

## I

(Actos cuya publicación es una condición para su aplicabilidad)

REGLAMENTO (CEE) N° 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

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento n° 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 <sup>(1)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) n° 3577/90 <sup>(2)</sup>, y, en particular, su artículo 35 bis,

Considerando que en el Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE se establecen las denominaciones y definiciones de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva comercializados dentro de cada Estado miembro, así como en los intercambios intracomunitarios y con terceros países;

Considerando que, para poder distinguir los diferentes tipos de aceite, procede definir las características fisicoquímicas de cada uno de ellos, así como las características organolépticas de los aceites vírgenes, a fin de garantizar así la pureza y calidad de estos productos, sin perjuicio de otras disposiciones existentes en la materia;

Considerando que conviene determinar de manera uniforme en toda la Comunidad la presencia de las características de los diferentes tipos de aceite; que, para ello, procede establecer los métodos comunitarios de análisis químico y de valoración organoléptica; que conviene, sin embargo, permitir que durante un período transitorio se utilicen otros métodos de análisis que sean aplicados en los Estados miembros, estableciendo al mismo tiempo que en caso de presentarse resultados divergentes prevalezcan los obtenidos a través del método común;

Considerando que la definición de las características fisicoquímicas de los aceites de oliva y de sus métodos de análisis comporta la adaptación de las notas complementarias del capítulo 15 de la nomenclatura combinada;

Considerando que el método de valoración de las características organolépticas de los aceites vírgenes requiere la creación de unos paneles de catadores seleccionados y

especialmente adiestrados; que conviene, por lo tanto, prever el plazo necesario para instaurar una estructura de este tipo; que, dadas las dificultades a las que se enfrentarían determinados Estados miembros para crear dichos paneles, procede autorizar que se recurra a paneles existentes en otros Estados miembros;

Considerando que, para garantizar el correcto funcionamiento del sistema de las exacciones reguladoras aplicables a la importación de orujo de oliva, es conveniente prever un método único para la determinación del contenido en aceite de estos productos;

Considerando que, para no perjudicar el comercio, resulta oportuno prever un período limitado para la salida al mercado del aceite que haya sido envasado antes de la entrada en vigor del presente Reglamento;

Considerando que procede derogar el Reglamento (CEE) n° 1058/77 de la Comisión <sup>(3)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) n° 1858/88 <sup>(4)</sup>;

Considerando que el Comité de gestión de las materias grasas no ha emitido dictamen alguno en el plazo establecido por su presidente,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

1. Se considerarán aceites de oliva vírgenes, a que se refieren las letras a), b), y c) del punto 1 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, los aceites cuyas características se ajusten a las indicadas, respectivamente, en los puntos 1, 2 y 3 del Anexo I del presente Reglamento.

2. Se considerará aceite de oliva virgen lampante, a que se refiere la letra d) del punto 1 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 4 del Anexo I del presente Reglamento.

3. Se considerará aceite de oliva refinado, a que se refiere el punto 2 del Anexo del Reglamento n° 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 5 del Anexo I del presente Reglamento.

<sup>(1)</sup> DO n° 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.

<sup>(2)</sup> DO n° L 353 de 17. 12. 1990, p. 23.

<sup>(3)</sup> DO n° L 128 de 24. 5. 1977, p. 6.

<sup>(4)</sup> DO n° L 166 de 1. 7. 1988, p. 10.

4. Se considerará aceite de oliva, a que se refiere el punto 3 del Anexo del Reglamento nº 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 6 del Anexo I del presente Reglamento.

5. Se considerará aceite de orujo de oliva crudo, a que se refiere el punto 4 del Anexo del Reglamento nº 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 7 del Anexo I del presente Reglamento.

6. Se considerará aceite de orujo de oliva refinado, a que se refiere el punto 5 del Anexo del Reglamento nº 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 8 del Anexo I del presente Reglamento.

7. Se considerará aceite de orujo de oliva, a que se refiere el punto 6 del Anexo del Reglamento nº 136/66/CEE, el aceite cuyas características se ajusten a las indicadas en el punto 9 del Anexo I del presente Reglamento.

#### Artículo 2

1. Las características de los aceites, previstas en el Anexo I, se determinarán empleando los métodos de análisis siguientes:

- para determinar los ácidos grasos libres, expresados en porcentaje de ácido oleico, el método recogido en el Anexo II,
- para determinar el índice de peróxidos, el método recogido en el Anexo III,
- para determinar los alcoholes alifáticos, el método recogido en el Anexo IV,
- para determinar el contenido de esteroides, el método recogido en el Anexo V,
- para determinar el eritrodíol + uvaol, el método recogido en el Anexo VI,
- para determinar los ácidos grasos saturados en la posición 2 del triglicérido, el método recogido en el Anexo VII,
- para determinar el contenido de trilinoleína, el método recogido en el Anexo VIII,
- para el análisis espectrofotométrico, el método recogido en el Anexo IX,
- para determinar la composición de ácidos grasos, el método recogido en los Anexos X «A» y X «B»,
- para determinar los solventes halogenados volátiles, el método recogido en el Anexo XI,
- para la valoración de las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes, el método recogido en el Anexo XII, que se aplicará de conformidad con el apartado 2,
- para la prueba de la refinación, el método recogido en el Anexo XIII.

2. El analista, asistido en su caso por expertos, llevará a cabo la valoración de las características organolépticas con arreglo al procedimiento descrito en la ficha de degustación contemplada en el Anexo XII. En caso de que el análisis determine características organolépticas distintas de las resultantes de la denominación del producto, el analista someterá la muestra al examen de un panel de catadores, con arreglo a las disposiciones del Anexo XII.

El análisis contradictorio será realizado por el panel de catadores de conformidad con las disposiciones citadas anteriormente.

Para la valoración de las características organolépticas con ocasión de operaciones relacionadas con el régimen de intervención, el panel de catadores procederá a aquella con arreglo a las disposiciones del Anexo XII.

#### Artículo 3

Hasta el 31 de octubre de 1992, la introducción de los métodos de análisis previstos en el artículo 2 no será óbice para que los Estados miembros empleen otros métodos comprobados y científicamente válidos, siempre que con ello no se obstaculice la libre circulación de los productos reconocidos conformes a la normativa en aplicación de los métodos comunitarios. Los Estados miembros interesados comunicarán a la Comisión dichos otros métodos antes de utilizarlos.

En caso de que alguno de estos otros métodos dé un resultado diferente del alcanzado por el método común, se considerará válido el resultado obtenido en aplicación del método común.

#### Artículo 4

1. A fin de apreciar las características organolépticas, los Estados miembros constituirán paneles de catadores seleccionados y entrenados de acuerdo con las normas previstas en el método descrito en el Anexo XII.

2. En caso de que un Estado miembro tenga dificultades para constituir un panel en su territorio podrá recurrir a un panel que se halle establecido en otro Estado miembro.

#### Artículo 5

Las notas complementarias números 2, 3 y 4 del capítulo 15 de la nomenclatura combinada se sustituirán por las que figuran en el Anexo XIV del presente Reglamento.

#### Artículo 6

1. El contenido en aceite de orujo de aceituna y demás residuos de la extracción del aceite de oliva (códigos NC 2306 90 11 y 2306 90 19) se determinará con arreglo al método recogido en el Anexo XV.

2. El contenido de aceite mencionado en el apartado 1 se expresará como porcentaje del extracto seco en peso.

#### Artículo 7

Serán aplicables las disposiciones comunitarias sobre la presencia de sustancias extrañas distintas de las mencionadas en el Anexo XI.

#### Artículo 8

1. Cada Estado miembro comunicará a la Comisión las medidas adoptadas en aplicación del presente Reglamento.

2. Cada Estado miembro comunicará a la Comisión, al inicio de cada semestre una recapitulación de los datos analíticos de las determinaciones efectuadas durante el semestre precedente.

Estos resultados serán examinados por el Comité de gestión de las materias grasas con arreglo al procedimiento previsto en el artículo 39 del Reglamento n° 136/66/CEE.

#### Artículo 9

Queda derogado el Reglamento (CEE) n° 1058/77.

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

Hecho en Bruselas, el 11 de julio de 1991.

#### Artículo 10

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

No obstante, el método que figura en el Anexo XII se aplicará a partir del 1 de enero de 1992, excepto en lo que se refiere a las operaciones relacionadas con la intervención.

El presente Reglamento no se aplicará a los aceites de oliva y de orujo de oliva envasados antes de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento y comercializados hasta el 31 de octubre de 1992.

*Por la Comisión*

RAY MAC SHARRY

*Miembro de la Comisión*

### ANEXOS

#### Índice

|  | Página |
|--|--------|
| Anexo I: Características de los aceites de oliva .....   | 4      |
| Anexo II: Determinación del grado de acidez .....  | 6      |
| Anexo III: Determinación del índice de peróxidos .....   | 8      |
| Anexo IV: Determinación del contenido de alcoholes alifáticos mediante cromatografía de gases con columna capilar .....          | 10     |
| Anexo V: Determinación de la composición y del contenido de esteroides mediante cromatografía de gases con columna capilar ..... | 15     |
| Anexo VI: Determinación del eritrodol y uvaol .....  | 23     |
| Anexo VII: Determinación de los ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos de aceites y grasas .....          | 25     |
| Anexo VIII: Determinación del porcentaje de trioleína .....  | 29     |
| Anexo IX: Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta .....  | 33     |
| Anexo X-A: Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases .....                          | 36     |
| Anexo X-B: Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos .....   | 44     |
| Anexo XI: Determinación del contenido en solventes halogenados volátiles en el aceite de oliva .....                             | 48     |
| Anexo XII: Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen .....   | 49     |
| Anexo XIII: Prueba de la refinación .....  | 75     |
| Anexo XIV: Notas complementarias 2, 3 y 4 del capítulo 15 de la nomenclatura combinada .....                                     | 77     |
| Anexo XV: Contenido de aceite de los orujos de aceituna .....  | 80     |
| Anexo XVI: Determinación del índice de yodo .....  | 82     |

ANEXO I  
CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

| Categoría                            | Acidez % | Índice de peróxidos meq/O <sub>2</sub> /kg | Solventes halogenados mg/kg (1) | Alcoholes alifáticos mg/kg | Ácidos grasos saturados en posición 2 de los triglicéridos % | Eritrodíol + uvaol % | Trilinoleína % | Colesterol % | Brassicasterol % | Campesterol % | Estigmasterol % | Betasiosterol % (2) | Δ-Estigmasterol % | Esteroles totales mg/kg |
|--------------------------------------|----------|--|---------------------------------|----------------------------|--|----------------------|----------------|--------------|------------------|---------------|-----------------|---------------------|-------------------|-------------------------|
| 1. Aceite de oliva virgen extra      | M 1,0    | M 20                                       | M 0,200                         | M 300                      | M 1,3  | M 4,5                | M 0,5          | M 0,5        | M 0,2            | M 4,0         | < Camp.         | m 93,0              | M 0,5             | m 1 000                 |
| 2. Aceite de oliva virgen            | M 2,0    | M 20                                       | M 0,200                         | M 300                      | M 1,3  | M 4,5                | M 0,5          | M 0,5        | M 0,2            | M 4,0         | < Camp.         | m 93,0              | M 0,5             | m 1 000                 |
| 3. Aceite de oliva virgen corriente  | M 3,3    | M 20                                       | M 0,200                         | M 300                      | M 1,3  | M 4,5                | M 0,5          | M 0,5        | M 0,2            | M 4,0         | < Camp.         | m 93,0              | M 0,5             | m 1 000                 |
| 4. Aceite de oliva virgen lampante   | ≥ 3,3    | ≥ 20                                       | ≥ 0,200                         | M 400                      | M 1,3  | M 4,5                | M 0,5          | M 0,5        | M 0,2            | M 4,0         | —               | m 93,0              | M 0,5             | m 1 000                 |
| 5. Aceite de oliva refinado          | M 0,5    | M 10                                       | M 0,200                         | M 350                      | M 1,5  | M 4,5                | M 0,5          | M 0,5        | M 0,2            | M 4,0         | < Camp.         | m 93,0              | M 0,5             | m 1 000                 |
| 6. Aceite de oliva                   | M 1,5    | M 15                                       | M 0,200                         | M 350                      | M 1,5  | M 4,5                | M 0,5          | M 0,5        | M 0,2            | M 4,0         | < Camp.         | m 93,0              | M 0,5             | m 1 000                 |
| 7. Aceite de orujo de oliva crudo    | m 2,0    | —  | —                               | —                          | M 1,8  | m 12                 | M 0,5          | M 0,5        | M 0,2            | M 4,0         | —               | m 93,0              | M 0,5             | m 2 500                 |
| 8. Aceite de orujo de oliva refinado | M 0,5    | M 10                                       | M 0,200                         | —                          | M 2,0  | m 12                 | M 0,5          | M 0,5        | M 0,2            | M 4,0         | < Camp.         | m 93,0              | M 0,5             | m 1 800                 |
| 9. Aceite de orujo de oliva          | M 1,5    | M 15                                       | M 0,200                         | —                          | M 2,0  | > 4,5                | M 0,5          | M 0,5        | M 0,2            | M 4,0         | < Camp.         | m 93,0              | M 0,5             | m 1 800                 |

M = máximo, m = mínimo

(1) Contenido total de compuestos detectados mediante captura de electrones. Para cada uno de los componentes el límite máximo es de 0,10 mg/kg.

(2) Δ-5-23-Estigmasterol + Campesterol + Sitosterol + Δ-5-Avenasterol + Δ-5-24-Estigmasterol.

Nota: Para descalficar un aceite bastará con que una sola de las características no se ajuste a los límites fijados.

| Categoría                            | Contenido de ácidos |              |              |              |            |               |        | K <sub>212</sub> | K <sub>270</sub> | K <sub>270</sub> después de pasar por alúmina <sup>(1)</sup> | ΔK    | Panel test |
|--------------------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|------------|---------------|--------|------------------|------------------|--|-------|------------|
|                                      | Mirístico %         | Linolénico % | Araquídico % | Icosanoico % | Behénico % | Lignocérico % |        |                  |                  |  |       |            |
| 1. Aceite de oliva virgen extra      | M 0,1               | M 0,9        | M 0,7        | M 0,5        | M 0,3      | M 0,5         | M 2,40 | M 0,20           | M 0,10           | M 0,010  | ≥ 6,5 |            |
| 2. Aceite de oliva virgen            | M 0,1               | M 0,9        | M 0,7        | M 0,5        | M 0,3      | M 0,5         | M 2,50 | M 0,25           | M 0,10           | M 0,010  | ≥ 5,5 |            |
| 3. Aceite de oliva virgen corriente  | M 0,1               | M 0,9        | M 0,7        | M 0,5        | M 0,3      | M 0,5         | M 2,50 | M 0,25           | M 0,10           | M 0,010  | ≥ 3,5 |            |
| 4. Aceite de oliva virgen lampante   | M 0,1               | M 0,9        | M 0,7        | M 0,5        | M 0,3      | M 0,5         | M 3,70 | > 0,25           | M 0,11           | —  | < 3,5 |            |
| 5. Aceite de oliva refinado          | M 0,1               | M 0,9        | M 0,7        | M 0,5        | M 0,3      | M 0,5         | M 3,40 | M 1,20           | —                | M 0,160  | —     |            |
| 6. Aceite de oliva                   | M 0,1               | M 0,9        | M 0,7        | M 0,5        | M 0,3      | M 0,5         | M 3,30 | M 1,0            | —                | M 0,130  | —     |            |
| 7. Aceite de orujo de oliva crudo    | M 0,1               | M 0,9        | M 0,7        | M 0,5        | M 0,3      | M 0,5         | —      | —                | —                | —  | —     |            |
| 8. Aceite de orujo de oliva refinado | M 0,1               | M 0,9        | M 0,7        | M 0,5        | M 0,3      | M 0,5         | M 5,50 | M 2,50           | —                | M 0,250  | —     |            |
| 9. Aceite de orujo de oliva          | M 0,1               | M 0,9        | M 0,7        | M 0,5        | M 0,3      | M 0,5         | M 5,30 | M 2,00           | —                | M 0,200  | —     |            |

(1) En el caso de aceites con acidez superior al 3,3 %, si después de tratados con alúmina activada se obtiene un K<sub>270</sub> superior a 0,11, se debe efectuar la prueba de refinado prevista en el Anexo XIII.

Nota: Para la determinación de la pureza, en caso de que el K<sub>270</sub> sobrepase el límite establecido para la categoría correspondiente, deberá efectuarse una nueva determinación del K<sub>270</sub> después de ser tratados con alúmina.

## ANEXO II

## DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ACIDEZ

## 1. OBJETO

Determinar los ácidos libres en los aceites de oliva. El contenido en ácidos grasos libres se expresa mediante la acidez calculada según el método convencional.

## 1.1. Principio

Disolución de la muestra en una mezcla de disolventes y valoración de los ácidos grasos libres mediante una solución etanólica de hidróxido potásico.

## 1.2. Reactivos

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida y el agua utilizada debe ser agua destilada o de una pureza equivalente.

## 1.2.1. Mezcla de éter dietílico y etanol de 95 % (V/V), en proporción de volumen 1:1.

*Nota:* El éter dietílico es muy inflamable y puede formar peróxidos explosivos. Debe utilizarse tomando especiales precauciones.

Debe neutralizarse exactamente en el momento de su utilización con la solución de hidróxido potásico (1.2.2) en presencia de 0,3 ml de la solución de fenolftaleína (1.2.3) por cada 100 ml de mezcla.

*Nota:* Si no es posible utilizar éter dietílico, puede sustituirse por una mezcla de disolventes formada por etanol y tolueno. Si fuera necesario, el etanol podría sustituirse, a su vez, por 2-propanol.

## 1.2.2. Solución etanólica valorada de hidróxido potásico, = 0,1 M o, en caso necesario, = 0,5 M. Nota 1.

Debe conocerse, y comprobarse inmediatamente antes de su utilización, la concentración exacta de la solución etanólica de hidróxido potásico. Debe utilizarse una solución que haya sido preparada por lo menos cinco días antes y decantada en un frasco de vidrio marrón cerrado con tapon de goma. La solución debe ser incolora o de color amarillo paja.

*Nota:* Se puede preparar una solución incolora y estable de hidróxido potásico de la manera siguiente: Llevar a ebullición, y mantener esta a reflujo durante una hora, 1 000 ml de etanol con 8 g de hidróxido potásico y 0,5 g de virutas de aluminio. Destilar inmediatamente. Disolver en el destilado la cantidad requerida de hidróxido potásico. Dejar reposar durante varios días y decantar el líquido claro sobrenadante, separándolo del precipitado de carbonato potásico.

La solución también puede prepararse de la manera siguiente sin efectuar la destilación: añadir 4 ml de butirato de aluminio a 1 000 ml de etanol y dejar reposar la mezcla durante algunos días. Decantar el líquido sobrenadante y disolver en él la cantidad necesaria de hidróxido potásico. La solución está lista para ser utilizada.

## 1.2.3. Solución de 10 g/l de fenolftaleína en etanol de 95-96 % (V/V) o solución de 20 g/l de azul alcalino (en caso de aceites de oliva muy coloreados) en etanol de 95-96 % (V/V).

## 1.3. Material

Material habitual de laboratorio, y en particular:

## 1.3.1. Balanza analítica

## 1.3.2. Matraz erlenmeyer de 250 ml de capacidad

## 1.3.3. Bureta de 10 ml de capacidad, con graduación de 0,05 ml

## 1.4. Procedimiento

## 1.4.1. Preparación de la muestra para la prueba

La determinación se efectuará en una muestra filtrada. Si el contenido global de humedad e impurezas es inferior al 1 %, se utilizará la muestra tal cual.

## 1.4.2. Muestra para la prueba

Tomar la muestra, según el grado de acidez previsto, de acuerdo con el cuadro siguiente:

| Grado de acidez previsto | Peso de la muestra (en g) | Precisión de la pesada de la muestra (en g) |
|--------------------------|---------------------------|---|
| < 1                      | 20                        | 0,05  |
| 1 a 4                    | 10                        | 0,02  |
| 4 a 15                   | 2,5                       | 0,01  |
| 15 a 75                  | 0,5                       | 0,001                                       |
| > 75                     | 0,1                       | 0,0002                                      |

Pesar la muestra en el matraz erlenmeyer (1.3.2)

#### 1.4.3 Determinación

Disolver la muestra (1.4.2) en 50 a 150 ml de la mezcla de éter dietílico y etanol (1.2.1), previamente neutralizada.

Valorar, agitando, con la solución de hidróxido potásico de 0,1 M (1.2.2) (véase nota 2) hasta el viraje del indicador (la coloración rosa de la fenolftaleína debe permanecer al menos durante 10 segundos).

*Nota 1:* La solución etanólica valorada de hidróxido potásico (1.2.2) puede sustituirse por una solución acuosa de hidróxido potásico o sódico siempre que el volumen de agua añadido no provoque una separación de las fases.

*Nota 2:* Si la cantidad necesaria de la solución de hidróxido potásico de 0,1 M supera los 10 ml, debe utilizarse una solución de 0,5 M.

*Nota 3:* Si la solución se enturbia durante la valoración, añadir una cantidad suficiente de la mezcla de disolventes (1.2.1) para que la solución se aclare.

#### 1.5 Expresión de la acidez en porcentaje de ácido oleico

La acidez, expresada en porcentaje de ácido oleico es igual a:

$$V \times c \times \frac{M}{1\,000} \times \frac{100}{P} = \frac{V \times c \times M}{10 \times P}$$

siendo:

V : volumen en ml de la solución valorada de hidróxido potásico utilizada.

c : concentración exacta, en moles por litro, de la solución de hidróxido potásico utilizada.

M : peso molecular del ácido en que se expresa el resultado (ácido oleico = 282).

P : peso en gramos de la muestra utilizada.

Se tomará como resultado la media aritmética de dos determinaciones.

## ANEXO III

## DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS

1. **OBJETO**

La presente norma describe un método para la determinación del índice de peróxidos de los aceites y grasas.
2. **ÁMBITO DE APLICACIÓN**

La presente norma es aplicable a los aceites y grasas animales y vegetales.
3. **DEFINICIÓN**

El índice de peróxidos es la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas.
4. **PRINCIPIO**

La muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con solución de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato sódico.
5. **APARATOS**

Todo el material utilizado estará exento de sustancias reductoras u oxidantes.

*Nota:* No engrasar las superficies esmeriladas.

  - 5.1. Navecilla de vidrio de 3 ml
  - 5.2. Matraces con cuello y tapón esmerilados, de 250 ml de capacidad aproximadamente, previamente secados y llenos de gas inerte puro y seco (nitrógeno o, preferiblemente, dióxido de carbono).
  - 5.3. Bureta de 25 o 50 ml, graduada en 0,1 ml.
6. **REACTIVOS**
  - 6.1. Cloroformo para análisis, exento de oxígeno por borbotado de una corriente de gas inerte puro y seco.
  - 6.2. Ácido acético glacial para análisis, exento de oxígeno por borbotado de una corriente de gas inerte puro y seco.
  - 6.3. Solución acuosa saturada de yoduro potásico, recién preparada, exenta de yodo y yodatos.
  - 6.4. Solución acuosa de tiosulfato sódico 0,01 N o 0,002 N valorada exactamente; la valoración se efectuará inmediatamente antes del uso.
  - 6.5. Solución de almidón, en solución acuosa de 10 g/l, recién preparada con almidón soluble.
7. **MUESTRA**

La muestra se tomará y almacenará al abrigo de la luz, y se mantendrá refrigerada dentro de envases de vidrio totalmente llenos y herméticamente cerrados con tapones de vidrio esmerilado o de corcho.
8. **PROCEDIMIENTO**

El ensayo se realizará con luz natural difusa o con luz artificial. Pesar con precisión de 0,001 g en una navecilla de vidrio (5.1) o, en su defecto, en un matraz (5.2) una cantidad de muestra en función del índice de peróxidos que se presuponga, con arreglo al cuadro siguiente:



| Índice de peróxidos que se supone<br>(meq de O <sub>2</sub> /kg) | Peso de la muestra problema<br>(en g) |
|--|---------------------------------------|
| de 0 a 12  | de 5,0 a 2,0                          |
| de 12 a 20   | de 2,0 a 1,2                          |
| de 20 a 30   | de 1,2 a 0,8                          |
| de 30 a 50   | de 0,8 a 0,5                          |
| de 50 a 90   | de 0,5 a 0,3                          |

Abrir un matraz (5.2) e introducir la navajilla de vidrio que contenga la muestra problema. Añadir 10 ml de cloroformo (6.1). Disolver rápidamente la muestra problema mediante agitación. Añadir 15 ml de ácido acético (6.2) y, a continuación, 1 ml de solución de yoduro potásico (6.3). Cerrar rápidamente el matraz, agitar durante 1 minuto y mantenerlo en la oscuridad durante 5 minutos exactamente, a una temperatura comprendida entre 15 y 25 °C.

Añadir 75 ml aproximadamente de agua destilada. Valorar (agitando al mismo tiempo vigorosamente) el yodo liberado con la solución de tiosulfato sódico (6.4) (solución 0,002 N si se presuponen valores inferiores a 12 y solución 0,01 N si se presuponen valores superiores a 12), utilizando la solución de almidón (6.5) como indicador.

Efectuar dos determinaciones por muestra.

Realizar simultáneamente un ensayo en blanco. Si el resultado del ensayo en blanco sobrepasa 0,05 ml de la solución de tiosulfato sódico 0,01 N (6.4), sustituir los reactivos.

## 9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El índice de peróxidos (I.P.), expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$IP = \frac{V \times N \times 1\,000}{p}$$

siendo:

V: ml de solución valorada de tiosulfato sódico (6.4) empleados en el ensayo, convenientemente corregidos para tener en cuenta el ensayo en blanco.

N: normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico (6.4) empleada.

p: peso, en gramos de la muestra problema.

El resultado será la media aritmética de las dos determinaciones efectuadas.

## ANEXO IV

## 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 de alcoholes del insaponificable extraído 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. MATERIAL

- 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, utilizando 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 µl 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. Probeta de 10 ml de fondo cónico con tapón hermético.
- 3.10. Equipo de cromatografía de gases que pueda funcionar con columna capilar, provisto de un sistema de división de flujo formado por:
  - 3.10.1. Horno para la columna, que pueda mantener la temperatura deseada con precisión de  $\pm 1$  °C.
  - 3.10.2. Inyector con elemento vaporizador de vidrio tratado con persilano.
  - 3.10.3. Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.
  - 3.10.4. Registrador-integrador que pueda funcionar con el convertidor-amplificador (3.10.3), 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 interno, 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.

## 4. REACTIVOS

- 4.1. Hidróxido potásico en solución etanólica aproximadamente 2N: disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (valoración mínima del 85 %) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol. Conservar la solución en botellas de vidrio oscuro 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 2N: disolver 13 g de hidróxido potásico en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol.
- 4.6. Benceno para cromatografía.
- 4.7. Acetona para cromatografía.
- 4.8. Hexano para cromatografía.
- 4.9. Éter etílico para cromatografía.
- 4.10. Cloroformo de calidad para análisis.
- 4.11. Solución patrón para cromatografía en capa fina: mezcla de alcoholes de C<sub>20</sub> a C<sub>24</sub>, disolución al 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 2N de hidróxido potásico.
- 4.13. Piridina anhidra para cromatografía.
- 4.14. Hexametildisilazano.
- 4.15. Trimetilclorosilano.
- 4.16. Solución problema de trimetilsililéteres de los alcoholes alifáticos de C<sub>20</sub> a C<sub>24</sub>: preparar en el momento del uso a partir de mezclas de alcoholes puros.
- 4.17. 1-icosanol, disolución al 0,1 % (m/v) en cloroformo (patrón interno).
- 4.18. Gas portador: hidrógeno o helio de calidad para cromatografía de gases.
- 4.19. Gases auxiliares:
  - hidrógeno de calidad para cromatografía de gases,
  - aire 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 disolución de 1-icosanol (se puede utilizar igualmente 1 encicosanol) al 0,1 % en cloroformo (4.17) que contenga una cantidad de 1-icosanol 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-icosanol 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 2N, adaptar el refrigerante de reflujo y calentar al baño María con ligera ebullición, agitando energica e ininterrumpidamente hasta que se produzca la saponificación (la solución se vuelve lumpada). Calentar durante 20 minutos más y, a continuación, añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del refrigerante; separar el refrigerante y enfriar el matraz a 30 °C aproximadamente.
  - 5.1.3. Transvasar cuantitativamente el contenido del matraz a un embudo de separación de 500 ml, mediante varios lavados con un total de 50 ml de agua destilada. Agregar 80 ml aproximadamente de éter etílico, agitar energicamente durante unos 30 segundos y dejar reposar hasta la completa separación de las fases (nota 1).

Separar la fase acuosa inferior pasándola a un segundo embudo de separación. 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 podrán eliminarse añadiendo pequeñas cantidades de alcohol etílico o metílico con un pulverizador.
  - 5.1.4. Reunir las fracciones étericas en un mismo embudo de separación 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, secar con sulfato sódico anhidro y filtrar sobre sulfato sódico anhidro a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando el embudo y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico.

5.1.5. Destilar el éter hasta que queden unos pocos ml; a continuación, secar en un vacío ligero o en una corriente de nitrógeno, completando el secado en una estufa a 100 °C durante 15 minutos aproximadamente; dejar enfriar en un desecador y pesar.

5.2. Separación de la fracción de alcoholes

5.2.1. Preparación de las placas básicas: sumergir completamente las placas con gel de sílice (4.4) en la solución etanólica 0,2N de hidróxido potásico (4.5) durante 10 segundos; dejar secar las placas en campana durante dos horas y, por último, mantenerlas en una estufa regulada a 100 °C durante una hora.

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

*Nota 2:* Si se utilizan placas básicas de gel de sílice para la separación de la fracción de alcoholes, ya no es necesario tratar el insaponificable con alúmina. De este modo, todos los compuestos de naturaleza ácida (ácidos grasos y otros) quedan retenidos en la línea de aplicación, y la banda de los esteroides aparece perfectamente diferenciada de la banda de los alcoholes alifáticos y terpenicos.

