}(1,2,3)}{\%\ \text{molar de AGI}} * (100 - \%\ \text{molar de P}(2) - \%\ \text{molar de S}(2))$$

4.5.5.3. Ácidos gordos nas posições 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)] (6):

$$\%\ \text{molar de P}(1,3) = \frac{\%\ \text{molar de P}(1,2,3) - \%\ \text{molar de P}(2)}{2} + \%\ \text{molar de P}(1,2,3)$$

$$\%\ \text{molar de S}(1,3) = \frac{\%\ \text{molar de S}(1,2,3) - \%\ \text{molar de S}(2)}{2} + \%\ \text{molar de S}(1,2,3)$$

$$\%\ \text{molar de Po}(1,3) = \frac{\%\ \text{molar de Po}(1,2,3) - \%\ \text{molar de Po}(2)}{2} + \%\ \text{molar de Po}(1,2,3)$$

$$\%\ \text{molar de O}(1,3) = \frac{\%\ \text{molar de O}(1,2,3) - \%\ \text{molar de O}(2)}{2} + \%\ \text{molar de O}(1,2,3)$$

$$\%\ \text{molar de L}(1,3) = \frac{\%\ \text{molar de L}(1,2,3) - \%\ \text{molar de L}(2)}{2} + \%\ \text{molar de L}(1,2,3)$$

$$\%\ \text{molar de Ln}(1,3) = \frac{\%\ \text{molar de Ln}(1,2,3) - \%\ \text{molar de Ln}(2)}{2} + \%\ \text{molar de Ln}(1,2,3)$$

4.5.6. *Cálculos relativos aos triacilgliceróis*

4.5.6.1. Triacilgliceróis com um único ácido gordo (AAA, neste caso LLL, PoPoPo) (7)

$$\%\ \text{molar de AAA} = \frac{\%\ \text{molar de A}(1,3) * \%\ \text{molar de A}(2) * \%\ \text{molar de A}(1,3)}{10\,000}$$

4.5.6.2. Triacilgliceróis com dois ácidos gordos diferentes (AAB, neste caso PoPoL, PoLL) (8)

$$\%\ \text{molar de AAB} = \frac{\%\ \text{molar de A}(1,3) * \%\ \text{molar de A}(2) * \%\ \text{molar de B}(1,3) * 2}{10\,000}$$

$$\%\ \text{molar de ABA} = \frac{\%\ \text{molar de A}(1,3) * \%\ \text{molar de B}(2) * \%\ \text{molar de A}(1,3)}{10\,000}$$

4.5.6.3. Triacilgliceróis com três ácidos gordos diferentes (ABC, neste caso OLLn, PLLn, PoOLn, PPoLn) (9)

$$\%\ \text{molar de ABC} = \frac{\%\ \text{molar de A}(1,3) * \%\ \text{molar de B}(2) * \%\ \text{molar de C}(1,3) * 2}{10\,000}$$

$$\%\ \text{molar de BCA} = \frac{\%\ \text{molar de B}(1,3) * \%\ \text{molar de C}(2) * \%\ \text{molar de A}(1,3) * 2}{10\,000}$$

$$\%\ \text{molar de CAB} = \frac{\%\ \text{molar de C}(1,3) * \%\ \text{molar de A}(2) * \%\ \text{molar de B}(1,3) * 2}{10\,000}$$

4.5.6.4. Triacilgliceróis com NCE42

Efetuam-se os cálculos relativos aos triacilgliceróis seguintes com NCE42 aplicando as equações 7, 8 e 9; apresentam-se os resultados correspondentes pela ordem de eluição esperada em HPLC (normalmente, evidenciam-se apenas três picos).

LLL

PoLL e o isómero posicional LPoL

OLLn e os isómeros posicionais OLnL e LnOL

PoPoL e o isómero posicional PoLPo

PoOLn e os isómeros posicionais OPoLn e OLnPo

PLLn e os isómeros posicionais LLnP e LnPL

PoPoPo

SLnLn e o isómero posicional LnSLn

PPoLn e os isómeros posicionais PLnPo e PoPLn

Os triacilgliceróis com NCE42 são dados pelo somatório dos nove triacilgliceróis acima indicados, incluindo os respetivos isómeros posicionais. Os resultados devem ter, pelo menos, duas casas decimais.

5. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Compara-se o teor teórico calculado com o teor determinado por HPLC. Se o valor absoluto da diferença "teor determinado por HPLC – teor teórico calculado" exceder os valores indicados na norma para a categoria de azeite ou óleo de bagaço de azeitona em questão, conclui-se que a amostra contém óleos de sementes.

Os resultados apresentam-se com duas casas decimais.

6. EXEMPLO (OS NÚMEROS DOS PONTOS CORRESPONDEM AOS DO TEXTO DESCRITIVO DO MÉTODO)

— 4.5.1. *Cálculo da percentagem molar dos ácidos gordos a partir de dados de cromatografia gás-líquido (percentagem normalizada correspondente a cada área)*

Pelo método de cromatografia gás-líquido, obtiveram-se os dados seguintes para a composição de ácidos gordos:

Ácido gordo	P	S	Po	O	L	Ln
PM	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
% correspondente a cada área	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

— 4.5.3 *Conversão, em moles, da percentagem correspondente a cada área para todos os ácidos gordos (ver a fórmula 1)*

$$\text{moles de P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles de P}$$

$$\text{moles de S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles de S}$$

$$\text{moles de Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles de Po}$$

$$\text{moles de O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles de O}$$

$$\text{moles de L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles de L}$$

$$\text{moles de Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ moles de Ln}$$

Total = 0,35821 moles de triacilgliceróis

— 4.5.4 *Normalização das moles de ácidos gordos a 100 % (ver a fórmula 2)*

$$\text{\% molar de P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles de P} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 10,887 \text{ \%}$$

$$\text{\% molar de S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles de S} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 2,942 \text{ \%}$$

$$\text{\% molar de Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles de Po} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,097 \text{ \%}$$

$$\text{\% molar de O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles de O} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 74,116 \text{ \%}$$

$$\text{\% molar de L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles de L} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 9,955 \text{ \%}$$

$$\text{\% molar de Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles de Ln} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,002 \text{ \%}$$

Total da percentagem molar = 100 %

Somatório dos ácidos gordos saturados e insaturados nas posições 1, 2 e 3 dos triacilgliceróis (ver a fórmula 3):

% molar de AGS = 10,887 % + 2,942 % = **13,829 %**

% molar de AGI = 100,000 % - 13,829 % = **86,171 %**

— 4.5.5. *Cálculo da composição de ácidos gordos na posição 2 e nas posições 1 e 3 dos triacilgliceróis*

— 4.5.5.1 Ácidos gordos saturados na posição 2 [P(2) e S(2)] (ver a fórmula 4)

% molar de P(2) = 10,887 % * 0,06 = 0,653 %

% molar de S(2) = 2,942 % * 0,06 = 0,177 %

— 4.5.5.2 Ácidos gordos insaturados na posição 2 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)] (ver a fórmula 5)

$$\%\ \text{molar de Po}(2) = \frac{1{,}097\ \%}{86{,}171\ \%} * (100 - 0{,}653 - 0{,}177) = 1{,}262\ \%$$

$$\%\ \text{molar de O}(2) = \frac{74{,}116\ \%}{86{,}171\ \%} * (100 - 0{,}653 - 0{,}177) = 85{,}296\ \%$$

$$\%\ \text{molar de L}(2) = \frac{9{,}955\ \%}{86{,}171\ \%} * (100 - 0{,}653 - 0{,}177) = 11{,}457\ \%$$

$$\%\ \text{molar de Ln}(2) = \frac{1{,}002\ \%}{86{,}171\ \%} * (100 - 0{,}653 - 0{,}177) = 1{,}153\ \%$$

— 4.5.5.3 Ácidos gordos nas posições 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)] (ver a fórmula 6)

$$\%\ \text{molar de P}(1,3) = \frac{10{,}887 - 0{,}653}{2} + 10{,}887 = 16{,}004\ \%$$

$$\%\ \text{molar de S}(1,3) = \frac{2{,}942 - 0{,}177}{2} + 2{,}942 = 4{,}325\ \%$$

$$\%\ \text{molar de Po}(1,3) = \frac{1{,}097 - 1{,}262}{2} + 1{,}097 = 1{,}015\ \%$$

$$\%\ \text{molar de O}(1,3) = \frac{74{,}116 - 85{,}296}{2} + 74{,}116 = 68{,}526\ \%$$

$$\%\ \text{molar de L}(1,3) = \frac{9{,}955 - 11{,}457}{2} + 9{,}955 = 9{,}204\ \%$$

$$\%\ \text{molar de Ln}(1,3) = \frac{1{,}002 - 1{,}153}{2} + 1{,}002 = 0{,}927\ \%$$

