

REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) N° 1348/2013 DE LA COMISIÓN

de 16 de diciembre de 2013

que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) n° 1234/2007 del Consejo, de 22 de octubre de 2007, por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM) ⁽¹⁾, y en particular su artículo 113, apartado 1, letra a), y el artículo 121, párrafo primero, letras a) y h), leídos en relación con su artículo 4,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CEE) n° 2568/91 de la Comisión ⁽²⁾ define las características químicas y organolépticas de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva, así como los métodos de evaluación de tales características. Estos métodos deben actualizarse teniendo en cuenta la opinión de los expertos químicos y en consonancia con los trabajos efectuados en el marco del Consejo Oleícola Internacional (en lo sucesivo, «COI»).
- (2) A fin de garantizar la aplicación a nivel de la Unión de las normas internacionales más recientes establecidas por el COI, deben adaptarse determinados métodos de análisis, así como ciertos valores límite para las características de los aceites establecidas en el Reglamento (CEE) n° 2568/91.
- (3) Por tanto, deben adaptarse los valores límite para estigmadienos, ceras, ácidos mirísticos y ésteres monoalquílicos de ácidos grasos y deben modificarse en consecuencia determinados esquemas de decisiones para comprobar si una muestra de aceite de oliva es conforme con la categoría declarada. Se deben introducir esquemas de decisiones para el campesterol y el delta-7-estigmastenol acompañados por parámetros más restrictivos a fin de facilitar la comercialización y garantizar la autenticidad del aceite de oliva, en interés de la protección de los consumidores. El método de análisis relacionado con la composición y el contenido de esteroides y la determinación del eritrodilol y el uvaol se debe sustituir por un método más fiable que también cubra los alcoholes triterpénicos. También es apropiado revisar la valoración organoléptica del aceite de oliva e introducir un método que permita detectar aceites vegetales ajenos en los aceites de oliva.
- (4) A la luz de los avances relacionados con los procedimientos de las comprobaciones de conformidad de los aceites, el método de toma de muestras del aceite de oliva y los orujos de aceite de oliva debe adaptarse en consecuencia.
- (5) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CEE) n° 2568/91 en consecuencia.
- (6) A fin de permitir un periodo de ajuste a la nueva normativa, dar tiempo para la introducción de los medios para aplicarla y evitar distorsiones en las transacciones comerciales, las modificaciones introducidas por el presente Reglamento deben aplicarse a partir del 1 de marzo de 2014. Por los mismos motivos, se deben adoptar las medidas necesarias para que los productos que se hayan fabricado y etiquetado legalmente en la Unión o se hayan importado legalmente en la Unión y despachado a libre práctica puedan comercializarse hasta que se agoten las existencias.
- (7) Las medidas previstas en el presente Reglamento son conformes con el dictamen del Comité de Gestión de la Organización Común de Mercados.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El Reglamento (CEE) n° 2568/91 se modifica como sigue:

- (1) El artículo 2 se sustituye por el texto siguiente:

«Artículo 2

1. Las características de los aceites, previstas en el anexo I, se determinarán empleando los métodos de análisis siguientes:
 - a) para determinar los ácidos grasos libres, expresados en porcentaje de ácido oleico, el método recogido en el anexo II;
 - b) para determinar el índice de peróxidos, el método recogido en el anexo III;
 - c) para determinar el contenido de ceras, el método recogido en el anexo IV;
 - d) para determinar la composición y el contenido de esteroides y dialcoholes triterpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar, el método recogido en el anexo V;
 - e) para determinar el porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo, el método recogido en el anexo VII;
 - f) para el análisis espectrofotométrico, el método recogido en el anexo IX;
 - g) para determinar la composición de ácidos grasos, el método recogido en los anexos X «A» y X «B»;
 - h) para determinar los disolventes halogenados volátiles, el método recogido en el anexo XI;

⁽¹⁾ DO L 299 de 16.11.2007, p. 1.

⁽²⁾ 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 (DO L 248 de 5.9.1991, p. 1).

- i) para la valoración de las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes, el método recogido en el anexo XII;
- j) para determinar los estigmastadienos, el método recogido en el anexo XVII;
- k) para determinar el contenido de triglicéridos con ECN42, el método que figura en el anexo XVIII;
- l) para determinar el contenido de alcoholes alifáticos, el método recogido en el anexo XIX;
- m) para determinar el contenido en ceras y en ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos, el método previsto en el anexo XX.

A fin de detectar la presencia de aceites vegetales ajenos en los aceites de oliva, se aplicará el método de análisis recogido en el anexo XX bis.

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

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

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

3. En lo tocante a la comprobación por las autoridades nacionales o sus representantes de las características de los aceites previstas en el apartado 1, la toma de muestras se efectuará de acuerdo con las normas internacionales EN ISO 661 y EN ISO 5555 relativas a la preparación de las muestras y al muestreo, respectivamente. Ahora bien, no obstante lo dispuesto en el punto 6.8 de la norma EN ISO 5555, respecto de los lotes de esos aceites presentados en envases inmediatos, la toma de muestras se realizará de acuerdo con el anexo I bis del presente Reglamento. En el caso de los aceites a granel para los que la toma de muestras no se pueda efectuar conforme a EN ISO 5555, dicha toma de muestras se realizará de conformidad con las instrucciones proporcionadas por la autoridad competente del Estado miembro.

Sin perjuicio de lo dispuesto en la norma EN ISO 5555 y en el capítulo 6 de la norma EN ISO 661, las muestras deberán guardarse lo antes posible en un lugar protegido de la luz y de las elevadas temperaturas y enviarse al laboratorio para la realización de los análisis a más tardar el quinto día hábil siguiente al de la toma de las muestras; de lo contrario, estas se deberán guardar de tal modo que no resulten deterioradas o dañadas durante el transporte o el almacenaje antes de ser enviadas al laboratorio.

4. Para la comprobación prevista en el apartado 3, los análisis a que se refieren los anexos II, III, IX, XII y XX así como, en su caso, los análisis contradictorios previstos por las legislaciones nacionales, se efectuarán antes de la fecha de caducidad mínima en el caso de los productos envasados. En el caso de la toma de muestras de aceites a granel, los análisis deberán llevarse a cabo a más tardar seis meses después del mes en que se tomó la muestra.

No se aplicará ningún plazo a los demás análisis previstos por el presente Reglamento.

Excepto si la toma de muestras se ha efectuado menos de dos meses antes de la fecha de caducidad mínima, en caso de que los resultados de los análisis no se ajusten a las características de la categoría de aceite de oliva o de orujo de oliva declarada, se notificará este extremo al interesado como muy tarde un mes antes de que finalice el plazo mencionado en el párrafo primero.

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

- 2) El anexo I se sustituye por el texto establecido en el anexo I del presente Reglamento.
- 3) El anexo I bis se sustituye por el texto establecido en el anexo II del presente Reglamento.
- 4) Al anexo I ter se sustituye por el texto establecido en el anexo III del presente Reglamento.
- 5) El anexo V se sustituye por el texto establecido en el anexo IV del presente Reglamento.
- 6) Se suprime el anexo VI.
- 7) El anexo XII se sustituye por el texto establecido en el anexo V del presente Reglamento.
- 8) El anexo XX bis, cuyo texto se establece en el anexo VI del presente Reglamento, se inserta después del anexo XX.

Artículo 2

Los productos que se hayan fabricado y etiquetado legalmente en la Unión o se hayan importado legalmente en la Unión y despachado a libre práctica antes del 1 de marzo de 2014 podrán comercializarse hasta que se agoten las existencias.

Artículo 3

El presente Reglamento entrará en vigor el séptimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 1 de marzo de 2014.

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

Hecho en Bruselas, el 16 de diciembre de 2013.

Por la Comisión
El Presidente
José Manuel BARROSO

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

Categoría	Ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) mg/kg (*)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxido mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadienos mg/kg (1)	Diferencia: ECN 42 (HPLC) y ECN 42 (2) (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ o K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del frutado (Mf) (*)
1. Aceite de oliva virgen extra	FAEEs ≤ 40 (campana 2013-2014) (3) FAEEs ≤ 35 (campana 2014-2015) FAEEs ≤ 30 (campanas posteriores a 2015)	≤ 0,8	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							
2. Aceite de oliva virgen	—	≤ 2,0	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							
3. Aceite de oliva lampante	—	> 2,0	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 300 (4)	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (5)	—
					≤ 1,1 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							
4. Aceite de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							

Categoría	Ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) mg/kg (*)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxido mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadienos mg/kg (1)	Diferencia: ECN 42 (HPLC) y ECN 42 (2) (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ o K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del frutado (Mf) (*)
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 % ≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico es > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Aceite de orujo de oliva crudo	—	—	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350 (6)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Aceite de orujo de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Aceite de orujo de oliva	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Total de isómeros que han podido (o no han podido) separarse con columna capilar.

(2) El aceite de oliva debe estar en conformidad con el método establecido en el anexo XX bis.

(3) Este límite se aplica a los aceites de oliva producidos a partir del 1 de marzo de 2014.

(4) Se considera que los aceites con un contenido de ceras entre 300 mg/kg y 350 mg/kg son aceites de oliva lampantes si el contenido total de alcoholes alifáticos es inferior o igual a 350 mg/kg o si el contenido de eritrodil y uvaol es inferior o igual al 3,5 %.

(5) O cuando la mediana de los defectos es superior a 3,5 o la mediana de los defectos es inferior o igual a 3,5 y la mediana del atributo frutado es igual a 0.

(6) Se considera que los aceites con un contenido de ceras entre 300 mg/kg y 350 mg/kg son aceites de orujo de oliva crudos si el contenido total de alcoholes alifáticos es superior a 350 mg/kg y si el contenido de eritrodil y uvaol es superior al 3,5 %.

