

REGLAMENTO (CE) Nº 796/2002 DE LA COMISIÓN

de 6 de mayo de 2002

por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, así como las notas complementarias que figuran en el anexo del Reglamento (CEE) nº 2658/87 del Consejo relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento nº 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1966, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de las materias grasas ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 1513/2001 ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 35 bis,

Visto el Reglamento (CEE) nº 2658/87 del Consejo, de 23 de julio de 1987, relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común ⁽³⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 578/2002 de la Comisión ⁽⁴⁾, y, en particular, su artículo 9,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) nº 2568/91 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis ⁽⁵⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 2042/2001 ⁽⁶⁾, define las características físicas, químicas y organolépticas de los aceites de oliva y orujo de oliva, así como los métodos de valoración de las mismas. Desde el 1 de noviembre de 2001, la definición de la categoría de aceite de orujo de oliva crudo recogida en el punto 4 del anexo del Reglamento nº 136/66/CEE establece la correspondencia, salvo en determinadas características, entre determinados aceites de oliva obtenidos a partir de orujo de oliva y los aceites de oliva lampantes.
- (2) Con el fin de distinguir los aceites obtenidos mediante la centrifugación del orujo de oliva de los aceites de oliva lampantes y, al no disponerse de un parámetro analítico a tal efecto, procede fijar valores límite relativos a su composición de ceras, eritrodol y uvaol o de alcoholes alifáticos totales que permitan diferenciarlos, con independencia de sus métodos de obtención. Con tal propósito, es preciso fijar un método para determinar el contenido de alcoholes alifáticos totales.
- (3) La existencia de esos nuevos valores límite exigen la modificación de la nota complementaria 2 del capítulo 15 de la nomenclatura combinada que figura en el anexo I del Reglamento (CEE) nº 2658/87; es preciso asimismo suprimir el artículo 5 y el anexo XIV del Reglamento (CEE) nº 2568/91 y corregir algunos errores que se deslizaron en el Reglamento (CEE) nº 2568/91.

- (4) La evolución técnica de los métodos de análisis permite, en función de la acidez libre de los aceites, reducir a dos los métodos que figuran en la sección B del anexo X actualmente vigente con el fin de armonizar los procedimientos de preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos destinados al análisis de la composición de ácidos grasos de los aceites.

- (5) Basándose en la experiencia adquirida, el Consejo Oleícola Internacional ha desarrollado un nuevo método de valoración de las características organolépticas de los aceites de oliva virgen que resulta más fiable y simple que el actualmente contemplado en el anexo XII del Reglamento (CEE) nº 2568/91. Procede por consiguiente sustituir el método recogido en el anexo XII por el nuevo método de valoración organoléptica de los aceites de oliva virgen.

- (6) Con vistas a la aplicación del nuevo método de valoración organoléptica, es preciso establecer un procedimiento de arbitraje en caso de discrepancia entre la categoría declarada y la atribuida por el panel de catadores que haya procedido a la valoración.

- (7) Con el fin de garantizar las condiciones necesarias para la realización de los análisis y habida cuenta de la dispersión geográfica de algunas regiones, es preciso fijar un plazo diferente para el envío de las muestras al laboratorio tras su obtención, tomando en consideración las condiciones climatológicas de cada estación. Por lo que respecta a la clasificación de los aceites, hay que precisar que los resultados de los análisis se compararán con los límites fijados en el Reglamento (CEE) nº 2568/91, que tienen ya en cuenta los márgenes de repetibilidad y reproducibilidad de los métodos de análisis empleados.

- (8) Con el fin de establecer un plazo de adaptación a las nuevas normas y permitir la implantación de los medios necesarios para su aplicación sin provocar perturbaciones de las transacciones comerciales, se considera necesario aplazar la aplicación de las modificaciones contenidas en el presente Reglamento hasta el 1 de septiembre de 2002 y establecer una excepción para los aceites de oliva y de orujo de oliva envasados para el comercio minorista antes de esa fecha.

⁽¹⁾ DO 172 de 30.9.1966, p. 3025/66.

⁽²⁾ DO L 201 de 26.7.2001, p. 4.

⁽³⁾ DO L 256 de 7.9.1987, p. 1.

⁽⁴⁾ DO L 97 de 13.4.2002, p. 1.

⁽⁵⁾ DO L 248 de 5.9.1991, p. 1.

⁽⁶⁾ DO L 276 de 19.10.2001, p. 8.

- (9) Las medidas de sus competencias respectivas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión de las materias grasas y al dictamen del Comité del código aduanero.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El Reglamento (CEE) nº 2568/91 quedará modificado como sigue:

- 1) En el apartado 1 del artículo 2:
 - a) el tercer guión se sustituirá por el texto siguiente:

«— para determinar el contenido de ceras, el método recogido en el anexo IV.»;
 - b) se añadirá el guión siguiente:

«— para determinar el contenido de alcoholes alifáticos, el método recogido en el anexo XIX.».
- 2) El apartado 2 del artículo 2 se sustituirá por el texto siguiente:

«2. La comprobación de las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes por parte de las autoridades nacionales o sus representantes correrá a cargo de paneles de catadores autorizados por los Estados miembros.

Las características organolépticas del aceite de oliva mencionado en el apartado 1 se considerarán conformes a la categoría declarada si un panel de catadores autorizado por el Estado miembro interesado confirma dicha clasificación.

En caso de que el panel autorizado no confirme tal declaración en lo que respecta a las características organolépticas de la categoría de aceite de oliva declarada, las autoridades nacionales o sus representantes ordenarán que se proceda, a petición del interesado, a dos análisis contradictorios por otros paneles autorizados; al menos uno de ellos deberá ser realizado por un panel de cata autorizado por el Estado miembro productor. Las características en cuestión se considerarán conformes a las declaradas si ambos análisis contradictorios confirman la clasificación declarada. En caso contrario, los gastos generados por los análisis contradictorios, sin perjuicio de otras posibles sanciones, correrán por cuenta del interesado.»
- 3) El párrafo segundo del apartado 3 del artículo 2 se sustituirá por el texto siguiente:

«Sin perjuicio de lo dispuesto en la norma EN ISO 5555 y en el capítulo 6 de la norma EN ISO 661, las muestras deberán guardarse lo antes posible en un lugar protegido de la luz y de las elevadas temperaturas y enviarse al laboratorio para la realización de los análisis a más tardar:

 - el décimo día hábil siguiente al de la toma de la muestra, durante los meses de octubre a mayo, y
 - el quinto día hábil siguiente al de la toma de la muestra, durante los meses de junio a septiembre.».
- 4) En el artículo 2, se añadirá el apartado 5 siguiente:

«5. Con vistas a la determinación de las características de los aceites de oliva efectuada con arreglo a los métodos contemplados en el apartado 1, los resultados de los análisis se compararán directamente con los límites fijados en el presente Reglamento.».

- 5) Se suprimirán los artículos 3 y 3 bis.
- 6) El artículo 3 *ter* pasa a ser el artículo 3.
- 7) El apartado 1 del artículo 4 se sustituirá por el texto siguiente:

«1. Para la apreciación y el control de las características organolépticas por parte de las autoridades nacionales o sus representantes, los Estados miembros podrán constituir paneles de catadores autorizados.

Las condiciones de autorización serán establecidas por los Estados miembros con los objetivos siguientes:

 - cumplir las condiciones del punto 4 del anexo XII,
 - asegurar que la formación del jefe del panel de catadores se efectúa en un establecimiento y en condiciones reconocidos a tal efecto por el Estado miembro,
 - someter la validez de la autorización a los resultados obtenidos en el sistema de control anual implantado por el Estado miembro.

Todos los Estados miembros comunicarán a la Comisión la lista de los paneles de catadores autorizados, así como las demás medidas adoptadas de conformidad con el presente apartado.».
- 8) Se suprimirá el artículo 5.
- 9) Los anexos se modifican conforme al anexo del presente Reglamento.