5.2.2. Introducir en la cubeta de desarrollo de las placas una mezcla de benceno y acetona 95:5 (V/V) hasta una altura de 1 cm aproximadamente. Puede utilizarse como alternativa una mezcla de hexano y éter etílico 65:35 (V/V). 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:* Para que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla de desarrollo deberá cambiarse en 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 una placa cromatográfica (5.2.1) a unos 2 cm de uno de los bordes, formando una línea 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 (4.11) para poder identificar la banda de alcoholes alifáticos una vez efectuado el desarrollo.

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 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 dejando la placa bajo una campana unos minutos.

5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2,7-diclorofluoresceína. Al examinar la placa a la luz ultravioleta puede identificarse la banda de los 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 considerar junto con la banda de alcoholes triterpénicos la de alcoholes alifáticos responde al hecho de que la primera, en las condiciones del presente ensayo, 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 de 4 a 5 ml, transvasar la solución residual al tubo de ensayo 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 una 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 de alcoholes.

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, hexamildisilazano y trimetilclorosilano 9:3:1 (V/V/V) (nota 5), a razón de 20 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 el bis-trimetilsililacetamida + 1% de trimetilclorosilano, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra.

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

*Nota 6:* La 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.

#### 5.4. Cromatografía de gases.

##### 5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna.

- 5.4.1.1. Colocar la columna en el cromatógrafo uniendo uno de los extremos de la columna al inyector y el otro al detector.

Efectuar los controles generales del equipo para cromatografía de gases (estanquidad 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 el equipo de cromatografía de gases e iniciar un calentamiento gradual hasta alcanzar una temperatura al menos 20 °C superior 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 de la relación de «split», ignición 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 deberá ser siempre, como mínimo, 20 °C superior 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 exigidas 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; después, mantener durante 15 minutos a 260 °C.
- temperatura del 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 «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 l.e.u.
- 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 C<sub>26</sub> debe ser de 18 ± 5 minutos.
- el pico del alcohol C<sub>22</sub> debe ser: para el aceite de oliva, 80 ± 20% del fondo de escala, y para el aceite de semillas, 40 ± 20% del fondo de escala.

- 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 deberán 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 embolo de la jeringa de modo que la aguja quede vacía. Introducir la aguja a través del septum 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 mezclas de TMSE de los alcoholes analizadas 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-encosanol y de los alcoholes alifáticos de C<sub>22</sub> a C<sub>26</sub> utilizando el integrador.

5.4.5.2. Calcular del modo siguiente el contenido de cada uno de los alcoholes, expresado en mg/100 g de materia grasa:

$$\text{alcohol } x = \frac{A_x \cdot m_x \cdot 100}{A_1 \cdot m}$$

siendo:

$A_x$ : área del pico del alcohol x.

$A_1$ : área del pico del 1-icosanol.

$m_x$ : peso de 1-icosanol añadido, en miligramos.

$m$ : peso de la muestra tomado para la determinación, en gramos.

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se expresa el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos en mg/100 g de materia grasa y como «alcoholes alifáticos totales», su suma. ( $C_{22} + C_{24} + C_{26} + C_{28}$ ).

APÉNDICE

*Determinación de la velocidad lineal del gas*

Injectar en el cromatógrafo, 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 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.

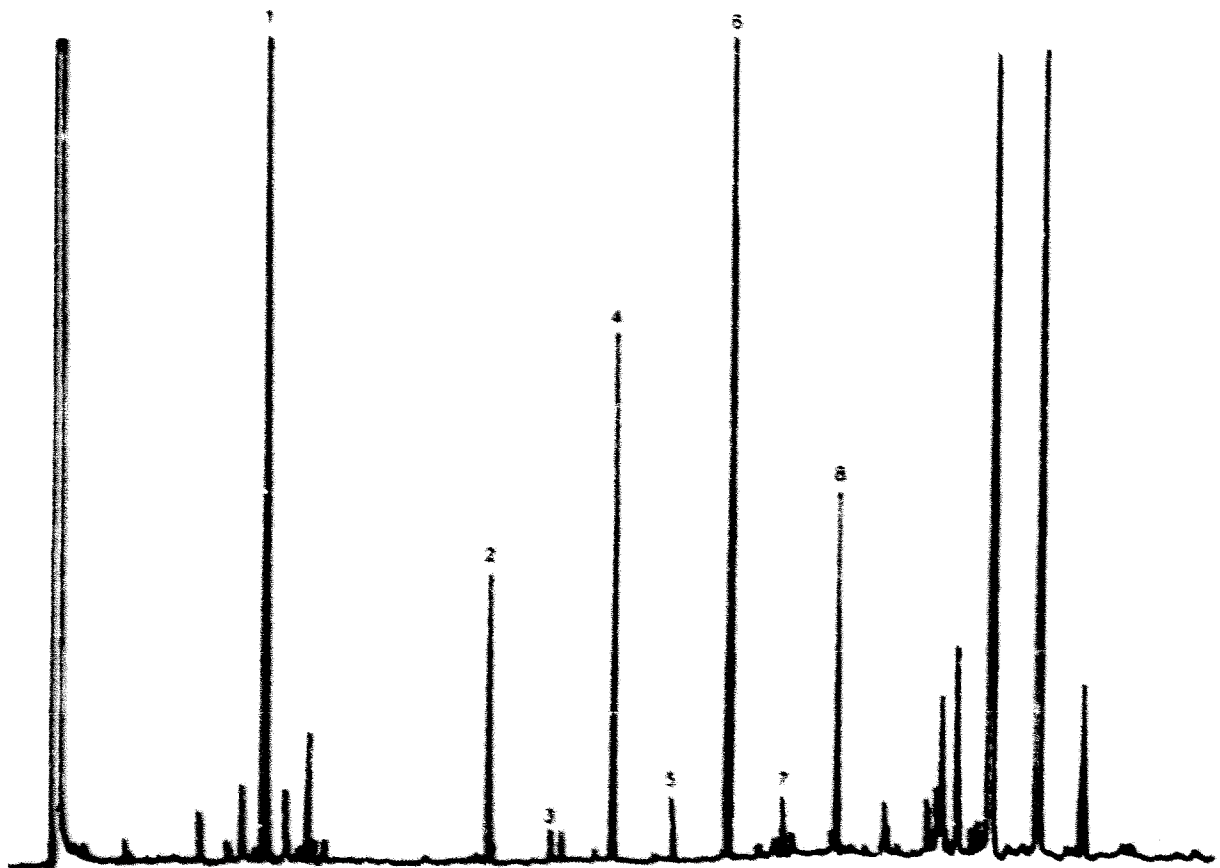


Figura 1 — Cromatograma de la fracción alcohólica de un aceite de sésame virgen

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

## ANEXO V

## DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y DEL CONTENIDO DE ESTEROLES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA CAPILAR

## 1. OBJETO

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

## 2. PRINCIPIO

Saponificación de la materia grasa, a la que se habrá añadido  $\alpha$ -colestanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación, extracción del insaponificable con éter etílico.

Separación de la fracción de esteroides del insaponificable extraído mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica; los esteroides recuperados del gel de sílice se transforman en trimetilsililéteres y se analizan mediante cromatografía de gases con columna capilar.

## 3. MATERIAL

- 3.1. Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- 3.2. Embudos de separación de 500 ml.
- 3.3. Matraces de 250 ml.
- 3.4. Equipo completo de cromatografía en capa fina, utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm.
- 3.5. Lámpara ultravioleta de una longitud de onda de 366 o 254 nm.
- 3.6. Microjeringa de 100  $\mu$ l y 500  $\mu$ l.
- 3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3 (porosidad 15-40  $\mu$ m), 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. Probeta de 10 ml de fondo cónico con tapón hermético.
- 3.10. Equipo de cromatografía de gases que pueda funcionar con columna capilar, provisto de un sistema de división de flujo formado por:
  - 3.10.1. Horno para la columna, que pueda mantener la temperatura deseada con precisión de  $\pm 1$  °C.
  - 3.10.2. Inyector con elemento vaporizador de vidrio tratado con persilano.
  - 3.10.3. Detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.
  - 3.10.4. Registrador-integrador que pueda funcionar con el convertidor-amplificador (3.10.3), 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 interno, recubierta internamente de líquido SE-52, SE-54 o equivalente, con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30  $\mu$ m.
- 3.12. Microjeringa de 10  $\mu$ l para cromatografía de gases, con aguja endurecida.

## 4. REACTIVOS

- 4.1. Hidróxido potásico, solución etanólica 2N aproximadamente: disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (valoración mínima del 85 %) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol. Conservar la solución en botellas de vidrio oscuro bien cerradas.

- 4.2. Éter etílico de calidad para análisis.
- 4.3. Sulfato sodico 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, solución etanólica 0,2N: disolver 13 g de hidróxido potásico en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol.
- 4.6. Benceno para cromatografía.
- 4.7. Acetona para cromatografía. (Véase 5.2.2).
- 4.8. Hexano para cromatografía. (Véase 5.2.2).
- 4.9. Éter etílico para cromatografía. (Véase 5.2.2).
- 4.10. Cloroformo de calidad para análisis.
- 4.11. Solución patrón para cromatografía en capa fina: colesterol o fitosteroles, solución al 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 2N de hidróxido potásico.
- 4.13. Piridina anhidra para cromatografía.
- 4.14. Hexamildisilazano.
- 4.15. Trimetilclorosilano.
- 4.16. Solución problema de trimetilsililéteres de los esteroides: preparar en el momento del uso a partir de esteroides puros o de mezclas de esteroides obtenidos de aceites que los contengan.
- 4.17.  $\alpha$ -colestanol, disolución al 0,2% (m/V) en cloroformo (patrón interno).
- 4.18. Gas portador: hidrógeno o helio de calidad para cromatografía de gases.
- 4.19. Gases auxiliares:
  - hidrógeno de calidad para cromatografía de gases.
  - aire de calidad para cromatografía de gases.

## 5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. Preparación del insaponificable.
  - 5.1.1. Con la microjeringa de 500  $\mu$ l introducir en el matraz de 250 ml un volumen de disolución de  $\alpha$ -colestanol al 0,2% en cloroformo (4.17) que contenga una cantidad de  $\alpha$ -colestanol correspondiente al 10% aproximadamente del contenido de esteroides en la alícuota de la muestra para la determinación. Por ejemplo, para 5 g de muestra añadir 500  $\mu$ l de la solución de  $\alpha$ -colestanol al 0,2%, si se trata de aceite de oliva, y 1 500  $\mu$ l, si se trata de aceite de semillas o 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.  
  
En el caso de aceites y grasas animales o vegetales con un alto contenido de colesterol puede producirse un pico cuyo tiempo de retención sea idéntico al del colestanol. En tal caso el análisis de la fracción de esteroides debe realizarse dos veces: con patrón interno y sin él.
  - 5.1.2. Añadir 50 ml de solución etanólica de hidróxido potásico 2N, adaptar el refrigerante de reflujo y calentar en baño María con ligera ebullición, agitando energíca 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 el refrigerante y enfriar el matraz a 30 °C aproximadamente.
  - 5.1.3. Transvasar cuantitativamente el contenido del matraz a un embudo de separación de 500 ml, mediante varios lavados con un total aproximado de 50 ml de agua destilada. Agregar 80 ml aproximadamente de éter etílico, agitar energícamente durante unos 30 segundos y dejar reposar hasta la separación de las fases (nota 1).

Separar la fase acuosa inferior pasándola a un segundo embudo de separación. 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 podrán eliminarse añadiendo pequeñas cantidades de alcohol etílico o metílico con un pulverizador.



- 5.1.4. Reunir las fracciones etereas en un mismo embudo de separación 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, secar con sulfato sódico anhidro y filtrar sobre sulfato sódico anhidro a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando el embudo y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico.
- 5.1.5. Destilar el éter hasta que queden unos pocos ml; a continuación, secar con un vacío ligero o en una corriente de nitrógeno, completando el secado en una estufa a 100 °C durante 15 minutos aproximadamente; dejar enfriar en un desecador y pesar.
- 5.2. Separación de la fracción de esteroides.
- 5.2.1. Preparación de las placas básicas: sumergir completamente las placas con gel de sílice (4.4) en la solución etanólica 0,2N de hidróxido potásico (4.5) durante 10 segundos; dejar secar las placas en campana durante dos horas y, por último, mantenerlas en una estufa regulada 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 deberán utilizarse en un plazo de quince días como máximo).
- Nota 2:* Si se utilizan placas básicas de gel de sílice para la separación de la fracción de esteroides, ya no es necesario tratar el insaponificable con alumina. De este modo, todos los compuestos de naturaleza ácida (ácidos grasos y otros) quedan retenidos en la línea de aplicación, y la banda de los esteroides aparece perfectamente diferenciada de la banda de los alcoholes alifáticos y terpenicos.
- 5.2.2. Introducir en la cubeta de desarrollo de las placas una mezcla de benceno-acetona 95:5 (v/v) hasta una altura de 1 cm aproximadamente. Puede utilizarse como alternativa una mezcla de hexano y éter etílico 65:35 (v/v). 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:* Para que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla de desarrollo deberá cambiarse en 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 una placa cromatográfica (5.2.1) a unos 2 cm de uno de los bordes, formando una línea 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 esteroides (4.11) para poder identificar la banda de esteroides una vez efectuado el desarrollo.
- 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 ambiente entre 15 y 20 °C. Tapar inmediatamente la cubeta 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 dejando la placa bajo una campana unos minutos.
- 5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2,7-diclorofluoresceína. Al examinar la placa a la luz ultravioleta puede identificarse la banda de los esteroides mediante comparación con la mancha obtenida a partir de la solución de referencia; marcar con lápiz negro los límites de la banda a lo largo de los márgenes de fluorescencia.
- 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 de 4 a 5 ml, transvasar la solución residual al tubo de ensayo 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 una 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 de esteroides.
- 5.3. Preparación de los trimetilsililéteres.
- 5.3.1. Agregar al tubo que contiene la fracción de esteroides el reactivo de sililización formado por una mezcla de piridina-hexametildisilazano-trimetilclorosilano 9:3:1 (v/v/v) (nota 4), a razón de 50 µl por miligramos de esteroides, evitando toda absorción de humedad (nota 5).

*Nota 4:* Existen soluciones comerciales listas para el uso. Además, también existen otros reactivos de sililización, como el bis-trimetilsililacetamida + 1% de trimetilclorosilano, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra.

- 5.3.2. Tapar el tubo y agitar cuidadosamente (sin invertir) hasta la completa disolución de los esteroides. Dejar reposar un cuarto de hora, como mínimo, a temperatura ambiente y centrifugar durante algunos minutos; la solución limpida queda lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

*Nota 5:* La 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.

#### 5.4. Cromatografía de gases.

##### 5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna.

- 5.4.1.1. Colocar la columna en el cromatógrafo uniendo uno de los extremos de la columna al inyector y el otro al detector.

Efectuar los controles generales del equipo para cromatografía de gases (estabilidad de los circuitos de gases, eficacia del detector, eficacia del sistema de división de flujo 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 el equipo de cromatografía de gases e iniciar un calentamiento gradual hasta alcanzar una temperatura al menos 20 °C superior a la temperatura de trabajo (nota 6). Mantener dicha temperatura durante 2 horas como mínimo; a continuación, poner el equipo completo en condiciones de funcionamiento (regulación del flujo de gases y de la relación de «split», ignición 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, 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 6:* La temperatura de acondicionamiento deberá ser siempre, como mínimo 20 °C inferior 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 exigidas son las siguientes:

- temperatura de la columna: 260 °C  $\pm$  5 °C,
- temperatura del evaporador: 280 °C,
- temperatura del detector: 290 °C,
- velocidad lineal del gas portador: helio 20 a 35 cm<sup>3</sup>/s, hidrógeno 30 a 50 cm<sup>3</sup>/s,
- relación de «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 β-sitosterol debe ser de 20  $\pm$  5 minutos,
- el pico del campesterol debe ser: para el aceite de oliva (contenido medio del 3%), 15  $\pm$  5% del fondo de escala; para el aceite de soja (contenido medio del 20%), 80  $\pm$  10% del fondo de escala,
- se deben separar todos los esteroides presentes; es necesario que los picos no solo se separen sino que se resuelvan completamente, es decir, que el trazo del pico llegue a la línea de base antes de que se inicie el pico siguiente. No obstante, podrá admitirse una resolución incompleta si el pico a TRR 1,02 puede cuantificarse utilizando la perpendicular.

##### 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 del septum 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 esteroides 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 mezclas de TMSE de los esteroides analizadas en las mismas condiciones.

La elución de los esteroides se efectúa en el orden siguiente: colesterol, brassicasterol, 24-metilcolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ<sup>7</sup>-campesterol, Δ<sup>5,23</sup>-estigmastadienol, clerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ<sup>5</sup>-avenasterol, Δ<sup>5,24</sup>-estigmastadienol, Δ<sup>7</sup>-estigmasterol, Δ<sup>7</sup>-avenasterol.

En el cuadro I figuran los tiempos de retención correspondientes al  $\beta$ -sitosterol para las columnas SE 52 y SE 54.

Las figuras 1 y 2 ilustran los cromatogramas típicos de algunos aceites.

#### 5.4.5. Determinación cuantitativa.

5.4.5.1. Calcular las áreas de los picos del  $\alpha$ -colestanol y de los esteroides utilizando el integrador. No se tomarán en cuenta los picos de aquellos componentes que no figuren en el cuadro I. El factor de respuesta para el  $\alpha$ -colestanol debe considerarse como 1.

5.4.5.2. Calcular del modo siguiente el contenido de cada uno de los esteroides, expresado en mg/100 g de materia grasa:

$$\text{esteroi } x = \frac{A_x \cdot m_1 \cdot 100}{A_1 \cdot m}$$

siendo:

$A_x$ : área del pico del esteroi x, en milímetros cuadrados,

$A_1$ : área del pico del  $\alpha$ -colestanol,

$m_1$ : peso de  $\alpha$ -colestanol añadido, en miligramos,

$m$ : peso de la muestra tomado para la determinación, en gramos.

## 6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1. Se registran el contenido de cada uno de los esteroides en mg/100 g de materia grasa y, como «esteroides totales», su suma.

6.2. El porcentaje de cada uno de los esteroides simples es la razón entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de los esteroides.

$$\% \text{ del esteroi } X = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

siendo:

$A_x$ : área del pico de x,

$\Sigma A$ : suma de las áreas de todos los picos.

## APÉNDICE

### *Determinación de la velocidad lineal del gas*

inyectar en el cromatógrafo, preparado para trabajar en condiciones normales, de 1 a 3  $\mu$ l 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 ( $t_M$ ).

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

Cuadro I

Tiempos de retención relativos de los esteroides

| Pico | Identificación                | Tiempo de retención |               |
|------|-------------------------------|---------------------|---------------|
|      |                               | Columna SE 54       | Columna SE 52 |
| 1    | colecsterol                   | 0,67                | 0,63          |
| 2    | colestanol                    | 0,68                | 0,64          |
| 3    | brasicasterol                 | 0,73                | 0,71          |
| 4    | 24-metilcolecsterol           | 0,82                | 0,80          |
| 5    | campesterol                   | 0,83                | 0,81          |
| 6    | campestanol                   | 0,85                | 0,82          |
| 7    | estigmasterol                 | 0,88                | 0,87          |
| 8    | $\Delta$ 7-campesterol        | 0,93                | 0,92          |
| 9    | $\Delta$ 5,23-stigmastadienol | 0,95                | 0,95          |
| 10   | cleroserol                    | 0,96                | 0,96          |
| 11   | $\beta$ -sitosterol           | 1                   | 1             |
| 12   | sitostanol                    | 1,02                | 1,02          |
| 13   | $\Delta$ 5-avenasterol        | 1,03                | 1,03          |
| 14   | $\Delta$ 5,24-stigmastadienol | 1,08                | 1,08          |
| 15   | $\Delta$ 7-stigmastenol       | 1,12                | 1,12          |
| 16   | $\Delta$ 7-avenasterol        | 1,16                | 1,16          |

Figura 1

*Cromatograma de la fracción de esteroides de un aceite de oliva bruto*

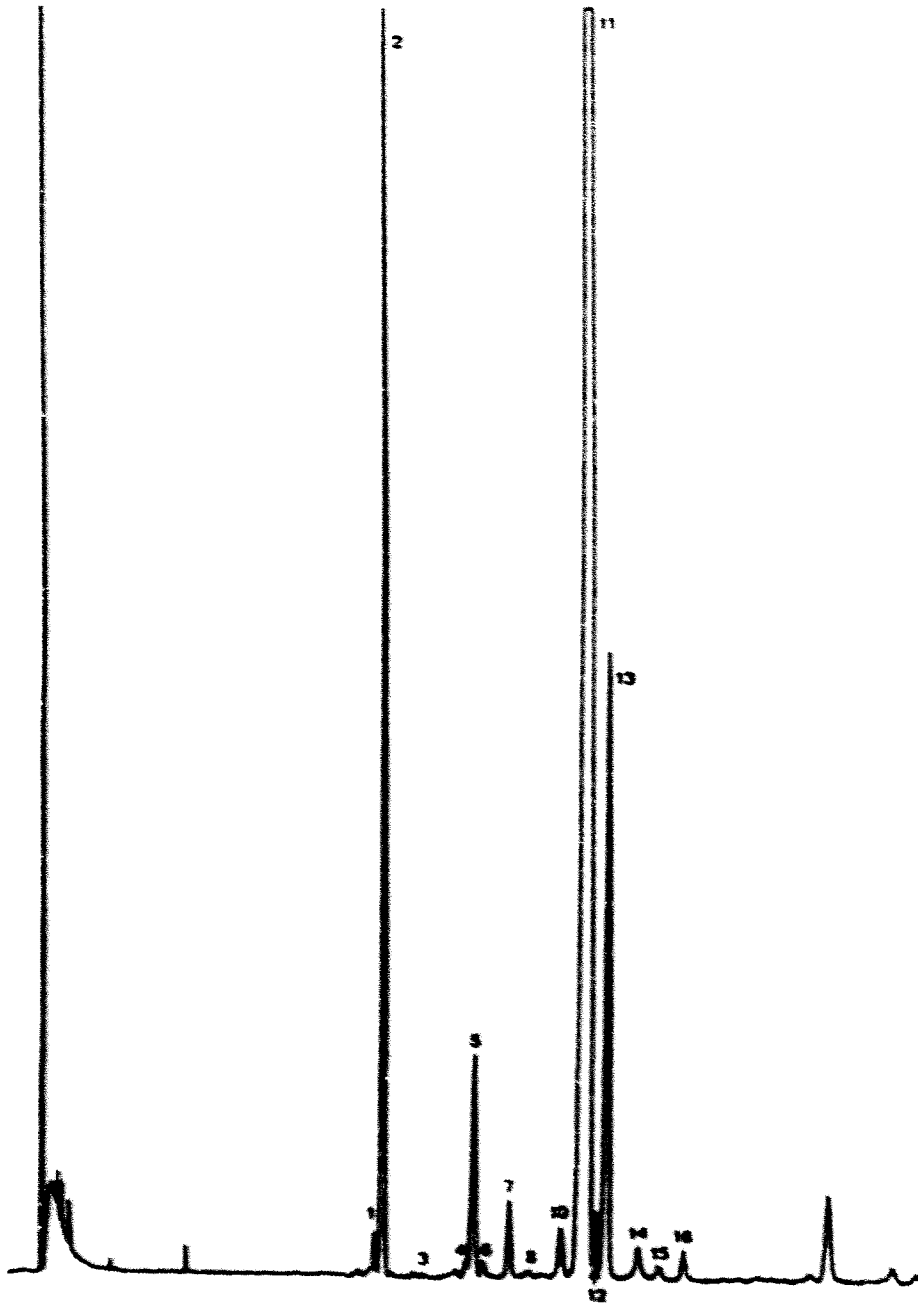
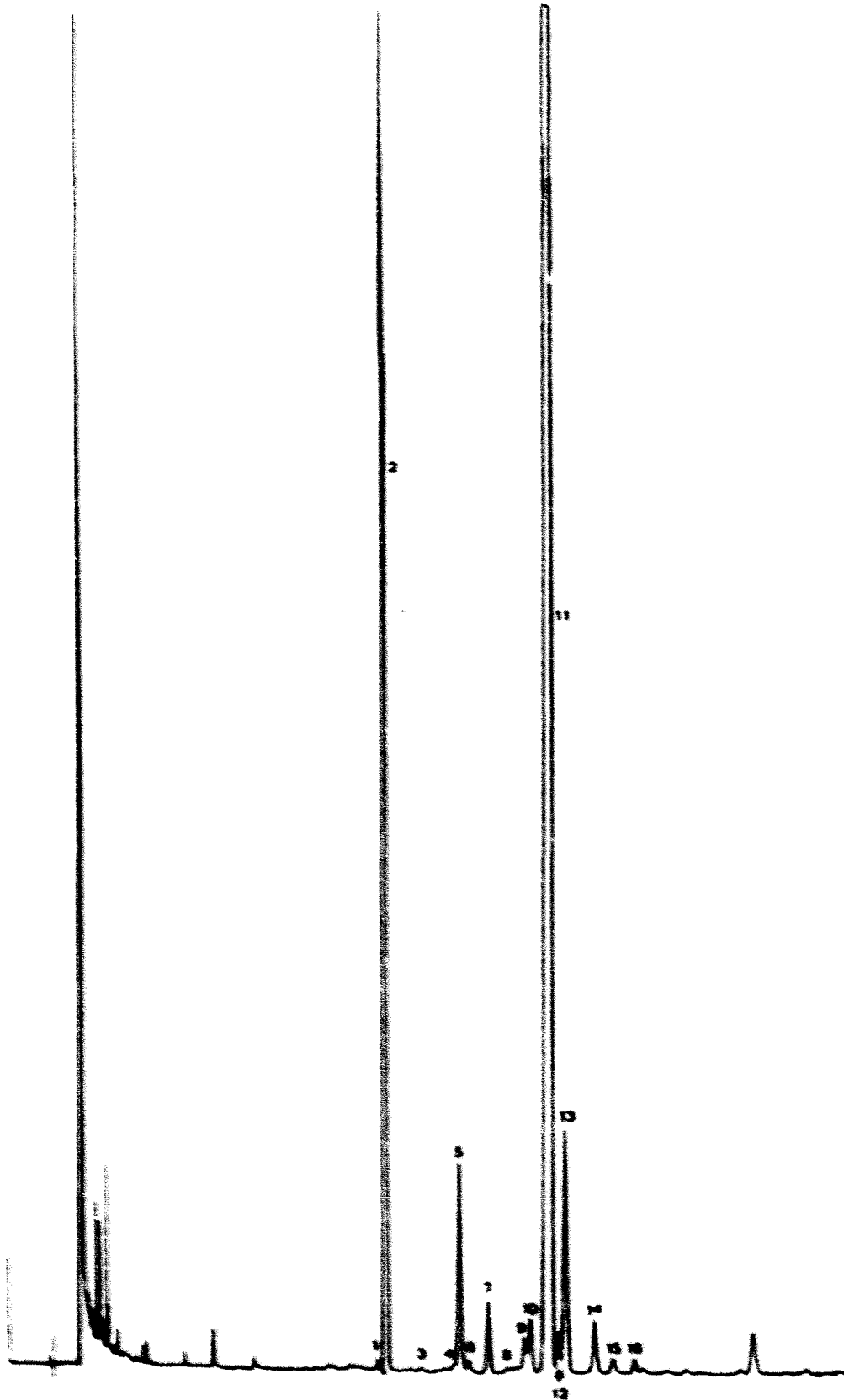


Figura 2

*Cromatograma de la fracción de esteroides de un aceite de oliva refinado*



## ANEXO VI

## DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ERITRODIOL Y UVAOL

## INTRODUCCION

El eritrodiol, entendido corrientemente como conjunto de los ácidos eritrodiol y uvaol, es un componente del insaponificable, característico de algunos tipos de materias grasas. Su concentración es mucho más elevada en los aceites de oliva obtenidos mediante extracción que en los obtenidos mediante presión o en el aceite de pepita de uva v, por lo tanto, su determinación puede servir para comprobar la existencia de aceite de oliva obtenido mediante extracción.

## 1. OBJETO

El presente método describe un procedimiento para determinar el eritrodiol en las materias grasas.

## 2. PRINCIPIO

La materia grasa se saponifica con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación se extrae el insaponificable con éter etílico y se purifica pasándolo por una columna de alúmina.

El fraccionamiento del insaponificable se realiza mediante cromatografía en capa fina en placa de gel de sílice y se aíslan la banda de la fracción esteroica y la del eritrodiol.

Los esteroides y el eritrodiol recuperados de la placa se transforman en trimetilsililéteres y seguidamente se analiza la mezcla mediante cromatografía de gases.

El resultado se expresa en porcentaje de eritrodiol respecto del conjunto de eritrodiol + esteroides.

## 3. MATERIAL Y APARATOS

3.1. El mismo material que el indicado para el método del Anexo V (Determinación del contenido de esteroides).

## 4. REACTIVOS

4.1. Los mismos reactivos que los indicados para el método del Anexo V (Determinación del contenido de esteroides).

4.2. Solución patrón de eritrodiol al 0,5% en cloroformo.

## 5. PROCEDIMIENTO

## 5.1. Preparación del insaponificable

Se realiza tal como se indica en el apartado 5.1.2 del método del Anexo V

## 5.2. Separación del eritrodiol y los esteroides

5.2.1. Véase el apartado 5.2.1 del método del Anexo V.

5.2.2. Véase el apartado 5.2.2 del método mencionado.

5.2.3. Preparar una solución del insaponificable al 5% en cloroformo.

Con una microjeringa de 0,1 ml depositar 0,3 ml de esta solución en una placa cromatográfica a aproximadamente 1,5 cm del borde inferior de la placa, formando una banda lo más fina y uniforme posible. Depositar en un extremo de la placa, como referencia, algunos microlitros de las soluciones de colesterol y eritrodiol.

5.2.4. Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, preparada como se indica en el apartado 5.2.1. La temperatura ambiente debe ser de unos 20 °C. Tapar inmediatamente la cubeta 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 ésta de la cubeta de desarrollo y evaporar el disolvente en una corriente de aire caliente.