Categoría	Composición de ácidos grasos (1)							Sumas de los isómeros transoleicos (%)	Sumas de los isómeros translinoleicos + translinoléicos (%)	Composición de los esteroides					Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodil y uvaol (%) (**)
	Mirístico (%)	Linoléico (%)	Araquídico (%)	Eicosenoico (%)	Behénico (%)	Lignocérico (%)	Colesterol (%)			Brasicasterol (%)	Campesterol (2) (%)	Estigmasterol (%)	β-sitosterol aparente (%) (3)	Delta-7-estigmatenol (2) (%)		
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Aceite de oliva lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (4)
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5

Categoría	Composición de ácidos grasos ⁽¹⁾						Sumas de los isómeros transoleicos (%)	Sumas de los isómeros translinoleicos + translinoléicos (%)	Composición de los esteroides					Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodiol y uvaol (%) ^(**)	
	Mirístico (%)	Linoléico (%)	Araquídico (%)	Eicoenoico (%)	Behénico (%)	Lignocérico (%)			Colesterol (%)	Brasicaesterol (%)	Camposterol ⁽²⁾ (%)	Estigmasterol (%)	β-sitosterol aparente ⁽³⁾ (%)			Delta-7-estigmastenol ⁽²⁾ (%)
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Aceite de orujo de oliva crudo	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁵⁾
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Contenido de otros ácidos grasos (%): palmítico: 7,50-20,00; palmitoleico: 0,30-3,50; heptadecanoico: ≤ 0,30; heptadecenoico: ≤ 0,30; esteárico: 0,50-5,00; oleico: 55,00-83,00; linoleico: 3,50-21,00.

⁽²⁾ Véase el apéndice del presente anexo.

⁽³⁾ β-sitosterol aparente: delta-5,23-estigmastadienol + clerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

⁽⁴⁾ Se considera que los aceites con un contenido de ceras entre 300 mg/kg y 350 mg/kg son aceites de oliva lampantes si el contenido total de alcoholes alifáticos es inferior o igual a 350 mg/kg o si el contenido de eritrodiol y uvaol es inferior o igual al 3,5 %.

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

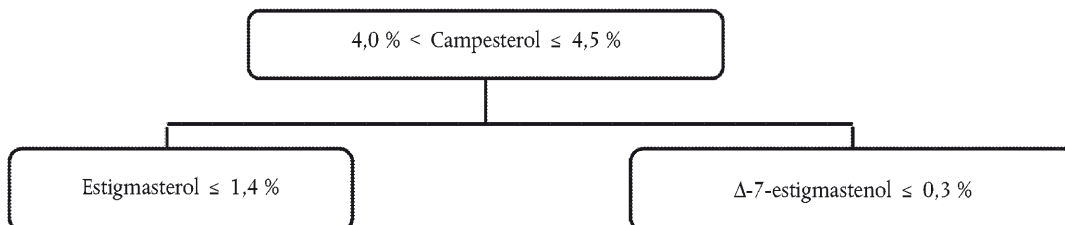
Notas:

- Los resultados de los análisis deben expresarse indicando el mismo número de decimales que el previsto para cada característica. La última cifra expresada deberá redondearse hacia arriba si la cifra siguiente es superior a 4.
- Es suficiente con que una sola de las características no se ajuste a los valores indicados para que el aceite cambie de categoría o se declare no conforme en cuanto a su pureza, a efectos del presente Reglamento.
- Las características indicadas con un asterisco (*), relativas a la calidad del aceite, implican lo siguiente: - en el caso del aceite de oliva lampante, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes; - en el caso de los aceites de oliva vírgenes, el incumplimiento de al menos uno de estos límites supondrá un cambio de categoría, aunque seguirán clasificándose en una de las categorías de los aceites de oliva vírgenes.
- Las características indicadas con dos asteriscos (**) implican que, en el caso de todos los aceites de orujo de oliva, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes.

Apéndice

Árbol de decisiones

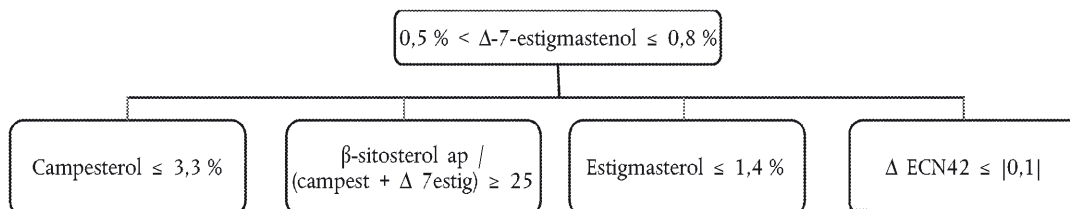
Árbol de decisiones del **campesterol** para los aceites de oliva virgen y virgen extra:



Los restantes parámetros se adaptarán a los límites que establece el presente Reglamento.

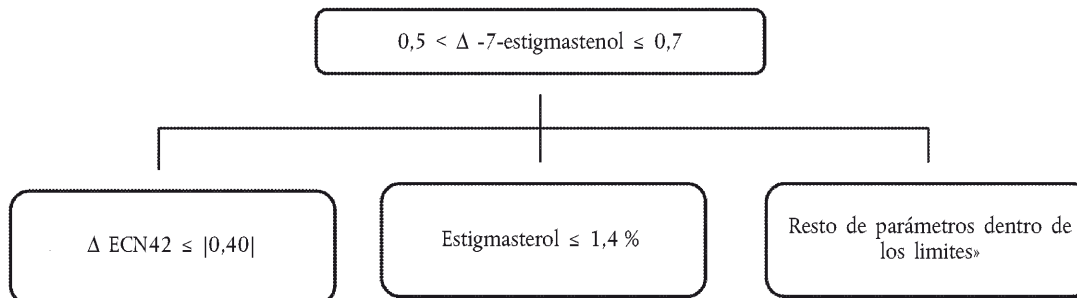
Árbol de decisiones del **delta-7-estigmasterol** para:

— Los aceites de oliva virgen y virgen extra



Los restantes parámetros se adaptarán a los límites que establece el presente Reglamento.

— Aceites de orujo de oliva (crudo y refinado)



ANEXO II

«ANEXO I BIS

MUESTREO DE ACEITE DE OLIVA O ACEITE DE ORUJO DE OLIVA ENTREGADO EN ENVASES INMEDIATOS

Este método de muestreo se aplica a lotes de aceite de oliva o aceite de orujo de oliva que se presenten en envases inmediatos. Se aplicarán distintos métodos de muestreo, en función de si los envases inmediatos superan o no los 5 litros.

Se entenderá por «lote» un conjunto de unidades de venta que se hayan producido, fabricado y envasado en circunstancias tales que el aceite contenido en cada una de dichas unidades de venta se considere homogéneo en lo que se refiere a sus características analíticas. La individualización de un lote debe hacerse de conformidad con la Directiva 2011/91/UE del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹⁾.

Se entenderá por «porción» la cantidad de aceite que contiene un envase inmediato tomada aleatoriamente del lote.

1. CONTENIDO DE UNA MUESTRA ELEMENTAL

1.1. Envases inmediatos de 5 litros como máximo

Se entenderá por «muestra elemental» para los envases inmediatos de 5 litros como máximo el número de porciones tomadas de un lote y de acuerdo con el cuadro 1.

Cuadro 1

El tamaño mínimo de las muestras elementales consistirá en lo siguiente

En caso de que los envases inmediatos tengan una capacidad	La muestra elemental debe extraerse del aceite de
a) superior o igual a 1 litro	a) un envase inmediato
b) inferior a 1 litro	b) el número mínimo de envases cuya capacidad total sea de al menos 1,0 litro

Cada Estado miembro podrá incrementar el número de envases a los que se hace referencia en el cuadro 1 que constituyan una muestra elemental, en función de sus necesidades específicas (por ejemplo, en caso de valoración organoléptica por parte de un laboratorio distinto del que llevó a cabo los análisis químicos, análisis contradictorios, etc.).

1.2. Envases inmediatos de más de 5 litros

Se entenderá por «muestra elemental» para los envases inmediatos de más de 5 litros una parte representativa del total de porciones, obtenida mediante un proceso de reducción y de acuerdo con el cuadro 2. La muestra elemental debe estar constituida por varios ejemplos.

Se entenderá por «ejemplo» cada uno de los envases que componen la muestra elemental.

Cuadro 2

Número mínimo de porciones que elegir

Número de envases de que consta el lote	Número mínimo de porciones que elegir
Hasta 10	1
De 11 a 150	2
De 151 a 500	3
De 501 a 1 500	4
De 1 501 a 2 500	5
> 2 500 por cada 1 000 envases	1 porción más

⁽¹⁾ Directiva 2011/91/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de diciembre de 2011, relativa a las menciones o marcas que permitan identificar el lote al que pertenece un producto alimenticio (DO L 334 de 16.12.2011, p. 1).

Con objeto de reducir el volumen del muestreo de envases inmediatos, el contenido de las porciones de muestreo es homogeneizado para preparar la muestra elemental. Las partes de las distintas porciones se pasan a un recipiente común para ser homogeneizadas mediante agitación, con el fin de evitar al máximo el contacto con el aire.

El contenido de la muestra elemental se pasará a una serie de envases con una capacidad mínima de 1,0 litro, cada una de las cuales constituye un ejemplo de la muestra elemental.

Cada Estado miembro puede incrementar el número de muestras elementales en función de sus necesidades específicas (por ejemplo, la valoración organoléptica por parte de un laboratorio distinto del que llevó a cabo los análisis químicos, análisis contradictorios, etc.).

Cada uno de los envases debe rellenarse de forma que se minimice la capa de aire superior, para posteriormente ser cerrado y sellado de forma que garantice que el producto es inalterable.

Estos ejemplos deben estar etiquetados para garantizar su correcta identificación.