Artículo 2

La nota complementaria 2 de capítulo 15 de la nomenclatura combinada, que figura en el anexo I del Reglamento (CEE) nº 2658/87 se modificará como sigue:

- 1) La letra a) del punto B I se sustituirá por el texto siguiente:

«a) un contenido de ceras no superior a 300 mg/kg.».
- 2) El número 4 de la letra g) del punto B I se sustituirá por el texto siguiente:

«4. características organolépticas que pongan de manifiesto una mediana de defectos superior a 6, conforme a lo establecido en el anexo XII del Reglamento (CEE) nº 2568/91.».
- 3) La letra g) del punto B II se sustituirá por el texto siguiente:

«g) características organolépticas que pongan de manifiesto una mediana de defectos inferior o igual a 6, conforme a lo establecido en el anexo XII del Reglamento (CEE) nº 2568/91.».
- 4) La letra b) del punto D se sustituirá por el texto siguiente:

«b) un contenido de eritrodio y uvaol superior a 4,5.».

Artículo 3

El presente Reglamento entrará en vigor el séptimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

Para los aceites de oliva y de orujo de oliva envasados para el comercio minorista, será aplicable a partir del 1 de septiembre de 2002.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 6 de mayo de 2002.

Por la Comisión
Franz FISCHLER
Miembro de la Comisión

ANEXO

1. En el sumario de anexos del Reglamento (CEE) n° 2568/91:
 - a) Se suprimirá el anexo XIV: «Notas complementarias 2, 3 y 4 del capítulo 15 de la nomenclatura combinada.».
 - b) Se añadirá el título siguiente: anexo XIX: «Método de determinación del contenido de alcoholes alifáticos.».
2. El anexo I se sustituirá por los cuadros y el texto siguientes:

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

Categoría	Acidez (%) (*)	Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg (*)	Disolventes halogenados mg/kg (*) (1)	Ceras mg/kg (**)	Ácidos saturados en posición 2 de los triglicéridos (%)	Estigmastadieno mg/kg (2)	Diferencia entre ECN42 (HPLC) y ECN42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ después de pasar por alúmina (3)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del atributo frutado (Mf) (*)
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Aceite de oliva virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Aceite de oliva virgen corriente	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 6,0 (4)	—
4. Aceite de oliva virgen lampante	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 300 (5)	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	Md > 6	—
5. Aceite de oliva refinado	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Aceite de oliva	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Aceite de orujo de oliva crudo	> 0,5 (**)	—	—	> 350 (6)	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Aceite de orujo de oliva	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

(1) Límite máximo de los compuestos totales halogenados detectados mediante captura de electrones. El límite máximo de cada uno de los componentes detectados es de 0,10 mg/kg.

(2) Suma de isómeros que podrían separarse (o no) mediante columna capilar.

(3) Para confirmar la presencia de aceite refinado, cuando el K₂₇₀ sobrepase el límite de la categoría correspondiente, deberá procederse a la determinación del K₂₇₀ después de tratamiento con alúmina.

(4) Si la mediana del atributo frutado es igual a 0, la mediana del defecto debe ser inferior o igual a 2,5.

(5) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de oliva lampante si el contenido de alcoholes alifáticos totales es inferior o igual a 350 mg/kg o si el porcentaje de eritrodil y uvaol es inferior o igual a 3,5.

(6) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva crudo si el contenido de alcoholes alifáticos totales es superior a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodil y uvaol es superior a 3,5.

Categoría	Contenido en ácidos						Sumas de los isómeros trans-oleicos (%)	Sumas de los isómeros trans-linoleicos + trans-linolénicos (%)	Colesterol (%)	Brasi-casterol (%)	Cam-pesteroles (%)	Estigmas-terol (%)	Beta-sitosterol (%) ⁽¹⁾	Delta-7-estigmas-tenol (%)	Esteroles totales (mg/kg)	Eritrodiol y uvaol (%) ^(**)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eico-senoico (%)	Behénico (%)	Lignocérico (%)										
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Aceite de oliva virgen corriente	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
4. Aceite de oliva virgen lampante	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽²⁾
5. Aceite de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Aceite de oliva	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
7. Aceite de orujo de oliva crudo	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽³⁾
8. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
9. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Suma de: delta-5,23-estigmastadienol + clerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

⁽²⁾ Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de oliva lampante si el contenido de alcoholes alifáticos totales es inferior o igual a 350 mg/kg o si el porcentaje de eritrodiol y uvaol es inferior o igual a 3,5.

⁽³⁾ Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva crudo si el contenido de alcoholes alifáticos totales es superior a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodiol y uvaol es superior a 3,5.

Notas:

a) Los resultados de los análisis deberán expresarse con el mismo número de decimales que el previsto para cada característica.

La última cifra expresada deberá redondearse hacia arriba si la cifra siguiente es superior a 4.

b) Para cambiar de categoría un aceite o declararlo no conforme en cuanto a su pureza, basta con que una sola de las características no se ajuste a los límites fijados.

c) Las características indicadas con asterisco (*), relativas a la calidad del aceite, implican lo siguiente:

— en el caso del aceite de oliva virgen lampante, los límites correspondientes (excepto el de K_{232}) pueden no respetarse simultáneamente.

— en el caso de los demás aceites de oliva vírgenes, el incumplimiento de uno de los límites supondrá un cambio de categoría, aunque seguirán clasificados dentro de una de las categorías de los aceites de oliva vírgenes.

d) Las características indicadas con dos asteriscos (**) implican que, en el caso de todos los aceites de orujo de oliva señalados, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes.»

3. La sección B del anexo X se sustituirá por el texto siguiente:

«ANEXO X B

PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE OLIVA Y DEL ACEITE DE ORUJO DE OLIVA

Se recomiendan los dos métodos siguientes para la preparación de los ésteres metálicos de los ácidos grasos de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva.

Método A: Transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico.

Método B: Metilación en caliente con una solución metanólica de metilato de sodio, seguida de esterificación en medio ácido.

Se aplicará uno u otro método según el parámetro analítico que se vaya a determinar y dependiendo de la categoría de aceite, tal como se indica a continuación:

- a) Determinación del ΔECN_{42} (diferencia entre el contenido real y el contenido teórico en triglicéridos con ECN₄₂):
- El método A se aplicará a las muestras de aceites de todas las categorías tras purificación del aceite pasándolo a través de una columna de gel de sílice.
- b) Determinación de la composición de ácidos grasos
- El método A se aplicará directamente a las muestras de aceites de las siguientes categorías:
 - aceites de oliva vírgenes con una acidez libre inferior al 3,3 %,
 - aceite de oliva refinado,
 - aceite de oliva (mezcla de aceites de oliva vírgenes y de aceite de oliva refinado),
 - aceite de orujo de oliva refinado,
 - aceite de orujo de oliva (mezcla de aceites de oliva vírgenes y de aceite de orujo de oliva refinado).
 - El método B se aplicará directamente a las muestras de aceites de las siguientes categorías:
 - aceite de oliva virgen con una acidez libre superior al 3,3 %,
 - aceite de orujo de oliva crudo.
- c) Determinación de los isómeros *trans* de los ácidos grasos
- El método A se aplicará directamente a las muestras de aceites de las siguientes categorías:
 - aceites de oliva vírgenes con una acidez libre inferior al 3,3 %,
 - aceite de oliva refinado,
 - aceite de oliva (mezcla de aceites de oliva vírgenes y de aceite de oliva refinado),
 - aceite de orujo de oliva refinado,
 - aceite de orujo de oliva (mezcla de aceites de oliva vírgenes y de aceite de orujo de oliva refinado).
 - El método B se aplicará a las muestras de aceite de las categorías siguientes tras purificación del aceite pasándolo a través de una columna de gel de sílice:
 - aceite de oliva virgen con una acidez libre superior al 3,3 %,
 - aceite de orujo de oliva crudo.

PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ACEITE

Cuando proceda, las muestras se purificarán pasando el aceite a través de una columna de gel de sílice, utilizando como disolvente de elución hexano/éter dietílico (87: 13, v/v) tal como se describe en el método IUPAC 2.507.

