# REGULAMENTO (CE) Nº 86/94 DA COMISSÃO

## de 19 de Janeiro de 1994

## que estabelece o método de referência para a determinação do sitosterol e do estigmasterol na manteiga

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CEE) nº 804/68 do Conselho, de 27 de Junho de 1968, que estabelece a organização comum de mercado no sector do leite e dos produtos lácteos (1), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CEE) nº 2071/92 (2), e, nomeadamente, o nº 7 do seu artigo 6º,

Considerando que a manteiga deve ser submetida a marcação e que os produtos marcados devem ser controlados em conformidade com os artigos 3º e 6º do Regulamento (CEE) nº 570/88 da Comissão (3), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) nº 3049/93 (4);

Considerando que a estrita observância das condições relativas à marcação da manteiga é essencial para prevenir o risco de utilizações não autorizadas da mantiga subsidiada;

Considerando que, dada a importância da marcação para o correcto funcionamento do regime, é necessário definir métodos comuns, aplicáveis do mesmo modo em toda a Comunidade, para a detecção de todos os marcadores exigidos pelo regime; que dessa forma se garantirá, designadamente, um tratamento idêntico a todos os operadores que tenham acesso ao regime e a eliminação de condições não equitativas de concorrência que, actualmente, podem decorrer de diferentes métodos de análise nacionais;

Considerando que o Regulamento (CEE) nº 3942/92 da Comissão (5) estabelece o método de referência para a determinação de estigmasterol e de sitosterol no *butteroil*; que este método pode ser aplicável, com ligeiras alterações, à deteriação de esteróis marcadores na manteiga;

Considerando que é necessário determinar a precisão do método e os respectivos limites de determinação;

Considerando que as medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité de Gestão do Leite e dos Produtos Lácteos,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

*Artigo 1º*

Se o teor de estigmasterol ou de β-sitosterol da manteiga tiver de ser determinado em conformidade com o artigo 6º do Regulamento (CEE) nº 570/88, será aplicado o método de análise de referência descrito em anexo.

A manteiga terá sido marcada correctamente se os resultados obtidos forem conformes aos critérios especificados no ponto 8 do anexo do presente regulamento.

*Artigo 2º*

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

É aplicável a partir de 1 de Abril de 1994.

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

Feito em Bruxelas, em 19 de Janeiro de 1994.

*Pela Comissão*

René STEICHEN

*Membro da Comissão*

(1) JO nº L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.
(2) JO nº L 215 de 30. 7. 1992, p. 64.
(3) JO nº L 55 de 1. 3. 1988, p. 31.
(4) JO nº L 273 de 5. 11. 1993, p. 7.
(5) JO nº L 399 de 31. 12. 1992, p. 29.

*ANEXO*

## DETERMINAÇÃO DO SITOSTEROL OU DO ESTIGMASTEROL NA MANTEIGA POR CROMATOGRAFIA GASOSA EM COLUNA CAPILAR

1. OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

O método descreve um processo para a determinação quantitativa do sitosterol ou do estigmasterol na manteiga. Considera-se o sitosterol como sendo a soma do β-sitosterol e do 22-di-hidro-β-sitosterol ; os outros sitosteróis são considerados insignificantes. O método é aplicável às amostras recebidas nos termos do Regulamento (CEE) nº 570/88.

2. PRINCÍPIO

A manteiga é saponificada com uma solução etanólica de hidróxido de potássio ; os insaponificáveis são extraídos com éter etílico.

Os esteróis são convertidos em éteres trimetilsilílicos e analisados por cromatografia gasosa em coluna capilar, tomando como referência um padrão interno de betulina.

3. EQUIPAMENTO

3.1. Balão de saponificação de 150 mililitros, equipado com um condensador de refluxo com juntas esmeriladas.

3.2. Ampolas de decantação de 500 mililitros.

3.3. Balões de 250 mililitros.

3.4. Balões de 250 mililitros, para equilíbrio da pressão, ou similar, para recolha do éter etílico evaporado.

3.5. Coluna de vidro com 350 mm × 20 mm, com tampa de vidro sinterizado.

3.6. Banho de água ou manta de aquecimento.

3.7. Tubos de reacção de 2 mililitros.

3.8. Cromatógrafo de fase gasosa utilizável com coluna capilar, que disponha de um sistema de divisão da amostra sendo constituído por :

3.8.1. Câmara termostatizada para colunas, capaz de manter a temperatura desejada a ± 1°C ;

3.8.2. Unidade de vaporização com regulação de temperatura ;

3.8.3. Detector de ionização de chama com conversor/amplificador ;

3.8.4. Integrador/registador adequado ao conversor/amplificador (3.8.3).

3.9. Coluna capilar de sílica fundida totalmente revestida com BP1 ou equivalente, com uma espessura uniforme de 0,25 mícron ; a coluna deve permitir a resolução dos picos dos derivados trimetilsilílicos do lanosterol e do sitosterol — é adequada uma coluna com 0,2 milímetro de diâmetro interno e 12 metros de comprimento revestida de BP1.