2. ANÁLISIS Y RESULTADOS

- 2.1. Cada muestra elemental debe subdividirse en muestras de laboratorio, con arreglo al punto 2.5 de la norma ISO 5555, y analizarse según el orden que se indica en el árbol de decisiones recogido en el anexo I *ter* o a cualquier otro orden aleatorio.
- 2.2. En caso de que todos los resultados de los análisis se ajusten a las características de la categoría de aceite declarada, todo el lote se declarará conforme.

Si un solo resultado de los análisis no se ajusta a las características de la categoría de aceite declarada, todo el lote se declarará no conforme.

3. VERIFICACIÓN DE LA CATEGORÍA DE LOTE

- 3.1. Con objeto de verificar la categoría del lote, las autoridades competentes podrán aumentar el número de muestras elementales tomadas en distintos puntos del lote con arreglo al siguiente cuadro:

Cuadro 3

Número de muestras elementales en función del tamaño del lote

Tamaño del lote (litros)	Número de muestras elementales
Inferior a 7 500	2
Entre 7 500 e inferior a 25 000	3
Entre 25 000 e inferior a 75 000	4
Entre 75 000 e inferior a 125 000	5
Igual y superior a 125 000	6 + 1 por cada 50 000 litros adicionales

Cada porción que constituya una muestra elemental deberá tomarse en un lugar continuo del lote; es necesario tomar nota de la ubicación de cada muestra elemental e identificarla de forma inequívoca.

Cada muestra elemental debe formarse con arreglo a los procedimientos mencionados en los puntos 1.1 y 1.2.

Posteriormente cada una de las muestras elementales es sometida a los análisis que se mencionan en el artículo 2, apartado 1.

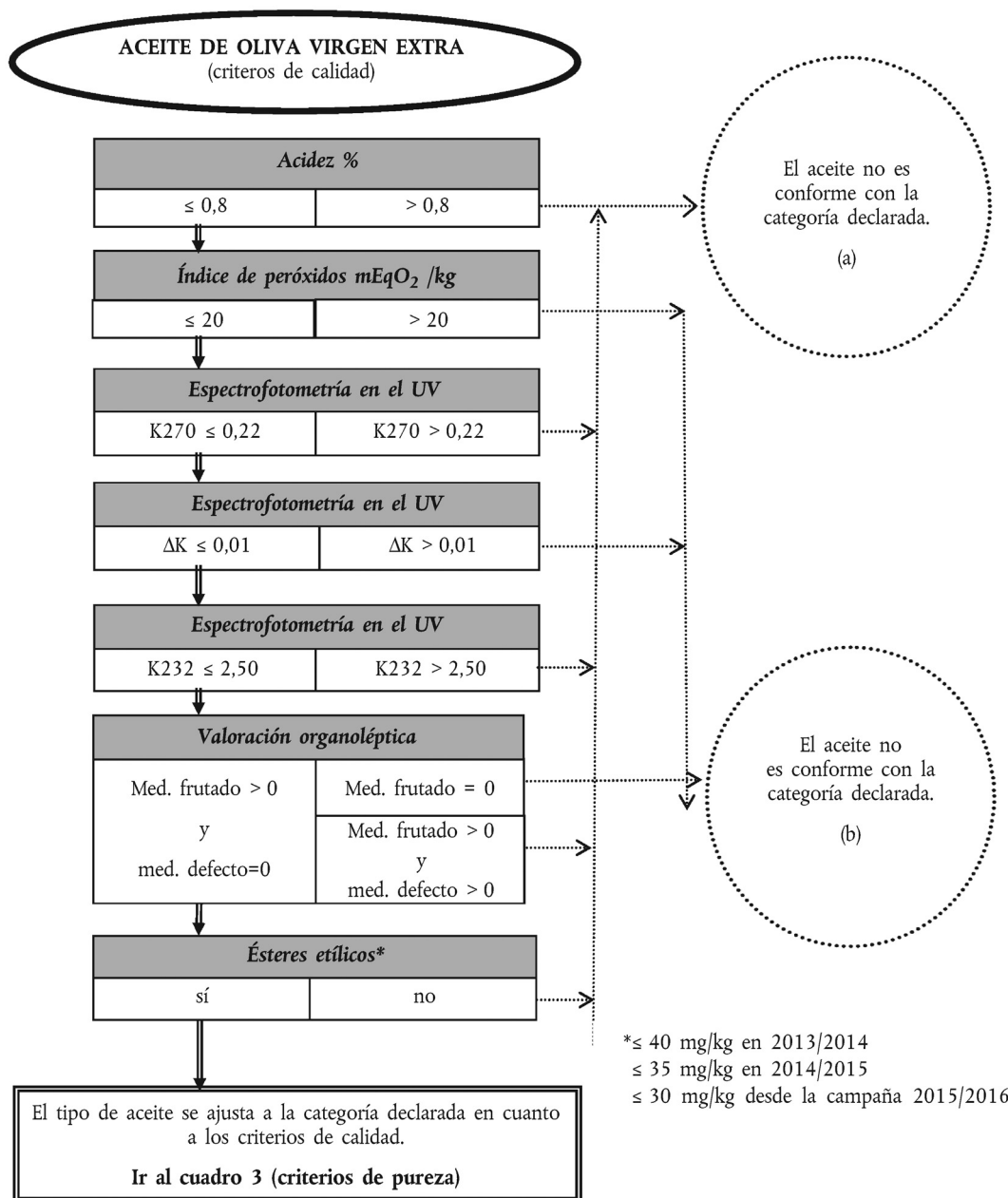
- 3.2. Cuando uno de los resultados de los análisis a los que se hace referencia en el artículo 2, apartado 1, de al menos una de las muestras elementales no se ajuste a las características de la categoría de aceite declarada, todo el lote muestreado se declarará no conforme.»

ANEXO III

«ANEXO I ter

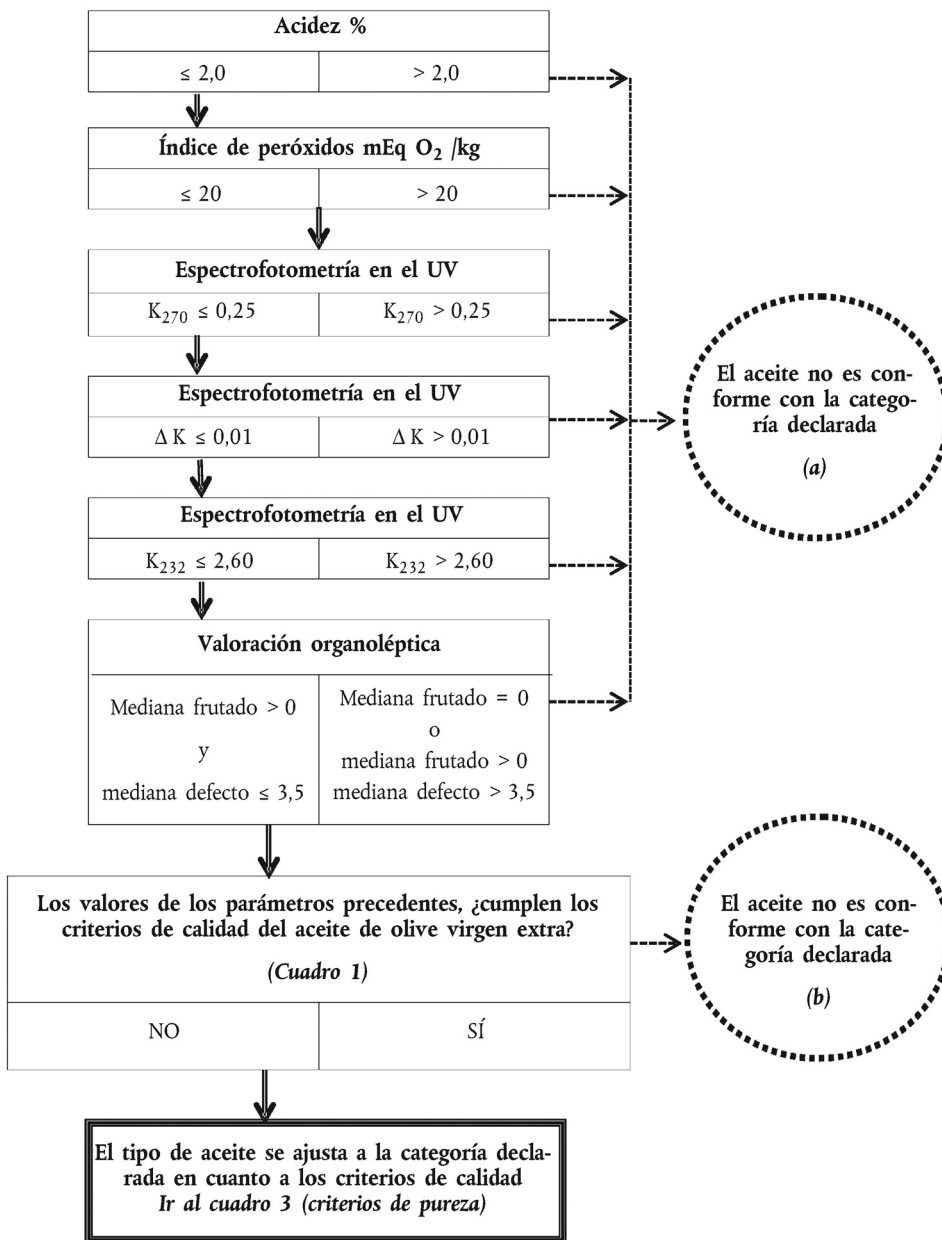
ESQUEMA DE DECISIONES PARA LA COMPROBACIÓN DE LA CONFORMIDAD DE UNA MUESTRA DE ACEITE DE OLIVA CON LA CATEGORÍA DECLARADA