— 4.5.6. *Cálculos relativos aos triacilgliceróis*

A partir da composição calculada de ácidos gordos na posição 2 e nas posições 1 e 3:

Ácido gordo	nas posições 1 e 3	na posição 2
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Somatório	100,0 %	100,0 %

procede-se aos cálculos relativos aos seguintes triacilgliceróis:

LLL

PoPoPo

PoLL com um isómero posicional

SLnLn com um isómero posicional

PoPoL com um isómero posicional

PPoLn com dois isómeros posicionais

OLLn com dois isómeros posicionais

PLLn com dois isómeros posicionais

PoOLn com dois isómeros posicionais.

— 4.5.6.1 Triacilgliceróis com um único ácido gordo (LLL, PoPoPo) (ver a fórmula 7)

$$\%\ \text{molar de LLL} = \frac{9{,}204\ \% * 11{,}457\ \% * 9{,}204\ \%}{10\,000} = \mathbf{0{,}09706\ \ \%}$$

$$\%\ \text{molar de PoPoPo} = \frac{1{,}015\ \% * 1{,}262\ \% * 1{,}015\ \%}{10\,000} = \mathbf{0{,}00013\ \ \%}$$

— 4.5.6.2 Triacilgliceróis com dois ácidos gordos diferentes (PoLL, SLnLn, PoPoL) (ver a fórmula 8)

$$\%\ \text{molar de PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1{,}015\ \% * 11{,}457\ \% * 9{,}204\ \% * 2}{10\,000} = 0{,}02141\ \%$$

$$\%\ \text{molar de LPoL} = \frac{9{,}204\ \% * 1{,}262\ \% * 9{,}204\ \%}{10\,000} = 0{,}01069\ \%$$

0,03210 % de moles de PoLL

$$\%\ \text{molar de SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4{,}325\ \% * 1{,}153\ \% * 0{,}927\ \% * 2}{10\,000} = 0{,}00092\ \%$$

$$\%\ \text{molar de LnSLn} = \frac{0{,}927\ \% * 0{,}177\ \% * 0{,}927\ \%}{10\,000} = 0{,}00002\ \%$$

0,00094 % de moles de SLnLn

$$\%\ \text{molar de PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1{,}015\ \% * 1{,}262\ \% * 9{,}204\ \% * 2}{10\,000} = 0{,}00236\ \%$$

$$\%\ \text{molar de PoLPo} = \frac{1{,}015\ \% * 11{,}457\ \% * 1{,}015\ \%}{10\,000} = 0{,}00118\ \%$$

0,00354 % de moles de PoPoL

— 4.5.6.3 Triacilgliceróis com três ácidos gordos diferentes (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) (ver a fórmula 9)

$$\%\ \text{molar de PPoLn} = \frac{16{,}004\ \% * 1{,}262\ \% * 0{,}927\ \% * 2}{10\,000} = 0{,}00374\ \%$$

$$\%\ \text{molar de LnPPo} = \frac{0{,}927\ \% * 0{,}653\ \% * 1{,}015\ \% * 2}{10\,000} = 0{,}00012\ \%$$

$$\%\ \text{molar de PoLnP} = \frac{1{,}015\ \% * 1{,}153\ \% * 16{,}004\ \% * 2}{10\,000} = 0{,}00375\ \%$$

0,00761 % de moles de PPoLn

$$\%\ \text{molar de OLLn} = \frac{68{,}526\ \% * 11{,}457\ \% * 0{,}927\ \% * 2}{10\,000} = 0{,}14556\ \%$$

$$\%\ \text{molar de LnOL} = \frac{0{,}927\ \% * 85{,}296\ \% * 9{,}204\ \% * 2}{10\,000} = 0{,}14555\ \%$$

$$\%\ \text{molar de LLnO} = \frac{9{,}204\ \% * 1{,}153\ \% * 68{,}526\ \% * 2}{10\,000} = 0{,}14544\ \%$$