3.10. Microsseringa para cromatografia gasosa 1µl de capacidade e agulha rígida.

4. REAGENTES

Todos os reagentes devem ser de grau analítico reconhecido. A água utilizada deve ser água destilada ou água de grau de pureza pelo menos equivalente.

4.1. Etanol, com um grau de pureza de, pelo menos, 95 %.

4.2. Solução de hidróxido de potássio, a 60 % : dissolver 600 gramas de hidróxido de potássio (mínimo : 85 %) em água e completar o volume, com água, até um litro.

4.3. Betulina (Sigma Chemicals Ltd.) com um grau de pureza de, pelo menos, 99 %.

4.3.1. Padrão interno : solução de betulina em éter etílico (4.4).

4.3.1.1. A concentração da solução de betulina utilizada na determinação do sitosterol deve ser 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. A concentração da solução de betulina utilizada na determinação do estigmasterol deve ser 0,4 mg/ml.

4.4. Éter etílico de qualidade analítica (isento de peróxidos ou resíduos).

4.5. Sulfato de sódio anidro granular, previamente seco a 102°C, durante duas horas.

4.6. TRI-SIL como reagente de sililação (fornecido por Pierce Chemical CO., número de catálogo 49001), ou equivalente. (ATENÇÃO : o TRI-SIL é inflamável, tóxico, corrosivo e, possivelmente, cancerígeno. O pessoal do laboratório deve estar familiarizado com os cuidados a ter com o TRI-SIL e tomar as precauções apropriadas.)

4.7. Lanosterol.

4.8. Sitosterol com um grau de pureza (P), conhecido, não inferior a 90 %.

*Nota 1:* o grau de pureza dos padrões utilizados na calibração deve ser determinado pelo método da normalização. Considerar que todos os esteróis presentes na amostra figuram no cromatograma, que a área total dos picos representa 100 % dos componentes esteróis e que todos os esteróis produzem a mesma resposta do detector. A linearidade do sistema deve ser assegurada para a gama de concentrações utilizada.

4.8.1. Solução-padrão de sitosterol : preparar uma solução aproximadamente 0,5 mg/ml (W1) de sitosterol (4.8) em éter etílico (4.4), com a precisão de 0,001 mg/ml.

4.9. Estigmasterol com um grau de pureza (P), conhecido, não inferior a 90 %.

4.9.1. Solução-padrão de estigmasterol : preparar uma solução aproximadamente 0,2 mg/ml (W1) de estigmasterol (4.9) em éter etílico (4.4), com a precisão de 0,001 mg/ml.

4.10. Solução para teste da resolução : preparar uma solução que contenha 0,05 mg de lanosterol (4.7) e 0,5 mg de sitosterol (4.8) por mililitro, em éter etílico (4.4).

5. TÉCNICA

5.1. Preparação das soluções-padrão para a cromatografia : o padrão interno (4.3.1) deve ser adicionado à solução-padrão do esterol apropriado ao mesmo tempo que for adicionado à amostra saponificada (5.2.2).

5.1.1. Solução-padrão cromatográfica de sitosterol : transferir um mililitro da solução-padrão de sitosterol (4.8.1) para dois tubos de ensaio (3.7) e remover o éter etílico com uma corrente de azoto. Adicionar um mililitro do padrão interno (4.3.1.1) e remover o éter etílico com uma corrente de azoto.

5.1.2. Solução-padrão cromatográfica de estigmasterol : transferir um mililitro da solução-padrão de estigmasterol (4.9.1) para dois tubos de ensaio (3.7) e remover o éter etílico com uma corrente de azoto. Adicionar um mililitro do padrão interno (4.3.1.2) e remover o éter etílico com uma corrente de azoto.