Cuadro 1

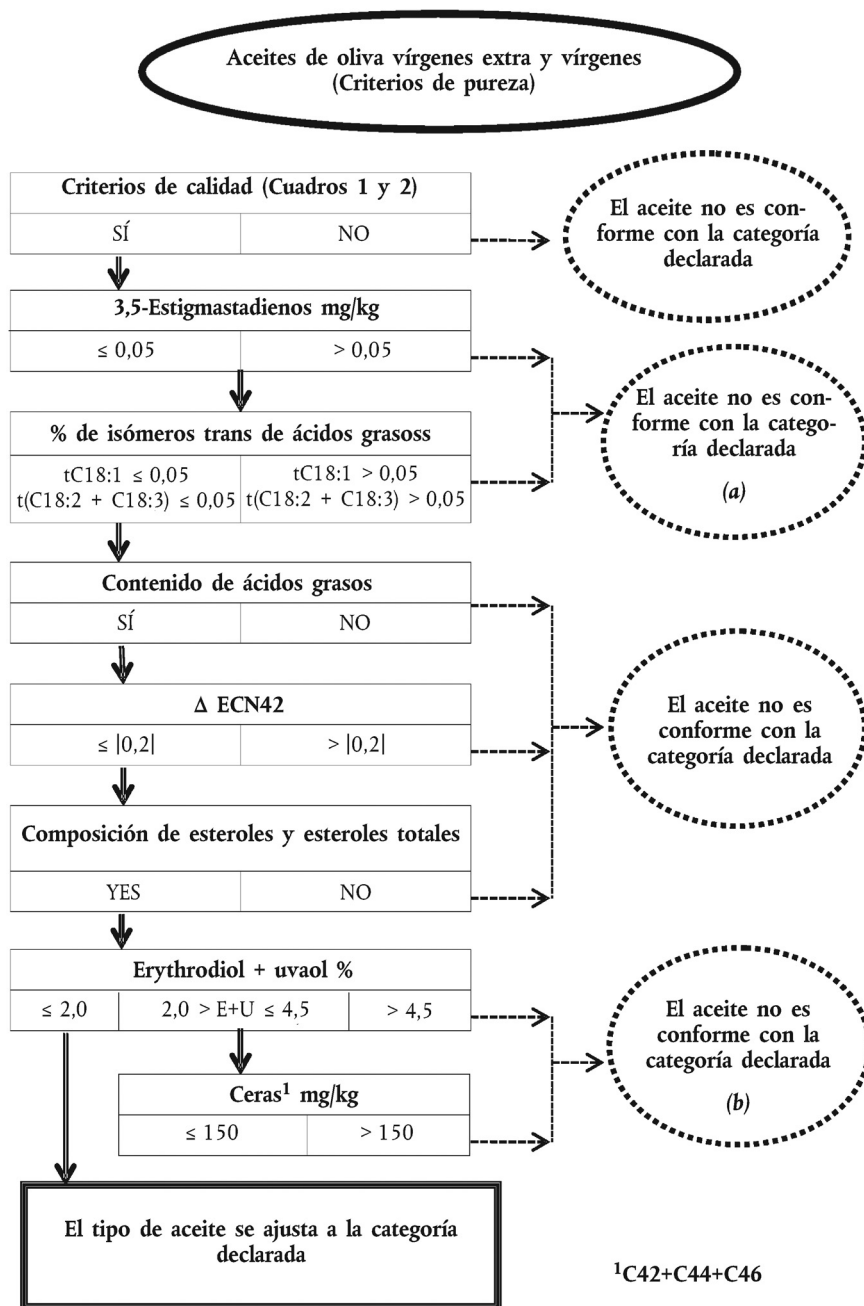


Cuadro 2

**Aceites de oliva vírgenes
(Criterios de calidad)**



Cuadro 3



Apéndice I

Correspondencia entre los anexos del presente Reglamento y los análisis previstos en el árbol de decisiones

— Acidez	Anexo II	Determinación de los ácidos grasos libres, método en frío
— Índice de peróxidos	Anexo III	Determinación del índice de peróxidos
— Espectrofotometría en el ultravioleta	Anexo IX	Prueba espectrofotométrica
— Valoración organoléptica	Anexo XII	Valoración organoléptica de los aceites de oliva vírgenes
— Ésteres etílicos	Anexo XX	Método para la determinación del contenido en ceras y en ésteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases con columna capilar
— Estigmasta-3,5-dienos	Anexo XVII	Método para la determinación de los estigmastadienos en los aceites vegetales
— Isómeros <i>trans</i> de ácidos grasos	Anexo X A y	Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases
	Anexo X B	Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos
— Contenido de ácidos grasos	Anexo X A y	Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases
	Anexo X B	Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos
— ΔECN42	Anexo XVIII	Determinación del contenido de triglicéridos con ECN42 (diferencia entre composición real y composición teórica)
— Composición esterólica y esteroides totales — Eritrodiol y uvaol	Anexo V	Determinación de la composición y del contenido de esteroides y dialcoholes triperpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar
— Ceras	Anexo IV	Determinación del contenido de ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar
— Alcoholes alifáticos	Anexo XIX	Determinación del contenido de alcoholes alifáticos mediante cromatografía de gases con columna capilar
— Ácidos grasos saturados en la posición 2	Anexo VII	Determinación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo»

ANEXO IV

«ANEXO V

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

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método describe un procedimiento para determinar el contenido individual y total de esteroides y de dialcoholes triterpénicos de los aceites de oliva y de orujo.

2. PRINCIPIO

Los aceites, con α -colestanol añadido como patrón interno, se saponifican con hidróxido potásico en solución etanólica y la materia insaponificable se extrae entonces con éter de etilo.

La fracción de esteroides y de dialcoholes triterpénicos se separa de la materia insaponificable mediante cromatografía en capa fina con una placa de gel de sílice básico. Las fracciones recuperadas del gel de sílice se transforman en éteres de trimetilsililo y se analizan entonces con cromatografía de gases con columna capilar.

3. APARATOS

El equipo de laboratorio habitual y, en particular, lo siguiente:

- 3.1. Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
 - 3.2. Ampolla de decantación de 500 ml.
 - 3.3. Matraces de 250 ml.
 - 3.4. Aparato completo para análisis mediante cromatografía en capa fina usando placas de vidrio de 20 × 20 cm.
 - 3.5. Lámpara ultravioleta con longitud de onda de 254 o 366 nm.
 - 3.6. Microjeringas de 100 μ l y 500 μ l.
 - 3.7. Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso G3 (porosidad 15-40 μ m) con un diámetro aproximado de 2 cm y una profundidad de 5 cm, apropiado para filtraciones al vacío, con junta esmerilada macho.
 - 3.8. Matraz cónico de vacío de 50 ml, con junta esmerilada hembra acoplable al embudo filtrante (punto 3.7).
 - 3.9. Tubo de ensayo de 10 ml con fondo cónico y tapón de vidrio de cierre hermético.
 - 3.10. Cromatógrafo de gases adecuado para su uso con columna capilar con inyector de fraccionamiento de flujo (split) formado por:
 - 3.10.1. Una cámara para columnas capaz de mantener la temperatura deseada con una precisión de ± 1 °C.
 - 3.10.2. Inyector termorregulable con elemento vaporizador de vidrio persilanizado y divisor.
 - 3.10.3. Detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés).
 - 3.10.4. Sistema de captura de datos para uso con el detector FID (punto 3.10.3), capaz de integrarse manualmente.
 - 3.11. Columna capilar de sílice fundida, de 20 a 30 m de longitud y de 0,25 a 0,32 mm de diámetro interno, recubierta con difenil (5%) y dimetilpolisiloxano (95%) (fase estacionaria SE 52 o SE 54 o equivalente), con un espesor uniforme que oscile entre 0,10 y 0,30 μ m.
 - 3.12. Microjeringa, de 10 μ l de capacidad, para cromatografía de gases, con aguja fija apropiada para división de flujo.
 - 3.13. Desecador de dicloruro de calcio.
4. REACTIVOS
- 4.1. Hidróxido potásico (pureza mínima del 85 %).

- 4.2. Hidróxido potásico, solución etanólica 2 N, aproximadamente:
Disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (punto 4.1) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol (punto 4.10). Conservar la solución en botellas de vidrio oscuro bien cerradas y almacenarla un máximo de dos días.
- 4.3. Éter etílico de calidad para análisis.
- 4.4. Hidróxido potásico, solución etanólica 0,2 N, aproximadamente:
Disolver 13 g de hidróxido potásico (punto 4.1) en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol (punto 4.10).
- 4.5. Sulfato sódico anhidro, de calidad para análisis.
- 4.6. Placas de vidrio (20 × 20 cm) recubiertas con gel de sílice, sin indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor (disponibles en el comercio ya preparadas para el uso).
- 4.7. Tolueno, de calidad para cromatografía.
- 4.8. Acetona, de calidad para cromatografía.
- 4.9. n-Hexano, de calidad para cromatografía.
- 4.10. Éter etílico, de calidad para cromatografía.
- 4.11. Etanol, de calidad para análisis.
- 4.12. Acetato de etilo, de calidad para análisis.
- 4.13. Solución de referencia para cromatografía en capa fina: colesterol o fitoesteres, y solución de eritrodiol al 5 % en acetato de etilo (punto 4.11).
- 4.14. Solución de 2,7-diclorofluoresceína al 0,2 % en etanol. Para hacerla ligeramente básica se añaden algunas gotas de solución alcohólica 2 N de hidróxido potásico (punto 4.2).
- 4.15. Piridina anhidra, de calidad para cromatografía (véase nota 5).
- 4.16. Hexametildisilazano, de calidad para análisis.
- 4.17. Trimetilclorosilano, de calidad para análisis.
- 4.18. Solución patrón de los trimetilsililéteres de esteroides:
Preparar en el momento del uso a partir de esteroides y eritrodiol obtenidos de aceites que los contengan.
- 4.19. α -Colesterol, de pureza superior al 99 % (hay que comprobar la pureza mediante cromatografía de gases).
- 4.20. α -Colesterol, disolución al 0,2 % (m/V) como patrón interno en acetato de etilo (punto 4.11).
- 4.21. Solución de fenoltaleína, 10 g/L en etanol (punto 4.10).
- 4.22. Gas portador: hidrógeno o helio, de calidad para cromatografía de gases.
- 4.23. Gases auxiliares: hidrógeno, helio, nitrógeno y aire, de calidad para cromatografía de gases.
- 4.24. Mezcla de n-hexano (punto 4.9)/éter etílico (punto 4.10) 65:35 (V/V).
- 4.25. Reactivo de sililación, consiste en una mezcla 9:3:1 (V/V/V) de piridina/hexametildisilazano/trimetilclorosilano.