0,43655 % de moles de OLLn

$$\%\ \text{molar de PLLn} = \frac{16{,}004\ \% * 11{,}457\ \% * 0{,}927\ \% * 2}{10\ 000} = 0{,}03399\ \%$$

$$\%\ \text{molar de LnPL} = \frac{0{,}927\ \% * 0{,}653\ \% * 9{,}204\ \% * 2}{10\ 000} = 0{,}00111\ \%$$

$$\%\ \text{molar de LLnP} = \frac{9{,}204\ \% * 1{,}153\ \% * 16{,}004\ \% * 2}{10\ 000} = 0{,}03397\ \%$$

0,06907 % de moles de PLLn

$$\%\ \text{molar de PoOLn} = \frac{1{,}015\ \% * 85{,}296\ \% * 0{,}927\ \% * 2}{10\ 000} = 0{,}01605\ \%$$

$$\%\ \text{molar de LnPoO} = \frac{0{,}927\ \% * 1{,}262\ \% * 68{,}526\ \% * 2}{10\ 000} = 0{,}01603\ \%$$

$$\%\ \text{molar de OLnPo} = \frac{68{,}526\ \% * 1{,}153\ \% * 1{,}015\ \% * 2}{10\ 000} = 0{,}01604\ \%$$

0,04812 % de moles de PoOLn

NCE42 = 0,69512 % de moles de triacilgliceróis

Nota 1: A ordem de eluição pode determinar-se calculando o número de átomos de carbono equivalente (NCE), normalmente definido pela relação NCE = NC − 2n, em que NC representa o número de átomos de carbono e n o número de ligações duplas (pode ser calculado com maior precisão tendo em conta a origem das ligações duplas). Se n_o, n_l e n_{ln} representarem o número de ligações duplas atribuído, respetivamente, aos ácidos oleico, linoleico e linolénico, o número de átomos de carbono equivalente pode calcular-se pela seguinte fórmula:

$$NE = NC - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

na qual os coeficientes d_o, d_l e d_{ln} podem ser calculados a partir dos triacilgliceróis de referência. Nas condições especificadas no presente método, a relação obtida deve aproximar-se da seguinte:

$$NCE = NC - (2{,}60\ n_o) - (2{,}35\ n_l) - (2{,}17\ n_{ln})$$

Nota 2: Com vários triacilgliceróis de referência, também é possível calcular a resolução relativamente à trioleína:

$$\alpha = TR^1/TR\ \text{trioleína}$$

utilizando para o efeito o tempo de retenção reduzido, TR^1 = TR − TR solvente.