5.2.5. Pulverizar la placa uniformemente con la solución alcohólica de 2',7'-diclorofluoresceína. Al examinar la placa a la luz ultravioleta pueden identificarse las bandas de los esteroides y del eritrodiol mediante comparación con las referencias; delimitar las bandas con una punta ligeramente por el exterior de las márgenes de fluorescencia.

5.2.6 Rascar con una espátula metálica el gel de sílice contenido en las áreas delimitadas. Reunir el material obtenido en un matraz cónico de 50 ml; añadir 15 ml de cloroformo caliente, agitar bien y filtrar en el embudo de filtro poroso vertiendo el gel de sílice sobre el propio filtro. Lavar tres veces con 10 ml de cloroformo caliente cada vez, recogiendo el filtrado en un matraz esférico de 100 ml. Evaporar hasta obtener un volumen de 4 a 5 ml, transvasar al tubo de centrifugado de fondo cónico de 10 ml previamente tarado, evaporar hasta sequedad mediante calentamiento suave en corriente de nitrógeno y pesar.

### 5.3. Preparación de los trimetilsililéteres

Se realiza tal como se indica en el apartado 5.3 del método del Anexo V.

### 5.4. Cromatografía de gases

Se realiza tal como se indica en el apartado 5.4 del método citado. Las condiciones operativas de la cromatografía de gases deben cumplir los requisitos necesarios para analizar los esteroides y, además, permitir la separación de los TMSE del entrodíol y del uvaol.

Una vez inyectada la muestra, dejar que se desarrolle el proceso hasta que se produzca la elución de los esteroides presentes, el entrodíol y el uvaol; identificar los picos (el entrodíol y el uvaol tienen tiempos de retención relativos, respecto al  $\beta$ -sitosterol, de alrededor de 1,45 y 1,55, respectivamente) y calcular las áreas de la misma forma que para los esteroides.

## 6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

$$\text{Entrodíol, \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \Sigma A_{\text{esteroides}}} \times 100$$

siendo:

$A_1$ : área del pico del entrodíol.

$A_2$ : área del pico del uvaol, en milímetros cuadrados.

$\Sigma A_{\text{esteroides}}$ : suma de las áreas de los esteroides presentes.

Los resultados deben expresarse con una cifra decimal.



## ANEXO VII

## DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS SITUADOS EN LA POSICIÓN 2 DE LOS TRIGLICÉRIDOS DE ACEITES Y GRASAS

## 1. OBJETO

La presente norma describe un método para la determinación de la composición porcentual de ácidos grasos que se encuentran esterificados en la posición 2 (posición interna) de los triglicéridos.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

La presente norma es aplicable a los aceites y grasas cuyo punto de fusión se sitúa por debajo de los 45 °C, debido a las características especiales de la acción de la lipasa pancreática.

No es aplicable sin reservas a los aceites y grasas que contengan cantidades importantes de ácidos grasos con 12 átomos de carbono o menos (aceites de coco y de palmiste, materias grasas butíricas), de ácidos grasos altamente insaturados (con más de cuatro enlaces dobles) que tengan 20 átomos de carbono o más (aceites de pescado y de mamíferos marinos) o de ácidos grasos que tengan grupos con funciones oxigenadas, además del grupo ácido.

## 3. PRINCIPIO

Neutralización de los aceites y grasas si fuera necesario. Purificación mediante tratamiento en columna de alumina. Hidrólisis parcial de los triglicéridos bajo la acción de la lipasa pancreática durante un tiempo determinado. Separación de los monoglicéridos resultantes mediante cromatografía en capa fina y metanolisis de estos monoglicéridos. Análisis de los ésteres metílicos mediante cromatografía gas-líquido.

## 4. EQUIPO

- 4.1. Matraz de fondo redondo de 100 ml.
- 4.2. Matraz de fondo redondo de 25 ml con boca esmerilada.
- 4.3. Refrigerante de aire de 1 m de longitud, adaptable al matraz 4.2.
- 4.4. Matraz erlenmeyer de 250 ml.
- 4.5. Vaso de precipitados de 50 ml.
- 4.6. Embudo de separación de 500 ml.
- 4.7. Columna para cromatografía, de vidrio, con diámetro interior de 13 mm y longitud de 400 mm, provista de un disco de vidrio poroso y de una llave.
- 4.8. Tubo de centrifuga de 10 ml con tapón de vidrio esmerilado.
- 4.9. Bureta de 5 ml graduada en 0,05 ml.
- 4.10. Jeringa hipodérmica de 1 ml provista de una aguja fina.
- 4.11. Microjeringa que pueda dispensar gotas de 3-4 µl.
- 4.12. Aplicador para cromatografía en capa fina.
- 4.13. Placas de vidrio de 20 x 20 cm para cromatografía en capa fina.
- 4.14. Cubeta de desarrollo para cromatografía en capa fina, de vidrio, provista de una tapa de vidrio esmerilado, adecuada para las placas de 20 x 20 cm.
- 4.15. Pulverizador para cromatografía en capa fina.
- 4.16. Estufa regulada a  $103 \pm 2$  °C.
- 4.17. Termostato regulable a una temperatura comprendida entre 30 y 45 °C con precisión de 0,5 °C.
- 4.18. Evaporador rotatorio.
- 4.19. Vibrador eléctrico, con el que pueda agitarse vigorosamente el tubo de centrifuga.
- 4.20. Lámpara ultravioleta para examinar las placas de capa fina.

*Para el control de la actividad lipásica:*

- 4.21. pH-metro.
- 4.22. Agitador espiral.
- 4.23. Bureta de 5 ml.
- 4.24. Cronómetro.

*Para la eventual preparación de la lipasa:*

- 4.25. Agitador de laboratorio, adecuado para dispersar y mezclar materiales heterogéneos.

## 5. REACTIVOS

- 5.1. n-Hexano o, en su defecto, éter de petróleo (punto de ebullición 30-50 °C), de calidad para cromatografía.
- 5.2. 2-Propanol, o etanol, 95 % (v/v) de calidad para análisis.
- 5.3. 2-Propanol, o etanol, solución acuosa 1/1.
- 5.4. Éter dietílico, exento de peróxidos.
- 5.5. Acetona.
- 5.6. Ácido fórmico, al menos de 98 % (p/p).
- 5.7. Solvente de desarrollo: una mezcla de n-hexano (5.1), éter dietílico (5.4) y ácido fórmico (5.6) en las proporciones 70/30/1 (v/v/v).
- 5.8. Alúmina activada para cromatografía, neutra, actividad I según Brockmann.
- 5.9. Gel de sílice con aglutinante, de calidad para cromatografía en capa fina.
- 5.10. Lipasa pancreática de calidad adecuada (véanse las notas 1 y 2).
- 5.11. Hidróxido sódico en solución acuosa de 120 g/l.
- 5.12. Ácido clorhídrico, solución acuosa 6 N.
- 5.13. Solución acuosa de 220 g/l de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>).
- 5.14. Solución acuosa de 1 g/l de colato sódico (de calidad enzimática).
- 5.15. Solución tampón: solución acuosa de tris-hidroximetil-aminometano 1 M, ajustada a pH = 8 con ácido clorhídrico (5.12) (controlar con un potenciómetro).
- 5.16. Solución de 10 g/l de fenolftaleína en etanol al 95 % (v/v).
- 5.17. Solución de 2 g/l de 2',7'-diclorofluoresceína en etanol al 95 % (v/v); alcalinizar ligeramente añadiendo 1 gota de solución de hidróxido sódico 1 N por 100 ml.

*Para el control de la actividad lipásica:*

- 5.18. Aceite neutralizado.
- 5.19. Solución acuosa de hidróxido sódico 0,1 N.
- 5.20. Solución acuosa de 200 g/l de colato sódico (de calidad enzimática).
- 5.21. Solución acuosa de 100 g/l de goma arábiga.

## 6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Si la acidez de la muestra, determinada con arreglo al método del Anexo II es inferior al 3 %, se efectuará directamente la purificación en columna de alúmina como se describe en el punto 6.2.

Si la acidez de la muestra, determinada con arreglo al método del Anexo II, es superior al 3 %, se efectuará una neutralización alcalina en presencia de un solvente, como se describe en el punto 6.1, y a continuación se realizará la purificación en columna de alúmina descrita en el punto 6.2.

### 6.1. Neutralización alcalina en presencia de un solvente.

Introducir en el embudo de separación (4.6) aproximadamente 10 g de aceite crudo y añadir 100 ml de hexano (5.1), 50 ml de 2-propanol (5.2), algunas gotas de solución de fenolftaleína (5.16) y el volumen de solución de hidróxido sódico (5.11) correspondiente a la acidez libre del aceite más un 0,3 % de exceso. Agitar energicamente durante 1 minuto, añadir 50 ml de agua desionada, agitar de nuevo y dejar reposar.

Una vez que se haya producido la separación, separar la capa inferior que contiene los jabones. Separar, asimismo, todas las capas intermedias (mucilagos, materias insolubles). Lavar la solución de hexano del

aceite neutralizado con porciones sucesivas de 25-30 ml de la solución de 2-propanol (5.3), hasta que desaparezca el color rosa de la fenolftaleína.

Eliminar la mayor parte del hexano mediante destilación en vacío en el evaporador rotatorio (4.18); desecar el aceite en vacío a 30-40 °C mediante una corriente de nitrógeno puro hasta la completa eliminación del hexano.

#### 6.2. Purificación con alúmina.

Preparar una suspensión de 15 g de alúmina activada (5.8) en 50 ml de hexano (5.1) y verterla en la columna cromatográfica (4.7), removiendo al mismo tiempo. Dejar que la alúmina se asiente uniformemente y esperar a que el nivel del solvente descienda a 1-2 mm por encima del absorbente. Verter cuidadosamente en la columna 5 g de aceite disueltos en 25 ml de hexano (5.1); recoger todo el eluyente de la columna en un matraz de fondo redondo (4.1).

### 7. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS CROMATOGRÁFICAS

Limpia perfectamente las placas de vidrio (4.13) con etanol, éter de petróleo y acetona para eliminar cualquier rastro de materia grasa.

Introducir en un matraz erlenmeyer (4.4) 30 g de polvo de sílice (5.9). Añadir 60 ml de agua destilada. Tapar y agitar enérgicamente durante 1 minuto. Transferir inmediatamente al aplicador la mezcla semifluida (4.12) y recubrir las placas limpias con una capa de 0,25 mm de espesor.

Secar las placas al aire durante 15 minutos y a continuación en la estufa (4.16) a  $103 \pm 2$  °C durante 1 hora. Antes del uso, enfriar las placas en un desecador a temperatura ambiente. En el comercio pueden adquirirse placas preparadas.

### 8. PROCEDIMIENTO

#### 8.1. Hidrólisis con lipasa pancreática.

Pesar en el tubo de centrifuga (4.8) 0,1 g aproximadamente de la muestra preparada; si la muestra es aceite líquido, proceder como se indica a continuación; si es una grasa sólida, disolverla en 0,2 ml de hexano (5.1), aplicando, si es necesario, un ligero calentamiento.

Añadir 20 mg de lipasa (5.10) y 2 ml de solución tampón (5.15). Agitar bien, pero con cuidado, y añadir a continuación 0,5 ml de la solución de cloruro de calcio (5.14) y 0,2 ml de la solución de cloruro de calcio (5.13). Cerrar el tubo con el tapón esmerilado, agitar cuidadosamente (evitando humedecer el tapón) e introducir el tubo inmediatamente en el termostato (4.17) a  $40 \pm 0,5$  °C y agitar manualmente durante 1 minuto exacto.

Sacar el tubo del termostato y agitar enérgicamente con el vibrador eléctrico (4.19) durante 2 minutos exactos.

Enfriar de inmediato en agua corriente; añadir 1 ml de ácido clorhídrico (5.12) y 1 ml de éter dietílico (5.4). Tapar y mezclar enérgicamente con el vibrador eléctrico. Dejar en reposo y extraer la capa orgánica con la jeringa (4.10), tras centrifugar si fuese necesario.

#### 8.2. Separación de los monoglicéridos por cromatografía en capa fina.

Con ayuda de la microjeringa (4.11) colocar el extracto a 1,5 cm aproximadamente del borde inferior de la placa cromatográfica, depositándolo de manera que forme una línea fina, uniforme y lo más estrecha posible. Introducir la placa en una cubeta de desarrollo (4.14) bien saturada y desarrollar con el solvente de desarrollo (5.7) a unos 20 °C hasta 1 cm aproximadamente del borde superior de la placa.

Secar la placa al aire a la temperatura de la cubeta y pulverizarla con la solución de 2',7'-diclorofluoresceína (5.17). Identificar la banda de los monoglicéridos ( $R_f$  aproximadamente 0,035) con luz ultravioleta (4.20).

#### 8.3. Análisis de los monoglicéridos por cromatografía gas-líquido.

Raspar con una espátula la banda citada en el punto 8.2 (procurando no raspar los componentes que permanezcan en la línea de base) y pasarla al matraz de metilación (4.2). Tratar directamente la sílice recogida como se indica en el Anexo X-B, de modo que los monoglicéridos se transformen en ésteres metílicos, y, a continuación, examinar los ésteres mediante cromatografía en fase gaseosa, como se describe en el Anexo X-A.

### 9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Calcular la composición de los ácidos grasos situados en la posición y expresar el resultado con una cifra decimal (nota 3).

## 10. NOTAS

**Nota 1:** Control de la actividad lipásica

Preparar una emulsión oleosa como sigue: agitar en un mezclador adecuado una mezcla constituida por 165 ml de solución de goma arábiga (5.21), 15 g de hielo picado y 20 ml de aceite neutralizado (5.18).

En un vaso de precipitados (4.5) introducir 10 ml de esta emulsión, 0,5 ml de solución de cloruro sódico (5.20) y 20 ml de agua destilada.

Colocar el vaso en un termostato a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  (nota 4) e introducir los electrodos del pH-metro (4.21) y un agitador espiral (4.22); después, añadir gota a gota con una bureta (4.23) solución de hidróxido sódico (5.19) hasta obtener un pH de 8,5.

Añadir una suspensión acuosa de la lipasa (véase a continuación) en cantidad suficiente. Se mide el pH y, tan pronto como alcance el valor de 8,5, se pone en marcha un cronómetro y se va añadiendo la disolución de hidróxido sódico (5.19) gota a gota, con la velocidad necesaria para mantener constante el pH de 8,5; anotar cada minuto el volumen de solución alcalina consumido.

Llevar los datos obtenidos a un sistema de ejes de coordenadas, indicando en abscisas los tiempos y en ordenadas los mililitros de solución alcalina necesarios para mantener constante el pH. Deberá obtenerse una gráfica lineal.

La suspensión de lipasa mencionada es una suspensión en agua al 1:1 000 (p/p). Deberá emplearse en cada ensayo una cantidad suficiente de esta suspensión, de modo que en 4 o 5 minutos se consuma 1 ml de solución alcalina aproximadamente. Normalmente se necesitan de 1 a 5 mg de polvo.

La unidad lipásica se define como la cantidad de enzima que libera 10  $\mu\text{eq}$  de ácido por minuto. La actividad A del polvo utilizado, medida en unidades lipásicas por mg, se calcula mediante esta fórmula:

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

siendo:

V = volumen de solución de hidróxido sódico (5.19) consumido por minuto (calculado a partir de la gráfica).

p = peso, en mg, de la muestra problema de polvo.

**Nota 2:** Preparación de la lipasa

En el comercio pueden encontrarse lipasas de actividad lipásica satisfactoria. También es posible prepararlas en laboratorio de la manera siguiente: tomar 5 kg de páncreas fresco de cerdo, refrigerado a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ; eliminar la grasa sólida y el tejido conjuntivo que lo rodean, y triturar en un molino de cuchillas hasta obtener una pasta fluida. Con un agitador (4.25) agitar la pasta junto con 2,5 l de acetona anhidra, durante 4-6 horas y después centrifugar. Efectuar tres extracciones más del residuo con el mismo volumen de acetona anhidra, dos extracciones con una mezcla de acetona y éter etílico 1:1 (V/V), y dos extracciones con éter etílico, en este orden.

Desecar el residuo al vacío durante 48 horas para obtener un polvo estable, que debe almacenarse en un refrigerador.

**Nota 3:** Es aconsejable en todos los casos determinar la composición de los ácidos grasos totales de la misma muestra, ya que la comparación con la de los ácidos situados en la posición 2 facilitará la interpretación de las cifras obtenidas.

**Nota 4:** Por tratarse de un aceite líquido, la hidrólisis se efectúa a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . No obstante, en el caso de la muestra problema se efectuará a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  a fin de que puedan examinarse las grasas con puntos de fusión de hasta  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## ANEXO VIII

## DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE TRILINOLEÍNA

## 1. OBJETO

Determinación de la composición de los triglicéridos de los aceites líquidos vegetales expresada en su número equivalente de carbonos mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

La presente norma describe un método para efectuar la separación y determinación de la composición de los triglicéridos de los aceites vegetales según su peso molecular y grado de insaturación en función de su número equivalente de carbonos (véase la nota 1).

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

La presente norma es aplicable a todos los aceites vegetales que contengan triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga. Este método es especialmente adecuado para detectar la presencia de pequeñas cantidades de aceites semisecantes (ricos en ácido linoleico) en aceites vegetales cuyo principal ácido graso insaturado sea el ácido oleico, como es el caso de los aceites de oliva.

## 3. PRINCIPIO

Separación de los triglicéridos en función de su número equivalente de carbonos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa e interpretación de los cromatogramas.

## 4. APARATOS

- 4.1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con control termostático de la temperatura de la columna.
- 4.2. Sistema de inyección con un volumen de 10 µl.
- 4.3. Detector: refractómetro diferencial. La sensibilidad en toda la escala deberá ser como mínimo de  $10^{-4}$  unidades de índice de refracción.
- 4.4. Columna de acero inoxidable de 250 mm de longitud y 4,5 mm de diámetro interior, rellena de partículas de sílice de 5 µm de diámetro con un 22-23% de carbono en forma de octadecilsilano (nota 2).
- 4.5. Registrador y/o integrador.

## 5. REACTIVOS

Los reactivos deberán ser de calidad para análisis. Los disolventes de elución deberán desgasificarse y podrán reciclarse varias veces sin que ello afecte a las separaciones.

- 5.1. Cloroformo.
- 5.2. Acetona.
- 5.3. Acetonitrilo.
- 5.4. Fase móvil: acetonitrilo + acetona (las proporciones se ajustarán para obtener la separación deseada; comenzar con una mezcla 50:50).
- 5.5. Disolvente de solubilización: acetona o mezcla de acetona-cloroformo 1:1.
- 5.6. Triglicéridos de referencia: pueden utilizarse bien triglicéridos comerciales (tripalmitina, trioleína, etc.), en cuyo caso se reflejarán en un gráfico los tiempos de retención frente al número equivalente de carbonos, alternativamente un cromatograma de referencia del aceite de soja (véanse las notas 3 y 4 y las figuras 1 y 2).

## 6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Preparar del siguiente modo una solución al 5% de las muestras que vayan a analizarse: pesar  $0,5 \pm 0,001$  g de la muestra en un matraz aforado de 10 ml y enrasar hasta 10 ml con el disolvente de solubilización (5.5).

## 7. PROCEDIMIENTO

- 7.1. Instalar el sistema cromatográfico. Bombear fase móvil (5.4) a razón de 1,5 ml/mm para purgar el sistema completo. Esperar hasta que se obtenga una línea de base estable. Inyectar 10 µl de la muestra preparada como se indica en el punto 6.

## 8. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Utilícese el método de normalización interna, es decir, considérese que la suma de las áreas de los picos de los diferentes triglicéridos es igual a 100%. Calcular el porcentaje relativo de cada triglicérido mediante esta fórmula:

$$\% \text{ del triglicérido} = \frac{\text{área del pico}}{\text{suma de las áreas de los picos}} \times 100$$

El resultado se expresa con un decimal.

*Nota 1:* El orden de elución puede determinarse calculando el número equivalente de carbonos, que a menudo viene dado por la relación  $NEC = NC - 2n$ , siendo  $NC$  el número de carbonos y  $n$  el número de enlaces dobles; es posible calcularlo con una precisión mucho mayor tomando en consideración el origen del enlace doble. Si  $n_o$ ,  $n_i$  y  $n_u$  son el número de enlaces dobles atribuible a los ácidos oleico, linoleico y linoléico, respectivamente, el número equivalente de carbonos puede calcularse mediante la relación siguiente:

$$NEC = NC - d_o n_o - d_i n_i - d_u n_u$$

Los coeficientes  $d_o$ ,  $d_i$  y  $d_u$  pueden calcularse mediante los triglicéridos de referencia.

En las condiciones que se especifican en el presente método, la relación que se obtenga será similar a la siguiente:

$$NEC = NC - [2,60 n_o] - [2,35 n_i] - [2,17 n_u]$$

*Nota 2:* Ejemplos: Lichrosorb (Merck) RP 18 Art 50333;

Lichrosphere (Merck) 100 CH 18 Art 50377 o similares.

*Nota 3:* Algunos triglicéridos de referencia también permiten calcular la resolución respecto a la trioleína:

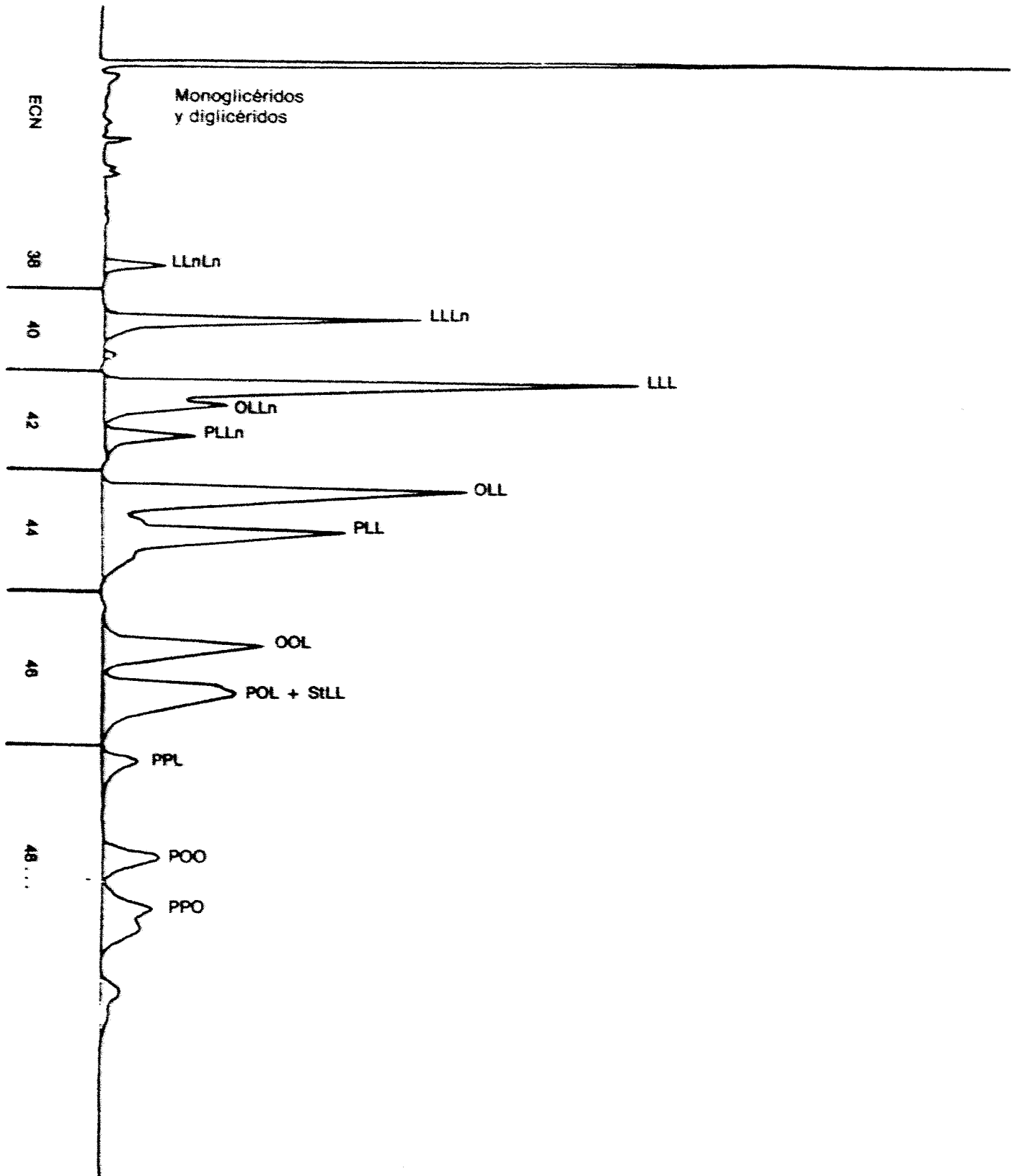
$$\alpha = TR' / TR'_{\text{oleína}}$$

utilizando el tiempo de retención corregido  $TR' = TR - TR_{\text{disolvente}}$ .

La representación gráfica del  $\log \alpha$  frente a  $i$  (número de enlaces dobles) permite determinar los valores de retención de todos los triglicéridos de los ácidos grasos contenidos en los triglicéridos de referencia (véase la figura 2).

*Nota 4:* La eficacia de la columna debe permitir separar claramente el pico de la LLL (trilinoleína) de los triglicéridos con tiempo de retención próximo.

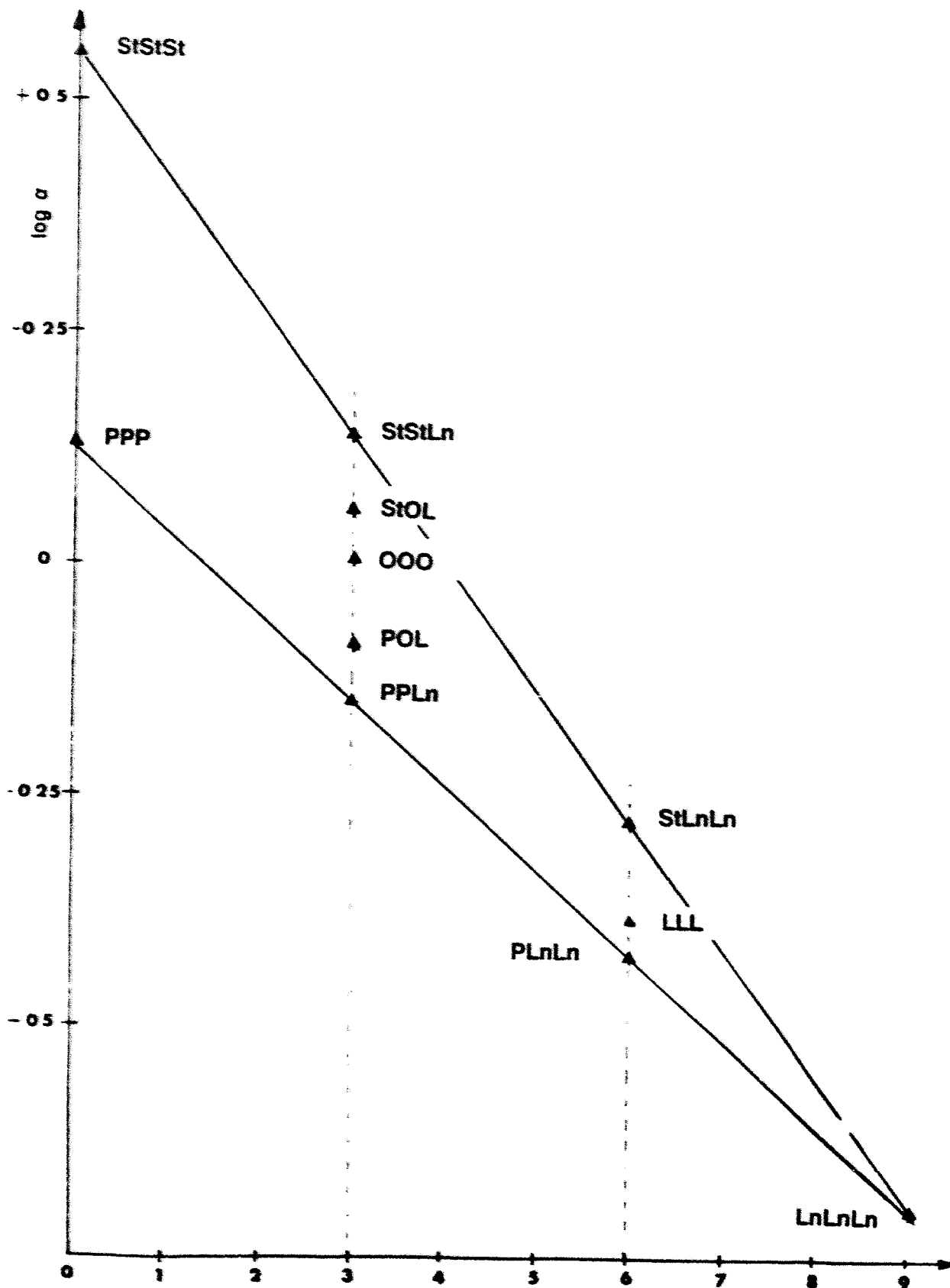
Figura 1

*Cromatograma de una muestra de aceite de soja*

Nota: P: ácido palmítico; Se: ácido esteárico; O: ácido oleico; L: ácido linoleico; Ln: ácido linolénico

Figura 2

Representación gráfica del log alfa frente a f (número de enlaces dobles)



Nota: La: ácido láurico; My: ácido mirístico; P: ácido palmítico; St: ácido esterárico; O: ácido oleico; L: ácido linoleico; Ln: ácido linoléico.



## ANEXO IX

## PRUEBA ESPECTROFOTOMÉTRICA EN EL ULTRAVIOLETA

## INTRODUCCION

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta puede proporcionar indicaciones sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos.

Las absorciones en las longitudes de onda indicadas en el método se deben a la presencia de sistemas diénicos y triénicos conjugados. Los valores de estas absorciones se expresan en extinción específica  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  (extinción de una solución de la materia grasa al 1% en el disolvente determinado, en un espesor de 1 cm) que se expresará convencionalmente como K, también denominado coeficiente de extinción.

## 1. OBJETO

El método describe el procedimiento de ejecución de la prueba espectrofotométrica en el ultravioleta de las materias grasas.