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. Preparación del insaponificable.
- 5.1.1. Con una microjeringa de 500 μ l (punto 3.6) introducir en el matraz de 250 ml (punto 3.1) un volumen de solución de patrón interno de α -colesterol (punto 4.20) que contenga una cantidad de colesterol correspondiente a aproximadamente el 10 % del contenido de esteroles de la muestra. Por ejemplo, para una muestra de aceite de oliva de 5 g añadir 500 μ l de la solución de α -colesterol (punto 4.20) y 1 500 μ l para el aceite de orujo. Evaporar hasta secar mediante una ligera corriente de nitrógeno en un baño de agua templado y, después de enfriar el matraz, poner $5 \pm 0,01$ g de muestra filtrada seca en el mismo matraz.

Nota 1: 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 colesterol. 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 2 N (punto 4.2) y algo de piedra pómez, ajustar el condensador de reflujo y calentar a ebullición suave hasta que tenga lugar la saponificación (la solución se vuelve incolora). Calentar durante 20 minutos más y, a continuación, añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del condensador; separar el condensador y enfriar el matraz a 30 °C aproximadamente.
- 5.1.3. Pasar el contenido del matraz cuantitativamente a una ampolla de decantación de 500 ml (punto 3.2) usando varias fracciones de agua destilada (50 ml). Añadir aproximadamente 80 ml de éter etílico (punto 4.10) y agitar con fuerza aproximadamente durante 60 segundos con liberación periódica de la presión invirtiendo la ampolla de decantación y abriendo la llave. Dejarla en reposo hasta que se produzca una completa separación en dos fases (nota 2).

Retirar entonces la solución de jabón lo más exhaustivamente posible y pasar a una segunda ampolla de decantación. Efectuar otras dos extracciones de la fase hidroalcohólica por el mismo procedimiento, utilizando cada vez de 60 a 70 ml de éter etílico (punto 4.10).

Nota 2: Las emulsiones pueden eliminarse añadiendo pequeñas cantidades de etanol (punto 4.11).

- 5.1.4. Combinar las tres extracciones de éter en una sola ampolla de decantación que contenga 50 ml de agua. Continuar lavando con agua (50 ml) hasta que el agua de lavado no adquiera un color rosa al añadirle una gota de solución de fenoltaleína (punto 4.21).

Una vez eliminada el agua de lavado, filtrar con sulfato sódico anhidro (punto 4.5) a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando el embudo y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico (punto 4.10).

- 5.1.5. Evaporar el disolvente mediante su destilación en un rotavapor a 30 °C al vacío. Añadir 5 ml de acetona y eliminar totalmente el disolvente volátil con una ligera corriente de aire. Secar el residuo en el horno a 103 ± 2 °C durante 15 min. Enfriar en desecador y pesar con precisión de 0,1 mg.

- 5.2. Separación de la fracción de esterol y dialcoholes triterpénicos (eritrodol + uvaol)

- 5.2.1. Preparación de placas para cromatografía en capa fina básicas. Sumergir las placas con gel de sílice (punto 4.6) unos 4 cm en la solución etanólica 0,2 N de hidróxido potásico (punto 4.5) durante 10 segundos; dejar secar las placas en una campana durante dos horas y, por último, mantenerlas en un horno a 100 °C durante una hora.

Sacarlas del horno y conservarlas en un desecador de cloruro de calcio (punto 3.13) hasta el momento del uso (las placas sometidas a este tratamiento deben utilizarse en el plazo de quince días como máximo).

Nota 3: 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 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 triterpénicos.

- 5.2.2. Colocar la mezcla de hexano y éter etílico (punto 4.24) (nota 4) en la cubeta de desarrollo, con una profundidad aproximada de 1 cm. Cerrar la cubeta con la tapa adecuada y dejarla así durante al menos media hora, en un lugar frío, de manera que se establezca el equilibrio líquido-vapor; se pueden colocar tiras de papel de filtro que se sumerjan en el eluyente en las caras interiores de la cubeta. 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 4: A fin de que las condiciones de elución sean perfectamente reproducibles, la mezcla de desarrollo debe cambiarse en cada prueba. Alternativamente, se puede utilizar una mezcla de n-hexano/éter etílico 50:50 (V/V).

- 5.2.3. Preparar una solución del insaponificable (punto 5.1.5) al 5 % aproximadamente en acetato de etilo (punto 4.12) y, utilizando una microjeringa de 100 µl, depositar 0,3 ml de solución sobre una línea fina e uniforme en el extremo inferior (2 cm) de la placa cromatográfica (punto 5.2.1). Paralela a esta línea, colocar de 2 a 3 µl de la solución de referencia (punto 4.13), de manera que pueda identificarse la banda de esterol y de dialcoholes triterpénicos después del desarrollo.

- 5.2.4. Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, preparada como se indica en el punto 5.2.2. Deberá mantenerse a una temperatura ambiente entre 15 y 20 °C (nota 5). 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.

Nota 5: Una temperatura más alta podría perjudicar la separación.

5.2.5. Pulverizar la placa ligera y uniformemente con la solución de 2,7-diclorofluoresceína (punto 4.14) y dejarla secar. Al examinar la placa a la luz ultravioleta pueden identificarse las bandas de esteroides y dialcoholes triperpénicos mediante comparación con las manchas obtenidas a partir de la solución de referencia (punto 4.13). Marcar con lápiz negro los límites de las bandas a lo largo de los márgenes de fluorescencia (véase la placa de la figura 3).

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 (punto 3.7); añadir 10 ml de acetato de etilo caliente (punto 4.12), mezclar cuidadosamente con la espátula metálica y filtrar en vacío, recogiendo el filtrado en el matraz cónico (punto 3.8) acoplado al embudo filtrante.

Lavar el residuo en el matraz tres veces con éter etílico (punto 4.3) (empleando cada vez unos 10 ml), recogiendo el filtrado en el mismo matraz 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 (punto 3.9) previamente pesado, evaporar hasta secar mediante calentamiento suave en corriente ligera de nitrógeno, recubrir con algunas gotas de acetona (punto 4.8), evaporar de nuevo hasta secar.

El residuo que queda en el tubo de ensayo debe estar formado por la fracción de esteroides y de dialcoholes triperpénicos.

5.3. Preparación de los trimetilsililéteres.

5.3.1. Añadir al tubo que contiene la fracción de esteroides y triterpenos el reactivo de sililación (punto 4.25) (nota 6) a razón de 50 µl por miligramo de esteroides y dialcoholes triterpénicos, evitando toda absorción de humedad (nota 7).

Nota 6: Existen soluciones comerciales listas para usar. Además, también existen otros reactivos de sililación, como la bis-trimetilsililtrifluoroacetamida + trimetilclorosilano al 1 %, que se diluye en el mismo volumen de piridina anhidra.

La piridina se puede sustituir por la misma cantidad de acetonitrilo.

5.3.2. Tapar el tubo y agitar cuidadosamente (sin invertir) hasta la completa disolución de los compuestos. Dejarlo en reposo durante al menos 15 min a temperatura ambiente y centrifugar durante algunos minutos; la solución límpida está lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

Nota 7: La eventual formación de una ligera opalescencia es normal y no ocasiona ninguna anomalía. La formación de una floculación blanca o la aparición de una coloración rosa es indicativa de presencia de humedad o de deterioro del reactivo. En este caso deberá repetirse la prueba (solo cuando se utilice hexametildisilazano/trimetilclorosilano).

5.4. Cromatografía de gases.

5.4.1. Operaciones preliminares: acondicionamiento de la columna capilar.

5.4.1.1. Colocar la columna (punto 3.11) en el cromatógrafo de gases conectando el extremo de entrada al inyector de fraccionamiento y el extremo de salida 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 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 8). Mantener dicha temperatura durante 2 horas como mínimo; a continuación, poner el equipo completo en condiciones de funcionamiento (regulación del flujo de gases y del fraccionamiento (*split*), ignición de la llama, conexión con el sistema informático, regulación de la temperatura de la columna, 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 8: La temperatura de acondicionamiento deberá ser siempre, como mínimo 20 °C inferior a la temperatura máxima especificada para la fase estacionaria utilizada.

5.4.2. Condiciones de funcionamiento:

5.4.2.1. Las condiciones de trabajo son las siguientes:

— temperatura de la columna: 260 ± 5 °C;

— temperatura del inyector: 280-300 °C;

— temperatura del detector: 280-300 °C;

— velocidad lineal del gas portador: helio 20 a 35 cm/s, hidrógeno 30 a 50 cm/s,

- relación de fraccionamiento (*split*) de 1/50 a 1/100;
- sensibilidad del instrumento: de 4 a 16 veces la atenuación mínima,
- sensibilidad de registro: 1 a 2 mV de fondo de escala;
- 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 gases, de modo que se obtengan cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos:

- el tiempo de retención del pico del β-sitosterol debe ser de 20 ± 5 min;
- el pico del campesterol debe ser: para el aceite de oliva (contenido medio del 3 %), 20 ± 5 % del fondo de escala; para el aceite de soja (contenido medio del 20 %), 80 ± 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 (sitostanol) 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 de la membrana del inyector y, después de 1 o 2 segundos, inyectar rápidamente; transcurridos unos 5 segundos, extraer la aguja lentamente.