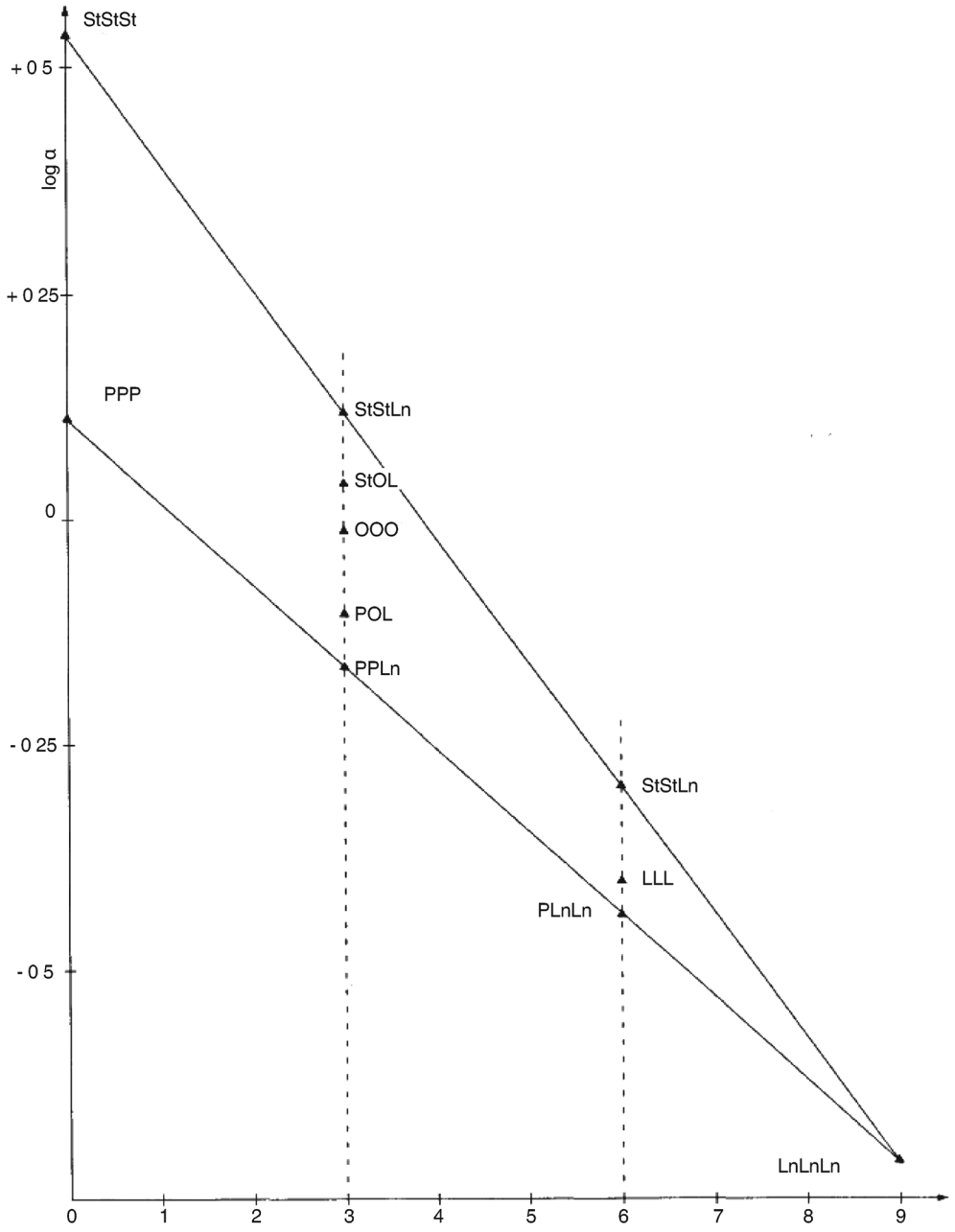
A representação gráfica de log α em função de f (número de ligações duplas) permite determinar o valor de retenção de cada um dos triacilgliceróis de ácidos gordos presente nos triacilgliceróis de referência – ver a figura 1.

Nota 3: A eficiência da coluna deve permitir uma separação nítida entre o pico da trilinoleína e os picos dos triacilgliceróis com TR próximo. A eluição prossegue até ao pico correspondente a NCE52.

Nota 4: Para se poderem medir corretamente as áreas de todos os picos de interesse para esta determinação, é necessário que a intensidade do segundo pico correspondente a NCE50 seja igual a 50 % do máximo da escala do registador.

Figura 1

Gráfico de log α em função de f (número de ligações duplas)