## 2. PRINCIPIO

La materia grasa se disuelve en el disolvente requerido y se determina la extinción de la solución a las longitudes de onda prescritas, respecto al disolvente puro. A partir de los valores espectrofotométricos se calculan las extinciones específicas.

## 3. MATERIAL Y APARATOS

- 3.1. Espectrofotómetro para medidas de extinción en el ultravioleta entre 220 y 360 nm, con posibilidad de lectura para cada unidad nanométrica.
- 3.2. Cubetas de cuarzo, con tapadera, con paso óptico de 1 cm. Las cubetas, llenas de agua o de otro disolvente adecuado, no deben presentar entre ellas diferencias superiores a 0,01 unidades de extinción.
- 3.3. Matraces aforados de 25 ml.
- 3.4. Columna de cromatografía, de 540 mm de longitud y 35 mm de diámetro, con tubo de reflujo de un diámetro aproximado de 10 mm.

## 4. REACTIVOS

- 4.1. Isooctano (2,2,4-trimetilpentano) de calidad para espectrofotometría: debe tener, respecto al agua destilada, una transmitancia del 60% como mínimo a 220 nm y del 95% como mínimo a 250 nm; o
  - ciclohexano de calidad para espectrofotometría: debe tener, respecto al agua destilada, una transmitancia del 40% como mínimo a 220 nm y del 95% como mínimo a 250 nm; u
  - otro disolvente adecuado, que permita obtener una disolución completa de la materia grasa (por ejemplo, alcohol etílico para el aceite de ricino).
- 4.2. Alúmina básica para cromatografía en columna, preparada y controlada como se describe en el apéndice I.
- 4.3. n-Hexano para cromatografía.

## 5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. La muestra debe ser perfectamente homogénea y estar exenta de impurezas en suspensión. Los aceites líquidos a temperatura ambiente se filtran con papel de filtro a una temperatura aproximada de 30 °C, las grasas sólidas se homogeneizan y se filtran a una temperatura superior en 10 °C como máximo a su temperatura de fusión.

- 5.2. Se pesan con precisión 0,25 g aproximadamente de la muestra preparada y se colocan en un matraz aforado de 25 ml, se completa con el disolvente adecuado y se homogeneiza. La solución resultante debe estar perfectamente clara. Si presenta opalescencia o turbidez, se filtrará rápidamente con papel de filtro.
- 5.3. Se llena una cubeta con la solución obtenida y se miden las extinciones, usando como referencia el disolvente empleado, a las longitudes de onda comprendidas entre 232 y 276 nm. Los valores de extinción obtenidos deben estar comprendidos en el intervalo entre 0,1 y 0,8; en caso contrario es necesario repetir la medida utilizando soluciones más concentradas o más diluidas según el caso.
- 5.4. Cuando se quiera determinar la extinción específica después del tratamiento con alúmina se procederá del siguiente modo: en la columna para cromatografía se introducen 30 g de alúmina básica en suspensión en hexano; después de asentarse el absorbente se elimina el exceso de hexano, hasta 1 cm aproximadamente sobre el nivel superior de la alúmina.

Se disuelven 10 g de materia grasa, homogeneizada y filtrada tal como se describe en el punto 5.1, en 100 ml de hexano y se vierte esta solución en la columna. Se recoge el líquido eluido y se evapora totalmente el disolvente en vacío a una temperatura inferior a 25 °C.

Con la materia grasa así obtenida se procede inmediatamente tal como se indica en el punto 5.2.

## 6. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

- 6.1. Se expresan las extinciones específicas o coeficientes de extinción a las diversas longitudes de onda, calculadas como sigue:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot e}$$

siendo:

$K_{\lambda}$  = extinción específica a la longitud de onda  $\lambda$ ,

$E_{\lambda}$  = extinción medida a la longitud de onda  $\lambda$ ,

$c$  = concentración de la disolución en g por 100 ml,

$e$  = espesor de la cubeta en cm.

Los resultados deben expresarse con dos cifras decimales.

- 6.2. La prueba espectrofotométrica del aceite de oliva según el método oficial de los Reglamentos de la CEE requiere la determinación de la extinción específica, en solución en isoocatano, a las longitudes de onda de 232 y 270 nm, y la determinación de  $\Delta E$  definido como:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

donde  $K_m$  es la extinción específica a la longitud de onda  $m$ , longitud de onda de máxima absorción alrededor de 270 nm.

## APENDICE I

### Preparación de la alúmina y control de su actividad

#### A.1.1. Preparación de la alúmina

En un recipiente que pueda cerrarse herméticamente se echa la alúmina previamente desecada en horno a 380-400 °C durante tres horas, se añade agua destilada en una proporción de 5 ml por 100 g de alúmina, se cierra rápidamente el recipiente, se agita repetidas veces y se deja reposar durante 12 horas como mínimo antes del uso.

**A.1.2. Control de la actividad de la alumina**

Se prepara una columna para cromatografía con 30 g de alumina. Se opera tal como se describe en el apartado 5.4. Se hace pasar a través de la columna una mezcla formada por:

- 95% de aceite de oliva virgen, con extinción específica a 268 nm menor que 0,18,
- 5% de aceite de cacahuete tratado con tierras decolorantes en el proceso de refinado, con una extinción específica a 268 nm mayor o igual que 4.

Si, después del paso por la columna, la mezcla presenta una extinción específica a 268 nm mayor que 0,11, la alumina es aceptable; en otro caso se debe aumentar el porcentaje de hidratación.

**APÉNDICE II****Ajuste del espectrofotómetro**

- A.2. El aparato debe revisarse periódicamente (por lo menos cada seis meses) tanto en lo que se refiere a la conformidad de la longitud de onda como a la exactitud de la respuesta.
- A.2.1. El control de la respuesta de la longitud de onda puede hacerse mediante una lámpara de vapor de mercurio o mediante filtros adecuados.
- A.2.2. Para controlar la célula fotoeléctrica y el fotomultiplicador se procede como sigue: se pesan 0,2 g de cromato potásico de calidad para espectrofotometría, se disuelven, en un matraz aforado de 1 000 ml, en una solución de hidróxido potásico 0,05 N y se completa hasta el enrase. De la solución obtenida se toman exactamente 25 ml, se transvasan a un matraz aforado de 500 ml y se completa hasta el enrase con la misma solución de hidróxido potásico.

Se mide la extinción a 275 nm de la solución así obtenida, utilizando la solución de hidróxido potásico como referencia. La extinción medida en cubeta de 1 cm deberá ser de  $0,200 \pm 0,005$ .

## ANEXO X «A»

## ANÁLISIS DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

## 1. OBJETO

El presente método internacional proporciona orientaciones generales para determinar, mediante cromatografía de gases con columna de relleno o capilar, la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos con arreglo al Anexo X B.

El método no es aplicable a los ácidos grasos polimerizados.

## 2. REACTIVOS

## 2.1. Gas portador

Gas inerte (nitrógeno, helio, argón, hidrógeno, etc.), perfectamente desecado y que contenga menos de 10 mg/kg de oxígeno.

*Nota 1:* El hidrógeno, que solo se emplea como gas portador en las columnas capilares, puede duplicar la velocidad del análisis, pero es peligroso. Existen dispositivos de seguridad.

## 2.2. Gases auxiliares

2.2.1. Hidrógeno (pureza  $\geq 99,9\%$ ) exento de impurezas orgánicas.

2.2.2. Aire u oxígeno, exento de impurezas orgánicas.

## 2.3. Patrón de referencia

Una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos puros, o los ésteres metílicos de una grasa de composición conocida y, preferentemente, similar a la de la materia grasa objeto de análisis.

Deberá evitarse la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados.

## 3. APARATOS

Las normas que figuran a continuación se refieren al equipo ordinario para cromatografía de gases, utilizando columnas de relleno y/o capilares y un detector de ionización de llama. Podrá utilizarse cualquier aparato cuya eficacia y resolución se ajusten a lo dispuesto en el punto 4.1.2.

## 3.1. Cromatógrafo de gases

El cromatógrafo de gases constará de los siguientes elementos:

## 3.1.1. Sistema de inyección

Utilizar un sistema de inyección:

- a) con columnas de relleno, con un espacio muerto lo más pequeño posible (en este caso, el sistema de inyección podrá calentarse a una temperatura que sea entre 20 y 50 °C superior a la de la columna);  
o
- b) con columnas capilares; en este caso, el sistema de inyección estará especialmente diseñado para poder operar con esa clase de columnas; podrá utilizarse un inyector con división de flujo o un inyector «on column».

*Nota 2:* En ausencia de ácidos grasos con menos de 16 átomos de carbono, podrá utilizarse un inyector de aguja móvil.

## 3.1.2. Horno

El horno podrá calentar la columna a 260 °C como mínimo y mantener dicha temperatura con una oscilación máxima de 1 °C, si se emplea una columna de relleno, y de 0,1 °C, si se emplea una columna capilar. Este último requisito es especialmente importante si se utiliza una columna de sílice fundida.

Se recomienda emplear en todos los casos un sistema de calentamiento programado, sobre todo en el caso de ácidos grasos con menos de 16 átomos de carbono.

## 3.1.3. Columna de relleno

3.1.3.1. Columna de un material inerte a las sustancias que vayan a analizarse (es decir, vidrio o acero inoxidable) y de las dimensiones siguientes:

- a) Longitud: de 1 a 3 m. Con ácidos grasos de cadena larga (más de C<sub>20</sub>) es conveniente utilizar una columna relativamente corta. Para el análisis de ácidos con 4 o 6 átomos de carbono se recomienda una columna de 2 m.
- b) Diámetro interior: de 2 a 4 mm.

*Nota 3:* Si hay componentes poliinsaturados con más de tres enlaces dobles, pueden descomponerse en una columna de acero inoxidable.

*Nota 4:* Puede utilizarse un sistema con doble columna de relleno.

3.1.3.2. Relleno, que incluya los siguientes elementos:

- a) *Soporte:* tierra de diatomeas lavada con ácido y silanizada, u otro soporte inerte adecuado, con un margen estrecho de tamaño de grano (margen de 25 µm, entre 125 y 200 µm); el tamaño medio de grano estará en función del diámetro interior y de la longitud de la columna.
- b) *Fase estacionaria:* líquido polar de tipo poliéster (por ejemplo: polisuccinato de dietilenglicol, polisuccinato de butanodiol, poliadipato de etilenglicol, etc.), cianosiliconas o cualquier otro líquido que permita efectuar la separación cromatográfica exigida (véase el punto 4). La fase estacionaria deberá constituir del 5 % (m/m) al 70 % (m/m) del relleno. Para algunas separaciones podrá utilizarse una fase fija no polar.

3.1.3.3. Acondicionamiento de la columna

Estando la columna desconectada del detector, es posible, calentar el horno gradualmente hasta 185 °C y hacer pasar a través de la columna recién preparada una corriente de gas inerte a razón de 20-60 ml/min durante 16 horas como mínimo a la temperatura citada y, a continuación, a la temperatura de 195 °C durante 2 horas más.

## 3.1.4. Columna capilar

3.1.4.1. Tubo de un material inerte a las sustancias que vayan a analizarse (generalmente, vidrio o sílice fundida). El diámetro interior estará comprendido entre 0,2 y 0,8 mm. La superficie interior se someterá a un tratamiento adecuado (por ejemplo, preparación de la superficie, inactivación) antes de introducir el recubrimiento de fase fija. En la mayoría de casos, es suficiente una longitud de 25 mm.

3.1.4.2. Fase estacionaria de tipo poliglicol [poli(etilenglicol) 20 000], poliéster (polisuccinato de butanodiol) o polisiloxano polar (cianosiliconas), generalmente. Son apropiadas las columnas de fase químicamente ligada.

*Nota 5:* Existe el riesgo de que los polisiloxanos polares dificulten la identificación y separación del ácido linoléico y de los ácidos C<sub>18</sub>.

El espesor de la fase estará comprendido entre 0,1 y 0,2 µm.

3.1.4.3. Montaje y acondicionamiento de la columna.

Observar las precauciones normales de montaje de columnas capilares (es decir, instalación de la columna en el horno, elección y montaje de las juntas (estanqueidad), conexión de los extremos de la columna al inyector y al detector (reducción de los espacios muertos). Colocar la columna bajo un flujo de gas portador [por ejemplo, 0,3 bar (30 kPa) para una columna de 25 mm de longitud y 0,3 mm de diámetro interior].

Acondicionar la columna programando el gradiente de temperatura del horno a 3 °C/min a partir de la temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura 10 °C inferior al límite de descomposición de la fase estacionaria. Mantener el horno a esa temperatura durante 1 hora hasta que se establezca la línea de base. Restablecer la temperatura de 180 °C para trabajar en condiciones isotérmicas.

*Nota 6:* En el comercio pueden obtenerse columnas adecuadas previamente acondicionadas.

3.1.5. Detector que puede calentarse a una temperatura superior a la de la columna.

## 3.2. Jeringa

Tendrá una capacidad máxima de 10 µl y estará graduada en 0,1 µl.

## 3.3. Registrador

Si se emplea la curva del registrador para calcular la composición de la mezcla analizada, se necesita un registrador electrónico de alta precisión compatible con los aparatos utilizados. El registrador deberá tener las siguientes características:

- a) tiempo de respuesta inferior a 1,5 s y, preferiblemente, inferior a 1 s (el tiempo de respuesta es el tiempo que tarda la pluma registradora en pasar de 0 a 90 % después de la introducción instantánea de una señal del 100 %);

- b) ancho del papel: 20 cm como mínimo;
- c) velocidad del papel: ajustable a valores comprendidos entre 0,4 cm/min y 2,5 cm/min.

### 3.4. Integrador

La utilización de un integrador electrónico permite efectuar cálculos rápidos y precisos. Debe proporcionar una respuesta lineal de sensibilidad adecuada y la corrección de la desviación de la línea de base debe ser satisfactoria.

## PROCEDIMIENTO

Las operaciones descritas en los puntos 4.1 a 4.3 sólo son válidas si se emplea un detector de ionización de llama.

Como alternativa puede emplearse un cromatógrafo de gases con catarómetro (cuyo funcionamiento se basa en el principio de los cambios de conductividad térmica). En ese caso, las condiciones de ensayo deberán modificarse como se indica en el punto 6.

### 4.1. Condiciones de ensayo

#### 4.1.1. Determinación de las condiciones operativas óptimas

##### 4.1.1.1. Columna de relleno

Al establecer las condiciones de ensayo deberán tenerse en cuenta las variables siguientes:

- a) longitud y diámetro de la columna;
- b) composición y cantidad de la fase estacionaria;
- c) temperatura de la columna;
- d) flujo del gas portador;
- e) resolución exigida;
- f) tamaño de la muestra problema, determinado de modo que el conjunto del detector y el electrómetro dé una respuesta lineal;
- g) duración del análisis.

Como norma general, las cifras de las tablas 1 y 2 permitirán obtener los resultados deseados, es decir, al menos 2 000 platos teóricos por metro de longitud de columna en el caso del estearato de metilo, y su elución en 15 minutos aproximadamente.

Cuando el aparato lo permita, la temperatura del inyector deberá ser de 200 °C aproximadamente y la del detector deberá ser igual o superior a la de la columna.

Por lo general, la razón entre la velocidad de flujo del hidrógeno suministrado al detector de ionización de llama y la del gas portador oscila entre 1:2 y 1:1, en función del diámetro de la columna. El flujo del oxígeno es de 5 a 10 veces superior al del hidrógeno.

Tabla 1

| Diámetro interior de la columna<br>mm | Flujo del gas portador<br>ml/min |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| 2                                     | 15 a 25                          |
| 3                                     | 20 a 40                          |
| 4                                     | 40 a 60                          |

Tabla 2

| Concentración de la fase fija<br>% (m/m) | Temperatura de la columna<br>°C |
|--|---------------------------------|
| 5  | 175                             |
| 10                                       | 180                             |
| 15                                       | 185                             |
| 20                                       | 185                             |

## 4.1.1.2. Columna capilar

Las propiedades de eficacia y permeabilidad de las columnas capilares implican que la separación de los constituyentes y la duración del análisis dependen considerablemente del flujo del gas portador en la columna. Por lo tanto, para optimizar las condiciones operativas será necesario manipular este parámetro (o, lo que es más sencillo, la presión en cabeza de columna) según se desee mejorar las separaciones o efectuar un análisis rápido.

## 4.1.2. Determinación del número de platos teóricos (eficiencia) y de la resolución

(Véase la figura 1)

Efectuar el análisis de una mezcla de estearato de metilo y de oleato de metilo (por ejemplo, ésteres metílicos de manteca de cacao) en proporciones aproximadamente equivalentes.

Escoger la temperatura de la columna y el flujo del gas portador de manera que el máximo del pico del estearato de metilo se registre aproximadamente 15 minutos después del pico del disolvente. Utilizar una cantidad suficiente de la mezcla de ésteres metílicos, de manera que el pico del estearato de metilo se eleve a tres cuartos aproximadamente de la escala completa.

Calcular el número de platos teóricos (eficiencia) mediante la siguiente fórmula:

$$n = 16 \left[ \frac{d r_1}{a_1} \right]^2$$

y la resolución «R» mediante la siguiente fórmula:

$$R = \frac{2\Delta}{a_1 + a_2}$$

siendo:

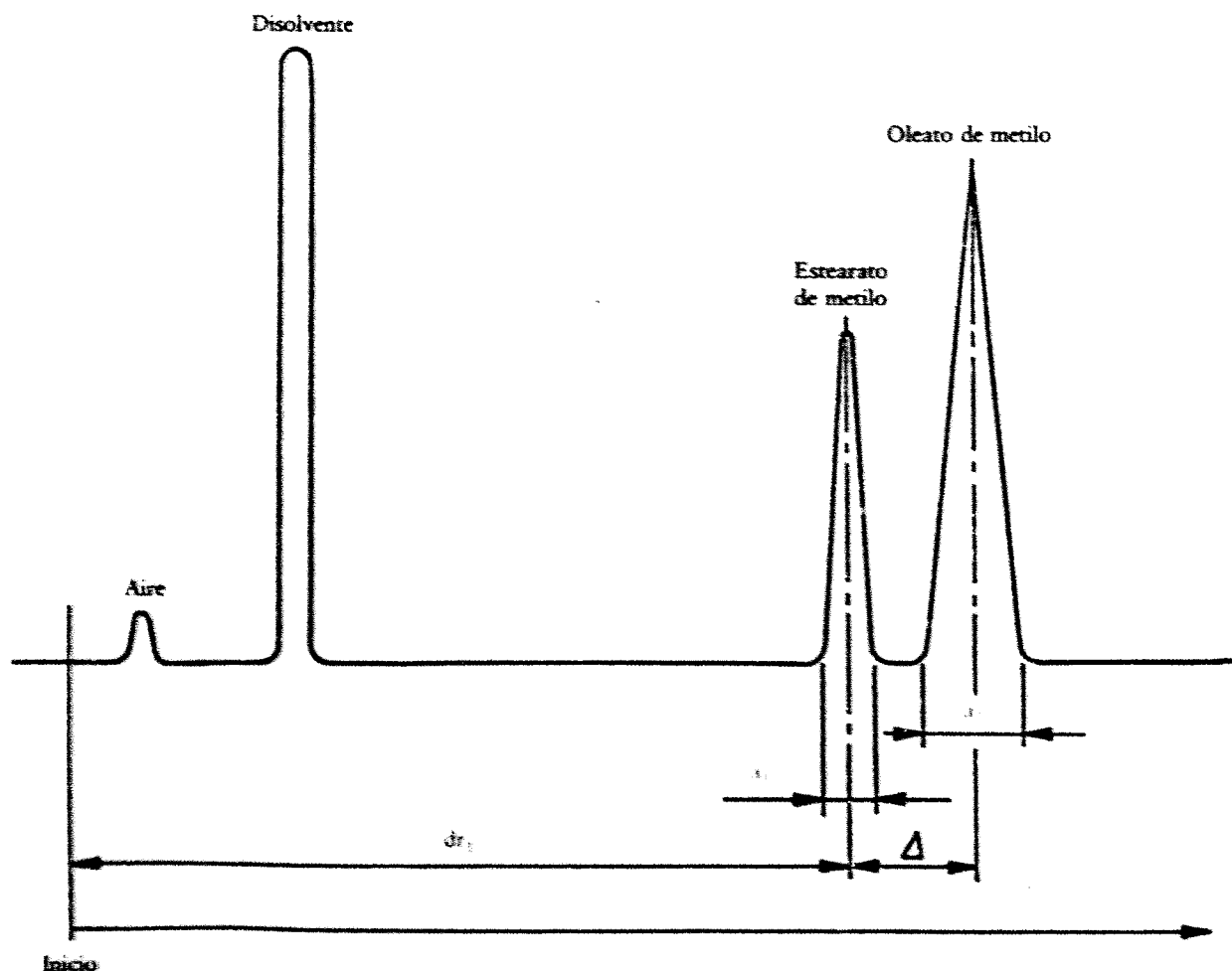
$d r_1$  = distancia, en mm, desde el inicio del cromatograma hasta el máximo del pico del estearato de metilo,

$a_1$  y  $a_2$  = anchura, en mm, de los picos del estearato de metilo y del oleato de metilo, respectivamente, medida entre los puntos de intersección de las tangentes en los puntos de inflexión de la curva con la línea de base,

$\Delta$  = distancia, en mm, entre los dos máximos de los picos del estearato de metilo y del oleato de metilo.

Figura 1

*Cromatograma para determinar el número de platos teóricos (eficacia) y la resolución*



Se establecerán unas condiciones de análisis que permitan obtener al menos 2 000 platos teóricos por metro de longitud de columna para el estearato de metilo y una resolución de 1,25 como mínimo.

#### 4.2. Muestra problema

Tomar con la jeringa (3.2) de 0,1  $\mu$ l a 2  $\mu$ l de la solución de ésteres metílicos preparados con arreglo al Anexo X B e inyectarlos en la columna.

En el caso de ésteres no disueltos, preparar una solución de 100 mg/ml aproximadamente en heptano de calidad para cromatografía e inyectar de 0,1  $\mu$ l a 1  $\mu$ l de esta solución.

Si sólo se desean detectar los componentes presentes en cantidades muy pequeñas, se podrá aumentar el tamaño de la muestra (hasta 10 veces).

#### 4.3. Análisis

Como norma general, las condiciones de ensayo son las que se especifican en el punto 4.1.1.

No obstante, cuando se determinan ácidos con menos de 12 átomos de carbono es posible operar a menor temperatura de columna, mientras que cuando se determinan ácidos grasos con más de 20 átomos de carbono es posible operar a una temperatura mayor. A veces se puede utilizar en los dos casos anteriores un sistema de programación de temperatura. Por ejemplo, si la muestra contiene ésteres metílicos de ácidos grasos con menos de 12 átomos de carbono, inyectar la muestra a 100 °C (o a 50 - 60 °C si hay ácido butírico) y elevar inmediatamente la temperatura a razón de 4 - 8 °C/min hasta alcanzar el nivel deseado. En algunos casos es posible combinar ambos procedimientos.

Tras el calentamiento programado, se continúa la elución a temperatura constante hasta que todos los componentes se hayan eluido. Si el instrumento no puede efectuar un calentamiento programado, se opera a dos temperaturas fijas comprendidas entre 100 y 195 °C.

Si es necesario, se recomienda que se efectúe un análisis con dos fases fijas de diferente polaridad para comprobar la ausencia de picos «ocultos», por ejemplo en caso de presencia simultánea de  $C_{18:1}$  y  $C_{20:2}$  o  $C_{18:1}$  y  $C_{18:2}$  conjugados.



#### 4.4. Preparación del cromatograma y las gráficas de referencia

Analizar la mezcla patrón de referencia (2.3) aplicando las mismas condiciones de ensayo que a la muestra y medir los tiempos o las distancias de retención de los ácidos grasos que la componen. Representar gráficamente en papel semilogarítmico, para cualquier grado de insaturación, el logaritmo del tiempo o de la distancia de retención en función del número de átomos de carbono. En condiciones isotérmicas, las gráficas de los ésteres de cadena lineal con el mismo grado de insaturación deben formar líneas rectas. Dichas líneas rectas deben ser aproximadamente paralelas.

Deben evitarse las condiciones que propicien la existencia de «picos ocultos», es decir, una resolución insuficiente para separar dos componentes.

### 5. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 5.1. Análisis cualitativo

Identificar los picos del estearato de metilo de la muestra a partir de los gráficos citados en el punto 4.4, si es necesario por interpolación.

#### 5.2. Análisis cuantitativo

##### 5.2.1. Determinación de la composición

Salvo en casos excepcionales, utilizar el método de normalización interna, es decir, partir del principio de que todos los componentes de la muestra están representados en el cromatograma, de manera que el total de las áreas situadas debajo de cada pico representa el 100 % de los constituyentes (elución total).

Si el equipo incluye un integrador, utilizar las cifras que éste proporcione. En caso contrario, determinar el área situada debajo de cada pico multiplicando la altura del pico por el ancho a la mitad de la altura y, cuando sea necesario, tomar en consideración las atenuaciones utilizadas durante el registro.

##### 5.2.2. Método de cálculo

###### 5.2.2.1. Caso general

Calcular el contenido de un componente dado (i) (expresado como porcentaje en masa de ésteres metílicos), mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico en relación con la suma de las áreas de todos los picos, aplicando la fórmula siguiente:

$$\frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$$

siendo:

$A_i$ : área del pico correspondiente al componente i.

$\Sigma A$ : suma de las áreas de todos los picos.

Expresar el resultado con una cifra decimal.

Nota 7: En este caso general se considera que el resultado del cálculo basado en las áreas relativas representa el porcentaje en peso. Para los casos en que no es válida esta consideración, véase el punto 5.2.2.2.

###### 5.2.2.2. Utilización de factores de corrección

En algunos casos, por ejemplo en presencia de ácidos grasos con menos de 8 átomos de carbono o de ácidos con grupos secundarios, si se utilizan detectores de conductividad térmica o si es necesario alcanzar mayor nivel de exactitud, deben aplicarse factores de corrección para convertir los porcentajes de las áreas de los picos en porcentajes en peso de los componentes.

Determinar los factores de corrección con un cromatograma obtenido del análisis de una mezcla de referencia de ésteres metílicos de composición conocida en condiciones de ensayo idénticas a las empleadas para el análisis de la muestra.

La fórmula que se aplicará a la muestra de referencia para obtener el porcentaje en peso del componente i es la siguiente:

$$\frac{m_i}{\Sigma m} \times 100$$

siendo:

$m_i$  = peso del componente i de la muestra de referencia.

$\Sigma m$  = suma de los pesos de los diversos componentes de la muestra de referencia.

A partir del cromatograma de la muestra de referencia (4.4) calcular el porcentaje (área/área) del componente  $i$  del siguiente modo:

$$\frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$$

siendo:

$A_i$ : área del pico correspondiente al componente  $i$ ,

$\Sigma A$ : suma de las áreas de todos los picos.

El factor de corrección se calcula del siguiente modo:

$$K_i = \frac{m_i \times \Sigma A}{A_i \times \Sigma m}$$

Por lo general, los factores de corrección se expresan con relación a  $K_{C16}$ , de modo que los factores relativos se convierten en lo siguiente:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

En la muestra, el contenido de cada componente  $i$ , expresado como porcentaje en peso de los ésteres metílicos, es el siguiente:

$$\frac{K'_i \times A_i}{\Sigma (K'_i \times A_i)} \times 100$$

Expresar los resultados con una cifra decimal.

#### 5.2.2.3. Utilización de patrón interno

En algunos análisis (por ejemplo, cuando no se cuantifican todos los ácidos grasos por estar presentes simultáneamente ácidos de 4 y 6 átomos de carbono y ácidos de 16 y 18 átomos de carbono, o cuando es necesario determinar la cantidad absoluta de un ácido graso en la muestra) es preciso utilizar un patrón interno. Se emplean con frecuencia ácidos grasos de 5, 15 o 17 átomos de carbono. Debe determinarse, si es necesario, el factor de corrección del patrón interno.

El porcentaje en peso del componente  $i$ , expresado como ésteres metílicos, se calcula mediante esta fórmula:

$$\frac{m_p \times K'_i \times A_i}{m \times K'_p \times A_p} \times 100$$

siendo:

$A_i$ : área del pico correspondiente al componente  $i$ .

$A_p$ : área del pico correspondiente al patrón interno.

$K'_i$ : factor de corrección del componente  $i$  (con relación a  $K_{C16}$ ).

$K'_p$ : factor de corrección del patrón interno (con relación a  $K_{C16}$ ).

$m$ : peso, en mg, de la muestra.

$m_p$ : peso, en mg, del patrón interno.

Expresar los resultados con una cifra decimal.

#### 6. CASO ESPECIAL DE UTILIZACIÓN DE UN CATARÓMETRO (FUNCIONAMIENTO BASADO EN EL PRINCIPIO DE LOS CAMBIOS DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA)

Para la determinación de la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos también podrá utilizarse un cromatógrafo de gases provisto de un detector cuyo funcionamiento se base en el principio de los cambios de conductividad térmica (catarómetro). En ese caso, las condiciones establecidas en los puntos 3 y 4 deberán modificarse como se indica en la tabla 3.

Para el análisis cuantitativo, utilizar los factores de corrección definidos en el punto 5.2.2.2.

Tabla 3

| Variable                                | Valor/condición  |
|---|--|
| Columna                                 | Longitud: 2 a 4 m<br>Diámetro interior: 4 mm                                 |
| Soporte                                 | Tamaño de grano entre 160 y 200 $\mu\text{m}$                                |
| Concentración de la fase estacionaria   | De 15 % a 25 % (m/m)   |
| Gas portador                            | Helio o, en su defecto, hidrógeno, con el menor contenido de oxígeno posible |
| Gases auxiliares                        | Ninguno  |
| Temperatura del inyector                | De 40 a 60 °C más que la de la columna                                       |
| Temperatura de la columna               | De 180 a 200 °C  |
| Flujo del gas portador                  | Normalmente entre 60 y 80 ml/min   |
| Tamaño de la muestra problema inyectada | Normalmente entre 0,5 y 2 $\mu\text{l}$                                      |

#### 7. INFORME DEL ANÁLISIS

En el informe del análisis se expondrán los métodos utilizados para la preparación de los ésteres metílicos y para la realización del análisis mediante cromatografía de gases, así como los resultados obtenidos. Se mencionarán, asimismo, cualesquiera procedimientos de trabajo que no se especifiquen en la presente norma internacional o que se consideren facultativos, así como toda circunstancia que pueda haber influido en los resultados.