5.2. Preparação dos insaponificáveis.

5.2.1. Fundir a amostra de manteiga por aquecimento a uma temperatura não superior a 35°C, misturando por agitação. Pesar para um balão de 150 ml (3.1), com a precisão de 1 mg, cerca de 1 g de manteiga (W2). Adicionar 50 mililitros de etanol (4.1) e 10 mililitros da solução de hidróxido de potássio (4.2). Adaptar o condensador de refluxo e aquecer a cerca de 75°C, durante 30 minutos. Retirar o condensador e arrefecer o balão até à temperatura ambiente, aproximadamente.

5.2.2. Adicionar ao balão 1,0 ml do padrão interno (4.3.1.1) caso se pretenda determinar o sitosterol, ou 1,0 ml de (4.3.1.2), caso se pretenda determinar o estigmasterol. Homogeneizar completamente. Transferir quantitativamente o conteúdo do balão para uma ampola de decantação de 500 mililitros (3.2), procedendo a lavagens com 50 mililitros de água e 250 mililitros de éter etílico (4.4). Agitar a ampola de decantação vigorosamente, durante dois minutos, e deixar as fases separarem-se. Escoar a fase aquosa inferior e proceder à lavagem da fase etérea, agitando a ampola com quatro alíquotas sucessivas de 100 mililitros de água.

*Nota 2:* para evitar a formação de uma emulsão é essencial que as duas primeiras lavagens com água sejam efectuadas com precaução (procedendo a 10 inversões). Na terceira lavagem, pode-se agitar vigorosamente durante 30 segundos. No caso de se formar uma emulsão, esta pode ser eliminada através da adição de 5 a 10 mililitros de etanol. Se se adicionar etanol, é essencial proceder a mais duas lavagens vigorosas com água.

5.2.3. Passar a fase etérea, límpida e isenta de sabões, por uma coluna de vidro (3.5), contendo 30 gramas de sulfato de sódio anidro (4.5). Recolher a fase etérea num balão de 250 mililitros (3.3). Introduzir um regularizador de ebulição e evaporar quase até à secura por recurso a um banho de água ou a uma manta de aquecimento; recolher os solventes evaporados.

*Nota 3:* se o extracto que contém a amostra for levado à secura total, a temperaturas muito elevadas, podem ocorrer perdas de esteróis.

5.3. Preparação dos éteres trimetilsilílicos.

5.3.1. Com o auxílio de 2 ml de éter etílico, transferir do balão para um tubo de ensaio de 2 ml (3.7) a solução etérea remanescente e remover o éter com uma corrente de azoto. Lavar o balão com mais duas alíquotas de 2 ml de éter etílico, transferindo-as para o tubo de ensaio e removendo o éter, cada uma das vezes, com uma corrente de azoto.

5.3.2. Proceder à sililação da amostra, adicionando um mililitro de TRI-SIL (4.6). Tapar o tubo de reacção e agitar vigorosamente, para dissolver. No caso de a dissolução ser incompleta, aquecer a 65-70° C. Deixar em repouso durante, pelo menos, cinco minutos antes de proceder à injecção no cromatógrafo de fase gasosa. Proceder à sililação dos padrões do mesmo modo que as amostras. Proceder à sililação da solução para teste da resolução (4.10) do mesmo modo que as amostras.

*Nota 4:* a sililação deve ser efectuada na ausência de água. A sililação incompleta da betulina é revelada pela presença de um segundo pico, próximo do pico correspondente à betulina.

A presença de etanol durante a sililação interfere no processo podendo resultar de lavagem inadequada na etapa de extracção. Se este problema persistir, poderá ser efectuada uma quinta lavagem, com agitação vigorosa durante 30 segundos, na etapa de extracção.

5.4. Análise por cromatografia em fase gasosa.

5.4.1. Selecção das condições operatórias.

Montar o cromatógrafo de fase gasosa de acordo com as instruções do fabricante.

Apresentam-se a seguir condições operatórias indicativas:

— temperatura da coluna: 265° C

— temperatura do injector: 280° C,

— temperatura do detector: 300° C,

— caudal do gás-vector: 0,6 ml/minuto,

— pressão de hidrogénio: 84 kPa,

— pressão de ar: 155 kPa,

— divisão da amostra: 10 : 1 a 50 : 1; esta relação deve ser optimizada em função das instruções do fabricante devendo, de seguida, assegurar-se a linearidade da resposta do detector em toda a gama de concentrações utilizada.