Como procedimiento alternativo puede recurrirse a la extracción en fase sólida utilizando cartuchos de gel de sílice. Se coloca un cartucho de gel de sílice (1 g, 6 ml) en un aparato de elución en vacío, se lava con 6 ml de hexano y se deja de aplicar el vacío para evitar que se seque la columna. A continuación se introduce en la columna una solución de aceite (0,12 g aproximadamente) en 0,5 ml de hexano y se aplica el vacío para que la solución se introduzca en la sílice; después se eluye con 10 ml de hexano/éter dietílico (87: 13 v/v) en vacío. Se homogeneiza la totalidad de los eluidos y se divide en dos alícuotas similares. Una alícuota se evapora hasta sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida y a temperatura ambiente. El residuo se disuelve en 1 ml de heptano y la solución queda lista para el análisis de ácidos grasos por CG. La segunda alícuota se evapora y el residuo se disuelve en 1 ml de acetona para el análisis de los triglicéridos mediante HPLC si es necesario.

MÉTODOS PARA LA PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÁLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

1. **Método A: Transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico**

1.1. **Ámbito de aplicación**

Este método rápido es aplicable a los aceites de oliva y a los aceites de orujo de oliva con un contenido en ácidos grasos libres inferior al 3,3 %. El hidróxido potásico no produce la esterificación de los ácidos grasos libres. Los ésteres etílicos de los ácidos grasos se transesterifican más lentamente que los glicéridos y puede que sólo se metilen parcialmente.

1.2. Principio

Los ésteres metílicos se forman por transesterificación con una solución metanólica de hidróxido potásico como fase intermedia antes de que se produzca la saponificación (punto 5 del método ISO 5509: 2000, punto 5 del método IUPAC 2.301).

1.3. Reactivos

Metanol con un contenido en agua igual o inferior al 0,5 % (m/m).

Heptano para cromatografía.

Hidróxido potásico, solución metanólica 2 N aproximadamente: disolver 11,2 g de hidróxido potásico en 100 ml de metanol.

1.4. Material

Tubos de rosca (5 ml de volumen) con tapón provisto de junta de PTFE

Pipetas aforadas o automáticas de 2 ml y 0,2 ml.

1.5. Procedimiento

En un tubo de rosca de 5 ml pesar aproximadamente 0,1 g de la muestra de aceite. Añadir 2 ml de heptano y agitar. Añadir 0,2 ml de la solución metanólica 2 N de hidróxido potásico, poner el tapón provisto de junta de PTFE, cerrar bien y agitar enérgicamente durante 30 segundos. Dejar reposar hasta que la parte superior de la solución quede clara. Decantar la capa superior, que es la que contiene los ésteres metílicos. La solución de heptano está lista para inyectarse en el cromatógrafo. Es aconsejable mantener la solución en el frigorífico hasta el momento de realizar el análisis cromatográfico. No se recomienda guardar la solución durante más de 12 horas.

2. Método B: Metilación en caliente con una solución metanólica de metilato de sodio, seguida de esterificación en medio ácido**2.1. Ámbito de aplicación**

Este método es aplicable a los aceites de oliva y a los aceites de orujo de oliva con un contenido en ácidos grasos libres superior al 3,3 %.

2.2. Principio

Neutralización de los ácidos grasos libres y metanólisis alcalina de los glicéridos, seguida de esterificación de los ácidos grasos en medio ácido (punto 4.2 del método IUPAC nº 2.301).

2.3. Reactivos

- Heptano para cromatografía,
- Metanol con un contenido en agua igual o inferior al 0,05 % (m/m),
- Metilato de sodio, solución metanólica 0,2 N: disolver 5 g de sodio en 1 000 ml de metanol (puede prepararse a partir de soluciones comerciales),
- Fenoltaleína, 0,2 % solución metanólica,
- Ácido sulfúrico, en solución metanólica 1 N: añadir 3 ml de ácido sulfúrico al 96 % a 100 ml de metanol,
- Solución saturada de cloruro sódico en agua.

2.4. Material

- Matraz aforado de 50 ml, con fondo plano y cuello esmerilado largo y estrecho,
- Refrigerante de reflujo: refrigerante de aire (de 1 m de longitud) con junta esmerilada,
- Perlas para regular la ebullición,
- Embudo de cristal.

2.5. Procedimiento

Poner 0,25 g de la muestra de aceite en un matraz aforado de 50 ml, con cuello esmerilado. Con ayuda del embudo, añadir 10 ml de la solución metanólica de metilato de sodio 0,2 N y las perlas para regular la ebullición. Acoplar el refrigerante de reflujo, agitar y llevar a ebullición. La solución debería quedar límpida al cabo de unos 10 minutos. La reacción está terminada prácticamente a los 15 minutos. Retirar el matraz de la fuente de calor, esperar hasta que pare el reflujo, quitar el refrigerante y añadir dos gotas de la solución de fenoltaleína. Añadir unos mililitros de ácido sulfúrico en solución metanólica 1 N hasta que la solución quede incolora y, a continuación, añadir un exceso de 1 ml. Colocar el refrigerante y volver a llevar a ebullición durante unos 20 minutos. Retirar el matraz de la fuente de calor y enfriarlo en chorro de agua. Quitar el refrigerante, añadir 20 ml de la solución saturada de cloruro sódico y agitar. Añadir 5 ml de heptano, taponar el matraz y agitar enérgicamente durante 15 segundos.

Dejar reposar hasta que las dos fases se separen completamente. Añadir de nuevo solución saturada de cloruro sódico hasta que la fase acuosa alcance la parte inferior del cuello del matraz. La capa superior, que se encuentra en el cuello del matraz, es la que contiene los ésteres metílicos. Esta solución está lista para inyectarse en el cromatógrafo de gases.

Precaución: La metilación con el método B debe realizarse en campana extractora.

2.6. Alternativas a la metilación según el Método B

2.6.1. Método C

2.6.1.1. Principio

La materia grasa analizada se trata con solución metanólica de ácido clorhídrico, en una ampolla cerrada, a 100 °C.

2.6.1.2. Material

- Ampolla de cristal grueso con una capacidad de unos 5 ml (altura de 40 a 45 mm, diámetro de 14 a 16 mm).
- Pipetas aforadas de 1 y 2 ml.

2.6.1.3. Reactivos

Solución de ácido clorhídrico en 2 % de metanol, preparada a partir de ácido clorhídrico gaseoso y metanol anhidro (nota 1).

Hexano para cromatografía.

Nota 1: Pueden emplearse soluciones comerciales de cloruro de hidrógeno en metanol. En el laboratorio pueden prepararse fácilmente pequeñas cantidades de ácido clorhídrico gaseoso por simple desplazamiento de la solución comercial ($p = 1,18$), añadiendo algunas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Como el metanol muestra mucha avidez por el ácido clorhídrico, se aconseja tomar las precauciones necesarias para la disolución (por ejemplo, introducir el gas a través de un pequeño embudo invertido cuyo borde roce la superficie del metanol). Pueden prepararse con antelación grandes cantidades de solución metanólica de ácido clorhídrico, ya que se conserva en perfectas condiciones en la oscuridad dentro de frascos con tapones de vidrio. Este reactivo puede asimismo prepararse disolviendo cloruro de acetilo en metanol anhidro.

2.6.1.4. Procedimiento

- Colocar en la ampolla de cristal 0,2 g de la materia grasa, previamente desecada en sulfato de sodio y filtrada, y 2 ml de la solución metanólica de ácido clorhídrico. Cerrar la ampolla.
- Sumergir la ampolla a 100 °C durante 40 minutos.
- Enfriar la ampolla en chorro de agua, abrirla y añadir 2 ml de agua destilada y 1 ml de hexano.
- Centrifugar y extraer la fase del hexano, que estará lista para ser utilizada.

2.6.2. Método D

2.6.2.1. Principio

La materia grasa analizada se calienta a reflujo con metanol, hexano y ácido sulfúrico. Los ésteres metílicos obtenidos se extraen con éter de petróleo.

2.6.2.2. Material

- Tubo de ensayo de unos 20 ml de capacidad, con refrigerante de reflujo de aire de aproximadamente 1 m de longitud, con junta esmerilada.
- Pipeta aforada de 5 ml.
- Ampolla de decantación de 50 ml.
- Probetas de 10 ml y 25 ml.
- Tubo de ensayo de fondo cónico de 15 ml.

2.6.2.3. Reactivos

- Reactivo de metilación: metanol anhidro, hexano y ácido sulfúrico concentrado ($p = 1,84$) en la siguiente proporción: 75:25:1 (v/v/v).