El informe del análisis incluirá todos los datos necesarios para la completa identificación de la muestra.

## ANEXO X «B»

**PREPARACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CONFORMIDAD CON LOS PUNTOS I Y II DEL ANEXO VI DEL REGLAMENTO (CEE) Nº 72/77 O SEGÚN EL MÉTODO QUE SE DESCRIBE A CONTINUACIÓN****INTRODUCCIÓN**

La elección del procedimiento a utilizar deberá hacerse en función de la composición de los ácidos y de la acidez de la materia grasa que haya que examinar y del análisis mediante cromatografía de gases que deba efectuarse.

En particular:

- cuando se trate de materias grasas que contengan ácidos grasos inferior a C<sub>12</sub>, sólo podrán utilizarse los procedimientos en tubo cerrado o con dimetilico,
- cuando se trate de materias grasas con una acidez superior al 3%, sólo podrán utilizarse los procedimientos con mezcla de metanol y ácido clorhídrico o con sulfato dimetilico,
- en la determinación mediante cromatografía de gases de los isómeros trans, sólo podrán utilizarse los procedimientos con metilato sódico o con sulfato dimetilico,
- el procedimiento con mezcla de metanol, hexano y ácido sulfúrico deberá utilizarse en la preparación de los ésteres metílicos de pequeñas cantidades de materias grasas por separación mediante cromatografía en capa fina.

No se tendrá en cuenta el insaponificable cuando no supere el 3%; en caso contrario, los ésteres metílicos deberán prepararse a partir de los ácidos grasos.

**1. OBJETO**

A continuación se describen cinco procedimientos para la preparación de los ésteres metílicos de las materias grasas:

- a) con metilato sódico;
- b) con metilato sódico en tubo cerrado;
- c) con mezcla de metanol y ácido clorhídrico en tubo cerrado;
- d) con sulfato dimetilico;
- e) con mezcla de metanol, hexano y ácido sulfúrico.

**Procedimiento A****2. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

La materia grasa objeto de análisis se calienta a reflujo con alcohol metílico y metilato sódico. Los ésteres metílicos que se obtengan se extraen con éter etílico.

**3. MATERIAL Y APARATOS**

- 3.1. Matraz redondo de 100 ml con refrigerante de reflujo, provisto en su extremidad superior de un tubo para cal sódica, con junta esmerilada.
- 3.2. Probetas de 50 ml.
- 3.3. Pipeta de 5 ml graduada en divisiones de 0,1 ml.
- 3.4. Embudos de separación de 250 ml.
- 3.5. Matraz redondo de 200 ml.

**4. REACTIVOS**

- 4.1. Metanol anhidro.

- 4.2. Solución de metilato sódico en metanol al 1 % aproximadamente. Se prepara disolviendo 0,34 g de sodio metal en 100 ml de metanol anhidro.
- 4.3. Éter etílico.
- 4.4. Solución de cloruro sódico al 10 %.
- 4.5. Éter de petróleo 40 °—60 °C.

## 5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. Introducir en el matraz de 100 ml 2 g de grasa previamente deshidratada en sulfato sódico y filtrada. Añadir 35 ml de metanol, acoplar el refrigerante y llevar a ebullición manteniéndola a reflujo durante algunos minutos.
- 5.2. Interrumpir el calentamiento, separar el refrigerante y añadir rápidamente 3,5 ml de la solución de metilato sódico; acoplar nuevamente el refrigerante y hervir a reflujo durante 3 horas como mínimo. La metilación se habrá completado cuando toda la materia grasa se haya disuelto y la mezcla de reacción esté perfectamente transparente a temperatura ambiente.
- 5.3. Enfriar y verter la mezcla de reacción en una ampolla de separación de 250 ml, añadir 35 o 40 ml de éter etílico, 100 ml de agua y 5 o 6 ml de la solución de cloruro sódico al 10 %. Agitar y esperar a que se produzca la separación de las capas; transferir la fase acuosa a una segunda ampolla de separación y extraerla de nuevo con 25 ml de éter etílico.

Añadir a los extractos etéreos reunidos 50 ml de éter de petróleo 40 °—60 °C, lo que provocará la separación del agua que debe eliminarse.

Lavar la fase etérea tres veces con 10 o 15 ml de agua cada vez, desecar sobre sulfato sódico y pasar filtrando a través de papel a un matraz redondo de 200 ml.

Concentrar la solución al baño María hasta unos 20 ml mientras se hace pasar una corriente de nitrógeno puro.

### Procedimiento B

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa objeto de análisis es tratada con metilato sódico en solución metanólica, en recipiente cerrado, a 85 °—90 °C.

## 3. MATERIAL Y APARATOS

- 3.1. Tubo de vidrio de paredes gruesas, de unos 5 ml (altura: 40—45 mm, diámetro: 14—16 mm).
- 3.2. Pipeta de 1 ml graduada en divisiones de 0,1 ml.

## 4. REACTIVOS

- 4.1. Solución de metilato sódico en metanol al 1,5 % aproximadamente. Se prepara disolviendo 0,50 g de sodio metal en 100 ml de metanol anhidro.

## 5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. Introducir en el tubo de vidrio 2 g de materia grasa previamente deshidratada en sulfato sódico y filtrada. Añadir 0,3 g (unos 0,4 ml) de la solución de metilato sódico y cerrar el tubo a la llama.
- 5.2. Mantener el tubo durante dos horas al baño María a una temperatura entre 85 ° y 90 °C agitándolo de vez en cuando. La esterificación se habrá conseguido cuando se vuelva transparente el contenido del frasco tras la sedimentación de la glicerina y de los residuos de los reactivos.
- 5.3. Enfriar a temperatura ambiente. Abrir el tubo cuando se vayan a utilizar los ésteres metílicos. Éstos no necesitan de ninguna otra manipulación antes de ser analizados.

### Procedimiento C

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa objeto de análisis es tratada con una mezcla de metanol y ácido clorhídrico, en tubo cerrado, a 100 °C.

**3. MATERIAL Y APARATOS**

- 3.1. Tubo de vidrio de paredes gruesas, de unos 5 ml (altura: 40—45 mm, diámetro: 14—16 mm).
- 3.2. Pipetas aforadas de 1 y 2 ml.

**4. REACTIVOS**

- 4.1. Solución de ácido clorhídrico en metanol al 2%. Se prepara con ácido clorhídrico gaseoso y metanol anhidro (nota 1).
- 4.2. Hexano de calidad adecuada para cromatografía.

**5. PROCEDIMIENTO**

- 5.1. Introducir en el tubo de vidrio 0,2 g de materia grasa, previamente deshidratada en sulfato sódico y filtrada, y 2 ml de la solución de ácido clorhídrico en metanol. Cerrar el tubo a la llama.
- 5.2. Mantener el tubo durante 40 minutos al baño María a 100 °C.
- 5.3. Enfriar el tubo en agua corriente, abrirlo, añadir 2 ml de agua destilada y 1 ml de hexano. Centrifugar y extraer la fase del hexano que estará lista para ser utilizada.

**Procedimiento D****2. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

La materia grasa objeto de análisis se saponifica con una solución en alcohol metílico de hidróxido potásico, y después se trata con sulfato dimetílico. Tras añadir ácido clorhídrico, los ésteres metílicos formados se separan espontáneamente. Mediante el tratamiento posterior con alumina, se obtienen ésteres metílicos de elevada pureza.

**3. MATERIAL Y APARATOS**

- 3.1. Tubo de ensayo de vidrio de paredes gruesas, de 20 ml aproximadamente de capacidad, con tapón esmerilado 10/19 y enganches de seguridad.
- 3.2. Refrigerante de reflujo de cinco ampollas con junta esmerilada 10/19.
- 3.3. Filtros de vidrio de fondo poroso, de graduación G 2 y diámetro de 20 mm.
- 3.4. Tubos de ensayo de vidrio de fondo cónico, de unos 10 ml de capacidad.
- 3.5. Jeringas de 1 y 5 ml.

**4. REACTIVOS**

- 4.1. Solución al 10% de hidróxido potásico en alcohol metílico de calidad adecuada para cromatografía.
- 4.2. Solución al 0,05% del indicador verde de bromocresol en alcohol metílico.
- 4.3. Sulfato dimetílico ( $d = 1,335$  a 15 °C).
- 4.4. Ácido clorhídrico concentrado ( $d = 1,19$ ) diluido 1:1 con alcohol metílico de calidad cromatográfica.
- 4.5. Óxido de aluminio normalizado según el método Brockmann para cromatografía de adsorción.

**5. PROCEDIMIENTO**

- 5.1. Introducir en el tubo de ensayo de 20 ml unos 2,2 ml de materia grasa previamente deshidratada en sulfato sódico y filtrada; añadir 5 ml de la solución de hidróxido potásico y algunos granos de piedra pómez para regular la ebullición. Acoplar el refrigerante de reflujo y calentar agitando sobre llama pequeña durante 5 minutos. Para que la saponificación sea completa, la solución deberá volverse transparente. Por último, enfriar en agua corriente y separar el refrigerante.

- 5.2. Añadir dos gotas del indicador y, lentamente, con la ayuda de una jeringa, 1 ml de sulfato dimetilico. Cerrar herméticamente el tubo de ensayo y agitar durante dos o tres minutos, introduciendo con frecuencia el fondo del tubo en agua hirviendo: la reacción será completa cuando el indicador pase del azul al amarillo. Al final, enfriar el tubo en agua corriente, abrirlo y añadir 5 ml de la solución metanólica de ácido clorhídrico.
- 5.3. Tras agitar durante unos segundos, inclinar el tubo y darle ligeras sacudidas que faciliten la aparición de los ésteres metílicos en forma de masa oleosa (nota A).
- Retirar los ésteres metílicos con una jeringa, introducirlos en un tubo de fondo cónico, añadir un volumen de alúmina equivalente a un cuarto del volumen de los ésteres metílicos, agitar y filtrar con papel de filtro.
- Nota A: En caso de que no se produzca espontáneamente la separación de los ésteres metílicos, añadir al tubo 5 ml de agua y agitar.

### Procedimiento E

#### 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa objeto de análisis se calienta a reflujo con metanol, hexano y ácido sulfúrico. Los ésteres metílicos que se obtengan se extraerán con éter de petróleo.

#### 3. MATERIAL Y APARATOS

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

#### 4. REACTIVOS

- 4.1. Reactivo de metilación: metanol anhidro, hexano y ácido sulfúrico concentrado ( $d = 1,84$ ) en la siguiente proporción: 75:25:1 (V/V/V).
- 4.2. Éter de petróleo 40—60 °C.
- 4.3. Sulfato sódico anhidro.

#### 5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. Introducir en el tubo de 20 ml el material recuperado de la placa y añadir 5 ml de reactivo de metilación.
- 5.2. Acoplar el refrigerante de reflujo y calentar al baño María en ebullición durante 30 minutos (nota 2).
- 5.3. Transferir cuantitativamente la mezcla a una ampolla de separación de 50 ml con la ayuda de 10 ml de agua destilada y 10 ml de éter de petróleo. Agitar energicamente y esperar a que se produzca la separación de las fases, extraer la capa acuosa y lavar la capa etérea dos veces con 20 ml de agua destilada. Añadir a la ampolla de separación una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro, agitar, dejar reposar unos minutos y pasar filtrando a un tubo de fondo cónico de 15 ml.

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

Nota 1: 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 ( $p = 1,84$ ). El gas liberado se deseca fácilmente por borboteo a través de ácido sulfúrico concentrado. Dado que el ácido clorhídrico es absorbido por el metanol con mucha rapidez, se aconseja que se adopten las precauciones necesarias al disolverlo (es decir, introducir el gas a través de un embudo pequeño invertido cuyo borde roce la superficie del líquido). Pueden prepararse con antelación cantidades grandes de solución metanólica de ácido clorhídrico, ya que se conserva en perfectas condiciones en la oscuridad dentro de botellas con tapones de vidrio.

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

## ANEXO XI

## DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN SOLVENTES HALOGENADOS VOLÁTILES EN EL ACEITE DE OLIVA

1. PRINCIPIO DEL MÉTODO  
Análisis por cromatografía en fase gaseosa según la técnica del espacio de cabeza (*head space*).
2. EQUIPO
  - 2.1. Cromatografía de gases con detector de captura de electrones (ECD).
  - 2.2. Equipo para espacio de cabeza (*head space*).
  - 2.3. Columna de cromatografía en fase gaseosa de vidrio de 2 metros de largo y 2 mm de diámetro, fase estacionaria.  
OV 101 al 10% impregnado en cromosorb W-AW-DMCS (tierra de diatomeas calcinada lavada con ácido y silanizado (80—100 Mesh).
  - 2.4. Gas portador y gas auxiliar: nitrógeno para cromatografía de gases de pureza adecuada para la detección por captura de electrones.
  - 2.5. Frascos de cristal de 10 a 15 ml provistos de septum de teflón y con una cápsula de aluminio con un orificio para toma de muestras con jeringa.
  - 2.6. Pinzas capsuladora para cerrar herméticamente.
  - 2.7. Jeringa para gases de 0,5 y 2 ml.
3. REACTIVOS  
Solventes halogenados con una pureza apropiada para su uso en cromatografía en la fase gaseosa.
4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS
  - 4.1. Pesar con exactitud unos 3 g de aceite en un frasco de cristal (no reutilizable), tapar el frasco de manera que quede cerrado herméticamente. Introducir el frasco en un baño con termostato a 70 °C durante 1 hora. Extraer con precisión, por medio de una jeringa, un volumen de 0,2 a 0,5 ml del espacio de cabeza. Inyectarlo en la columna del cromatógrafo de gases con las siguientes condiciones:  
temperatura inyector: 150 °C  
temperatura columna: 70—80 °C  
temperatura detector: 200—250 °C  
Podrán utilizarse otras temperaturas siempre que los resultados sean equivalentes.  
La inyección se puede realizar con el equipo para espacio de cabeza.
  - 4.2. Soluciones de referencia. Preparar soluciones patrón utilizando aceite de oliva refinado sin trazas de solventes con concentraciones en hidrocarburos halogenados de 0,05 a 1 ppm (mg/lg) según el contenido supuesto de la muestra. Para preparar la solución de referencia, si es necesario diluir previamente el hidrocarburo halogenado patrón, puede utilizarse pentano.
  - 4.3. Cuantificación. Se efectúa por cálculo mediante la relación de áreas o alturas del pico de la muestra y de la solución patrón cuya concentración sea la más próxima a la de la muestra. Si la desviación es superior al 10%, será necesario volver a hacer el análisis, comparándolo con una nueva solución patrón de concentración tal que se ajuste a la desviación relativa antes mencionada. El contenido se establecerá efectuando la media de varias inyecciones.
  - 4.4. Expresión de los resultados. Los resultados se expresarán en ppm (mg/kg). El límite de detección del método es de 0,01 mg/kg.



## ANEXO XII

## VALORACIÓN ORGANOLÉPTICA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

## 1. OBJETO

El presente método tiene por finalidad establecer los criterios necesarios para valorar las características del flavor del aceite de oliva virgen y desarrollar la sistemática necesaria.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

El método que se describe sólo es aplicable a la valoración y clasificación organoléptica del aceite de oliva virgen utilizable para consumo directo. Se limita a clasificar el aceite virgen en una escala numérica, relacionada con la percepción de los estímulos de su flavor, según el juicio de un grupo de cata-dores seleccionados constituidos en panel.

## 3. ANÁLISIS SENSORIAL: VOCABULARIO GENERAL BÁSICO

Véase el capítulo «Análisis sensorial: vocabulario general básico».

## 4. VOCABULARIO ESPECÍFICO PARA EL ACEITE DE OLIVA

*Almendrado*: este flavor puede darse en dos aspectos, el típico de la almendra fresca o el propio de la almendra seca y sana que puede confundirse con un rancio incipiente. Se aprecia como un regusto cuando el aceite permanece en contacto con la lengua y el paladar, se asocia a los aceites dulces y de olor apagado.

*Alpechin*: flavor característico adquirido por el aceite a causa de una mala decantación y prolongado contacto con las aguas de vegetación.

*Amargo*: sabor característico del aceite obtenido de aceitunas verdes o en envero. Puede ser más o menos agradable según su intensidad.

*Apagado o plano*: flavor del aceite de oliva cuyas características organolépticas son muy tenues, debido a la pérdida de sus componentes aromáticos.

*Áspero*: sensación característica de algunos aceites que al ser degustados producen una reacción buco-táctil de astringencia.

*Atrojado*: flavor característico del aceite obtenido de aceitunas amontonadas que han sufrido un avanzado grado de fermentación.

*Avinado-avinagrado*: flavor característico de algunos aceites que recuerdan al vino o vinagre. Es debido fundamentalmente a la formación de ácido acético, acetato de etilo y etanol, en cantidades superiores a lo normal en el aroma del aceite de oliva.

*Basto*: percepción característica de algunos aceites que, al ser degustados, producen una sensación buco-táctil densa y pastosa.

*Borras*: flavor característico del aceite recuperado de los lados decantados en depósitos y trujales.

*Capacho*: flavor característico del aceite obtenido de aceitunas prensadas en capachos sucios con residuos fermentados.

*Cocido o quemado*: flavor característico del aceite originado por un excesivo y/o prolongado calentamiento durante su obtención muy particularmente durante el termo-batido de la pasta, si éste se realiza en condiciones inadecuadas.

*Dulce*: sabor agradable del aceite que, sin ser precisamente azucarado, no predominan en él los atributos amargo, astringente y picante.

*Esparto*: flavor característico del aceite obtenido de aceitunas prensadas en capachos nuevos de esparto. El flavor puede ser diferente si el capacho está fabricado con esparto verde o si lo está con esparto seco.

*Frutado*: flavor que recuerda el olor y gusto del fruto sano, fresco y recogido en el punto óptimo de su maduración.

*Frutado maduro*: flavor del aceite de oliva obtenido de frutos maduros generalmente de olor apagado y sabor dulce.

*Grasa de máquina:* olor del aceite de oliva obtenido en una almazara de cuya maquinaria no han sido adecuadamente eliminados residuos de petróleo, de grasa o aceite mineral.

*Gusano:* flavor característico del aceite obtenido de aceitunas fuertemente atacadas por larvas de mosca del olivo (*Dacus oleae*).

*Heno:* flavor característico de algunos aceites que recuerda a la hierba mas o menos desecada.

*Hierba:* flavor característico de algunos aceites que recuerda a la hierba recién cortada.

*Hojas verdes (amargo):* flavor del aceite obtenido de aceitunas excesivamente verdes o que se han molido mezcladas con hojas y tallos.

*Jabonoso:* flavor con una sensación olfato-gustativa que recuerda a la del jabón verde.

*Manzana:* flavor del aceite de oliva que recuerda a dicho fruto.

*Metálico:* flavor que recuerda a los metales. Es característico del aceite que ha permanecido en contacto, durante tiempo prolongado, con alimentos o superficies metálicas en condiciones indebidas, durante los procesos de molienda, barido, prensado o almacenamiento.

*Moho-humedad:* flavor característico del aceite obtenido de frutos en los que se han desarrollado abundantes hongos y levaduras a causa de haber permanecido amontonados y con humedad varios días.

*Orujo:* flavor característico que recuerda al del orujo de aceituna.

*Pepino:* flavor que se produce en el aceite sometido a un envasado hermético y excesivamente prolongado particularmente en hojalata, que es atribuido a la formación de 2-6 nonadienal.

*Rancio:* flavor característico y común a todos los aceites y grasas que han sufrido un proceso autoxidativo, a causa de su prolongado contacto con el aire. Este flavor es desagradable e irreversible.

*Salmuera:* flavor del aceite extraído de aceitunas conservadas en soluciones salinas.

*Tierra:* flavor característico del aceite obtenido de aceitunas recogidas con tierra, embarradas y no lavadas. Este flavor puede ir unido al de moho-humedad en algunas ocasiones.

*Viejo:* flavor característico del aceite cuando permanece demasiado tiempo en recipientes de almacenamiento. También puede darse en aceites envasados durante un periodo prolongado.

## 5. COPA PARA DEGUSTACIÓN DE ACEITES

Véase el capítulo «Copa para la degustación de aceites».

## 6. SALA DE CATA

Véase el capítulo «Guía para la instalación de una sala de cata».

## 7. UTENSILIOS

En cada cabina y a disposición del catador deben estar los utensilios necesarios para que este pueda ejercer adecuadamente su cometido. Estos son:

- copas (normalizadas), conteniendo las muestras marcadas en clave con un par de números dígitos tomados al azar, o con un par de números y letras. Las marcas se deben hacer con un lápiz indeleble e inodoro,
- vidrios de reloj con idénticas marcas, para cubrir las copas,
- hoja de puntuación, véase figura 2, conteniendo las instrucciones para su utilización,
- lápiz o bolígrafo,
- bandejitas conteniendo rodajas de manzanas,
- vaso de agua a la temperatura ambiente.

## 8. METODOLOGÍA

En este apartado se establecen los conocimientos previos necesarios para la realización del análisis sensorial de los aceites de oliva vírgenes y trata de normalizar el comportamiento y la actuación de los catadores que han de intervenir en las pruebas, los cuales han de tomar conciencia tanto de las recomendaciones de tipo general como de las específicas para la cata de los aceites de oliva.

### 8.1. Actuación del organizador o jefe del panel (o grupo de catadores)

El organizador del panel deberá ser una persona suficientemente formada, conocedora y experta en los tipos de aceites que encontrará en su trabajo. Es la figura clave del panel y el responsable de la organización y del funcionamiento del mismo. Convocará con tiempo suficiente a los catadores y les aclarará cualquier duda en cuanto a la realización de los ensayos, aunque se abstendrá de sugerirles ningún tipo de opinión sobre la muestra.

Será responsable del inventario de los utensilios, de su adecuada limpieza, de la preparación y codificación de las muestras, así como de su presentación a dos catadores según el diseño experimental adecuado; de la recopilación de los datos y de su tratamiento estadístico, a fin de obtener los mejores resultados con el menor esfuerzo.

El trabajo del jefe del panel requiere habilidad sensorial, meticulosidad en la preparación de los ensayos, riguroso orden para su ejecución, así como habilidad y paciencia para planificar y ejecutar las pruebas. Es misión del jefe de panel estimular la moral de los componentes del grupo, fomentando entre ellos el interés, curiosidad y espíritu competitivo. Debe evitar que su opinión sea conocida e impedir que los criterios de posibles líderes se impongan sobre los restantes catadores. También es de su competencia el entrenamiento, selección y control sobre los mismos, a fin de conocer si se mantienen con el adecuado nivel de aptitud.

### 8.2. Condiciones del ensayo

#### 8.2.1. Tamaño de la muestra

La cantidad de aceite contenido en cada copa debe ser de 15 ml.

#### 8.2.2. Temperatura de la prueba

Las muestras de aceite a catar se mantendrán dentro de las copas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esta temperatura se ha elegido por ser en la que se observan con mayor facilidad diferencias organolépticas, dentro de la temperatura normal, cuando los aceites se usan como condimento. Otro aspecto que inclina a tomar este valor es que temperaturas más bajas o más altas producen una escasa volatilización de los compuestos aromáticos o por el contrario volátiles ya propios de aceites calentados.

#### 8.2.3. Horario del ensayo

Para la cata de aceites, las horas de trabajo óptimas son las de la mañana. Está demostrado que durante el día existen periodos de óptima percepción para el gusto y el olfato.

Las comidas son precedidas de un periodo de incremento de la sensibilidad olfato-gustativa, seguidas de un decrecimiento de la misma.

Sin embargo, este criterio no debe ser llevado al extremo, hasta el punto de que el hambre pueda distraer a los catadores, haciendo descender en ellos su capacidad de discriminación y, particularmente, sus criterios de preferencia y aceptación.

## 9. CATADORES

Las personas que intervengan como catadores en los ensayos organolépticos de aceites de oliva comestibles deberán ser entrenados y seleccionados de acuerdo con su habilidad para distinguir entre muestras similares, debiéndose tener en cuenta que la precisión se mejorará con el entrenamiento (véase apartado correspondiente).

Para la prueba se exige un número de 8 a 12 catadores siendo conveniente disponer de algunos más en reserva, para cubrir posibles ausencias.

### 9.1. Normas generales de comportamiento para candidatos y catadores

Las presentes recomendaciones se refieren al comportamiento de los candidatos y catadores durante su trabajo.

Al recibir la comunicación del jefe del panel para intervenir en un ensayo organoléptico, el catador deberá estar en condiciones de realizarlo a la hora previamente señalada, ateniéndose a las siguientes normas:

- 9.1.1. Se abstendrá de fumar al menos 30 minutos antes de la hora fijada.
- 9.1.2. No utilizara ningun perfume, cosmetico o jabon cuyo olor persista en el momento del ensayo. Para el lavado de las manos utilizara un jabon no perfumado o poco perfumado, procediendo a enjuagarse las manos y a secarselas tantas veces como sean necesarias para eliminar cualquier olor.
- 9.1.3. No debera haber tomado ningun alimento al menos una hora antes de realizar la cata.
- 9.1.4. Si se encontrase en condiciones de inferioridad fisiologica, particularmente si tiene afectado el sentido del olfato o del gusto, o bajo algun efecto psicologico que le impida concentrarse en su trabajo, debera comunicarlo al jefe del panel al objeto de que lo aparte del trabajo, o bien para que tome las decisiones oportunas, teniendo en cuenta su posible desviacion de los valores medios del resto del panel.
- 9.1.5. El catador, una vez cumplidas las normas precedentes, procedera a ocupar su lugar en la cabina que le corresponda, con el mayor orden y silencio posibles.
- 9.1.6. Una vez sentado, procedera a examinar si el material que necesita esta en orden y es el correcto, comprobando si la clave de la copa se corresponde con la del vidrio de reloj que la cubre.
- 9.1.7. Leerá detenidamente las instrucciones contenidas en la hoja de puntuacion, no comenzando el examen de la muestra hasta estar totalmente compenetrado con el trabajo que debe realizar. En caso de duda, debe consultar privadamente las dificultades encontradas con el jefe del panel.
- 9.1.8. El catador procedera a tomar la copa, manteniéndola cubierta con su vidrio de reloj, la inclinara ligeramente, y en esta posicion le dara un giro total a fin de mojar lo mas posible la superficie interior. Hecha esta operacion, separara el vidrio de reloj y procedera a oler la muestra, haciendo inspiraciones suaves, lentas e intensas, hasta formarse un criterio sobre el aceite que debe juzgar. El periodo de olfaccion no debe sobrepasar 30 segundos. Si en este periodo no se ha llegado a ninguna conclusion, debe tomarse un pequeño descanso, antes de un nuevo intento. Una vez realizado el ensayo olfativo, se procedera a enjuiciar el flavor (sensacion conjunta olfato-gustativa-tactil). Para ello se tomara un pequeño sorbo de aceite, de unos 3 ml aproximadamente. Es muy importante distribuir el aceite por toda la cavidad bucal, desde la parte anterior de la boca y la lengua, por los laterales y la parte posterior, hasta los pilares del paladar; ya que, como se sabe, la percepcion de los cuatro sabores fundamentales, dulce, salado, acido y amargo, se hace con distinta intensidad según las zonas de la lengua y el paladar.

Debe insistirse en la necesidad de que el aceite se extienda en cantidad suficiente y muy lentamente por la parte posterior de la lengua hacia los pilares del paladar y la garganta, concentrando la atencion en el orden de aparicion de los estímulos amargo y picante; si no se procede asi, en algunos aceites ambos estímulos pueden pasar inadvertidos o el amargo quedar oculto por el picante.

Aspiraciones cortas y sucesivas, introduciendo aire por la boca, permiten, ademas de extender la muestra ampliamente por la cavidad bucal, percibir por via retronasal los componentes volatiles aromaticos.

La sensacion tactil debe tomarse, tambien, en consideracion: asi, la fluidez, pastosidad y picor o escozor deben ser anotados cuando se detecten y, si la prueba asi lo exige, cuantificar su intensidad.

- 9.1.9. La valoracion organoleptica de un aceite virgen debe hacerse evaluando una sola muestra por sesion, para evitar el efecto de contraste que podria producir la degustacion inmediata de otras.

Puesto que las catas sucesivas son afectadas por la fatiga, o perdida de sensibilidad, causadas por las precedentes, se impone utilizar un producto capaz de eliminar de la boca los restos de aceite de la cata anterior.

Se recomienda el uso de un pequeño trozo de manzana, de unos 15 gr, el cual, despues de masticado, puede ser vertido al escupidor, procediendo seguidamente a enjuagarse con un poco de agua a temperatura ambiente. Entre la cata finalizada y la siguiente deben transcurrir al menos 15 minutos.

## 9.2. Preseleccion de candidatos

Esta etapa debera realizarla el organizador del panel mediante entrevistas personales y tiene por objeto conocer la personalidad del candidato y las caracteristicas que le rodean. Las exigencias previas respecto a las condiciones fisiologicas y psicologicas no son muy rigurosas, ya que, en principio, cualquier persona normal puede desarrollar esta actividad. La importancia de la edad, sexo, determinados habitos (fumar) etc., se consideran secundarios frente a otros aspectos, tales como: la salud, el interes personal y disponer de tiempo para este trabajo.

Durante la entrevista, el organizador del ensayo debe explicar al candidato las caracteristicas de la funcion que va a realizar e informarle del tiempo aproximado que le va a ocupar. A continuacion ha de recabar datos que le permitan valorar el grado de interes y motivacion del candidato, asi como de su disponibilidad real de tiempo. La encuesta siguiente debera servirle como referencia.