*Nota 5:* é de especial importância que a linha de injecção seja limpa com regularidade.

— volume injectado: 1 µl de solução (éter trimetilsilílico).

Deixar que o sistema atinja o equilíbrio e obter uma resposta suficientemente estável antes de começar as análises.

As condições indicadas podem ser alteradas em função das características da coluna e do cromatógrafo de fase gasosa, de modo a obter cromatogramas que obedeçam às seguintes condições:

— o pico do sitosterol deve-se distinguir claramente do pico do lanosterol. A figura 1 mostra o cromatograma típico que deve ser obtido com a solução para teste da resolução (4.10), depois de submetida a sililação,

— os tempos de retenção relativos dos esteróis que se indicam a seguir devem ser, aproximadamente:

| | |
|---|---|
| Colesterol: | 1,0 |
| Estigmasterol: | 1,3 |
| Sitosterol: | 1,5 |
| Betulina: | 2,5, |

— o tempo de retenção da betulina deve ser, aproximadamente, de 24 minutos.

5.4.2. Execução da análise

Injectar 1 µl da solução-padrão sililada (estigmasterol ou sitosterol) e ajustar os parâmetros de calibração do integrador.

Injectar novo volume de 1 µl da solução-padrão sililada para determinar os factores de resposta da betulina.

Injectar 1 µl da solução-amostra silidada e medir as áreas dos picos. Intercalar cada série de amostras com a injecção dos padrões. A título de orientação, proceder a seis injecções de amostra em cada série limitada pelos padrões.

*Nota 6:* a integração do pico do estigmasterol deve incluir as caudas respectivas, definidas pelos pontos 1, 2 e 3 da figura 2 b.

Ao calcular o total de sitosterol, incluir na integração do pico do sitosterol a área do 22-dihidro-β-sitosterol (estigmastanol), que é eluído imediatamente a seguir ao sitosterol (ver a figura 3 b).

6. CÁLCULO DOS RESULTADOS

6.1. Determinar as áreas dos picos do esterol e da betulina nos padrões que delimitam cada série de amostras e calcular $R_1$:

$$R_1 = \frac{\text{área média dos picos do esterol no padrão}}{\text{área média dos picos da betulina no padrão}}$$

Determinar as área dos picos do esterol (estigmasterol ou sitosterol) e da betulina da amostra e calcular $R_2$:

$$R_2 = \frac{\text{área do pico do esterol da amostra}}{\text{área do pico da betulina da amostra}}$$

$W_1$ = massa (em mg) de esterol contida em um mililitro de solução-padrão (4.8.1 ou 4.9.1).

$W_2$ = massa da amostra (em g) (5.2.1).

P = grau de pureza do esterol padrão (4.8 ou 4.9).

$$\text{Teor de esterol da amostra (em mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10.$$

7. PRECISÃO DO MÉTODO

7.1. Repetibilidade

7.1.1. Estigmasterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas com o menor intervalo de tempo possível pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento e testando o mesmo material, não deve exceder 19,3 mg/kg.

7.1.2. Sitosterol

A diferença entre os resultados de duas determinações, efectuadas com o menor intervalo de tempo possível pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento e testando o mesmo material, não deve exceder 23,0 mg/kg.

7.2. Reprodutibilidade

7.2.1. Estigmasterol

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamento diferente e testando o mesmo material, não deve exceder 31,9 mg/kg.

7.2.2. Sitosterol

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas por operadores de laboratórios diferentes, utilizando equipamento diferente e testando o mesmo material, não deve exceder 8,7 % da média das determinações.

7.3. Origem dos dados relativos à precisão

Os dados relativos à precisão foram determinados com base num ensaio efectuado em 1992, que envolveu oito laboratórios, seis amostras (três duplicados em teste cego) de estigmasterol e seis amostras (três duplicados em teste cego) para o sitosterol.

8. TOLERÂNCIAS

8.1. Devem ser recolhidas três amostras do produto marcado, de modo a verificar a sua homogeneidade.

8.2. Estigmasterol

8.2.1. A taxa de incorporação de estigmasterol é de 150 gramas de estigmasterol com grau de pureza de, pelo menos, 95 % por tonelada de manteiga, isto é, 142,5 mg/kg ; ou 170 gramas de estigmasterol com grau de pureza de, pelo menos, 85 % por tonelada de manteiga, isto é, 144,5 mg/kg.