- Éter de petróleo 40-60 °C.
- Sulfato sódico anhidro.

2.6.2.4. Procedimiento

Introducir 0,1 g de aceite en el tubo de 20 ml y añadir 5 ml del reactivo de metilación.

Acoplar el refrigerante de reflujo y calentar al baño María en ebullición durante 30 minutos (nota 2).

Pasar cuantitativamente la mezcla a una ampolla de decantación de 50 ml con 10 ml de agua destilada y 10 ml de éter de petróleo. Agitar enérgicamente y esperar a que se produzca la separación de las fases. Separar la fase acuosa y lavar dos veces la capa etérea con 20 ml de agua destilada. Añadir a la ampolla de decantación una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro, agitar, dejar reposar unos minutos y filtrar, recogiendo el filtrado en un tubo de fondo cónico de 15 ml.

Evaporar el disolvente al baño María haciendo pasar una corriente de nitrógeno.

Nota 2: Para controlar la ebullición, introducir una varita de vidrio en el tubo y limitar la temperatura del baño María a 90 °C.

3. **Parámetros de precisión**

La evaluación estadística de la precisión de los métodos A y B ha sido publicada por el Consejo Oleícola Internacional en su método COI/T.20/Doc. n° 24.

RECOMENDACIONES PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LOS ÉSTERES DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE OLIVA Y DEL ACEITE DE ORUJO DE OLIVA

1. **Procedimiento**

El análisis mediante cromatografía de gases de soluciones de ésteres grasos en hexano se realizará según la norma ISO 5508, utilizando una columna capilar (50 m de longitud \times 0,25 o 0,32 mm de diámetro interior) impregnada con cianopropilsilicona, tal como se indica para la determinación de los isómeros *trans* de los ácidos grasos (COI/T.20/Doc. n° 17).

En la figura 1 se presenta el perfil cromatográfico típico de un aceite de orujo de oliva que contiene ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos e isómeros *trans* de ésteres metílicos.

2. **Cálculos**

2.1. Para calcular la composición en ácidos grasos y el Δ ECN42, se han de tener en cuenta los siguientes ácidos grasos:

Mirístico (C14:0).

Palmítico (C16:0). Suma de las áreas de los picos correspondientes a los ésteres metílicos y etílicos.

Palmitoleico (C16:1). Suma de las áreas de los picos correspondientes a los isómeros ω 9 y ω 7 del éster metílico.

Heptadecanoico (C17:0).

Heptadecenoico (C17:1).

Esteárico (C18:0).

Oleico (C18:1). Suma de las áreas de los picos correspondientes a los isómeros ω 9 y ω 7 del éster metílico, del éster etílico y de los isómeros *trans* del éster metílico.

Linoleico (C18:2). Suma de las áreas de los picos correspondientes a los ésteres metílicos y etílicos y a los isómeros *trans* del éster metílico.

Araquídico (C20:0).

Linolénico (C18:3). Suma de las áreas del éster metílico y de los isómeros *trans* del éster metílico.

Eicosenoico (C20:1).

Behénico (C22:0).

Lignocérico (C24:0).

El escualeno no se tiene en cuenta para calcular el área total.

2.2. Para calcular el porcentaje de *trans*-C18:1 se utilizará el pico correspondiente a los ésteres metílicos de este ácido graso. Para la suma [*trans*-C18:2 + *trans*-C18:3], se sumarán todos los picos correspondientes a los isómeros *trans* de estos dos ácidos grasos. Para calcular el área total se tendrán en cuenta todos los picos mencionados en 2.1 (véase COI/T.20/Doc. n° 17).

El cálculo del porcentaje de cada ácido graso se efectuará según la siguiente fórmula:

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

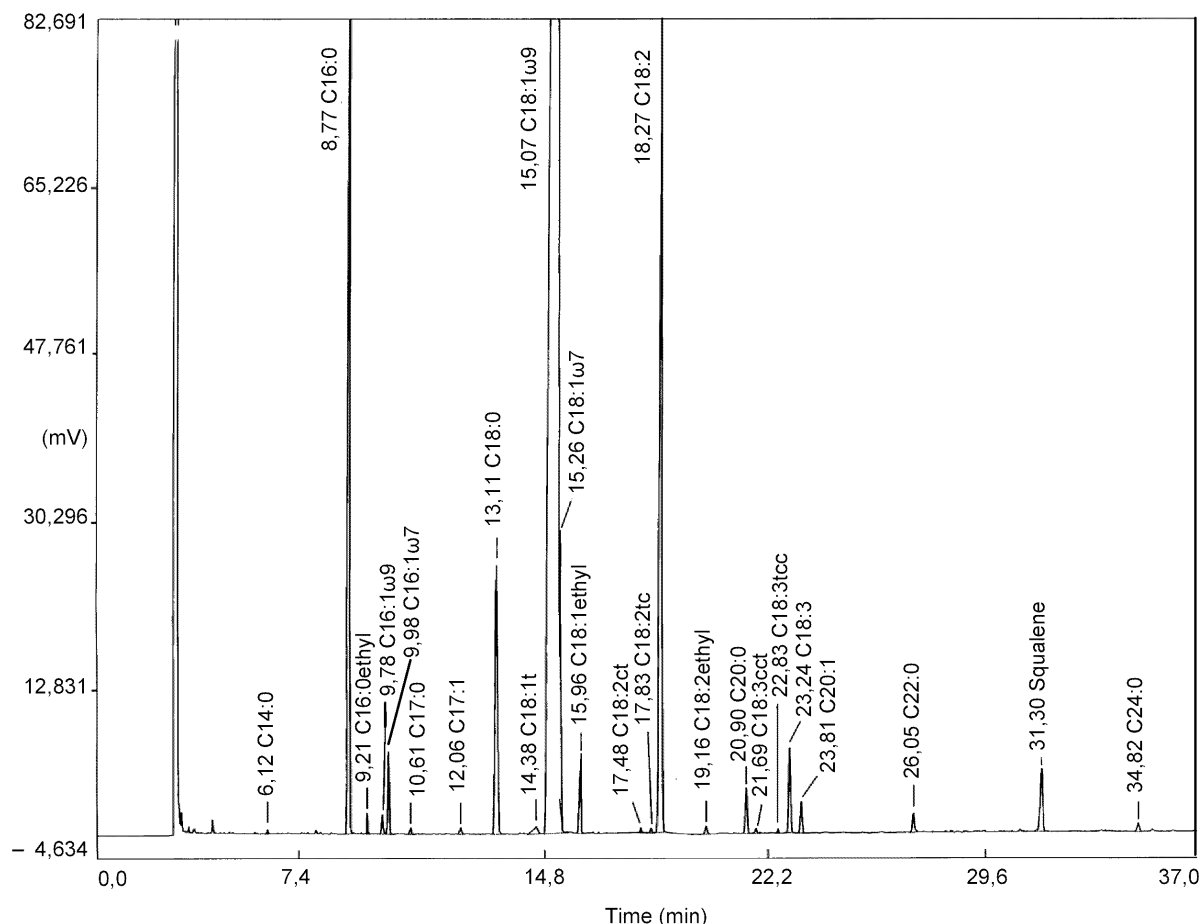


Figura 1: Perfil cromatográfico de un aceite de orujo de oliva, obtenido con el método de metilación en frío. Los picos cromatográficos corresponden a los ésteres metílicos, excepto aquellos en que se indica otra cosa.»

4. El anexo XII se sustituirá por el texto siguiente:

«ANEXO XII

VALORACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LOS ACEITES DE OLIVA VÍRGENES

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente método tiene por finalidad establecer los criterios necesarios para la valoración de las características organolépticas del aceite de oliva virgen según se define en el punto 1 del anexo del Reglamento nº 136/66/CEE, y describir las normas para su clasificación en ese sentido.

El método descrito sólo es aplicable a la clasificación de los aceites de oliva vírgenes, en función de la existencia del atributo "frutado" y de la intensidad de los defectos, determinados por un grupo de catadores seleccionados y entrenados, constituido en panel de conformidad con el punto 4.

2. ASPECTOS GENERALES

Para el vocabulario general de base, la sala de degustación, la metodología general y la copa de cata de los aceites, se recomienda ajustarse a las prescripciones del Consejo Oleícola Internacional.