## ENCUESTA

Conteste ahora, por favor, a las siguientes preguntas:

- |   |                          |                          |
|---|--------------------------|--------------------------|
|   | sí                       | no                       |
| 1) ¿Le gustaría colaborar en los trabajos de este tema?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
|   | sí                       | no                       |
| 2) ¿Considera que el trabajo puede ser importante para mejorar la calidad de los alimentos en su país y el comercio internacional?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3) ¿Por qué <sup>(1)</sup> ? .....  |                          |                          |
| .....   |                          |                          |
| .....   |                          |                          |
|   | sí                       | no                       |
| 4) No olvide que en este trabajo tendrá que probar aceites cuando sea requerido para ello. ¿Le desagrada hacerlo?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
|   | sí                       | no                       |
| 5) ¿Le gustaría comparar su habilidad olfato-gustativa con la de sus compañeros?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
|   | sí                       | no                       |
| 6) ¿Tiene tiempo disponible? ¿Tiene independencia suficiente para organizar su trabajo diario?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
|   | sí                       | no                       |
| 7) Si depende de su jefe, ¿cree que si, reiteradamente, en días sucesivos le apartasen en algunos casos, hasta media hora, de su trabajo usual le permitiría participar en este asunto? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
|   | sí                       | no                       |
| 8) ¿Sería capaz de suplir el tiempo que dedique al análisis sensorial para no caer en falta en su trabajo ordinario?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
|   | sí                       | no                       |
| 9) ¿Considera que este trabajo debería ser retribuido?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10) ¿Cómo? .....  |                          |                          |
| .....   |                          |                          |

Con esta información el organizador realizará la preselección, rechazando a los candidatos con poco interés por este tipo de trabajo, poco tiempo disponible, o incapaces para concretar sus ideas.

### 9.3. Determinación del «umbral medio» del grupo para «atributos característicos»

Se eligen cuidadosamente cuatro aceites, de tal forma que cada uno sea considerado como representante típico de los atributos: atrojado, aviado, rancio y amargo, con la mayor y más clara intensidad posible.

Tomando una parte alícuota de cada uno de ellos se preparan muestras, a distintas concentraciones de razón 2, por sucesivas diluciones con el soporte apropiado hasta que en las dos o tres diluciones últimas no sea posible detectar diferencia con la copa que contiene sólo el soporte. Una última pareja la formarán dos copas de soporte.

La serie se completará con copas de concentraciones superiores, hasta un total de 8.

Preparar suficiente cantidad de muestras de las distintas concentraciones para entregar series completas de cada atributo a cada uno de los candidatos.

Para establecer el «umbral medio» de los candidatos, para cada atributo se presentará a éstos una copa conteniendo 15 ml de una cualquiera de las concentraciones preparadas, junto con otra copa que contenga sólo 15 ml del «soporte». El candidato, después de realizar el ensayo, debe indicar si son iguales o distintas.

El mismo ensayo se repite para las restantes concentraciones del atributo estudiado.

Se anota el número de contestaciones correctas obtenidas para cada concentración del conjunto de candidatos, y se refiere como porcentaje del número de ensayos efectuados.

(1) Describa el interés que puede tener la valoración organoléptica de cualquier alimento o si le parece del aceite de oliva.

Se representa en orden creciente, en abscisas las concentraciones ensayadas y en ordenadas el % de identificaciones correctas hechas para cada concentración.

La figura 1 representa un ejemplo práctico de lo expuesto anteriormente. El umbral de detección se define sobre abscisas extrapolando de la curva el punto de la ordenada que corresponde a un 75 % de aciertos.

Esta concentración «umbral», que puede ser distinta para cada aceite de partida, dependiendo de la intensidad del atributo en dicho aceite, debe ser similar para los distintos grupos de candidatos de distintos paneles; no está unida a ninguna costumbre, hábito o preferencia tendenciosa, consiguientemente es un punto de referencia común a cualquier grupo humano normal y puede servir para homogeneizar los distintos paneles sólo por su sensibilidad olfato-gustativa.

A partir de la concentración umbral del grupo obtenida se procederá como sigue:

Prepárese una serie de concentraciones crecientes y decrecientes de forma que esta «concentración umbral» corresponda al lugar 10 de esta escala. Lógicamente las concentraciones 11 y 12 serán más diluidas y consiguientemente muy difíciles de detectar en ellas la presencia del aceite con el atributo elegido.

A partir de la concentración  $C_{10}$ , las restantes muestras pueden prepararse mediante la fórmula:

$C_{10} \times a^n$ , donde «a» es una constante correspondiente al factor de dilución igual a 1,5 y «n» el exponente que variará desde  $9$  a  $-2$ .

Por ejemplo: supuesto el umbral obtenido para el aceite rancio = 0,32; será  $C_{10} = 0,32$ , a partir de ella como  $a = 1,5$  la serie de muestras tendría las siguientes concentraciones.

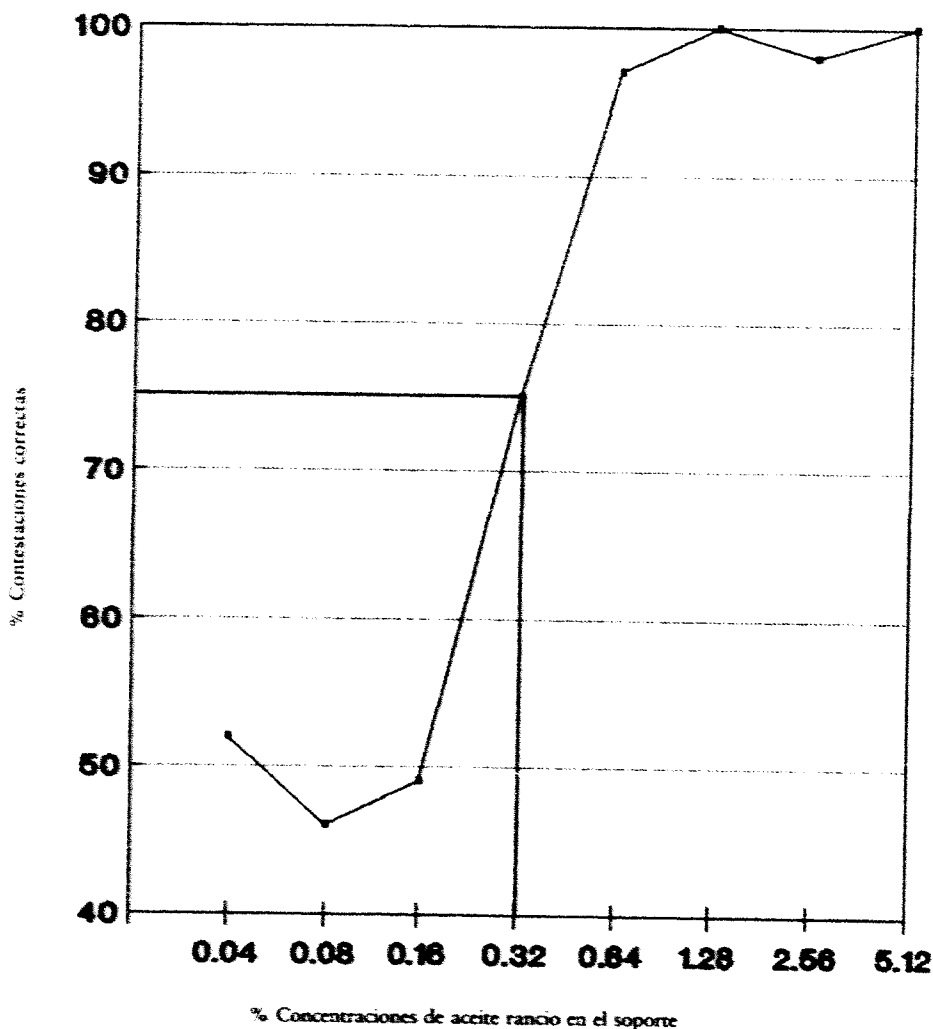
| Muestras      | 1     | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|---------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Concentración | 12,30 | 8,20 | 5,47 | 3,65 | 2,43 | 1,62 | 1,08 | 0,72 | 0,48 | 0,32 | 0,21 | 0,14 |

Si se repite todo lo anterior para los tres restantes atributos, partiendo de los umbrales respectivos calculados también como antes se indicó, se obtendrán así escalas que para todos los laboratorios tendrán intensidades aromáticas similares para cada estímulo, aunque se haya partido de aceites de oliva cuyos defectos son perceptibles con distinta intensidad.

#### 9.4. Selección de catadores por el método de «clasificación de intensidad»

La selección debe realizarse partiendo de un número de candidatos dos o tres veces superior al necesario para formar el grupo, con objeto de poder elegir a los más sensibles y de mayor capacidad discriminatoria. Siempre es aconsejable realizar las pruebas con el mismo producto que se va a analizar posteriormente. (Consiguientemente nosotros utilizaremos aceite de oliva.)

Figura 1



En la elección del método, junto a su eficacia no se puede olvidar que es de interés que el procedimiento a seguir sea lo más económico posible en cuanto a cantidad de aceite, número de muestras a utilizar y tiempo dedicado a la selección. La eficacia de un procedimiento de selección se caracteriza por la elección de los niveles óptimos de las tres variables dependientes siguientes: a) «costo» determinado por el número de ensayos, b) «proporción» de candidatos potencialmente aptos que por azar pueden ser desafortunadamente rechazados en la criba y c) «proporción» de candidatos no apropiados que por un azar favorable son aceptados en la selección sin deber serlo.

El procedimiento de selección elegido: «prueba de clasificación de intensidad» (*The intensity rating test*) descrito en las normas ASTM (*American Society for Testing and Materials*) y STP (*Special Technical Publication*) 440 página 53, modificado en cuatro puntos:

- 1) reducción del número de muestras en la serie;
- 2) ampliación de estímulos con objeto de aumentar el número de notas olfato-gustativas sobre las que está basada la selección, a fin de adecuarlas a los defectos más comunes perceptibles en el aceite de oliva;
- 3) variación de la relación de concentración en la serie;
- 4) tratamiento estadístico de los resultados.

*Material necesario*

- botellas o matraces de 1 500 ml,
- copas de vidrio oscuro,
- probetas de 10 ml, 15 ml, 1 000 ml y 1 500 ml.

*Productos necesarios*

- Parafina Merck (referencia 7.160, DAB 8, USP XX) o soporte oleoso inodoro e insípido (aceite de oliva u otro similar recién refinado),
- aceites: atrojado, avinado, rancio y amargo.

9.4.1. Procedimiento operatorio

Una vez preparadas las concentraciones se empezará la selección partiendo de 25 candidatos, de acuerdo con la metodología que se explicará a continuación para cada estímulo:

- 1) Se preparan series de 12 copas, marcadas en clave (una serie por candidato). En cada copa se vierten 15 ml de cada una de las distintas concentraciones, preparadas de acuerdo con la fórmula  $C_{10} \times a^n$ .
- 2) Una vez llenas las copas conviene que permanezcan en la sala de cata, a 20—22 °C, cubiertas con un vidrio de reloj al menos una hora antes de comenzar los ensayos, a fin de homogeneizar su temperatura con la ambiente.
- 3) Las 12 copas de una serie se colocan por el organizador del ensayo, de mayor a menor concentración, en una fila.

A continuación se procede a invitar a cada candidato para que realice el ensayo por separado, dándole las siguientes instrucciones:

9.4.2. Instrucciones para el candidato

Las 12 copas alineadas frente al candidato contienen diluciones de cada uno de los estímulos atrojado, avinado, rancio y amargo según sea el caso. Las copas se diferencian unas de otras en la intensidad del olor, la de olor más intenso se encuentra en el extremo izquierdo, la intensidad de olor de las restantes va disminuyendo gradualmente hacia la derecha. La última copa de la derecha puede tener tan poco olor que podría no ser detectable.

Procédase como sigue: familiarícese con los olores de las copas que forman la serie. Para ello comience a oler por la de la derecha (nº 12) e intente recordar la intensidad de los olores. Procure no fatigarse.

Cuando considere que se ha habituado a la escala de concentraciones de olor presentada, salga de la habitación.

El organizador del ensayo procederá, mientras tanto, a entresacar una copa de la serie que emparejará con la última de la derecha procediendo a tapar el hueco aproximando entre sí las restantes. Vuelva entonces de nuevo a la habitación para continuar el ensayo.

La prueba consiste en lo siguiente:

La copa separada debe ser restituida al lugar que le corresponde en la serie. Para ello puede olerla y compararla con las restantes tantas veces como se quiera, teniendo en cuenta que si la restituye correctamente al lugar que le corresponde, debe oler más fuerte que su inmediata de la derecha y más débil que la de la izquierda. Esta prueba se repetirá con otras tres copas.

Para facilitar el trabajo y la recogida de la respuesta emitida, a cada candidato se le entregará junto con las instrucciones anteriormente descritas el siguiente estadiño.

SELECCIÓN DE CANDIDATOS

Prueba nº ..... Atributo .....

Le copa problema corresponde al lugar nº .....

Fecha ..... Nombre .....

9.4.3. Obtención de los resultados

Para facilitar la ordenación de datos de cada uno de los candidatos, el organizador del panel los anotará de la forma siguiente:

| Nombre del candidato | Atributo estudiado | Nº de orden dado (K') | Nº de orden que le corresponde (K) | Puntuación (K' - K)² |
|----------------------|--------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------|
| .....                | .....              | .....                 | .....                              | .....                |
| .....                | .....              | .....                 | .....                              | .....                |

9.4.4. Procedimiento estadístico de puntuación

En el caso concreto de la selección efectuada, las copas a reintegrar en su lugar serán las mismas para todos y cada uno de los candidatos y de acuerdo con los cálculos estadísticos realizados para este caso serán aquellas cuyo orden de serie se indica a continuación para cada atributo.



|                          |                          |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Atrojado (At)            | Avinado (Av)             | Rancio (Ra)              | Amargo (Am)              |
| Copa n°<br>(10, 5, 7, 2) | Copa n°<br>(11, 3, 8, 6) | Copa n°<br>(7, 4, 10, 2) | Copa n°<br>(6, 3, 11, 9) |

El número ocupado por las copas en la serie no puede ser variado, puesto que los cálculos estadísticos para este ensayo se han realizado de acuerdo con la probabilidad de que las copas indicadas sean restituidas a su lugar por azar.

Ahora bien, con objeto de dificultar, cualquier paso de información de un candidato a otro el organizador del panel tendrá presente los siguientes puntos:

- 1) Los candidatos no pueden comunicarse entre sí. Las claves serán diferentes para cada candidato.
- 2) Los candidatos no pueden enterarse qué posición ocupan las copas que se le han retirado.
- 3) Aunque todos los candidatos deben recibir las copas reseñadas anteriormente, el organizador debe variar el orden en que las entrega a cada candidato.

A cada candidato se le asigna una puntuación en función de sus resultados obtenidos; procediendo tal y como se pasa a describir a continuación:

Sean  $e'_1, e'_2, \dots, e'_{12}$  las 12 copas con las doce concentraciones correspondientes de un atributo  $i$  ( $i$  = cualquiera de los cuatro atributos atrojado, avinado, rancio y amargo) ordenadas de mayor a menor.

Sea  $e'_k$  una de las copas seleccionadas y sea  $K'$  la posición que asigna el candidato a dicha copa en la serie. Los valores de  $K$  y  $K'$  son, por consiguiente, números enteros comprendidos entre el 1 y el 12 ambos inclusive que corresponden a las posiciones real y asignada por el candidato, respectivamente, de la copa seleccionada.

Sea  $T$  (máxima desviación admitida) un valor, fijado de antemano, en nuestro caso igual a 3 de tal forma que si  $(K' - K) > T$  el candidato es rechazado automáticamente <sup>(1)</sup>.

Si por el contrario  $(K' - K) \leq T$ , el candidato, en principio, no es rechazado y puede continuar la prueba, puesto que es capaz de situar el estímulo problema en el lugar que le corresponde o cuando menos en los lugares próximos inmediatos.

En este caso, la puntuación asignada a un candidato cuando valora un estímulo (concentración) de un determinado atributo, por ejemplo, de la serie atrojado (At), será igual al cuadrado de la diferencia entre el número de orden que corresponde a la posición correcta que ocuparía en la serie la copa portadora del estímulo y la posición a que el candidato la ha reintegrado, es decir:

$$P^{At}_b = (K' - K)^2$$

Puesto que esta operación será realizada por un mismo candidato sobre cuatro estímulos (concentraciones) de cada atributo, la puntuación parcial para dicho atributo (por ejemplo At) sería:

$$Z^{At} = P^{At}_b + P^{At}_t + P^{At}_r + P^{At}_m$$

Para facilidad de comprensión se exponen los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1:

Supongamos que las respuestas del candidato A para los cuatro estímulos que se han retirado de la serie del atributo (i) son las siguientes:

| Posición correcta de la copa en la serie (K) | Posición en que fue colocada (K') | Separación de la posición correcta (K' - K) |
|--|-----------------------------------|---|
| 7  | 7                                 | 7 - 7 = 0                                   |
| 4  | 5                                 | 4 - 5 = -1                                  |
| 10   | 6                                 | 10 - 6 = 4 <sup>(1)</sup>                   |
| 2  | 4                                 | 2 - 4 = -2                                  |

<sup>(1)</sup> Este candidato es rechazado, ya que ha obtenido en el ensayo un valor de  $T > 3$ .

<sup>(1)</sup> Es importante que el organizador insista sobre el candidato a fin de que el ensayo se conduzca razonablemente sin que se produzca una pérdida de sensibilidad por cansancio olfativo.

Ejemplo 2:

Supongamos que un candidato reordena las copas de un atributo como sigue:

| Posición correcta de la copa en la serie (K) | Posición en que fue colocada (K') | Separación de la posición correcta (K' - K) |
|--|-----------------------------------|---|
| 7  | 7                                 | 7 - 7 = 0                                   |
| 4  | 4                                 | 4 - 4 = 0                                   |
| 10   | 7                                 | 10 - 7 = 3                                  |
| 2  | 3                                 | 2 - 3 = -1                                  |

Este candidato no es rechazado y la puntuación que obtiene para este atributo es:

$$Z^i = 0^2 + 0^2 + 3^2 + (-1)^2 = 10$$

La puntuación final del candidato que nos permitirá seleccionarlo o no como catador en función de sus respuestas frente a los cuatro atributos que hemos tomado para la selección sería:

$$p_h^{At} + p_i^{At} + p_l^{At} + p_m^{At} = Z^{At}$$

$$p_h^{Av} + p_i^{Av} + p_l^{Av} + p_m^{Av} = Z^{Av}$$

$$p_h^{Ra} + p_i^{Ra} + p_l^{Ra} + p_m^{Ra} = Z^{Ra}$$

$$p_h^{Am} + p_i^{Am} + p_l^{Am} + p_m^{Am} = Z^{Am}$$

$$Z \text{ final} = Z^{At} + \dots + Z^{Am}$$

siendo: At: atrojado.

Av: avinado.

Ra: rancio.

Am: amargo.

El problema es ahora determinar hasta qué valor de Z es posible considerar que el candidato posee buenos niveles de percepción, memoria olfativa y organización mental para dar la adecuada respuesta para los cuatro estímulos considerados. Naturalmente Z es siempre un valor no negativo, y Z = 0 significa que el candidato ha reconocido y cuantificado correctamente todas las 16 intensidades presentadas (cuatro de cada atributo). Valores de Z distintos de cero indican que el candidato ha reconocido las zonas de las escalas donde se sitúan las intensidades seleccionadas, pero dentro de ellas no ha podido realizar una correcta situación a su posición debido a que no posee una buena capacidad discriminativa asociada a la escala de intensidad que se le ha presentado para uno o varios de los estímulos.

Así pues, habrá que determinar un valor crítico Z, tal que en el supuesto de que el candidato realice todas sus asignaciones de posición en la escala al azar dentro de las zonas que previamente ha reconocido, la probabilidad de una puntuación definitiva Z, inferior a Z<sub>c</sub>, sea una cantidad suficientemente pequeña α que previamente se puede fijar. En otras palabras, que la probabilidad de que con este procedimiento se seleccione un catador para el panel que no posea suficiente capacidad discriminativa para las intensidades de estos estímulos que se han utilizado para la selección, sea inferior a α.

Fijado α, en nuestro caso igual 0,05, la obtención de Z<sub>c</sub> depende de la distribución de probabilidad de la variable Z, que a su vez depende de las distribuciones de probabilidad de las variables p (K').

Realizados los cálculos estadísticos correspondientes, el valor obtenido para Z<sub>c</sub> es igual a 34.

Una vez obtenida la puntuación Z de todos los candidatos, serán rechazados aquellos cuya puntuación sea superior a 34.

Por ejemplo, los candidatos A y B obtienen las siguientes puntuaciones:

| Atributo | Candidato A          | Candidato B          |
|----------|----------------------|----------------------|
| Atrojado | Z <sup>At</sup> = 10 | Z <sup>At</sup> = 12 |
| Avinado  | Z <sup>Av</sup> = 10 | Z <sup>Av</sup> = 11 |
| Rancio   | Z <sup>Ra</sup> = 10 | Z <sup>Ra</sup> = 15 |
| Amargo   | Z <sup>Am</sup> = 4  | Z <sup>Am</sup> = 0  |
|          | Σ = 34               | Σ = 38               |

Los valores de Z para ambos candidatos son para el A = 34 y para el B = 38, luego será elegido el candidato A y rechazado el B. Eliminando los candidatos con puntuación superior a 34 los restantes se ordenarán por sus valores de Z, eligiéndose por orden hasta completar el número de 12 que deseamos reunir.

### 9.5. Entrenamiento

El entrenamiento tiene como objetivos principales:

- a) familiarizar al catador con las numerosas variantes olfato-gustativo-táctiles que ofrecen los aceites de oliva vírgenes;
- b) familiarizar a los catadores con la metodología sensorial específica;
- c) incrementar la habilidad individual para reconocer, identificar y cuantificar los atributos sensoriales;
- d) mejorar la sensibilidad y la memoria frente a los distintos atributos para conseguir juicios consistentes.

El período de entrenamiento suele consistir en una serie de sesiones según las posibilidades del grupo y del estudio, en las que después de analizar individualmente los aceites, los catadores discuten conjuntamente con el director las dificultades encontradas y comentan las calificaciones para aunar criterios y unificar opiniones.

El grado de entrenamiento conseguido después de un determinado número de sesiones se evalúa observando el incremento en el porcentaje de juicios correctos si se utilizan pruebas discriminatorias o analizando las variaciones de las calificaciones individuales medias del grupo, cuando se trata de pruebas escalares.

La utilidad práctica de este período de entrenamiento ha sido ampliamente discutida, pero hoy se considera muy eficaz e incluso imprescindible cuando se necesita disponer de datos sensoriales exactos y precisos.

### 9.6. Comprobación

Los grupos de catadores muy entrenados suelen realizar catas periódicas y continuadas con pruebas sensoriales que requieren un gran esfuerzo. Sobre su opinión se basan, en muchas ocasiones, decisiones de gran importancia tecnológica y comercial, y por ello, después de seleccionados y entrenados, deben estar sometidos a comprobaciones que garanticen la fiabilidad de los resultados.

Es evidente que sería necesario, una vez los paneles constituidos y sometidos a ensayos de rutina, proceder periódicamente a comprobar su «performance» a intervalos adecuados.

## 10. PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES

Reunidas las condiciones y medios necesarios indicados en las normas anteriormente citadas y seleccionado el grupo de catadores, cada uno de ellos olerá y degustará <sup>(1)</sup> la copa que contiene la muestra de aceite sometida a examen analizando en ella las percepciones olfativas, gustativas, táctiles y kinestéticas con ayuda de la hoja de la figura 2 donde anotará su presencia y el valor de su intensidad. A continuación pasará a puntuar la calidad del aceite.

### 10.1. Utilización de la hoja de la figura 2 (descripción del flavor y puntuación de calidad)

En la parte izquierda de esta hoja se incluyen algunas de las percepciones sensoriales más características que suelen encontrarse con mayor frecuencia en los aceites de oliva y que describen su flavor. En el caso de que se perciban otros estímulos que no se correspondan con los calificativos enumerados deberá anotarlos como «otros» empleando el calificativo o calificativos que lo describa o describan con mayor propiedad.

Los estímulos perceptibles deberán ser valorados proporcionalmente a su intensidad indicando ésta con un signo (+) en el casillero correspondiente, de acuerdo con el criterio siguiente:

- 1: casi imperceptible.
- 2: ligera.
- 3: media.
- 4: grande.
- 5: extrema.

En la parte derecha de esta hoja, se establece una escala de 9 puntos (9 calidad excepcional, 1 pésima) que será utilizada por el catador para dar una puntuación única, conjunta, de las características del aceite. Esta puntuación debe ser consecuente con las virtudes, defectos encontrados en el aceite, anotados ya en la parte de la izquierda.

<sup>(1)</sup> Podrá abstenerse cuando al olerla encuentre algún atributo extremada e intensamente desagradable y anotará esta circunstancia excepcional en la hoja de puntuación.

La primera columna (defectos) de la tabla de puntuación comprende cinco apartados, de esta forma la clasificación de los aceites se basará fundamentalmente en la ausencia total o en la presencia de sabores defectuosos así como en la mayor o menor gravedad o intensidad de éstos; sin embargo, como la escala de valoración es de 9 puntos, deberán considerarse algunos matices o aspectos que contribuyen de forma definitiva a decidir la puntuación total de calidad, que se describen en la segunda columna (características).

#### 10.2. Puntuación final

El jefe del panel recogerá las puntuaciones dadas por cada uno de los catadores, comprobará que los atributos y las intensidades con que los ha percibido y marcado en la tabla de perfil se corresponden aceptablemente con la valoración asignada al aceite en la «hoja de puntuación». En caso de existir una diferencia apreciable, solicitará al catador que revise su hoja de puntuación.

Si fuese necesario, el catador repetirá el ensayo.

Por último, el jefe del panel tabulará las puntuaciones de todo el grupo y calculará la media aritmética y el error típico (de la media).

Si el error típico es superior al error de método, hará repetir el ensayo a todo el grupo.

El grupo repetirá los ensayos hasta obtener una evaluación por triplicado de la muestra, únicamente en el caso de análisis de revisión. La puntuación final de la muestra será la media de las tres puntuaciones dadas, con una cifra decimal.

Si el valor de intensidad media de amargo y/o picante es superior a 2,5, al aceite se le dará la calificación correspondiente y se hará constar que es especialmente amargo y/o picante.

Expresión de los resultados: el jefe del panel determinará, a partir de la puntuación media, la categoría a la que corresponde la muestra, según los valores establecidos en el Anexo I. En el informe se indicará únicamente esta categoría.

*Nota:* Las muestras deberán conservarse cerradas y en frigorífico hasta su análisis, devolviéndolas a éste hasta completar el triplicado.

Figura 2

## Aceite de oliva virgen

Hoja de perfil  
Notas olfato-gustativas-táctiles

| Atributos   | Intensidad de percepción <sup>(2)</sup> |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
|   | 0                                       | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Frutado de aceituna (madura [o] verde) <sup>(1)</sup> |   |   |   |   |   |   |
| Manzana .....   |   |   |   |   |   |   |
| Otra(s) fruta(s) madura(s) .....                      |   |   |   |   |   |   |
| Verde (hoja, hierba) .....                            |   |   |   |   |   |   |
| Amargo .....  |   |   |   |   |   |   |
| Picante .....   |   |   |   |   |   |   |
| Dulce .....   |   |   |   |   |   |   |
| Otro(s) atributo(s) tolerable(s) .....                |   |   |   |   |   |   |
| ¿Cuál(es)? .....                                      |   |   |   |   |   |   |
| .....   |   |   |   |   |   |   |
| Agrio/ Avinado/ Avinagrado/ Ácido <sup>(1)</sup> ..   |   |   |   |   |   |   |
| Basto .....   |   |   |   |   |   |   |
| Metálico .....  |   |   |   |   |   |   |
| Moho/Humedad .....                                    |   |   |   |   |   |   |
| Borras/Turbios .....                                  |   |   |   |   |   |   |
| Atrojado .....  |   |   |   |   |   |   |
| Rancio .....  |   |   |   |   |   |   |
| Otro(s) atributo(s) intolerable(s) .....              |   |   |   |   |   |   |
| ¿Cuál(es)? .....                                      |   |   |   |   |   |   |
| .....   |   |   |   |   |   |   |

<sup>(1)</sup> Táchese lo que no proceda.<sup>(2)</sup> Intensidad de la percepción0 = Ausencia total <sup>(3)</sup>

1 = Casi imperceptible

2 = Ligera

3 = Media

4 = Grande

5 = Extrema

<sup>(3)</sup> Es obligatorio indicar la ausencia de la nota sensorial marcando una « X » en la casilla correspondiente.

## Tabla de puntuación

| Defectos                                   | Características  | Evaluación global: puntos |
|--|--|---------------------------|
| Ninguno                                    | Frutado de aceitunas                                     | 9                         |
|  | Frutado de aceitunas y otros frutos frescos              | 8                         |
|  |  | 7                         |
| Leves y casi imperceptibles                | Frutado apagado de cualquier tipo                        | 6                         |
| Perceptibles                               | Frutado algo defectuoso, olores y sabores anómalos       | 5                         |
| Notables, en el límite de aceptación       | Claramente defectuoso, olores y sabores desagradables    | 4                         |
| Grandes y/o graves claramente perceptibles |  | 3                         |
|  |  | 2                         |
|  | Olores y sabores totalmente inadmisibles para el consumo | 1                         |

Observaciones .....

.....

Nombre del catador .....

.....

Clave de la muestra .....

.....

Fecha .....

.....

.....

.....

.....

## ANÁLISIS SENSORIAL: VOCABULARIO GENERAL BÁSICO

## 1. OBJETO

La presente norma tiene por objeto agrupar los términos generales utilizados para el análisis sensorial y proporcionar su definición.

## 2. VOCABULARIO

## 2.1. Terminología general

*Análisis sensorial* (sustantivo):

examen de los caracteres organolépticos de un producto mediante los sentidos.

*Percepción* (sustantivo):

toma de conciencia sensorial de objetos o acontecimientos exteriores.

*Organoléptico* (adjetivo) (carácter o propiedad):

califica toda propiedad de un producto susceptible de ser percibida por los órganos de los sentidos.

*Experto* (sustantivo):

(en lo que concierne al examen de los caracteres organolépticos)

catador especializado en el análisis sensorial de un determinado producto y que posee conocimientos básicos sobre la elaboración del mismo y las preferencias del mercado.

*Catador* (sustantivo):

persona perspicaz, sensible, seleccionada y entrenada, que estima con los órganos de sus sentidos los caracteres organolépticos de un alimento.