8.2.2. Tomando em consideração a diferença crítica para um nível de probabilidade de 95 % ($DCr_{95}$), a média dos três resultados não deve ser inferior a :

126,0 mg/kg, no caso de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 95 %,

128,0 mg/kg, no caso de incorporação de estigmasterol com grau de pureza de 85 %.

8.2.3. Para além do critério definido em 8.2.2, o menor dos resultados obtidos na análise do produto é utilizado para verificar a homogeneidade da distribuição do marcador. Tal é efectuado por comparação com os seguintes limites :

— 116,4 mg/kg (95 % da taxa de incorporação mínima para estigmasterol com um grau de pureza de 95 %, tomando em consideração a $DCr_{95}$ para uma única amostra),

— 118,3 mg/kg (95 % da taxa de incorporação mínima para estigmasterol com um grau de pureza de 85 %, tomando em consideração a $DCr_{95}$ para uma única amostra),

— 95,1 mg/kg (80 % da taxa de incorporação mínima para estigmasterol com um grau de pureza de 95 %, tomando em consideração a $DCr_{95}$ para uma única amostra),

— 96,7 mg/kg (80 % da taxa de incorporação mínima para estigmasterol com um grau de pureza de 85 %, tomando em consideração a $DCr_{95}$ para uma única amostra),

A concentração de marcador na amostra com o menor dos resultados é obtida por interpolação entre 116,4 mg/kg e 95,1 mg/kg ou 118,3 mg/kg e 96,7 mg/kg, respectivamente.

8.3. Sitosterol

8.3.1. A taxa de incorporação de sitosterol é de 600 gramas de sitosterol com grau de pureza de, pelo menos, 90 % por tonelada de manteiga, isto é, 540 mg/kg.

8.3.2. Tomando em consideração a $DCr_{95}$, a média dos três resultados não deve ser inferior a 514,4 mg/kg.

8.3.3. Para além do critério definido em 8.3.2, o menor dos resultados obtidos na análise do produto é utilizado para verificar a homogeneidade da distribuição do marcador. Tal é efectuado por comparação com os seguintes limites :

— 485,1 mg/kg (95 % da taxa de incorporação mínima para estigmasterol com um grau de pureza de 90 %, tomando em consideração a $DCr_{95}$ para uma única amostra),

— 404,1 mg/kg (80 % da taxa de incorporação mínima para estigmasterol com um grau de pureza de 90 %, tomando em consideração a $DCr_{95}$ para uma única amostra).

A concentração de marcador na amostra com o menor dos resultados é obtida por interpolação entre 485,1 mg/kg e 404,1 mg/kg.

*Figura 1* Cromatograma da solução para teste da resolução.

É preferível uma resolução completa, isto é, o traçado do pico do lanosterol deve voltar à linha de base antes de iniciar a definição do pico do sitosterol, se bem que uma resolução incompleta seja admissível.