También puede emplearse un inyector automático.

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

5.4.4. Identificación de los picos

Para la identificación de los diferentes picos se utilizan los tiempos de retención y la comparación con la mezcla de TMSE de los esteroides y dialcoholes triperpénicos analizada en las mismas condiciones (véase apéndice).

La elución de los esteroides y dialcoholes triperpénicos se efectúa en el orden siguiente: colesterol, brasicasterol, ergosterol, 24-metilcolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ-7-campesterol, Δ-5,23-estigmastadienol, clerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ-5-avenasterol, Δ-5,24-estigmastadienol, Δ-7-estigmastanol, Δ-7-avenasterol, eritrodol y uvaol.

En el cuadro 1 figuran los tiempos de retención correspondientes al β-sitosterol para las columnas SE 52 y SE 54.

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

5.4.5. Determinación cuantitativa.

- 5.4.5.1. Calcular las áreas de los picos del α-colestanol y de los esteroides y dialcoholes triperpénicos utilizando el sistema informático. No se tomarán en cuenta los picos de aquellos componentes que no figuren en el cuadro 1 (el ergosterol no debe calcularse). El factor de respuesta para el α-colestanol debe considerarse como 1.

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

$$\text{esterol } x = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

donde:

A_x = área del pico del esteroide x, en unidades de cuenta del sistema informático;

A_s = área del pico del α-colestanol, en unidades de cuenta del sistema informático;

m_s = peso de α-colestanol añadido, en miligramos;

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

6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- 6.1. Se expresan las concentraciones de cada uno de los esteroides en mg/kg de materia grasa y su suma como «esteroides totales».

La composición de cada uno de los esteroides y del eritrodol y uvaol debe expresarse con una cifra decimal.

La composición de los esteroides totales debe expresarse sin ningún decimal.

- 6.2. El porcentaje de cada uno de los distintos esteroides se calcula a partir de la razón entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de los esteroides y del eritrodol y uvaol.

$$\text{esterol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

donde:

A_x = área del pico de x;

ΣA = suma de las áreas de todos los picos de esteroides;

- 6.3. β -sitosterol aparente: Δ^5 -23-estigmastadienol+ clerosterol + β -sitosterol + sitostanol + Δ^5 -avenasterol + Δ^5 -24-estigmastadienol.

- 6.4. Cálculo del porcentaje de eritrodol y uvaol:

$$\text{Eritrodol} + \text{uvaol} = \frac{Er + Uv}{Er + Uv + \Sigma A} \times 100$$

Donde

ΣA = suma de las áreas de los esteroides en unidades de cuenta del sistema informático;

Er = área del eritrodol en unidades de cuenta del sistema informático;

Uv = área del uvaol en unidades de cuenta del sistema informático;

—

Apéndice

Determinación de la velocidad lineal del gas

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

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

Cuadro 1

Tiempos de retención relativos de los esteroides

Pico	Identificación		Tiempo de retención relativo	
			Columna SE 54	Columna SE 52
1	Colesterol	Δ -5-colesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	Colestanol	5 α -colestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brasicasterol	[24S]-24-metil- Δ -5,22-colestadien-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-metil- Δ -5-7-22 colestatrien 3 β -ol	0,78	0,76
4	24-Metilencolesterol	24-metilen- Δ -5,24-colestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	Campesterol	(24R)-24-metil- Δ -5-colesten-3 β -ol	0,83	0,81
6	Campestanol	(24R)-24-metil-colestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	Estigmasterol	(24S)-24-etil- Δ -5,22-colestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-Campesterol	(24R)-24-metil- Δ -7-colesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-Estigmastadienol	[24R,S]-24-etil- Δ -5,23-colestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	Clerosterol	[24S]-24-etil- Δ -5,25-colestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -Sitosterol	(24R)-24-etil- Δ -5-colesten-3 β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etil-colestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-Avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -colesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5,24-Estigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-colestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-Estigmastenol	(24R,S)-24-etil- Δ -7-colesten-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-Avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -7-colesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	Eritrodiol	5 α -olean-12-en-3 β 28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-ursen-3 β 28-diol	1,52	1,52

Figura 1

Cromatografía de gases de la fracción de esteroides y dialcoholes triperpénicos de aceite de oliva lampante (con ayuda de patrón interno)

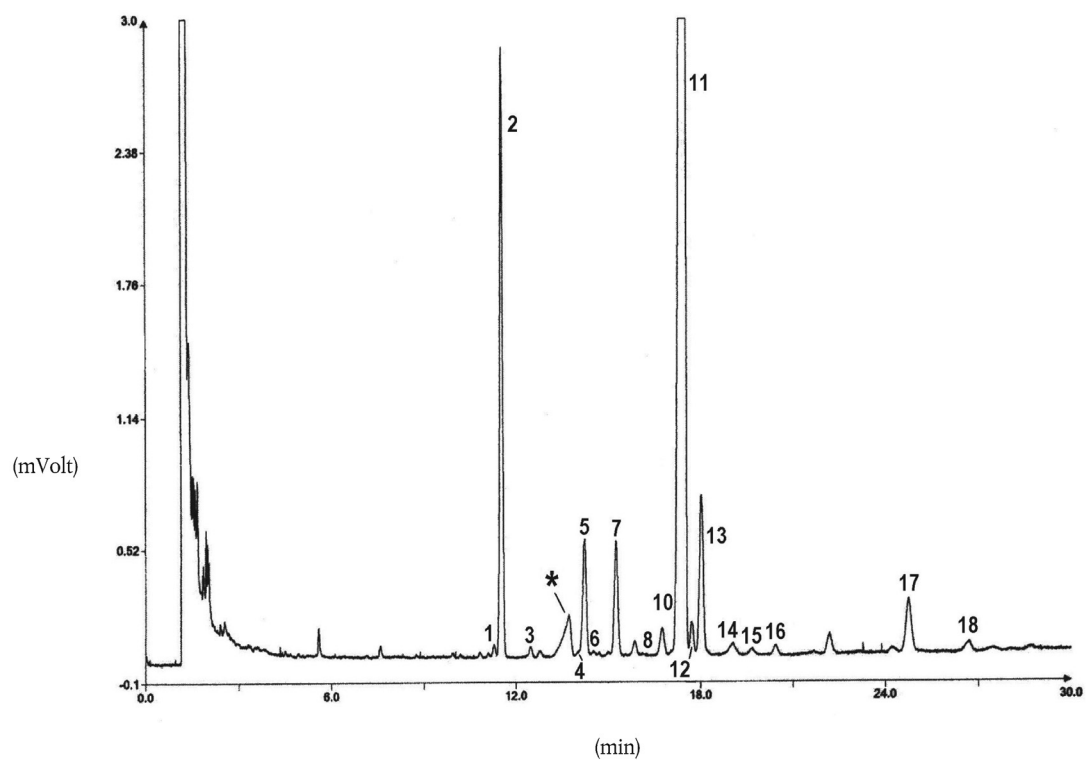


Figura 2

Cromatografía de gases de la fracción de esteroides y dialcoholes triperpénicos de aceite de oliva refinado (con ayuda de patrón interno)

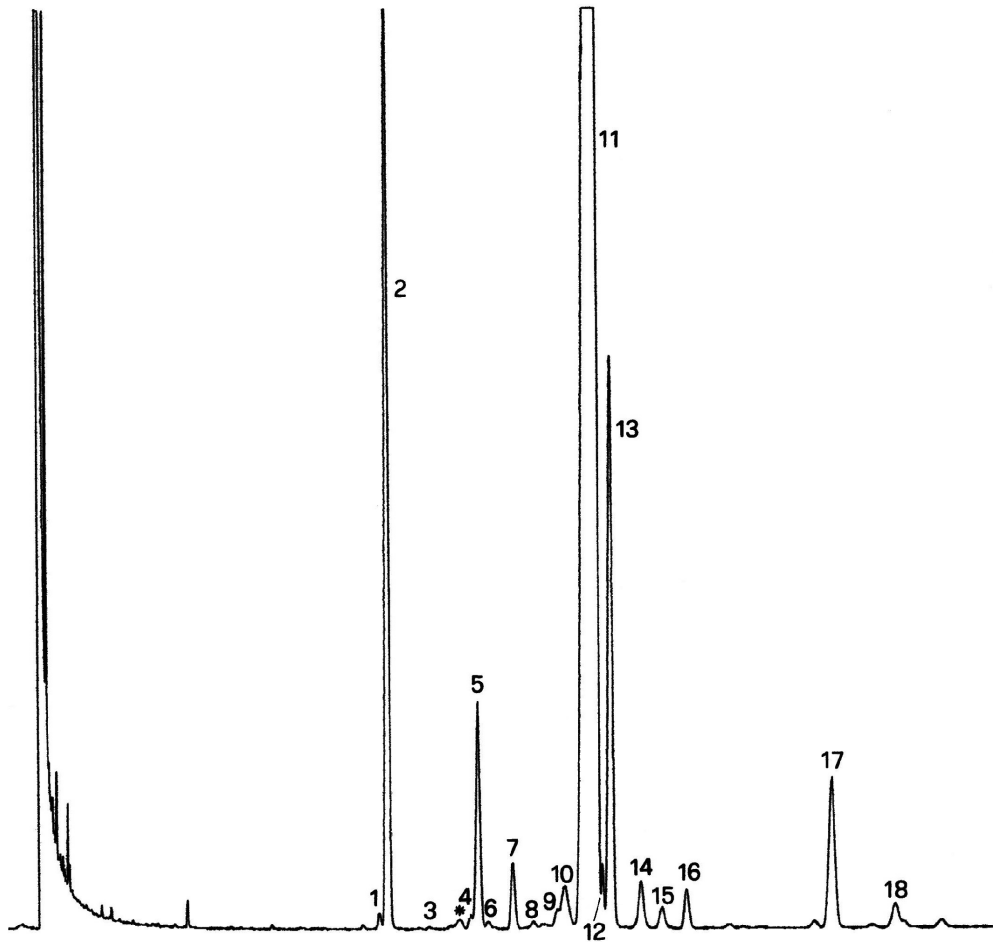
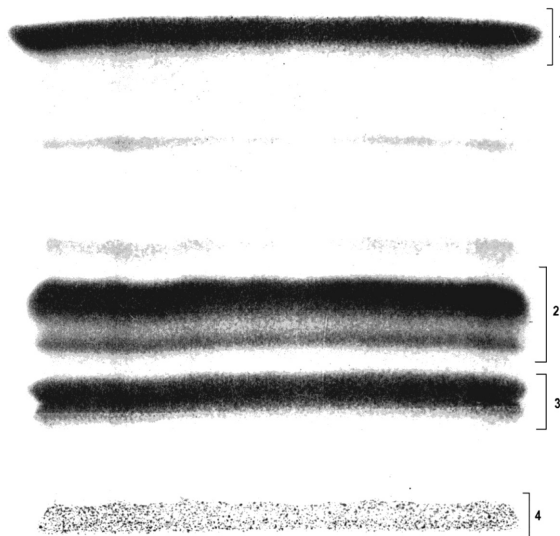