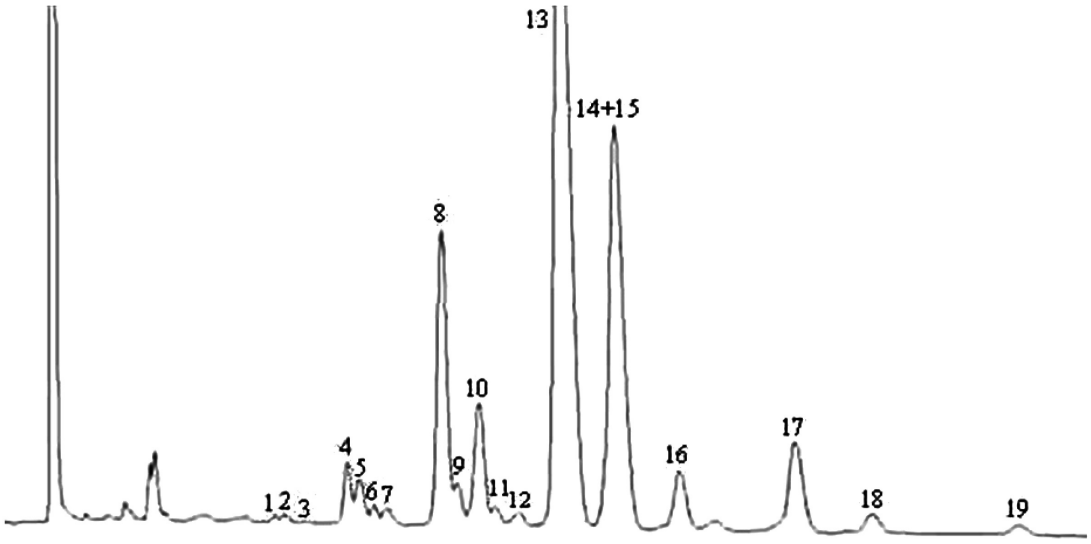
Número de ligações duplas

La: ácido láurico; My: ácido mirístico; P: ácido palmítico; S: ácido esteárico; O: ácido oleico; L: ácido linoleico; Ln: ácido linolénico.

Figura 2

Azeite ou óleo de bagaço de azeitona com baixo teor de ácido linoleico

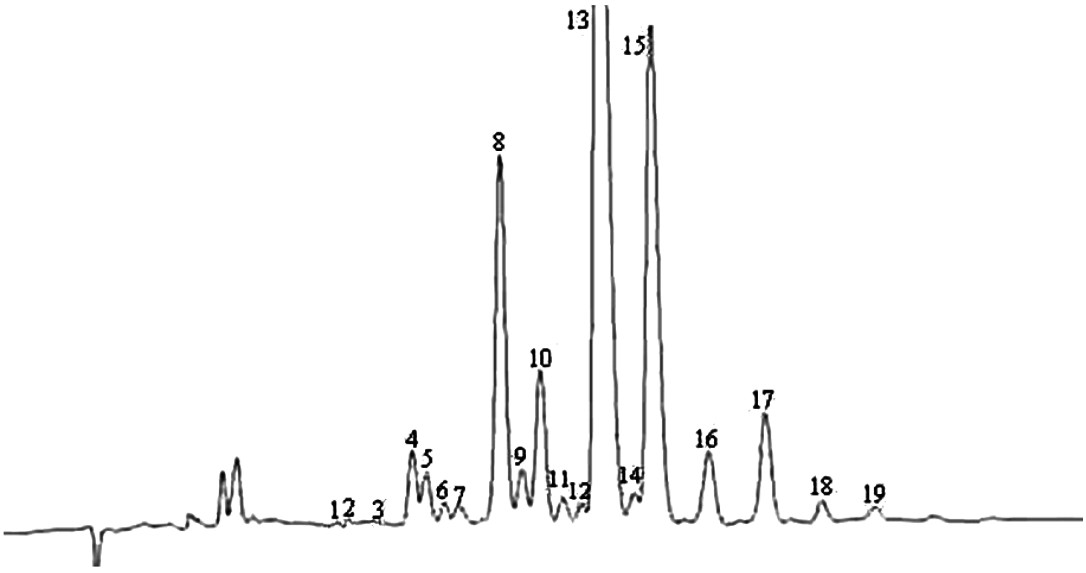
a)



Solvente: acetona/acetonitrilo.

TRAÇADO a: Principais componentes dos picos cromatográficos: **NCE42:** (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; **NCE44:** (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PLL; (6) POLn + PPoPo; (7) OOL + PoOO; **NCE46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **NCE48:** (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; **NCE50:** (17) SOO; (18) POS + SLS.

b)



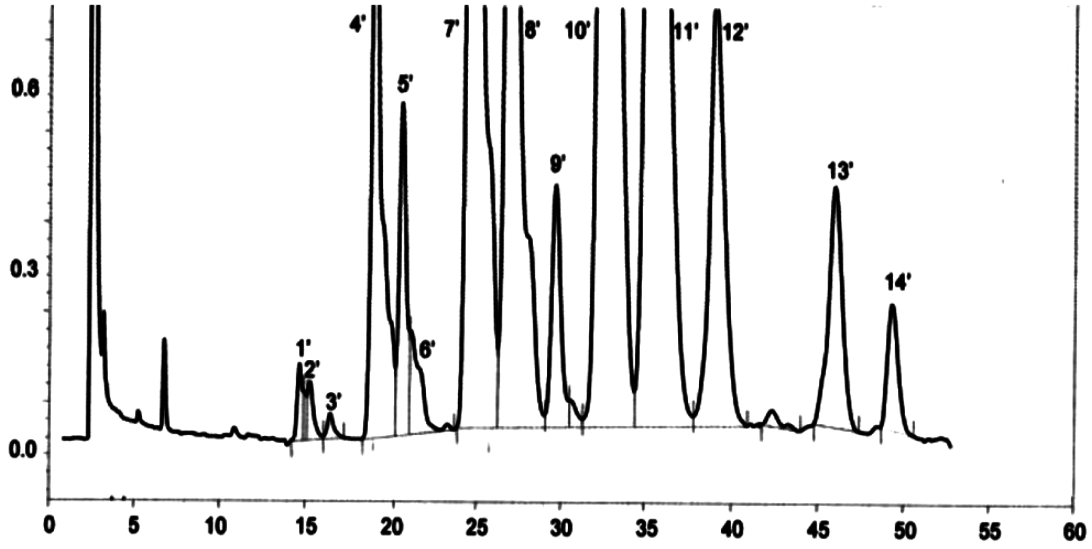
Solvente: propionitrilo.