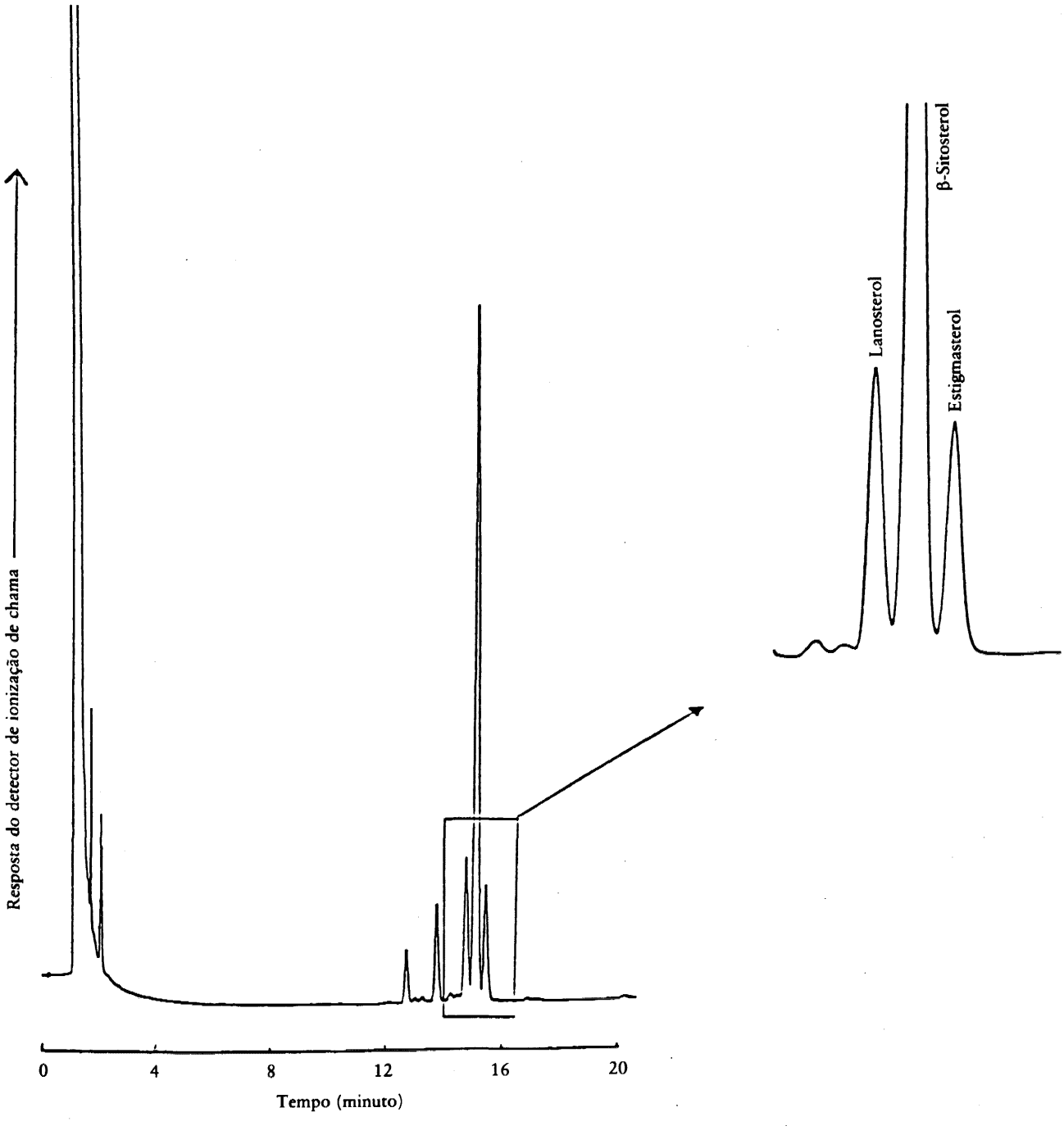


*Figura 2a*
Padrão de estigmasterol

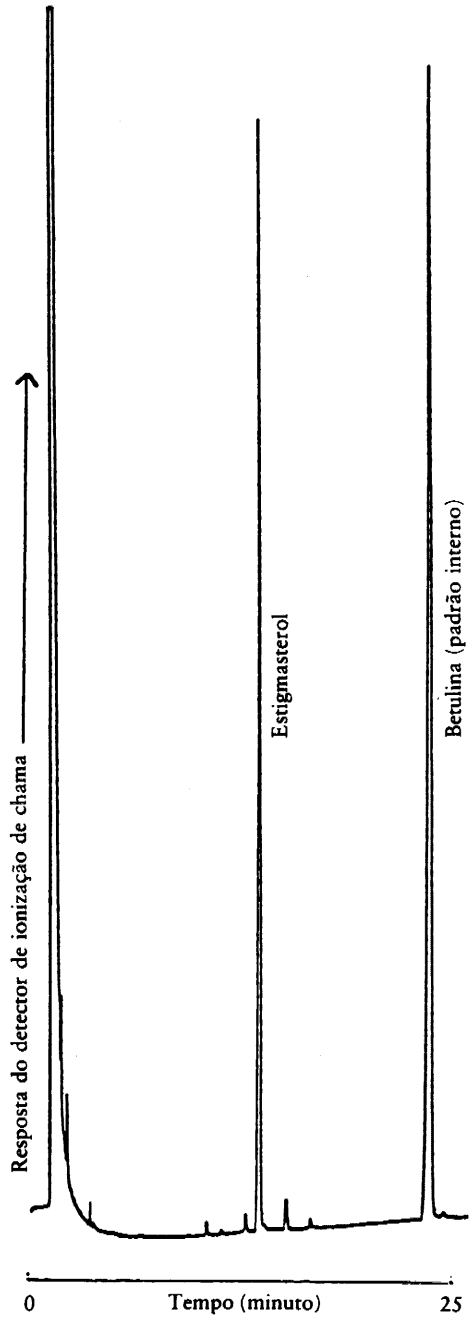