Figura 3

Placa cromatográfica de aceite de orujo de oliva en la que se observa el área que debe rasparse para determinar el contenido de esteroides y dialcoholes triperpénicos



- 1 - Escualeno
- 2 - Alcoholes triperpénicos y alifáticos
- 3 - Esteroides y dialcoholes triperpénicos
- 4 - Inicio y ácidos grasos libres»

ANEXO V

«ANEXO XII

MÉTODO DEL CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL PARA LA VALORACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LOS ACEITES DE OLIVA VÍRGENES**1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN**

Este método internacional tiene por finalidad establecer el procedimiento para evaluar las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes según se define en el punto 1 del anexo XVI del Reglamento (CE) n.º 1234/2007, y describir el método para su clasificación en función de dichas características. El método incluye, asimismo, indicaciones para un etiquetado optativo.

El método descrito solo es aplicable a los aceites de oliva vírgenes, y a su clasificación o su etiquetado en función de la intensidad de los defectos detectados y del atributo frutado, determinados por un grupo de catadores seleccionados, entrenados y examinados, constituidos en panel.

El método establece, asimismo, indicaciones para un etiquetado optativo.

La versión de las normas del COI que se mencionan en este anexo es la más reciente disponible.

2. ANÁLISIS SENSORIAL: VOCABULARIO GENERAL BÁSICO

Remítase a la norma COI/T.20/Doc. N.º 4 «Análisis sensorial: vocabulario general básico».

3. VOCABULARIO ESPECÍFICO**3.1. Atributos negativos**

Atrojado/borras: Flavor característico del aceite obtenido de aceitunas amontonadas o almacenadas en condiciones tales que han sufrido un avanzado grado de fermentación anaerobia o del aceite que ha permanecido en contacto con los lodos de decantación, que también han sufrido un proceso de fermentación anaerobia en trujales y depósitos.

Moho-humedad: Flavor característico del aceite obtenido de frutos en las que se han desarrollado abundantes hongos y levaduras a causa de haber permanecido amontonadas con humedad varios días, o aceite obtenido de las aceitunas que han sido recogidas con tierra o barro y que no han sido lavadas.

Avinado-avinagrado/Ácido-agrio: Flavor característico de algunos aceites que recuerda al vino o vinagre. Es debido fundamentalmente a un proceso fermentativo aerobio de las aceitunas o de los restos de pasta de aceitunas en cachapos que no han sido limpiados adecuadamente, que da lugar a la formación de ácido acético, acetato de etilo y etanol.

Rancio: Flavor de los aceites que han sufrido un proceso oxidativo intenso.

Aceitunas congeladas (madera mojada): Flavor característico de aceites que han sido extraídos de aceitunas que han sufrido un proceso de congelación en el árbol.

3.2. Otros atributos negativos

Cocido o quemado: Flavor característico del aceite originado por un excesivo y/o prolongado calentamiento durante el procesado, muy particularmente durante el termo-batido de la pasta, si este se realiza en condiciones térmicas inadecuadas.

Heno-madera: Flavor característico de algunos aceites procedentes de aceitunas secas.

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

Lubricante: Flavor del aceite que recuerda al gasóleo, a la grasa de lubricar o al aceite mineral.

Alpechín: Flavor adquirido por el aceite a causa de un contacto prolongado con alpechín que han sufrido procesos fermentativos.

Salmuera: Flavor del aceite extraído de aceitunas conservadas en salmuera.

Metálico: Flavor que recuerda a los metales. Es característico del aceite que ha permanecido en contacto, durante tiempo prolongado, con superficies metálicas, durante los procesos de molienda, batido, prensado o almacenamiento.

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.

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

Pepino: Flavor que se produce en el aceite cuando se mantiene en un envase hermético durante un tiempo excesivo, particularmente en hojalata, que se atribuye a la formación de 2,6-nonadienal.

3.3. Atributos positivos

Frutado: Conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de frutos sanos y frescos, verdes o maduros, y percibidas por vía directa y/o retronasal.

Amargo: Sabor elemental característico del aceite obtenido de aceitunas verdes o en envero. Se percibe en las papilas circunvaladas de la uve lingual.

Picante: Sensación táctil de picor, característica de los aceites obtenidos al comienzo de la campaña, principalmente de aceitunas todavía verdes. Puede ser percibido en toda la cavidad bucal, especialmente en la garganta.

3.4. Terminología opcional para el etiquetado

A petición expresa, el jefe de panel puede certificar que los aceites evaluados cumplen las definiciones e intervalos correspondientes a las expresiones y adjetivos siguientes en función de la intensidad y de la percepción de los atributos:

Atributos positivos (frutado, amargo y picante): En función de la intensidad de la percepción:

- *intenso*, cuando la mediana del atributo sea superior a 6;
- *medio*, cuando la mediana del atributo esté comprendida entre 3 y 6;
- *ligero*, cuando la mediana del atributo sea superior a 3;

Frutado: Conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de frutos sanos y frescos, en el que no predomina el sabor del fruto verde ni el del fruto maduro, que se percibe por vía directa y/o retronasal.

Frutado verde: Conjunto de sensaciones olfativas características del aceite que recuerdan a los frutos verdes, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de aceitunas verdes, sanas y frescas, y percibido por vía directa y/o retronasal.

Frutado maduro: Conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, que recuerdan a los frutos maduros, procedente de aceitunas, sanas y frescas, y percibidas por vía directa y/o retronasal.

Equilibrado: Aceite que no presenta desequilibrio, por el que se entiende la sensación olfato-gustativa y táctil del aceite en que la mediana de los atributos amargo y/o picante es superior en dos puntos a la mediana del atributo frutado.

Aceite dulce: Aceite en el cual la mediana del atributo amargo y la del picante sean inferiores o iguales a 2.

4. COPA PARA DEGUSTACIÓN DE ACEITES

Remítase a la norma COI/T.20/Doc. N° 5 «Copa para la degustación de aceites».

5. SALA DE CATA

Remítase a la norma COI/T.20/Doc. N° 6 «Guía para la instalación de una sala de cata»

6. ACCESORIOS

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

- copas (normalizadas) que contengan las muestras, codificadas y recubiertas de un cristal de reloj y mantenidas a $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- ficha de cata (véase figura 1) en papel o en formato electrónico que cumplan con los requisitos de la hoja de perfil, que se completará si fuera preciso con las instrucciones de empleo;
- bolígrafo o tinta indeleble;
- bandejitas con rodajas de manzana y/o agua con o sin gas y/o tostadas;
- vaso de agua a temperatura ambiente;
- documento con las normas generales mencionadas en las secciones 8.4 y 9.1.1;
- escupideras.

7. JEFE DE PANEL Y CATADORES

7.1. El jefe del panel

El jefe del panel deberá tener una sólida formación y ser un conocedor experto de todos los tipos de aceite con los que habrá de tratar en el desempeño de su trabajo. Es la figura clave del panel y el responsable de la organización y del funcionamiento del mismo.

Su trabajo requiere la pertinente formación en análisis sensorial y las herramientas correspondientes, además de meticulosidad en la preparación de los ensayos y la organización y ejecución de estos, así como destreza y paciencia para planificar y efectuar los ensayos de forma científica.

También es de su exclusiva competencia proceder a la selección, el entrenamiento y el control de los catadores, para asegurarse de su nivel de aptitud, siendo por tanto responsable de la cualificación de estos. Dicha cualificación deberá ser en todo momento objetiva, por lo que deberá diseñar procedimientos específicos basados en ensayos y en criterios de aceptación y rechazo sólidamente fundamentados. Véase la norma COI/T.20/Doc. n° 14 «Guía para la selección, el entrenamiento y el control de los catadores cualificados de aceite de oliva virgen».

Es asimismo responsable del rendimiento del panel y, por consiguiente, de su evaluación, que deberá acreditar de forma fiel y objetiva. Deberá poder demostrar en todo momento que el método y los catadores están bajo control. Se recomienda llevar a cabo una calibración periódica del panel (COI/T.20/Doc. N° 14, § 5).

Es el más alto responsable de los registros del panel y de la custodia de los mismos. Dichos registros deberán poder rastrearse en todo momento y ajustarse a los requisitos en materia de garantía de la calidad establecidos en las normas internacionales relativas al análisis sensorial, además de garantizar el anonimato de las muestras.

Es el responsable de los utensilios y del material necesario para el cumplimiento de las especificaciones del presente método, así como del inventario y de la perfecta limpieza y conservación de los mismos. Redactará un informe sobre todo cuanto antecede y sobre el cumplimiento de las condiciones del ensayo.