TRAÇADO b: Principais componentes dos picos cromatográficos: **NCE42:** (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **NCE44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **NCE46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **NCE48:** (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **NCE50:** (17) SOO; (18) POS + SLS.

Figura 3

Azeite ou óleo de bagaço de azeitona com elevado teor de ácido linoleico

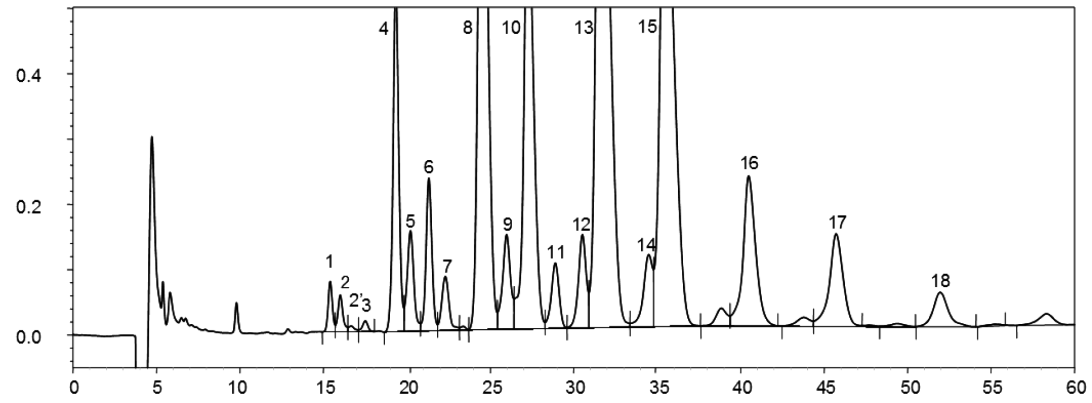
a)



Solvente: acetona/acetonitrilo (50:50).

Traçado a: Principais componentes dos picos cromatográficos: **NCE42:** (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; **NCE44:** (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPoPo; **NCE46:** (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; **NCE48:** (10') OOO; (11') POO + SLL + PPoO; (12') POP + PLS; **NCE50:** (13') SOO; (14') POS + SLS.

b)



Solvente: propionitrilo.

Traçado b: Principais componentes dos picos cromatográficos: **NCE42:** (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **NCE44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **NCE46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **NCE48:** (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **NCE50:** (17) SOO; (18) POS + SLS; **NCE52:** (19) AOO.»

ANEXO III

«ANEXO XXI

Resultados das verificações de conformidade efetuadas aos azeites e aos óleos de bagaço de azeitona referidas no artigo 8.º, n.º 2

				Rotulagem						Parâmetros químicos			Características organoléticas [4]			Conclusão final	
Amostra	Categoria	Pais de origem	Local da inspeção [1]	Designação legal	Designação de origem	Condições de armazenagem	Informações erradas	Legibilidade	C/NC [3]	Parâmetros fora dos limites Sim/Não	Em caso afirmativo, qual ou quais [2]	C/NC [3]	Mediana dos defeitos	Mediana do frutado	C/NC [3]	Ações necessárias	Sanções

[1] Mercado interno (lagar, engarrafadores, retalho), exportação, importação.
[2] Cada característica dos azeites e óleos de bagaço de azeitona especificada no anexo I deve ser indicada por um código.
[3] Conforme ou não-conforme.
[4] Não exigido no caso do "azeite" e dos óleos de bagaço de azeitona.»