3. VOCABULARIO ESPECÍFICO

3.1. Atributos positivos

Frutado: conjunto de sensaciones olfativas, dependientes de la variedad de oliva y características del aceite procedente de frutos sanos y frescos, verdes o maduros, percibido por vía directa o retronasal.

Amargo: gusto característico del aceite obtenido a partir de las aceitunas verdes o en enero.

Picante: sensación táctil de picor, característica de los aceites producidos en inicio de campaña, principalmente de aceitunas todavía verdes.

3.2. **Atributos negativos**

Atrojado: flavor característico del aceite obtenido a partir de aceitunas amontonadas en avanzado grado de fermentación anaerobia.

Moho-humedad: flavor característico del aceite obtenido a partir de aceitunas en las que se han desarrollado abundantes hongos y levaduras por haber permanecido almacenadas con humedad durante varios días.

Borras: flavor característico del aceite que ha permanecido en contacto con los lodos de decantación en trujales y depósitos.

Avinado-avinagrado: flavor característico de determinados aceites que recuerda al vino o el vinagre. Se debe fundamentalmente a un proceso de fermentación de las aceitunas que da lugar a la formación de ácido acético, acetato de etilo y etanol.

Metálico: flavor que recuerda a los metales, característica del aceite que ha permanecido mucho tiempo en contacto con superficies metálicas durante los procesos de molienda, batido, prensado o almacenamiento.

Rancio: flavor de los aceites que han sufrido un proceso de oxidación.

Cocido o quemado: flavor característico de los aceites, originada por un calentamiento excesivo y/o prolongado durante su obtención, especialmente durante el termobatido de la pasta, si éste se ha realizado en condiciones térmicas inadecuadas.

Heno-madera: flavor característico de determinados aceites procedentes de aceitunas secas.

Basto: sensación buco-táctil densa y pastosa producida por algunos aceites.

Lubricante: flavor que recuerda al del gasóleo, la grasa o el aceite mineral.

Alpechín: flavor adquirido por el aceite como consecuencia de un contacto prolongado con las aguas de vegetación.

Salmuera: flavor del aceite obtenido a partir de aceitunas conservadas en salmuera.

Esparto: flavor característico del aceite obtenido a partir de aceitunas prensadas en capachos nuevos de esparto. Puede ser diferente según se trate de capachos fabricados con esparto verde o con esparto seco.

Tierra: flavor del aceite obtenido a partir de aceitunas recogidas con tierra, embarradas y no lavadas.

Gusano: flavor del aceite obtenido a partir de aceitunas fuertemente atacadas por larvas de la mosca del olivo (*Bactrocera Oleae*).

Pepino: flavor del aceite característico de un envasado hermético excesivamente prolongado, especialmente en recipientes de hojalata, que se atribuye a la formación de 2-6 nonadienal.

4. **PANEL DE CATADORES**

El panel deberá ser nombrado por el Estado miembro y componerse de un jefe de panel y un número de catadores comprendido entre ocho y doce. No obstante, el número de catadores para la campaña 2001/02 podrá ser inferior a ocho.

El jefe del panel deberá haber recibido una sólida formación y ser un avezado experto en los diferentes tipos de aceite de oliva. Será responsable del panel, de su organización y funcionamiento y de la preparación, codificación y presentación de las muestras a los catadores, así como de la compilación de los datos y su tratamiento estadístico.

El jefe del panel seleccionará a los catadores y supervisará su entrenamiento y actuación profesional para garantizar que se mantienen en un nivel de aptitud adecuado.

Los catadores de los controles organolépticos del aceite de oliva deberán ser seleccionados y entrenados en función de su habilidad para distinguir entre muestras similares, conforme a lo establecido en la guía del Consejo Oleícola Internacional para la selección, entrenamiento y control de los catadores cualificados de aceite de oliva virgen.

Los paneles deberán comprometerse a participar en las valoraciones organolépticas que se programen en el ámbito nacional, comunitario o internacional para el control periódico y la armonización de los criterios de percepción. Además, deberán presentar anualmente al Estado miembro interesado toda la información que éste solicite sobre la composición del panel e indicarle el número de valoraciones que hayan realizado en calidad de panel autorizado.

5. **PROCEDIMIENTO DE VALORACIÓN ORGANOLÉPTICA Y CLASIFICACIÓN**

5.1. **Utilización de la ficha de cata por el catador**

En el apéndice A del presente método figura el modelo de ficha de cata que deben emplear los catadores.

Cada uno de los catadores integrantes del panel deberá oler y, acto seguido, degustar ⁽¹⁾ el aceite sometido a valoración, contenido en la copa de cata, con el fin de analizar las percepciones olfativas, gustativas, táctiles y quinesésicas. A continuación, deberá consignar en la ficha de cata que se pondrá a su disposición la intensidad con la que percibe cada uno de los atributos negativos y positivos.

En caso de que se perciban atributos negativos no indicados en la ficha de cata, deberán consignar en el apartado "Otros", empleando los términos que los describan con mayor precisión de entre los definidos en el punto 3.2 del presente método.

5.2. Utilización de los datos por el jefe de panel

El jefe de panel deberá recoger las fichas de cata cumplimentadas por cada uno de los catadores, controlar las intensidades atribuidas, y, si comprueba alguna anomalía, solicitar al catador que revise su ficha de cata y, en caso necesario, que repita la prueba.

El jefe de panel puede introducir los datos de cada catador en un programa informático conforme al método de cálculo estadístico de la mediana indicado en el apéndice B. La introducción de datos para cada muestra deberá realizarse mediante una matriz compuesta de diez columnas correspondientes a los diez atributos sensoriales y de n líneas correspondientes a los n miembros del panel de cata.

Cuando al menos el 50 % del panel inscriba un atributo negativo en el apartado "Otros", el jefe de panel deberá proceder al cálculo de la mediana de este atributo y a la clasificación correspondiente.

En el caso de los análisis efectuados a propósito de los controles de conformidad con las normas o de los análisis contradictorios, el jefe de panel deberá ordenar que se proceda a la valoración organoléptica del aceite por triplicado, con al menos un día de intervalo entre cada prueba; la mediana de los atributos se calculará a partir del conjunto de datos de las fichas de cata de las tres pruebas.

5.3. Clasificación de los aceites

El aceite se clasifica bajo las denominaciones que se indican más adelante, en función de la mediana de los defectos y de la mediana del atributo "frutado". Por mediana de los defectos se entiende la mediana del atributo negativo percibido con mayor intensidad. El valor del coeficiente de variación sólido para ese atributo negativo debe ser inferior o igual al 20 %.

- a) *Aceite de oliva virgen extra*: la mediana de los defectos es igual a 0 y la del atributo "frutado" superior a 0.
- b) *Aceite de oliva virgen*: la mediana de los defectos es superior a 0 e inferior a igual a 2,5 y la del atributo "frutado" superior a 0.
- c) *Aceite de oliva virgen corriente*: la mediana de los defectos es superior a 2,5 e inferior o igual a 6,0, o bien, la mediana de los defectos es inferior o igual a 2,5 y la del atributo "frutado" igual a 0.
- d) *Aceite de oliva virgen lampante*: la mediana de los defectos es superior a 6,0.

No obstante, a partir del 1 de noviembre de 2003, las categorías c) y d) quedan sustituidas por la siguiente categoría única:

- c) *Aceite de oliva lampante*: la mediana de los defectos es superior a 2,5, o bien, la mediana de los defectos es inferior o igual a 2,5 y la del atributo "frutado" es igual a 0.

5.4. Casos particulares

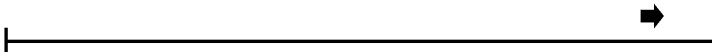

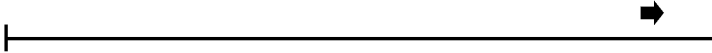
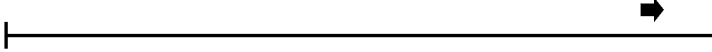
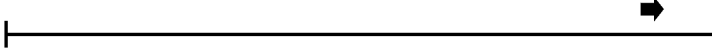
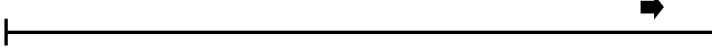
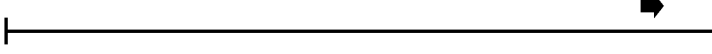
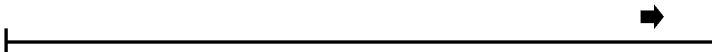

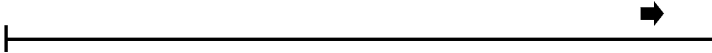
Cuando la mediana de los atributos positivos distintos de "frutado" sea superior a 5,0, el jefe de panel consignará tal extremo en el certificado de análisis del aceite.