*Grupo de catadores*:

conjunto de sujetos o jueces los cuales han sido especialmente seleccionados y entrenados y que se reúnen para efectuar bajo condiciones controladas el análisis sensorial del producto.

*Sensación* (sustantivo):

fenómeno subjetivo resultante del estímulo de un sistema sensorial. Este fenómeno es subjetivamente discriminable y objetivamente definible a través del órgano sensorial interesado, según la naturaleza o la cualidad del estímulo, así como por su intensidad.

*Sensibilidad* (sustantivo):

capacidad de los órganos sensoriales que les permite percibir cualitativa y cuantitativamente un estímulo de poca intensidad o diferencias pequeñas entre estímulos.

*Cata* (sustantivo):

operación que consiste en percibir, analizar y juzgar los caracteres organolépticos, y más particularmente los olfato-gustativos, táctiles y quinestéticos de un producto alimenticio.

*Aceptación* (sustantivo):

acto que consiste en admitir como favorable un producto por parte de un individuo o una población.

*Armonía* (sustantivo):

cualidad de un producto que origina una sensación de conjunto agradable. Dicha sensación es debida a la percepción de sus componentes, aportados como estímulos olfativos, gustativos, táctiles y quinestéticos porque se encuentran en relaciones de concentración adecuadas.

*Aceptabilidad* (sustantivo):

estado de un producto recibido favorablemente por un individuo o población en función de sus propiedades organolépticas.

*Discriminación* (sustantivo):

diferenciación cualitativa y/o cuantitativa entre dos o varios estímulos.

*Compensación* (sustantivo):

resultado de la interacción debida a un conjunto de estímulos de modo que cada uno se percibe con menor intensidad que si actuara solo.

*Aspecto* (sustantivo):

conjunto de caracteres organolépticos percibidos por el órgano de la vista: tamaño, forma, color, conformación, turbidez, limpieza, fluidez, espuma y efervescencia.

Este término es preferible al de apariencia.

*Atributo* (sustantivo):

propiedad característica perceptible.

## 2.2. Terminología relativa a la fisiología

*Estímulo* (sustantivo):

agente físico o químico que produce específicamente la respuesta de los receptores sensoriales externos o internos.

*Gusto*:

(Sentido del gusto)

uno de los sentidos cuyos receptores están localizados en la boca, particularmente sobre la lengua y que son activados por diferentes compuestos en solución.

*Gustativo* (adjetivo):

califica la propiedad de un producto capaz de estimular el aparato gustativo despertando las sensaciones correspondientes a uno a varios de los cuatros sabores elementales: dulce, salado, ácido y amargo.

*Receptor* (sustantivo):

estructura especializada de un órgano sensorial excitable, capaz de recibir un estímulo y convertirlo en influjo nervioso.

*Nota:* Los receptores se clasifican según el tipo de energía asociada al estímulo (luz, calor, sonido, etcétera).

*Olfacción* (sustantivo):

función del aparato olfativo con vistas a la percepción y discriminación de las moléculas que acceden a él, en fase gaseosa desde un medio externo, por vía nasal directa o indirecta.

*Intensidad* (sustantivo):

grado de energía de una cualidad medible según una escala cuantitativa de valores superiores al umbral.

*Adaptación* (sustantivo):

modificación temporal de la sensibilidad para percibir estímulos sensoriales como resultado de una continua y repetida exposición a ese o similar estímulo.

*Inhibición* (sustantivo):

falta de respuesta por parte de un órgano sensorial o de una parte del mismo, a pesar de estar sometido a la acción de un estímulo adecuado de intensidad superior al umbral.

*Respuesta* (sustantivo):

acción con que las células sensoriales corresponden a la de uno o varios estímulos relativos a una modalidad sensorial definida.

*Cuerpo* (sustantivo):

sensación táctil percibida en la boca y que otorga un grado de densidad, viscosidad, consistencia o compacidad a un producto.

*Fragancia* (sustantivo):

olor fresco, suave y delicioso.

*Oler* (verbo):

(sentido activo aplicado al olfato)

designa la acción de percibir un olor.

*Objetivo* (adjetivo):

a) califica a aquello que proporciona una representación real y comprobable del objeto, reduciendo al mínimo los factores humanos (por ejemplo: preferencia, costumbre, afectividad);

b) califica a aquella técnica que, bien utilizando métodos sensoriales o métodos instrumentales, permite reducir al mínimo los errores propios.

*Nota:* Se desaconseja emplear como sinónimo el término de instrumental.

*Subjetivo* (adjetivo):

califica a aquello que proporciona una percepción condicionada por nuestro modo de pensar o sentir y no sólo por el estímulo.

*Quinestesia:*

conjunto de sensaciones resultante de una presión aplicable a la muestra por un movimiento (por ejemplo, presión de los dedos en el caso de un queso).

*Umbral* (sustantivo):*Umbral absoluto:*

cantidad mínima de un estímulo sensorial, que da lugar:

- a la aparición de una sensación (umbral de aparición o de detección).
- o al reconocimiento de dicha sensación (umbral de identificación).

*Umbral diferencial:*

cantidad mínima de estímulo sensorial que da lugar a una diferencia perceptible en la intensidad de la sensación.

*Umbral final:*

cantidad máxima de un estímulo a partir de la cual un aumento de intensidad no se percibe.

*Umbral preferencial:*

valor cuantitativo mínimo de un estímulo o valor crítico supraliminar de este estímulo al que corresponde la aparición de una respuesta de atracción o repulsa en relación con un estímulo neutro, por ejemplo, en la elección entre una solución azucarada y el agua.

*Nota:* se debe distinguir entre umbral absoluto de preferencia y umbral diferencial de preferencia.

*Subliminar* (adjetivo):

por debajo del umbral absoluto.

*Supraliminar* (adjetivo):

por encima del umbral absoluto.

*Fatiga sensorial:*

caso particular de adaptación sensorial en el que se produce una disminución de la sensibilidad.

*Compensación* (sustantivo):

resultado de la interacción debida a un conjunto de estímulos de modo que cada uno se percibe con menor intensidad que si actuara solo.

*Sinérgico* (adjetivo):

efecto o acción concertada de determinadas sustancias, de modo que la intensidad de los caracteres organolépticos resultantes de la mezcla son superiores a la suma de las intensidades que cada uno de ellos mostraba por separado.

*Efecto de contraste:*

aumento de la respuesta a las diferencias entre los estímulos simultáneos o consecutivos.

Contrario del efecto de convergencia.

*Efecto de convergencia:*

disminución de la respuesta a las diferencias entre los estímulos simultáneos o consecutivos.

Contrario del efecto de contraste.

### 2.3. Terminología relativa a las propiedades organolépticas

*Ácido* (adjetivo):

- a) califica el sabor elemental producido por soluciones acuosas diluidas de la mayoría de los ácidos (por ejemplo, ácidos cítrico, láctico y tartárico);
- b) califica la propiedad de los cuerpos puros o mezclas que al ser degustados producen este sabor.

El sustantivo correspondiente es *acidez*.

*Agrio* (adjetivo):

califica la sensación olfato-gustativa con predominio de ácidos generalmente de origen fermentativo, y a los alimentos que producen esta sensación. Algunos factores que contribuyen a dicha sensación están relacionados con el proceso de fermentación, por ejemplo acética, de un producto alimenticio.



*Amargo* (adjetivo):

- a) califica el sabor elemental producido por soluciones acuosas diluidas de diversas sustancias tales como quinina, cafeína y determinados heterósidos;
- b) califica la propiedad de aquellos cuerpos puros o sus mezclas que al ser degustados producen este sabor.

El sustantivo correspondiente es amargor.

*Salado* (adjetivo):

- a) sensación característica que se percibe a través del sentido del gusto, cuyo ejemplo más típico es el producido por una solución de cloruro sódico;
- b) califica la propiedad de las sustancias o mezclas que producen este sabor durante la degustación.

El sustantivo correspondiente es salinidad.

*Dulce* (adjetivo):

- a) califica el sabor elemental producido por las soluciones acuosas de diversas sustancias, por ejemplo, la sacarosa;
- b) califica la propiedad de las sustancias puras o mezclas, que al ser degustadas producen este sabor.

El sustantivo correspondiente es dulzor.

*Astringente*:

- a) califica la sensación compleja producida en la boca por una solución acuosa diluida de productos como algunos taninos (por ejemplo, los taninos del caqui y de endrina);
- b) califica la propiedad de los cuerpos puros o mezclas que producen esta sensación.

El sustantivo correspondiente es astringencia.

*Flavor* (sustantivo):

se entiende por flavor el conjunto de percepciones de estímulos olfatorios, táctiles y quínicos que permite a un sujeto identificar un alimento y establecer un criterio, a distintos niveles, de agrado o desagrado.

*Sabor* (sustantivo):

- a) sensaciones percibidas como consecuencia del estímulo de las papilas gustativas por algunas sustancias solubles,
- b) cualidad de la sensación particular producida por tales sustancias.

*Sabor elemental* (sustantivo):

Cada uno de los cuatro sabores reconocidos: dulce, salado, ácido, amargo.

*Olor* (sustantivo):

- a) conjunto de sensaciones percibidas por el órgano olfativo cuando se inspiran determinadas sustancias volátiles;
- b) cualidad de la sensación particular producida por cada una de las sustancias anteriores.

*Aroma* (sustantivo):

- a) sensaciones agradables percibidas por el órgano olfativo por vía indirecta cuando se realiza la degustación de un alimento;
- b) en perfumería y en lenguaje no especializado se aplica también a las mismas sensaciones apreciadas por vía nasal directa.

*Regusto* (sustantivo):

Conjunto de sensaciones percibidas después de haber desaparecido el estímulo de la boca, distintas a las percibidas previamente.

Es sinónimo de dego.

*Aromático* (adjetivo):

- a) califica la propiedad de los cuerpos puros o mezclas que, al ser degustados, producen las sensaciones calificadas como aroma;
- b) califica a aquellos productos que, examinados por vía nasal directa, producen sensaciones de fragancia y frescor.

*Textura* (sustantivo):

características del estado sólido o reológico de un producto, cuyo conjunto es capaz de estimular los receptores mecánicos, durante la degustación, particularmente de los situados en la región bucal.

*Nota:* Este término se refiere únicamente a las propiedades objetivas y no a las sensaciones producidas y que se designan por términos generales, tales como consistencia, fibrosidad, untuosidad, etc.

*Paladear:*

acción de conseguir que un alimento situado en la boca entre en contacto con todas las zonas sensibles de la misma, con objeto de percibir las sensaciones bucales que produce.

*Nota:* Este vocabulario puede ampliarse consultando las Normas ISO 5492/I, II, III, IV, V y otras existentes, tales como el elaborado por J.L. Magnen «Les cahiers techniques du Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation», etc.

## COPA PARA LA DEGUSTACIÓN DE ACEITES

## 1. OBJETO

La presente norma tiene por objeto describir las características de la copa destinada al análisis organoléptico de los aceites comestibles (olor, sabor, flavor).

Describe, además, el dispositivo de calentamiento adaptado, necesario para la obtención y el mantenimiento de la temperatura adecuada para este análisis.

## 2. DESCRIPCIÓN

El esquema diseñado de la figura 1 pretende optimizar las características deseables en un utensilio de esta naturaleza, y que pueden concretarse en los puntos siguientes:

- a) máxima estabilidad, dificultando su inclinación y derramamiento del aceite contenido;
- b) fondo fácilmente adaptable a los huecos del bloque de calefacción que permite el calentamiento homogéneo de la base de la copa;
- c) estrechamiento de la boca que favorece la concentración de olores y facilita su identificación;
- d) de vidrio oscuro que no permita al catador percibir el color del aceite, impidiéndole cualquier prejuicio y la posible creación de sesgos o tendencias que puedan afectar a la objetividad de la determinación.

## 2.1. Dimensiones

El esquema de la copa va representado en la figura 1, teniendo las dimensiones siguientes:

|  |                      |
|--|----------------------|
| — capacidad total .....                            | 130 ml $\pm$ 10 ml,  |
| — altura total .....                               | 60 mm $\pm$ 1 mm,    |
| — diámetro de la boca .....                        | 50 mm $\pm$ 1 mm,    |
| — diámetro de la parte más ancha .....             | 70 mm $\pm$ 1 mm,    |
| — diámetro de la base .....                        | 35 mm $\pm$ 1 mm,    |
| — espesor de vidrio en las paredes laterales ..... | 1,5 mm $\pm$ 0,2 mm, |
| — espesor de vidrio en el fondo .....              | 5 mm $\pm$ 1 mm.     |

Cada copa irá acompañada de un vidrio de reloj cuyo diámetro será de unos 10 mm superior al de su boca. Este vidrio servirá de tapa para evitar la pérdida de aroma y la entrada de polvo.

## 2.2. Características de fabricación

La copa deberá estar fabricada con vidrio resistente; de color oscuro que impida apreciar la coloración de su contenido, exento de rayas o burbujas.

El borde deberá ser regular, liso y rebordado.

La pieza deberá estar recocida, permitiéndole resistir las variaciones de temperatura que ha de sufrir en los ensayos.

### 2.3. Normas para la utilización

La limpieza de las copas deberá realizarse utilizando jabón o detergente no perfumados, enjuagándose a continuación repetidas veces hasta eliminar totalmente el agente de limpieza. Se enjuaga finalmente con agua destilada, se deja escurrir y se seca en una estufa de desecación.

No deben utilizarse ácidos concentrados ni mezcla crómica.

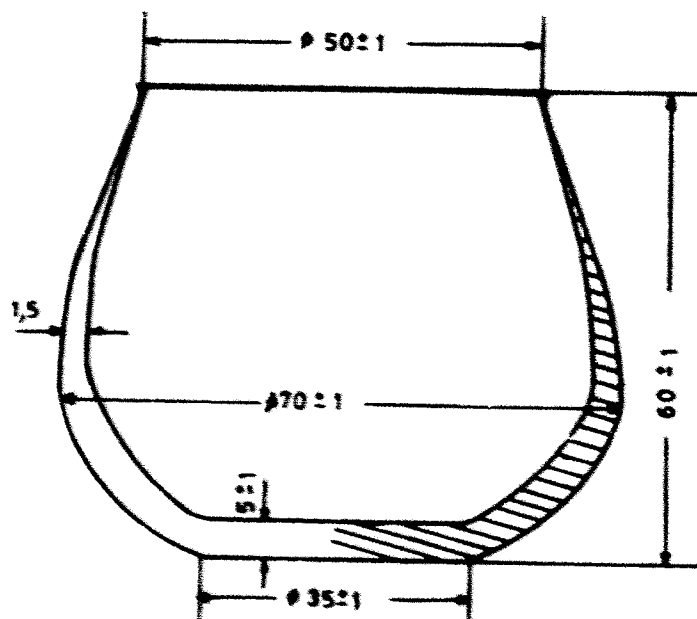
Las copas deben mantenerse en la estufa hasta su utilización, o conservarse en un armario protegiéndolas de toda contaminación de olores extraños.

Antes de cada utilización, deberá olerse cada copa, con el fin de comprobar la ausencia de cualquier olor extraño. Al preparar el ensayo se tendrá mucho cuidado de anotar la clave de cada copa y el aceite que le corresponde. Esta correspondencia clave/aceite sólo será conocida por el organizador del ensayo.

### 3. DISPOSITIVO DE CALENTAMIENTO DE LAS MUESTRAS

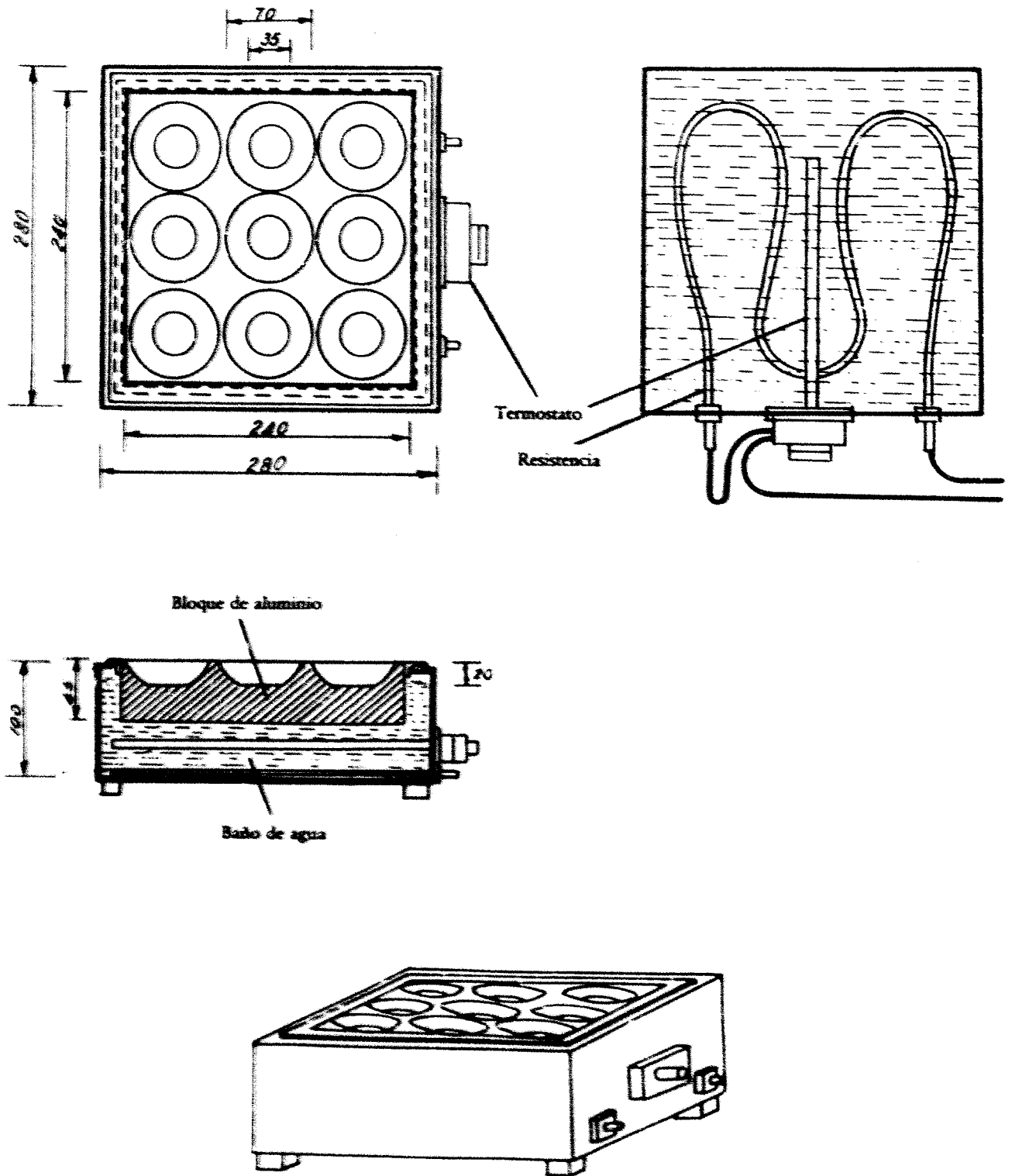
El examen organoléptico de las muestras deberá efectuarse a una temperatura determinada que, para los aceites comestibles, debe ser de  $28 \pm 2$  °C. Para conseguir esto, deberá instalarse en el interior de cada cabina, al alcance del catador, un dispositivo de calefacción como el representado en la figura 2. Consiste en un bloque de aluminio sumergido en un baño de agua regulado termostáticamente, con el objeto de obtener una temperatura uniforme. Este bloque lleva una serie de oquedades a las que se adaptan los fondos de las copas. La diferencia de temperatura entre el dispositivo de calentamiento y el aceite de las copas colocadas en las oquedades de los distintos bloques no debe ser superior a  $\pm 2$  °C.

Figura 1 — Copa de degustación



Dimensiones (en mm)

Figura 2 — Dispositivo de calentamiento de las muestras (Dimensiones en milímetros)



## GUÍA PARA LA INSTALACIÓN DE UNA SALA DE CATA

## 1. INTRODUCCIÓN

La sala de cata tiene por objeto proporcionar al grupo de catadores que intervienen en los ensayos sensoriales un ambiente adecuado, cómodo y normalizado que facilite el trabajo y tienda a mejorar la repetitividad y reproducibilidad de los resultados.

## 2. OBJETO

La presente norma tiene por objeto precisar las condiciones básicas a que debe atenderse la instalación de una sala de cata.

## 3. ESPECIFICACIONES GENERALES DE LA INSTALACIÓN

Un local, cualquiera que sea su superficie, deberá responder a las especificaciones siguientes:

El local deberá ser agradable y estar convenientemente iluminado, pero conservando un carácter neutro. Con este fin, se recomienda un color relajante, liso y claro en las paredes para que se cree una atmósfera de distensión <sup>(1)</sup>.

El local será de fácil limpieza y estará aislado de cualquier fuente de ruido; por tanto, preferentemente insonorizado. Estará igualmente aislado de olores extraños por lo que, a ser posible, estará provisto de un dispositivo eficaz de ventilación. Si las oscilaciones de la temperatura ambiental lo aconsejan, la sala de cata deberá dotarse de aire acondicionado que mantenga el ambiente próximo a 20-22 °C.

## 3.1. Dimensiones

Las dimensiones del local dependen frecuentemente de las disponibilidades de los laboratorios o de las empresas. En general, deberá ser lo suficientemente espacioso para permitir la instalación de unas diez cabinas y también de una zona para la preparación de las muestras.

Sin embargo, es evidente que cuanto mayor sea el espacio dedicado a las instalaciones, mejor será, ya que así se podrán prever dependencias anexas para, por ejemplo, limpieza del material, colocación de preparaciones culinarias y reuniones de «paneles abiertos».

## 3.2. Iluminación

La iluminación general, ya provenga de la luz solar o de lámparas (por ejemplo, lámparas de tubo tipo «luz de día») será uniforme, regulable y con luz difusa.

## 3.3. Temperatura y estado higrométrico

El local se mantendrá continuamente en condiciones térmicas e higrométricas agradables. Salvo circunstancias especiales, se recomienda una temperatura de 20-22 °C y un estado higrométrico de 60 a 70% de humedad relativa.

## 4. DESCRIPCIÓN DE LAS CABINAS

## 4.1. Características generales

Las cabinas se situarán en el local una al lado de otra, serán idénticas entre sí y estarán separadas unas de otras por mamparas lo suficientemente altas y anchas para aislar a los catadores entre sí, una vez sentados. Se pueden construir de cualquier material apropiado y de fácil limpieza y conservación (por ejemplo: madera, contra-chapado vitrificado, paneles laminados, etcétera). Si se utilizan pinturas, estas deberán, después de secas, ser totalmente inodoras.

Los asientos previstos en cada cabina serán cómodos y de altura regulable.

También hay que prever que en cada una de ellas el alumbrado sea individual, regulable en dirección e intensidad.

Es muy recomendable que las cabinas estén provistas de un pulsador conectado a un dispositivo luminoso exterior que permita al catador comunicar a la persona que lo atiende desde el exterior, sin distraer a los demás, que ha terminado el ensayo, desea nuevas muestras, carece de algún utensilio, ha observado alguna irregularidad, o desea alguna información, etc.

(1) El color de la habitación y su iluminación pueden influir en los resultados del análisis sensorial.

**4.2. Dimensiones**

Las cabinas serán suficientemente amplias y confortables.

En general, se mantendrán las siguientes dimensiones:

- ancho:
  - 0,75 m (sin pila en la mesa),
  - 0,85 m (con pila en la mesa);
- fondo:
  - 0,50 m (la mesa),
  - 0,20 m exceso de la mampara;
- altura de las mamparas:
  - 0,60 m mínimo a partir de la mesa;
- altura de la mesa:
  - 0,75 metros.

**4.3. Disposición**

La superficie de la mesa será de fácil limpieza.

Una parte de esta superficie debe reservarse para una pila dotada de agua corriente potable. Sin embargo, si esto no es factible, se reservará este espacio para la colocación de una cubeta, escupidera o similar.

Cuando se deban mantener las muestras, mientras se realiza la prueba a temperatura constante superior o inferior al ambiente, conviene disponer de un equipo adecuado para tal fin (baño María, placa calefactora, etc.).

También se puede instalar una repisa, a una altura aproximada del suelo de 1,10 metros, para colocar en ella diferentes accesorios (vasos, material menudo, etc.).

Si la disposición de las cabinas en la sala lo permite, es conveniente instalar un dispositivo para facilitar la presentación de las muestras. Este puede ser en forma de corredera (figura 1), de torno vertical (figura 2) indicado para vasos o copas (recipientes altos), o de torno horizontal cuando los recipientes en que se sirven las muestras tienen poca altura (figura 3). Sencillamente, que posea hueco suficiente para el paso de las bandejas y copas que contengan las muestras a examinar.

**5. LOCALES COMPLEMENTARIOS**

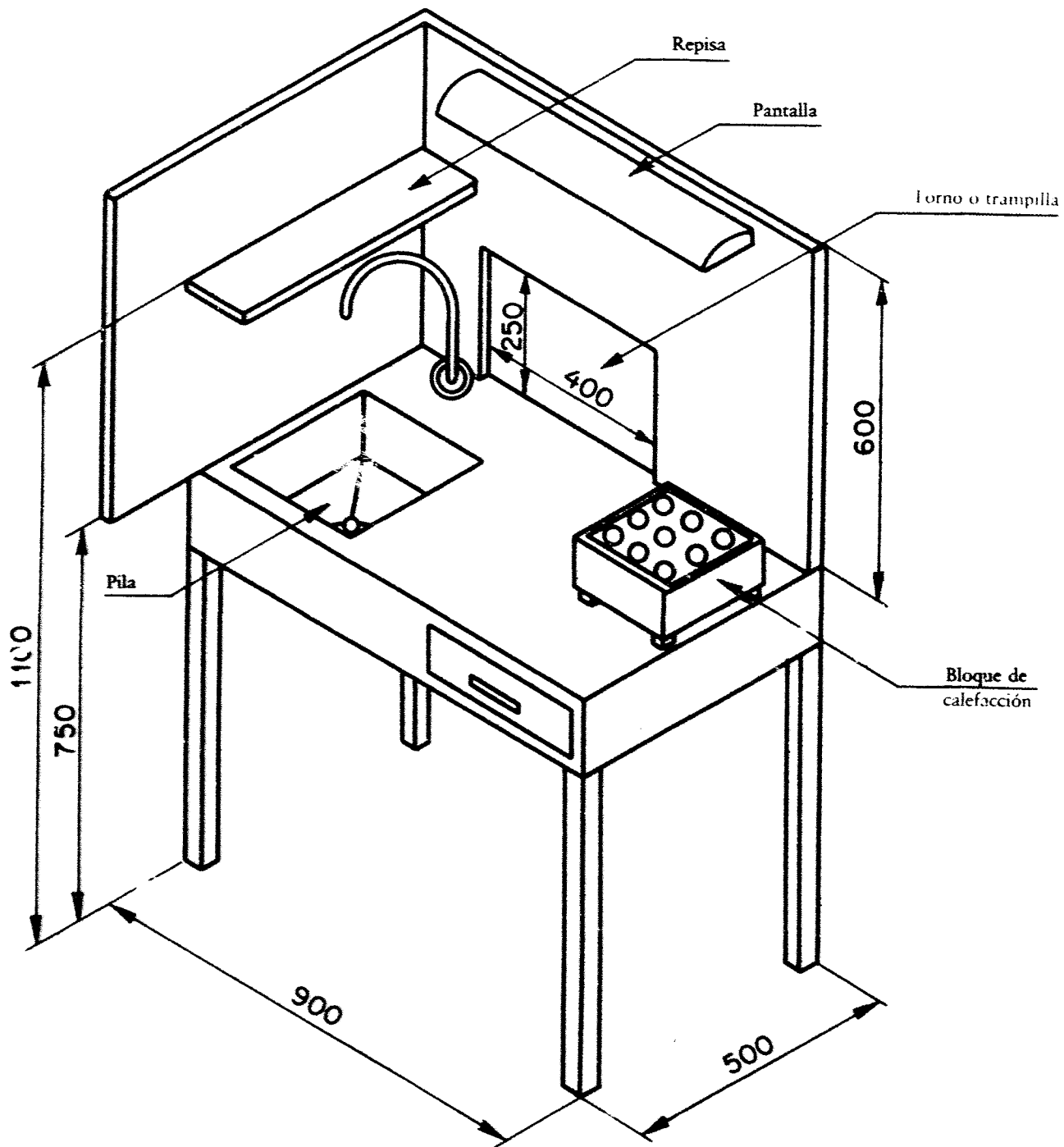
Si se dispone de espacio suficiente, conviene contar con locales separados para preparación de muestras (cocina experimental si se prevén ensayos culinarios u otros), estanterías para la colocación de vasos o utensilios y salas de reunión para las discusiones previas o posteriores a los ensayos. En estos casos dichos locales se mantendrán limpios y en ningún caso podrán molestar el trabajo de los jueces, en la sala de cata, con sus olores, ruidos, o con la conversación de los reunidos.

Véase en la figura 4 un ejemplo de sala de cata e instalaciones complementarias.

*Nota:* Las condiciones descritas son las ideales; pero si no fuese posible disponer de una instalación semejante reservada únicamente para el análisis sensorial, los ensayos podrían realizarse en un local que reúna las condiciones mínimas descritas (luz, temperatura, ruido, olores), instalando cabinas móviles a partir de elementos plegables de tal forma que permitan, como mínimo aislar entre sí a los catadores.