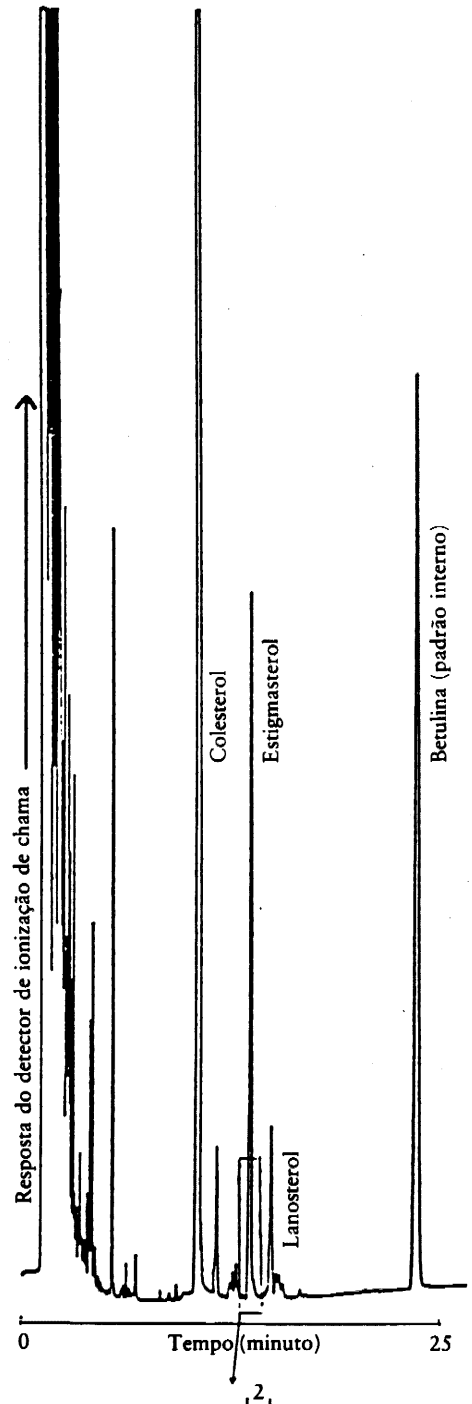
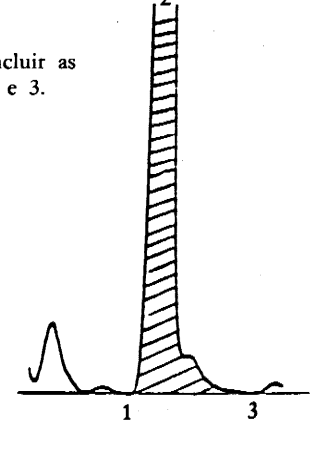