⁽¹⁾ Podrá abstenerse de la degustación cuando aprecie algunos atributos negativos sumamente intensos, circunstancia excepcional que deberá indicar en la ficha de cata.

APÉNDICE A

Ficha de cata

(para uso de catadores)

PERCEPCIÓN DE LOS DEFECTOS	INTENSIDAD
Atrojado	
Moho-húmedo	
Vinado-avinagrado	
Borras	
Metálico	
Rancio	
Otros (especifíquense)	
PERCEPCIÓN DE LOS ATRIBUTOS POSITIVOS	
Frutado	
Amargo	
Picante	

Nombre del catadorCódigo de la muestrafecha

APÉNDICE B

MÉTODO DE CÁLCULO DE LA MEDIANA Y DE LOS INTERVALOS DE CONFIANZA

Mediana

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

La mediana es la cifra real X_m caracterizada por el hecho de que la probabilidad (P) de que los valores de la distribución (X) sean inferiores a esa cifra (X_m) es inferior o igual a 0,5, y de que, simultáneamente, la probabilidad (P) de que los valores de la distribución (X) sean inferiores o iguales a X_m es superior o igual a 0,5. Otra definición considera la mediana como el percentil 50 de una distribución de cifras ordenadas de forma creciente. En otros términos, la mediana representa el valor central de una serie ordenada de cifras impares, o bien la media de los dos valores centrales de una serie ordenada de cifras pares.

Desviación típica sólida

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

Para obtener una estimación fiable de la variabilidad que se produce en torno a la mediana, es preciso referirse a la estimación de la desviación típica sólida de Stuart y Kendall. La fórmula de la desviación típica asintótica depende de N e IQR. N es el número de observaciones e IQR el rango intercuartílico, es decir, la estimación sólida de la variabilidad de los datos considerados (el rango intercuartílico encierra exactamente el 50 % de los casos de una distribución cualquiera de probabilidad). Para determinar el rango intercuartílico se calcula la dimensión de la desviación entre los percentiles 75 y 25.

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

El percentil es el valor X_{pc} caracterizado por el hecho de que la probabilidad (P) de que los valores de la distribución sean inferiores a X_{pc} es inferior o igual a una centésima determinada, y de que, simultáneamente, la probabilidad (P) de que los valores de la distribución sean inferiores o iguales a X_{pc} es superior o igual a dicha centésima. La centésima indica la fracción de distribución escogida. En el caso de la mediana, ésta es igual a 50/100.

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

En otras palabras, el percentil es el valor de distribución que corresponde a un área determinada, trazada a partir de la curva de distribución o de densidad. Por ejemplo, el percentil 25 representa el valor de distribución correspondiente a un área igual a 0,25 o 25/100.

Coefficiente de variación sólido en %

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

El CVR es una cifra pura, es decir, carente de dimensión, que indica el porcentaje de variabilidad de la serie de cifras analizadas en relación con el valor Me de la mediana; por ese motivo, este coeficiente resulta muy útil a la hora de comprobar la fiabilidad de los miembros del panel de cata.

Intervalos de confianza al 95 % sobre la mediana

Los intervalos de confianza (IC) al 95 % (valor del error de primera especie igual a 0,05, o 5 %) constituyen el intervalo dentro del que podría variar el valor de la mediana en la hipótesis de que fuera posible repetir la experiencia un número infinito de veces. En la práctica, este intervalo indica el intervalo de variabilidad de la prueba en las condiciones fijadas, en la hipótesis de que el ensayo pueda repetirse varias veces. Al igual que el CVR, el intervalo contribuye a evaluar la fiabilidad de la prueba.

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

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

Donde c, en el caso del intervalo de confianza a 0,95, es igual a 1,96.

La clasificación se efectúa mediante la comparación de los valores de la mediana con los intervalos de referencia establecidos en el punto 5.3 del método. El programa informático permite visualizar la clasificación en un cuadro de datos estadísticos o en un gráfico.»

5. Se suprimirá el anexo XIV.
6. Se añadirá el anexo XIX siguiente.

«ANEXO XIX

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCOHOLES ALIFÁTICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR

1. OBJETO

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido de alcoholes alifáticos en las materias grasas, expresado como contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos analizados y como contenido total.

2. PRINCIPIO

Saponificación de la materia grasa, a la que se habrá añadido 1-eicosanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación, extracción del insaponificable con éter etílico. Separación de la fracción alcohólica del insaponificable mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica; los alcoholes recuperados del gel de sílice se transforman en trimetilsililéteres y se analizan mediante cromatografía de gases con columna capilar.

3. EQUIPO

- 3.1. Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- 3.2. Embudos de decantación de 500 ml.
- 3.3. Matraces de 250 ml.
- 3.4. Equipo completo de cromatografía en capa fina (fase sólida), con placas de vidrio de 20 × 20 cm.
- 3.5. Lámpara ultravioleta de una longitud de onda de 366 o 254 nm.
- 3.6. Microjeringas de 100 y 500 µl.
- 3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3 (porosidad 15-40 µm), de 2 cm de diámetro y 5 cm de altura, aproximadamente, con un dispositivo adecuado para la filtración en vacío y una junta esmerilada macho 12/21.
- 3.8. Matraz cónico para vacío de 50 ml, con junta esmerilada hembra 12/21 acoplable al embudo filtrante (3.7).
- 3.9. Tubo de 10 ml de fondo cónico con tapón hermético.
- 3.10. Cromatógrafo de gases que pueda funcionar con columna capilar, provisto de un sistema de fraccionamiento, formado por:
 - 3.10.1. Horno termostático para la columna, que pueda mantener la temperatura deseada con precisión aproximada de 1 °C.
 - 3.10.2. Inyector termorregulable con elemento vaporizador de vidrio persilanizado.
 - 3.10.3. Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.
 - 3.10.4. Registrador-integrador que pueda funcionar con un convertidor-amplificador, con un tiempo de respuesta no superior a 1 segundo y con velocidad de papel variable.
- 3.11. Columna capilar de vidrio o sílice fundida, de 20 a 30 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de líquido SE-52, SE-54 o equivalente, con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30 µm.
- 3.12. Microjeringa de 10 µl para cromatografía de gases, con aguja endurecida.
- 3.13. Balanza de precisión con sensibilidad de 1 mg e indicación de 0,1 mg.

4. REACTIVOS

- 4.1. Hidróxido potásico en solución etanólica aproximadamente 2 N: disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (título mínimo del 85 %) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol. Conservar la solución en botellas de vidrio opaco bien cerradas.
- 4.2. Éter etílico de calidad para análisis.
- 4.3. Sulfato sódico anhidro de calidad para análisis.