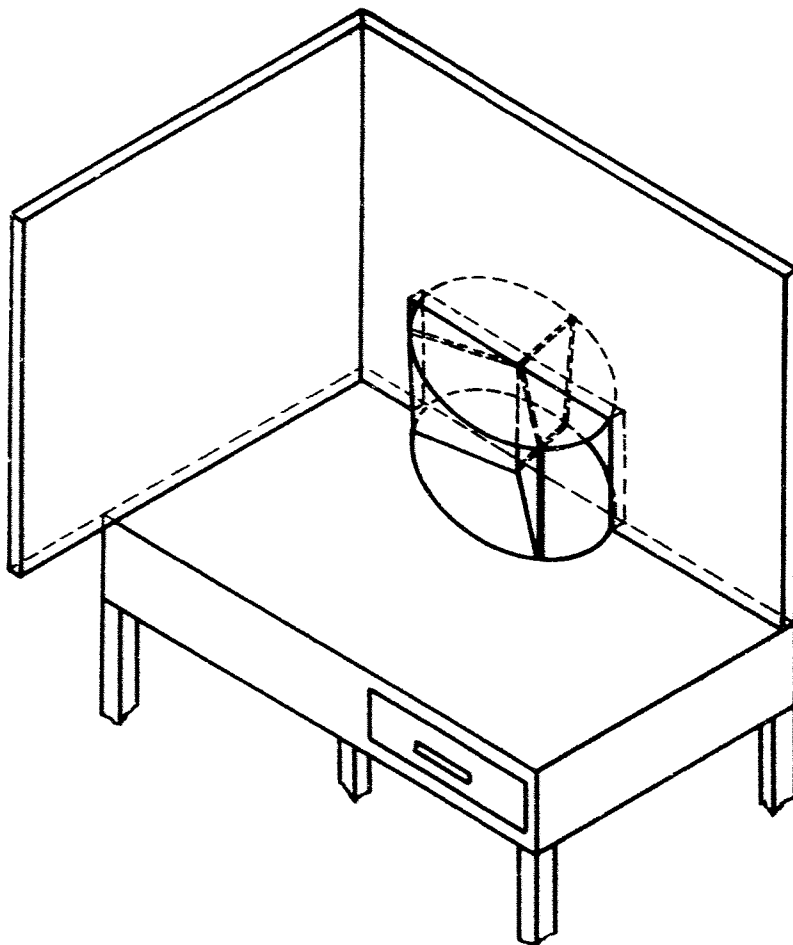
DISPOSICIÓN DE LA CABINA

Figura 1



TORNO DE PRESENTACIÓN DE LAS MUESTRAS

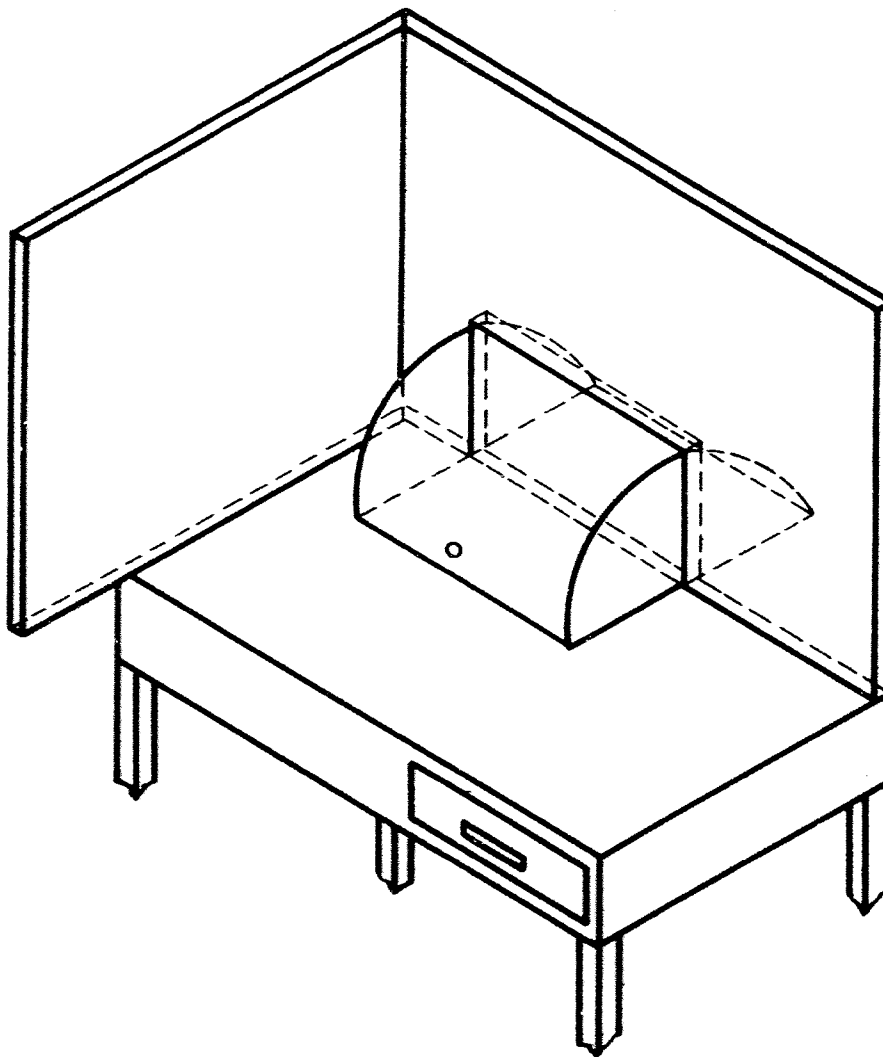
Figura 2





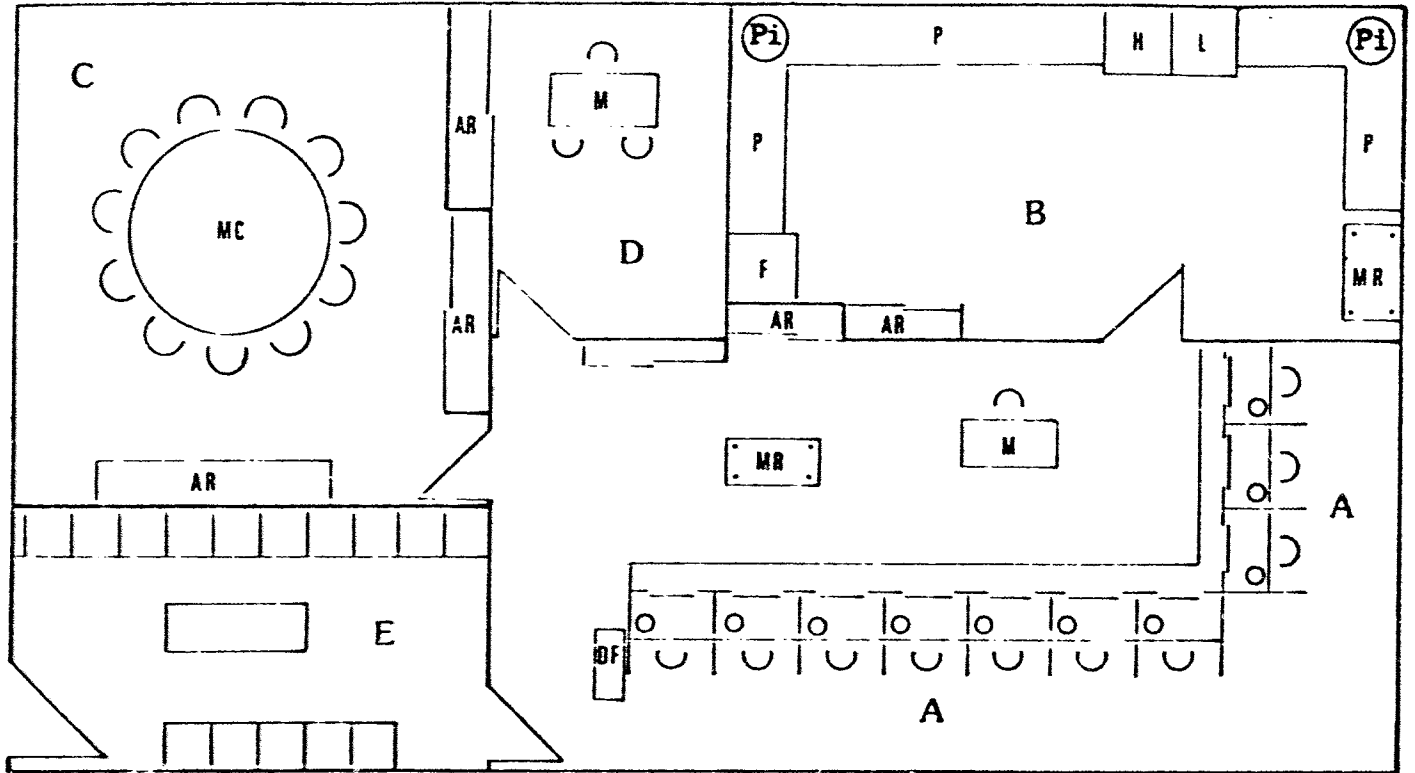
TRAMPILLA DE PRESENTACIÓN DE LAS MUESTRAS

Figura 3



LABORATORIO DE ANÁLISIS SENSORIAL

Figura 4 — Ejemplo de sala de cata



- A — Cabina de degustación
- B — Sala de limpieza de material y preparación de muestra
- C — Panel abierto
- D — Despacho
- E — Sala espera
- F — Frigorífico
- H — Horno
- L — Lavaplatos
- Pi — Pileta vertedero
- Ar — Armario
- Mr — Mesa auxiliar rodante
- Df — Distribución formularios
- Mc — Mesa circular
- M — Mesa
- P — Poyata

## ANEXO XIII

## PRUEBA DE REFINACIÓN

## 1. NEUTRALIZACIÓN Y DECOLORACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA EN LABORATORIO

## 1.1. Neutralización del aceite

## 1.1.1. Equipo

- vaso de 300 ml de forma alta,
- centrifuga con tubos de 100 ml,
- vaso de 250 ml,
- matraces de 100 ml,
- ampolla de decantación de 1 litro.

## 1.1.2. Reactivos

- solución acuosa de hidróxido de sodio al 12 %,
- solución etanólica al 1 % de fenolftaleína,
- hexano para análisis,
- alcohol isopropílico puro para análisis.

## 1.1.3. Modo de operar

## a) Aceites de acidez expresada en ácido oleico inferior al 30 %

Introducir en un vaso de 300 ml de forma alta, 50 g de aceite bruto y calentar a 65 °C al baño María. Agitar lentamente, y añadir una cantidad de solución de hidróxido de sodio al 12 % que corresponda a la acidez libre del aceite con un exceso del 5 %. Continuar agitando durante cinco minutos, manteniendo la temperatura a 65 °C.

Trasladar el total a unos tubos de centrifuga de 100 ml, separar la masa jabonosa por centrifugación. Verter el aceite decantado en un vaso de 250 ml y lavar con 50-60 ml de agua destilada hirviendo eliminando durante este proceso la capa acuosa con la ayuda de un sifón. Repetir los lavados hasta eliminar completamente los restos de jabon residual (desaparición de la coloración rosa en la fenolftaleína).

Centrifugar el aceite para eliminar las pequeñas cantidades de agua residual.

## b) Aceites de acidez expresada en ácido oleico superior al 30 %

Introducir en una ampolla de decantación de un litro, 50 g de aceite bruto, 200 ml de hexano, 100 ml de alcohol isopropílico y una cantidad de solución de hidróxido de sodio al 12 % que corresponda a la acidez libre del aceite, con un exceso del 0,3 %. Agitar enérgicamente durante un minuto. Añadir 100 ml de agua destilada, agitar de nuevo y dejar reposar.

Después de la separación de las capas, dejar salir la capa inferior que contiene los jabones. Entre ambas capas (aceitosa por encima y acuosa por debajo) se forma frecuentemente una capa intermedia constituida por mucilagos y sustancias insolubles que deberá eliminarse igualmente.

Proceder a continuación al lavado de la solución hexánica de aceite neutro con porciones de 50-60 ml de una solución de alcohol isopropílico/agua destilada 1/1 (v/v) hasta la desaparición de la coloración rosa en la fenolftaleína. Proceder a continuación a la eliminación completa del hexano por destilación en vacío (por ejemplo, en el rotavapor).

## 1.2. Decoloración del aceite neutro

## 1.2.1. Equipo

- matraz de 250 ml con 3 bocas que permitan la inserción de:
  - a) un termómetro graduado en grados que permita hacer lecturas hasta 90 °C,
  - b) un agitador mecánico que gire a 250-300 vueltas por minuto equipado para el funcionamiento en vacío,
  - c) un rácor hacia la bomba de vacío,
- bomba de vacío, provista de un manómetro, capaz de lograr presiones residuales de 15-30 milibares.



## ANEXO XIV

## NOTAS COMPLEMENTARIAS 2, 3 Y 4 DEL CAPÍTULO 15 DE LA NOMENCLATURA COMBINADA

1. «Nota 2A: Sólo se considerará "aceite de oliva", para la aplicación de los códigos NC 1509 y 1510, el aceite que proceda exclusivamente del tratamiento de aceitunas, con exclusión del aceite de oliva reesterificado y de cualquier mezcla de aceite de oliva con aceites de otra naturaleza.

La presencia de aceite de oliva reesterificado o de aceites de otra naturaleza se comprobará con los métodos recogidos en los Anexos V, VII, IX, X y XII. En el cuadro siguiente figuran las características analíticas del contenido de esteroides y ácidos grasos común a todos los aceites de oliva pertenecientes a los códigos NC 1509 y 1510.

| Cuadro I: contenido de ácidos en % |       | Cuadro II: Contenido de esteroides en % |               |
|------------------------------------|-------|---|---------------|
| Ácido mirístico                    | M 0,1 | Colesterol                              | M 0,5         |
| Ácido linolénico                   | M 0,9 | Brasicasterol                           | M 0,2         |
| Ácido araquídico                   | M 0,7 | Campesterol                             | M 4,0         |
| Ácido eicosánico                   | M 0,5 | Estigmasterol                           | < Campesterol |
| Ácido behénico                     | M 0,3 | $\beta$ -sitosterol ( <sup>1</sup> )    | m 93,0        |
| Ácido lignocérico                  | M 0,5 | $\Delta$ -7-estigmasterol               | M 0,5         |

m = mínimo.

M = máximo.

(<sup>1</sup>)  $\Delta$ -5,23-Estigmasterol + Colesterol +  $\beta$ -sitosterol + Sitostanol +  $\Delta$ -5-Avenasterol +  $\Delta$ -5-24-Estigmas-tadienol.

Nota 2B: Se considerarán "aceites de oliva vírgenes" los obtenidos a partir del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos, en condiciones, sobre todo térmicas, que no impliquen la alteración del aceite, y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, el centrifugado y el filtrado, con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolventes (código NC 1510) que se definen a continuación en los puntos I y II.

- I. Se considerará "aceite de oliva virgen lampante", para la aplicación del código NC 1509 10 10, cualquiera que sea su acidez, el aceite que presente las siguientes características:
- un contenido de alcoholes alifáticos de 400 mg/kg como máximo;
  - un contenido de eritrodíol y uvaol del 4,5 % como máximo;
  - un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos del 1,3 % como máximo;
  - o una de las características siguientes:
    - d1) un índice de peróxidos superior a 20 meq/02/kg;
    - d2) un contenido total de solventes halogenados volátiles superior a 0,2 mg/kg y/o que alguno de ellos sea superior a 0,1 mg/kg;
    - d3) un coeficiente de extinción  $K_{270}$  superior a 0,25 y, después de tratar el aceite con alúmina activada, no superior a 0,11. Algunos aceites con un contenido de ácidos grasos libres, expresado en ácido oleico, superior a 3,3 g por cada 100, pueden tener, después de pasar sobre la alúmina activada, de acuerdo con el método recogido en el Anexo XV, un coeficiente de extinción  $K_{270}$  superior a 0,11. En tal caso, después de neutralizarlos y decolorarlos en el laboratorio, deberán presentar las siguientes características:

- un coeficiente de extinción  $K_{270}$  inferior o igual a 1,20,
- una variación ( $\Delta K$ ) del coeficiente de extinción en un entorno de 270 nanómetros superior a 0,01 e inferior o igual a 0,16;

siendo:

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

$K_m$  = coeficiente de extinción con la longitud de onda del vértice máximo de la curva de absorción en un entorno de 270 nm,

$K_{m-4}$  y  $K_{m+4}$  = coeficientes de extinción con longitudes de onda inferiores y superiores en 4 nm a la de  $K_m$ .

- d4) características organolépticas con defectos que puedan percibirse con una intensidad superior a la aceptable medida con una puntuación inferior a 3,5 en la cata.

II. Se considerará «aceite de oliva virgen», para la aplicación del código NC 1509 10 90, el aceite de oliva que presente las siguientes características:

- a) una acidez máxima, expresada en ácido oleico, de 3,3 g por cada 100;
- b) un índice de peróxidos de 20 meq O<sub>2</sub>/kg como máximo;
- c) un contenido de alcoholes alifáticos de 300 mg/kg como máximo;
- d) un contenido total de solventes halogenados volátiles que no exceda de 0,2 mg/kg, y siempre que no exceda de 0,1 mg/kg en cada uno de ellos;
- e) un coeficiente de extinción  $K_{270}$  de 0,250 como máximo y, después de tratar el aceite con alumina activada, de 0,10 como máximo <sup>(1)</sup>;
- f) una variación del coeficiente de extinción ( $\Delta K$ ) en la zona de 270 nanómetros de 0,010 como máximo;
- g) características organolépticas con defectos que puedan percibirse con una intensidad inferior a la aceptable medida con una puntuación superior a 3,5 en la cata;
- h) un contenido de eritrodol y uvaol del 4,5% como máximo;
- i) un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos del 1,3% como máximo.

*Nota 2C:* Se incluirá en el código NC 1509 10 90 el aceite de oliva obtenido por tratamiento de los aceites de los códigos NC 1509 10 10 o 1509 10 90, incluso con adición de aceite de oliva virgen, que presente las siguientes características:

- a) una acidez máxima, expresada en ácido oleico, de 3,3 g por cada 100;
- b) un contenido de alcoholes alifáticos de 350 mg/kg como máximo;
- c) un coeficiente de extinción  $K_{270}$  superior a 0,25 pero no a 1,20 y, después de pasar la muestra de aceite sobre la alumina activada, superior a 0,10;
- d) una variación del coeficiente de extinción ( $\Delta K$ ) en la zona de 270 nanómetros superior a 0,01 pero no a 0,16;
- e) un contenido de eritrodol y uvaol del 4,5% como máximo;
- f) un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos del 1,5% como máximo.

*Nota 2D:* Se considerarán "aceites crudos" del código NC 1510 00 10 los aceites, principalmente los aceites de orujo, que presenten las siguientes características:

- a) una acidez, expresada en ácido oleico, superior a 2 gr por cada 100;
- b) un contenido de eritrodol y uvaol superior al 12%;
- c) un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 del triglicérido del 1,8% como máximo.

*Nota 2E:* Se considerarán aceites del código NC 1510 00 90 los aceites obtenidos por tratamiento de los aceites del código NC 1510 00 10, incluso con adición de aceites de oliva vírgenes, que no posean las características de los aceites que figuran en los puntos I y II y siempre que presenten un contenido de ácidos grasos saturados en la posición 2 de los triglicéridos del 2% como máximo.

<sup>(1)</sup> Cuando el  $K_{270}$  sea superior a 0,25 se procederá a una nueva determinación utilizando el tratamiento con alumina; el  $K_{270}$  no deberá sobrepasar 0,10.

2. «Nota 3: Se excluirán de los códigos NC 1522 00 31 y 1522 00 39:
  - a) los residuos procedentes del tratamiento de grasas que contengan aceite cuyo índice de yodo, determinado por el método que figura en el Anexo XVI, sea inferior a 70 o superior a 100;
  - b) los residuos procedentes del tratamiento de grasas que contengan aceite cuyo índice de yodo esté comprendido entre 70 y 100, pero en los que la superficie del pico correspondiente al volumen de retención de beta-sitosterol, determinada de acuerdo con las disposiciones del Anexo V del Reglamento mencionado en la nota complementaria 4 siguiente, represente menos del 93 % de la superficie total de los picos de los esteroides.».
  
3. «Nota 4: Los métodos de análisis para determinar las características de los productos contemplados anteriormente son los previstos en los Anexos del Reglamento (CEE) n° 2568/91.».

## ANEXO XV

## 1. CONTENIDO EN ACEITE DE LOS ORUJOS DE ACEITUNA

## 1.1. Material

- aparato de extracción apropiado tipo suxhlet, provisto de un matraz de 200 a 250 ml,
- baño por calefacción eléctrica (baño de arena, baño de agua, etc.) o placa calefactora,
- balanza analítica,
- estufa regulada a 80 °C como máximo,
- estufa de calefacción eléctrica provista de un dispositivo de termorregulación regulada a 103 °C  $\pm$  2 °C y que permita realizar una insuflación de aire o una presión reducida,
- triturador mecánico fácil de limpiar y que permita el triturado del orujo sin calentamiento y sin disminución sensible de su contenido en agua y en aceite,
- cartucho de extracción y algodón hidrófilo o papel filtro, exentos de productos extraíbles por el hexano,
- desecador,
- criba con agujeros de 1 mm de diámetro,
- piedra pómez en pequeños granos, previamente secada.

## 1.2. Reactivo

n-hexano técnico cuyo residuo en evaporación completa deberá ser inferior a 0,002 g para 100 ml.

## 2. MODO DE OPERAR

## 2.1. Preparación de la muestra para ensayo

Triturar la muestra para laboratorio, si fuera necesario, en el triturador mecánico, previamente bien limpio, para reducirla a partículas que puedan atravesar completamente la criba.

Utilizar aproximadamente una vigésima parte de la muestra para completar la limpieza del triturador, tirar dicha mezcla, triturar el resto, recogerlo, mezclarlo con cuidado y analizarlo sin demora.

## 2.2. Toma de muestra

Pesar inmediatamente después del triturado, alrededor de 10 g de la muestra para ensayo con una aproximación de 0,01 g.

## 2.3. Preparación del cartucho de extracción

Colocar la toma de muestra en el cartucho y taparlo con el tampón de algodón hidrófilo. En caso de haber utilizado papel de filtro, envolver la muestra molida en dicho papel.

## 2.4. Presecado

Cuando el orujo esté muy húmedo (contenido en agua y en materias volátiles superior al 10%), efectuar un presecado colocando durante un tiempo conveniente el cartucho lleno (o el papel de filtro) en la estufa calentada a 80 °C como máximo, para llevar el contenido en agua y en materias volátiles por debajo del 10%.

## 2.5. Preparación del matraz

Pesar con aproximación de 1 g el matraz que contenga 1 a 2 granos de piedra pómez, previamente secado en la estufa a 103 °C  $\pm$  2 °C y después enfriado durante al menos una hora en el desecador.

## 2.6. Primera extracción

Colocar en el aparato de extracción el cartucho (o el papel de filtro) que contenga la muestra. Verter en el matraz la cantidad necesaria de hexano. Adoptar el matraz al aparato de extracción y colocarlo todo sobre la placa calefactora. Llevar la calefacción a tal estado que el caudal de reflujo sea al menos de tres gotas por segundo (ebullición moderada, no tumultuosa).

Después de cuatro horas de extracción, dejar enfriar. Quitar el cartucho del aparato de extracción y colocarlo en una corriente de aire para eliminar la mayor parte del disolvente que lo impregna.



## 2.7. Segunda extracción

Vaciar el cartucho en el microtriturador y triturar tan finamente como sea posible. Colocar de nuevo cuantitativamente la mezcla en el cartucho y esta en el aparato de extracción.

Empezar de nuevo la extracción durante dos horas más, utilizando el mismo matraz conteniendo la primera extracción.

La solución obtenida en el matraz de extracción deberá ser limpida. Si no fuere así, filtrarla sobre un papel de filtro lavando varias veces el primer matraz y el papel de filtro con hexano. Recoger el filtrado y el disolvente en un segundo matraz previamente secado y tarado aproximadamente a 1 mg.

## 2.8. Eliminación del disolvente y pesada del extracto

Eliminar en el equipo de extracción la mayor parte del disolvente. Eliminar los últimos restos de este calentando el matraz en la estufa a  $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Facilitar dicha eliminación, ya sea insuflando aire de vez en cuando o preferiblemente un gas inerte, o actuando bajo una presión reducida.

Dejar enfriar el matraz en un desecador durante al menos una hora, y pesarlo con una precisión de 1 mg aproximadamente.

Calentar de nuevo 10 minutos en las mismas condiciones, dejar enfriar en el desecador y pesar.

La diferencia entre los resultados de estas dos pesadas deberá ser inferior o igual a 10 mg, si no, calentar de nuevo durante periodos de diez minutos seguidos de enfriamiento y pesada, hasta que la diferencia de peso sea, a lo sumo, de 10 mg. Seleccionar la última pesada del matraz.

Efectuar dos determinaciones.

## 3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

## 3.1. Modo de cálculo y fórmula

a) El extracto expresado en peso del producto tal cual será igual a:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

donde: S es el porcentaje en peso del extracto del producto tal cual,

$m_0$  es el peso, en gramos, de la muestra,

$m_1$  es el peso, en gramos, del extracto seco.

Tomar como resultado la media aritmética de las dos determinaciones, si las condiciones de repetitividad se cumplen.

Expresar el resultado con un solo decimal.

b) El extracto se relacionará con la materia seca utilizando la siguiente fórmula:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \% \text{ grasa sobre extracto seco}$$

donde: S es el porcentaje en peso de extracto del producto tal cual (ver a),

U es su contenido en agua y en materias volátiles.

## 3.2. Repetitividad

La diferencia entre los resultados de las dos determinaciones, efectuadas simultáneamente o rápidamente la una a continuación de la otra mediante el mismo análisis, no deberá ser superior a 0,2 g de extracto de hexano por cada 100 g de muestra.

En caso contrario, repetir sobre otras dos tomas de muestra. Si esta vez la diferencia es de nuevo superior a 0,2 g tomar como resultado la media aritmética de las cuatro determinaciones efectuadas.

## ANEXO XVI

## DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE YODO

## 1. OBJETO

La presente norma internacional especifica un metodo para la determinacion del indice de yodo de las grasas y aceites animales y vegetales, en lo sucesivo denominados grasas.

## 2. DEFINICIÓN

A los fines de la presente norma internacional, se aplicara la definicion siguiente:

2.1. *Índice de yodo*: el peso de yodo absorbido por la muestra en las condiciones de trabajo que se especifican en la presente norma internacional.

El indice de yodo se expresa en gramos de yodo por 100 gr de muestra.

## 3. PRINCIPIO

Disolución de la muestra problema y adición de reactivo de Wijs. Una vez transcurrido el tiempo que se especifica, adición de solución acuosa de yoduro potasico y valoración del yodo liberado con solución de tiosulfato sódico.

## 4. REACTIVOS

Todos los reactivos seran de calidad analitica reconocida.

## 4.1. Yoduro potasico, solución de 100 g/l, exento de yodatos o de yodo libre.

## 4.2. Engrudo de almidón.

Mezclar 5 g de almidón soluble con 30 ml de agua, añadir esta mezcla a 1 000 ml de agua en ebullición, hervir durante 3 minutos y dejar enfriar.

## 4.3. Solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico.

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$ , valorada como máximo 7 dias antes de su uso.

## 4.4. Disolvente, preparado mezclando volúmenes iguales de ciclohexano y ácido acético.

## 4.5. Reactivo de Wijs, que contenga monoyoduro de yodo en ácido acético. Se utilizara reactivo de Wijs comercializado.

*Nota:* El reactivo contiene 9 g de  $\text{ICl}_2$  + 9 g de I en ácido acético.

## 5. MATERIAL

Material ordinario de laboratorio y, en particular, lo siguiente:

## 5.1. Navajillas de vidrio, apropiadas para la muestra problema y que puedan introducirse en los matraces (5.2).

## 5.2. Matraces erlenmeyer de 500 ml de capacidad con boca esmerilada, provistos de sus correspondientes tapones de vidrio y perfectamente secos.

## 6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA QUE DEBERÁ ANALIZARSE.

Secar la muestra homogeneizada con  $\text{CaH}_2$  o sódico y filtrarla.

## 7. PROCEDIMIENTO

## 7.1. Tamaño de la muestra

El peso de la muestra varia en funcion del indice de yodo previsto, como se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1

| Índice de yodo previsto | Peso de la muestra problema |
|-------------------------|-----------------------------|
| menos de 5              | 3,00 g                      |
| 5— 20                   | 1,00 g                      |
| 21— 50                  | 0,40 g                      |
| 51—100                  | 0,20 g                      |
| 101—150                 | 0,13 g                      |
| 151—200                 | 0,10 g                      |

Pesar la muestra problema con precisión de 0,1 mg en una navajilla capsula de pesadas de vidrio 5.1.

#### 7.2. Determinación

Introducir la muestra problema en un matraz de 500 ml (5.2). Añadir 20 ml del disolvente (4.4) para disolver la grasa. Agregar exactamente 25 ml del reactivo de Wijs (4.5), tapar el matraz, agitar el contenido y colocar el matraz al abrigo de la luz. No deberá utilizarse la boca para pipetear el reactivo de Wijs.

Preparar del mismo modo un ensayo en blanco con el disolvente y el reactivo, pero sin la muestra problema.

Para las muestras con un índice de yodo inferior a 150, mantener los matraces en la oscuridad durante 1 hora; para las muestras con un índice de yodo superior a 150, así como en el caso de productos polimerizados o considerablemente oxidados, mantener en la oscuridad durante 2 horas.

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, agregar a cada uno de los matraces 20 ml de solución de yoduro potásico (4.1) y 150 ml de agua.

Valorar con la disolución de tiosulfato sódico (4.3) hasta que haya desaparecido casi totalmente el color amarillo producido por el yodo. Añadir unas gotas de engrudo de almidón (4.2) y continuar la valoración hasta el momento preciso en que desaparezca el color azul después de una agitación muy intensa.

*Nota:* Se permite la determinación potenciométrica del punto final.

#### 7.3. Número de determinaciones

Efectuar 2 determinaciones de la muestra problema.

### 8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El índice de yodo se expresa del siguiente modo:

$$\frac{12,69 c (V_1 - V_2)}{p}$$

siendo:

*c*: valor numérico de la concentración exacta, expresada en moles por litro, de la solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico (4.3) utilizada;

*V*<sub>1</sub>: valor numérico del volumen, expresado en mililitros, de la solución de tiosulfato sódico (4.3) utilizada para el ensayo en blanco;

*V*<sub>2</sub>: valor numérico del volumen, expresado en mililitros, de la solución de tiosulfato sódico (4.3) utilizada para la determinación;

*p*: valor numérico del peso, expresado en gramos, de la muestra problema (7.1).

Se tomará como resultado la media aritmética de las dos determinaciones, siempre que se cumpla el requisito establecido con respecto a la repetibilidad.