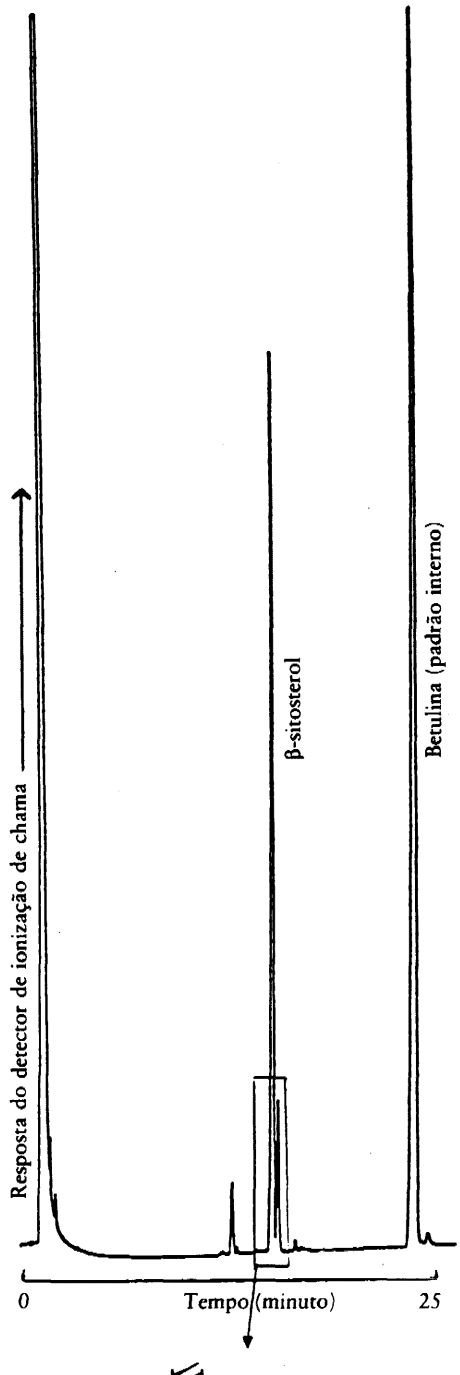

*Figura 2b*
Amostra de manteiga desnaturada com estigmasterol




Nota: a integração do pico do estigmasterol deve incluir as caudas respectivas, definidas pelos pontos 1, 2 e 3.

*Figura 3a*
Padrão de β-sitosterol



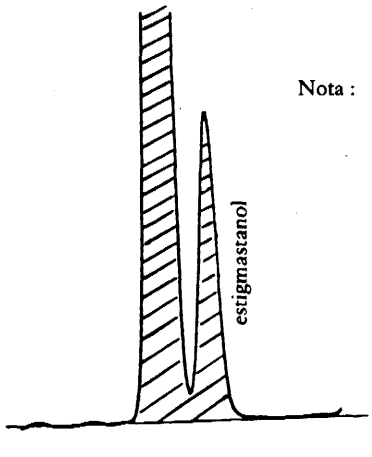
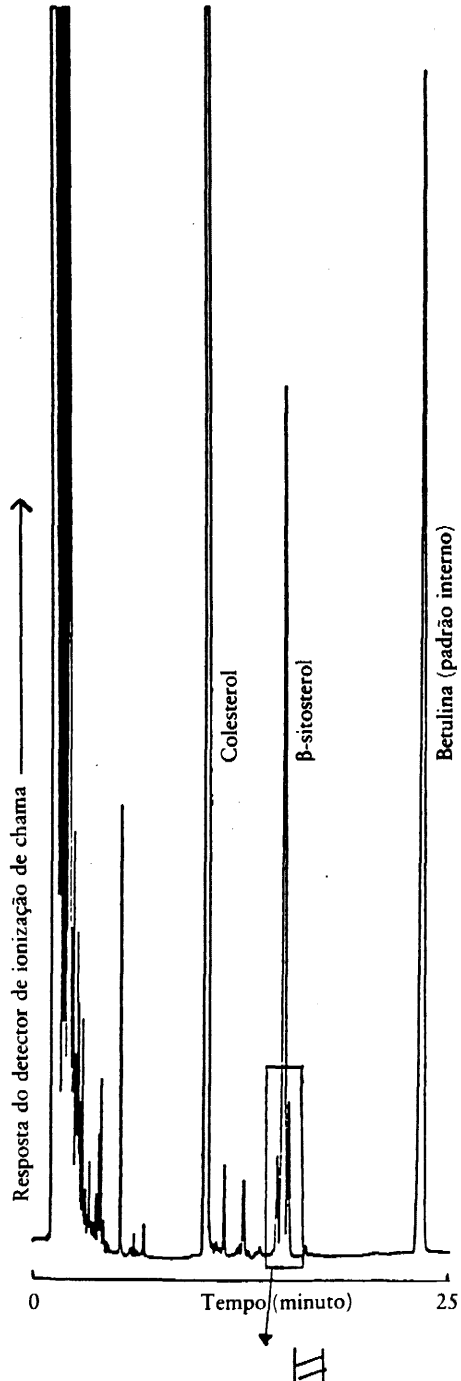
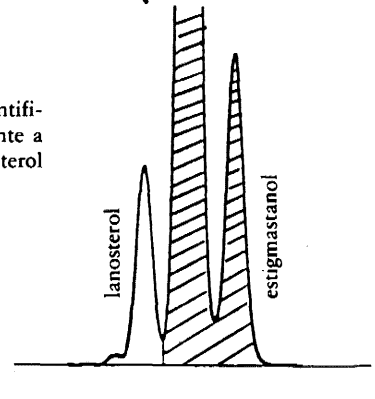




*Figura 3b*
Amostra de manteiga desnaturada com β-sitosterol




Nota: é frequente o β-sitosterol conter uma impureza (identificada como estigmastanol) que é eluída imediatamente a seguir ao β-sitosterol. Ao calcular o total de β-sitosterol presente devem-se somar as áreas dos dois picos.