- 4.4. Placas de vidrio recubiertas con gel de sílice, sin indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor (disponibles en el comercio ya preparadas para el uso).
- 4.5. Hidróxido potásico en solución etanólica 0,2 N: disolver 13 g de hidróxido potásico en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol.
- 4.6. Benceno para cromatografía (5.2.2).
- 4.7. Acetona para cromatografía (5.2.2).
- 4.8. Hexano para cromatografía (5.2.2).
- 4.9. Éter etílico para cromatografía (5.2.2).
- 4.10. Cloroformo de calidad para análisis.
- 4.11. Solución de referencia para cromatografía en capa fina: colesterol o fitosterol, solución al 0,5 % en cloroformo.
- 4.12. Solución de 2,7-diclorofluoresceína al 0,2 % en etanol; para hacerla ligeramente básica se añaden algunas gotas de solución alcohólica 2 N de hidróxido potásico.
- 4.13. Piridina anhidra para cromatografía.
- 4.14. Hexametildisilazano.
- 4.15. Trimetilclorosilano.
- 4.16. Solución patrón de trimetilsililéteres de los alcoholes alifáticos de C₂₀ a C₂₈; debe prepararse en el momento de utilización a partir de mezclas de alcoholes puros.
- 4.17. 1-eicosanol, solución al 0,1 % (m/v) en cloroformo (patrón interno).
- 4.18. Gas portador: hidrógeno o helio puro, de calidad para cromatografía de gases.
- 4.19. Gas auxiliar: nitrógeno puro, de calidad para cromatografía de gases.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Preparación del insaponificable

- 5.1.1. Con la microjeringa de 500 µl, introducir en el matraz de 250 ml un volumen de solución de 1-eicosanol al 0,1 % en cloroformo (4.17) que contenga una cantidad de 1-eicosanol correspondiente al 10 % aproximadamente del contenido de alcoholes alifáticos en la alícuota de la muestra para la determinación. Por ejemplo, para 5 g de muestra, añadir 250 µl de la solución de 1-eicosanol al 0,1 %, si se trata de aceite de oliva, y 1 500 µl si se trata de aceite de orujo de oliva.

Evaporar en corriente de nitrógeno hasta sequedad y, a continuación, pesar con precisión, en el mismo matraz, 5 g de muestra seca y filtrada.

- 5.1.2. Añadir 50 ml de solución etanólica de hidróxido potásico 2 N, poner en funcionamiento el refrigerante de reflujo y calentar al baño María con ligera ebullición, agitando enérgica e ininterrumpidamente hasta que se produzca la saponificación (la solución se vuelve límpida). Calentar durante 20 minutos más y, a continuación, añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del refrigerante; separar éste y enfriar el matraz a 30 °C aproximadamente.
- 5.1.3. Pasar cuantitativamente el contenido del matraz a una ampolla de decantación de 500 ml, mediante varios lavados con un total de unos 50 ml de agua destilada. Agregar 80 ml aproximadamente de éter etílico, agitar enérgicamente durante unos 30 segundos y dejar reposar hasta la completa separación de las fases (nota 1).

Separar la fase acuosa inferior pasándola a una segunda ampolla de decantación. Efectuar otras dos extracciones de la fase acuosa por el mismo procedimiento, utilizando cada vez de 60 a 70 ml de éter etílico.

Nota 1: Las posibles emulsiones pueden eliminarse añadiendo una pequeña cantidad de alcohol etílico o metílico con un pulverizador.

- 5.1.4. Reunir las fracciones etéreas en una misma ampolla de decantación y lavarlas con agua destilada (50 ml cada vez) hasta que el agua de lavado presente reacción neutra.

Una vez eliminada el agua de lavado, desecar con sulfato sódico anhidro y filtrar sobre sulfato sódico anhidro a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando la ampolla y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico.

- 5.1.5. Destilar el éter hasta que quede una pequeña cantidad; a continuación, secar en vacío ligero o en corriente de nitrógeno y completar el secado en estufa a 100 °C durante 15 minutos aproximadamente; dejar enfriar en un desecador y pesar.

5.2. Separación de la fracción alcohólica

- 5.2.1. Preparación de las placas básicas: sumergir completamente las placas con gel de sílice (4.4) en la solución etanólica 0,2 N de hidróxido potásico (4.5) durante 10 segundos; dejarlas en reposo; secarlas bien bajo campana de aspiración durante dos horas y, por último, ponerlas en estufa a 100 °C durante una hora.

Sacarlas de la estufa y conservarlas en un desecador de cloruro de calcio hasta el momento del uso (las placas sometidas a este tratamiento deben utilizarse en el plazo de quince días como máximo).

Nota 2: Si se utilizan placas básicas de gel de sílice para la separación de la fracción alcohólica, ya no es necesario tratar el insaponificable con alúmina. De esta manera, se retienen en la línea de aplicación todos los componentes de naturaleza ácida (ácidos grasos y otros). Así se obtiene la banda de alcoholes alifáticos y terpénicos netamente separada de la banda de esteroides.

- 5.2.2. Introducir en la cubeta de desarrollo de las placas una mezcla de hexano-éter etílico 65:35 (v/v) hasta una altura de 1 cm aproximadamente (*).

Cerrar la cubeta con su correspondiente tapa y dejar transcurrir media hora como mínimo, de forma que se alcance el equilibrio líquido-vapor. En las caras interiores de la cubeta pueden colocarse tiras de papel de filtro que se sumerjan en el eluyente: de esta manera el tiempo de desarrollo se reduce casi un tercio y se obtiene una elución más uniforme y regular de los componentes.

Nota 3: A fin de que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla debe cambiarse para cada prueba.

- 5.2.3. Preparar una solución de insaponificable (5.1.5) en cloroformo al 5 % aproximadamente y, con la microjeringa de 100 µl, depositar 0,3 ml de dicha solución en la placa cromatográfica (5.2.1) a unos 2 cm de uno de los bordes, formando una línea continua lo más fina y uniforme posible. A la altura de la línea de aplicación se depositan, en un extremo de la placa, de 2 a 3 µl de la solución de referencia de alcoholes alifáticos (4.11) para poder identificar la banda de alcoholes alifáticos en el revelado.

- 5.2.4. Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, preparada como se indica en el punto 5.2.2. Deberá mantenerse una temperatura de entre 15 y 20 °C. Tapar inmediatamente la cubeta con su tapa y dejar que se produzca la elución hasta que el frente del disolvente se sitúe a 1 cm aproximadamente del borde superior de la placa.

Sacar la placa de la cubeta y evaporar el disolvente en una corriente de aire caliente o bien dejando la placa bajo campana de aspiración un breve momento.

- 5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2,7-diclorofluoresceína. Identificar la banda de alcoholes alifáticos mediante comparación con la mancha obtenida con la solución de referencia; marcar con lápiz negro el conjunto de la banda de alcoholes alifáticos y de la banda inmediatamente superior correspondiente a los alcoholes triterpénicos.

Nota 4: La prescripción de recoger el conjunto de la banda de alcoholes alifáticos y de la banda de alcoholes terpénicos responde al hecho de que ésta, en las condiciones del método, incluye cantidades significativas de alcoholes alifáticos.

- 5.2.6. Rascar con una espátula metálica el gel de sílice contenido en el área delimitada. Introducir el material obtenido, finamente triturado, en el embudo filtrante (3.7); añadir 10 ml de cloroformo caliente, mezclar cuidadosamente con la espátula metálica y filtrar en vacío, recogiendo el filtrado en el matraz cónico (3.8) acoplado al embudo filtrante.

Lavar el residuo en el embudo tres veces con éter etílico (empleando cada vez unos 10 ml), recogiendo cada vez el filtrado en el mismo matraz cónico acoplado al embudo. Evaporar el filtrado hasta obtener un volumen aproximado de 4 a 5 ml, transvasar la solución residual al tubo de 10 ml (3.9) previamente pesado, evaporar hasta sequedad mediante calentamiento suave en corriente ligera de nitrógeno, recoger con algunas gotas de acetona, evaporar de nuevo hasta sequedad, introducir en estufa a 105 °C durante unos 10 minutos, dejar enfriar en el desecador y pesar.

El residuo que queda en el tubo de ensayo está formado por la fracción alcohólica.

5.3. Preparación de los trimetilsililéteres

- 5.3.1. Agregar al tubo que contiene la fracción de alcoholes el reactivo de silanización formado por una mezcla de piridina, hexametildisilazano y trimetilclorosilano 9:3:1 (V/V/V) (nota 5), a razón de 50 µl por miligramo de alcoholes evitando toda absorción de humedad (nota 6).

Nota 5: Existen soluciones comerciales listas para el uso. Además, también existen otros reactivos de silanización, como la bis-trimetilsililfluoroacetamida + 1 % de trimetilclorosilano, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra.

Nota 6: La eventual formación de una ligera opalescencia es normal y no ocasiona ninguna interferencia. La formación de una floculación blanca o la aparición de una coloración rosa son indicios de presencia de humedad o de deterioro del reactivo. En este caso deberá repetirse la prueba.

- 5.3.2. Tapar el tubo y agitar cuidadosamente (sin invertir) hasta la total disolución de los alcoholes. Dejar reposar al menos un cuarto de hora a temperatura ambiente y centrifugar durante algunos minutos; la solución límpida queda lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

(*) En ciertos casos particulares, para obtener una buena separación de las bandas es necesario emplear como eluyente la mezcla benceno-acetona 95/5 (v/v).

5.4. Cromatografía de gases

5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna

5.4.1.1. Colocar la columna en el cromatógrafo de gases, uniendo el extremo de entrada al inyector conectado al sistema de fraccionamiento y el extremo de salida al detector. Efectuar los controles generales del equipo de cromatografía de gases (estanqueidad de los circuitos de gases, eficacia del detector, eficacia del sistema de fraccionamiento y del sistema de registro, etc.).

5.4.1.2. Si la columna se utiliza por vez primera, es conveniente acondicionarla previamente. Hacer pasar un ligero flujo de gas a través de la columna, encender después el equipo de cromatografía de gases e iniciar un calentamiento gradual hasta alcanzar una temperatura superior al menos en 20 °C a la temperatura de trabajo (nota 7). Mantener dicha temperatura durante 2 horas como mínimo; a continuación, poner el equipo completo en condiciones de funcionamiento [regulación del flujo de gases y del fraccionamiento (*split*), encendido de la llama, conexión con el registrador electrónico, regulación de la temperatura del horno, del detector y del inyector, etc.] y registrar la señal con una sensibilidad al menos dos veces superior a la prevista para el análisis. El trazado de la línea de base debe ser lineal, estar exento de picos de cualquier tipo y no debe presentar deriva. Una deriva rectilínea negativa indica que las conexiones de la columna no son totalmente estancas; una deriva positiva indica que el acondicionamiento de la columna es insuficiente.

Nota 7: La temperatura de acondicionamiento debe ser siempre inferior en, como mínimo, 20 °C a la temperatura máxima prevista para la fase estacionaria utilizada.

5.4.2. Elección de las condiciones de trabajo

5.4.2.1. Las condiciones de trabajo sugeridas son las siguientes:

- temperatura de la columna: inicialmente isoterma durante 8 minutos a 180 °C; a continuación, programar un incremento de 5 °C/minuto hasta alcanzar los 260 °C y mantener después 15 minutos a 260 °C,
- temperatura del evaporador (inyector): 280 °C,
- temperatura del detector: 290 °C,
- velocidad lineal del gas portador: helio 20 a 35 cm/s, hidrógeno 30 a 50 cm/s,
- relación de fraccionamiento (*split*): de 1/50 a 1/100,
- sensibilidad del instrumento: de 4 a 16 veces la atenuación mínima,
- sensibilidad de registro: 1 a 2 mV f.e.,
- velocidad del papel: 30 a 60 cm/hora,
- cantidad de sustancia inyectada: 0,5 a 1 µl de solución de TMSE.

Estas condiciones pueden modificarse en función de las características de la columna y del cromatógrafo, de modo que se obtengan cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos:

- el tiempo de retención del alcohol C₂₆ debe ser de 18 ± 5 minutos,
- el pico del alcohol C₂₂ debe ser el 80 ± 20 % de la escala de fondo en el caso del aceite de oliva y el 40 ± 20 % de la escala de fondo en el caso del aceite de semillas.

5.4.2.2. Para comprobar los requisitos citados, efectuar varias inyecciones de mezclas problema de TMSE de alcoholes y ajustar las condiciones de trabajo para obtener los mejores resultados.

5.4.2.3. Los parámetros de integración de los picos deben establecerse de modo que se obtenga una evaluación correcta de las áreas de los picos tomados en consideración.

5.4.3. Realización del análisis

5.4.3.1. Con la microjeringa de 10 µl tomar 1 µl de hexano, aspirar 0,5 µl de aire y, a continuación, entre 0,5 y 1 µl de la solución problema; elevar el émbolo de la jeringa de modo que la aguja quede vacía. Introducir la aguja a través de la membrana del complejo de inyección y, después de 1 o 2 segundos, inyectar rápidamente; transcurridos unos 5 segundos, extraer la aguja lentamente.

5.4.3.2. Continuar el registro hasta la completa elución de los TMSE de los alcoholes presentes. La línea de base debe ajustarse en todo momento a las condiciones exigidas (5.4.1.2).

5.4.4. Identificación de los picos

Para la identificación de los diferentes picos se utilizan los tiempos de retención y la comparación con la mezcla de TMSE de los alcoholes alifáticos, analizada en las mismas condiciones.

La figura 1 muestra un cromatograma de la fracción alcohólica de un aceite de oliva virgen.

5.4.5. Determinación cuantitativa

5.4.5.1. Calcular las áreas de los picos del 1-eicosanol y de los alcoholes alifáticos C_{22} , C_{24} , C_{26} y C_{28} utilizando el integrador.

5.4.5.2. Calcular del modo siguiente el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos, expresado en miligramos por 1 000 gramos de materia grasa:

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

donde:

A_x = área del pico del alcohol x

A_s = área del pico del 1-eicosanol

m_s = peso de 1-eicosanol añadido, en miligramos

m = peso de la muestra tomada para la determinación, en gramos.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se expresa el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos en miligramos por 1 000 gramos de materia grasa y su suma como "alcoholes alifáticos totales."

APÉNDICE

Determinación de la velocidad lineal del gas

Inyectar en el cromatógrafo de gases, preparado para trabajar en condiciones normales, de 1 a 3 µl de metano (o propano) y medir el tiempo que tarda el gas en recorrer la columna, desde el momento de la inyección hasta el momento en que aparece el pico (tM).

La velocidad lineal en cm/s viene dada por L/tM , siendo L la longitud de la columna en cm y tM el tiempo, expresado en segundos.

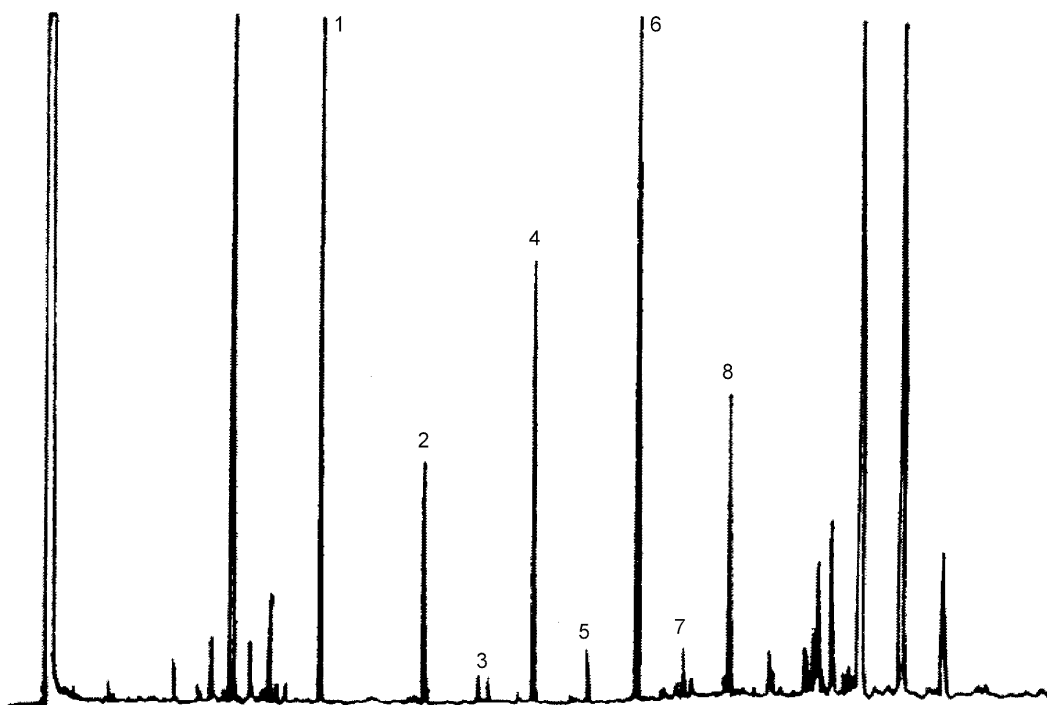


Figura 1 — Cromatograma de la fracción alcohólica de un aceite virgen

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