Es el responsable de la recepción y la conservación de las muestras desde su llegada al laboratorio hasta el análisis, garantizando en todo momento el anonimato de las mismas y su adecuada conservación. A tal efecto, deberá redactar procedimientos sobre todo cuanto antecede con vistas a garantizar la trazabilidad y la calidad de todo el proceso.

También es responsable de la preparación, codificación y presentación de las muestras a los catadores según el diseño experimental adecuado de acuerdo con el protocolo previamente establecido, de la recopilación de los datos de los catadores y del tratamiento estadístico de estos.

Es responsable de establecer y redactar todos los demás procedimientos que pudieran precisarse para completar la presente norma o para el adecuado funcionamiento del panel.

Deberá buscar la manera de comparar los resultados del panel con los de otros paneles de cata de aceite de oliva virgen para asegurarse de que el funcionamiento de su panel es el correcto.

Es misión del jefe de panel motivar a los componentes del grupo, fomentando entre ellos el interés, la curiosidad y el espíritu competitivo. Por este motivo se recomienda garantizar el intercambio fluido de información con los miembros del grupo, implicándolos en todas las tareas que realicen, así como en los resultados obtenidos. Debe evitar que su opinión sea conocida e impedir que los criterios de posibles líderes se impongan sobre los restantes catadores.

Convocará con tiempo suficiente a los catadores y responderá a cualquier consulta en cuanto a la realización de los ensayos, aunque se abstendrá de sugerirles ningún tipo de opinión sobre la muestra.

7.2. Catadores

Las personas que intervengan en calidad de catadores en los ensayos organolépticos de aceites de oliva deberán hacerlo de forma voluntaria, con las consecuencias que implica este acto volitivo en términos de obligaciones y ausencia de remuneración económica. Por este motivo, se recomienda exigir a los candidatos una petición por escrito. Los candidatos deberán ser seleccionados, entrenados y evaluados por el jefe de panel de acuerdo con su habilidad para distinguir entre muestras similares, debiéndose tener en cuenta que la precisión se mejorará con el entrenamiento.

El catador deberá comportarse como un auténtico observador sensorial, dejando a un lado sus gustos personales para dar cuenta únicamente de las sensaciones que percibe. Por ello deberá realizar su trabajo en silencio, estar relajado y no tener prisa. Deberá prestar la máxima atención posible a la muestra que está catando.

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

8. CONDICIONES DE ENSAYO

8.1. Presentación de la muestra

La muestra de aceite que se vaya a analizar se presentará en las copas de degustación normalizadas con arreglo a la Norma COI/T.20/Doc. N° 5 «Copa para la degustación de aceites».

La copa deberá contener 14-16 ml de aceite, o bien entre 12,8 y 14,6 g si las muestras se pesan, y estar tapada con un vidrio de reloj.

Cada copa deberá estar marcada con un código numérico o alfanumérico aleatorio. El código se aplicará mediante un sistema inodoro.

8.2. Temperatura de la muestra y durante el ensayo

La muestra de aceite que se vaya a analizar deberá mantenerse en la copa a una temperatura de $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante todo el ensayo. Se ha elegido esta temperatura porque permite detectar con mayor facilidad que a temperatura ambiente las diferencias organolépticas. Además, a temperaturas más bajas se produce una escasa volatilización de los componentes aromáticos propios de estos aceites, y a temperaturas más altas se forman componentes volátiles propios de los aceites calentados. Véase la norma COI/T.20/Doc. N° 5 «Copa para la degustación de aceites» para consultar el sistema de calentamiento de las muestras que se ha de utilizar una vez que la muestra se haya introducido en la copa.

La sala de cata debe estar a una temperatura comprendida entre los 20° y los 25° C (véase COI/T.20/Doc. N° 6).

8.3. 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 períodos de óptima percepción para el gusto y el olfato. Las comidas son precedidas de un período 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. Por consiguiente, se recomienda que las sesiones de cata se realicen entre las 10 y las 12 de la mañana.

8.4. Normas generales de comportamiento para catadores

Las siguientes recomendaciones se refieren al comportamiento de los catadores durante su trabajo.

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

- Se abstendrán de fumar o de beber café al menos 30 minutos antes de la hora fijada.
- No deberán haberse aplicado ningún perfume, cosmético o jabón cuya fragancia persista hasta el momento del ensayo. Para el lavado de las manos deberán utilizar un jabón no perfumado, procediendo a enjuagarse las manos y a secárselas tantas veces como sean necesarias para eliminar cualquier olor.
- No deberán haber tomado ningún alimento al menos una hora antes de realizar la cata.
- Si se encontrasen en condiciones de inferioridad fisiológica, particularmente si tienen afectado el sentido del olfato o del gusto, o bajo algún efecto psicológico que les impida concentrarse en su trabajo, deberán abstenerse de participar en la cata e informarán oportunamente al jefe del panel.
- Una vez que los catadores hayan cumplido las normas precedentes, procederán a ocupar su lugar en la cabina que les corresponda en silencio y de forma ordenada.
- Leerán detenidamente las instrucciones que detalle la ficha de cata y no comenzarán el examen de la muestra hasta estar totalmente preparados para el trabajo que deben realizar (relajados y sin prisas). En caso de duda, deben consultar privadamente al jefe del panel.
- Deberán permanecer en silencio mientras realizan su trabajo.
- Deberán mantener el móvil apagado en todo momento para proteger la concentración y el trabajo de sus colegas.

9. PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA Y LA CLASIFICACIÓN DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES

9.1. Técnica de cata

- 9.1.1. Los catadores procederán a tomar la copa, manteniéndola cubierta con su vidrio de reloj, la inclinarán ligeramente, y en esta posición le darán un giro total a fin de mojar lo más posible la superficie interior. Hecha esta operación, separarán el vidrio de reloj y procederán a oler la muestra, haciendo inspiraciones lentas e intensas para evaluar el aceite. El período de olfacción no debería superar los 30 segundos. Si en este período no se ha llegado a ninguna conclusión, deberán tomarse un pequeño descanso, antes de proceder a un nuevo intento.

Una vez realizado el ensayo olfativo, los catadores procederán a enjuiciar las sensaciones bucales (sensación conjunta olfato-gustativa-táctil). Para ello se tomarán 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 y la garganta, ya que, como se sabe, la percepción de los sabores y las sensaciones táctiles se hace con distinta intensidad según las zonas de la lengua, el paladar y la garganta.

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 atención en el orden de aparición de los estímulos amargo y picante. Si no se procede así, en algunos aceites ambos estímulos pueden pasar inadvertidos o el amargo quedar oculto por el picante.

Las aspiraciones cortas y sucesivas, introduciendo aire por la boca, permiten, además de extender la muestra ampliamente por la cavidad bucal, percibir por vía retronasal los componentes volátiles aromáticos, al forzarse el uso de esta vía.

La sensación táctil del picante también debe tomarse en consideración, por lo que conviene tragar el aceite.

- 9.1.2. La valoración organoléptica de un aceite de oliva virgen debe hacerse evaluando un máximo de CUATRO MUESTRAS por sesión, con un máximo de tres sesiones diarias, para evitar el efecto de contraste que podría producir la degustación inmediata de otras.

Puesto que las catas sucesivas producen fatiga o pérdida de sensibilidad, causadas por las muestras precedentes, es preciso 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, el cual, después de masticado, puede ser vertido al escupidor, procediendo seguidamente a enjuagarse con un poco de agua a temperatura ambiente. Entre la sesión finalizada y la siguiente deben transcurrir al menos 15 minutos.

9.2. Utilización de la ficha de cata por los catadores

La ficha de cata que deben utilizar los catadores se recoge en la figura 1 del presente anexo.

Cada uno de los catadores que componen el panel olerá y degustará⁽¹⁾ el aceite sometido a examen. Deben consignar en las escalas de 10 cm de la ficha de cata que se pondrá a su disposición la intensidad con la que perciben cada uno de los atributos negativos y positivos.

En caso de que los catadores perciban atributos negativos no indicados en la sección 4, deberán consignarse en el apartado «otros», empleando el término o términos que los describan con mayor precisión.

9.3. Utilización de los datos por los jefes de panel

El jefe del panel deberá recoger las fichas de cata cumplimentadas por cada uno de los catadores y revisar las intensidades asignadas a los diferentes atributos. De constatarse alguna anomalía, pedirá al catador que revise su ficha de cata y, si fuera necesario, que repita la prueba.

El jefe del panel deberá inscribir los datos de la valoración de cada miembro del panel en un programa informático como el que se recoge en la norma COI/T.20/Doc. N° 15, con miras al cálculo estadístico de los resultados del análisis, basados en el cálculo de la mediana. Véanse las secciones 9.4 y el apéndice del presente anexo. La introducción de los datos correspondientes a cada muestra se realizará con ayuda de una matriz compuesta de nueve columnas que corresponden a los nueve atributos sensoriales y n líneas que corresponden a los n miembros del panel utilizados.

En caso de que en el apartado «otros» figure un defecto percibido y señalado por al menos el 50 % del panel, el jefe del panel calculará la mediana de dicho defecto y lo clasificará en consecuencia.

El valor del coeficiente de variación robusto que define la clasificación (defecto con la mayor intensidad y el mayor atributo frutado) deberá ser inferior o igual al 20 %.

Cuando no sea así, el jefe del panel deberá repetir la evaluación de la muestra específica en otra sesión de cata.

Si esta situación se produce con frecuencia, se recomienda al jefe del panel que imparta formación específica adicional (COI/T.20/Doc. N° 14, § 5) y utilice el índice de repetibilidad y el índice de desviación para controlar el desempeño del panel (COI/T.20/Doc. N° 14, § 6).

9.4. Clasificación del aceite

El aceite se clasifica en las categorías que se indican más adelante, en función de la mediana de los defectos y de la mediana del atributo frutado. Por mediana de los defectos se entiende la mediana del defecto percibido con mayor intensidad. La *mediana* de los defectos y la mediana del atributo frutado se expresarán con una sola cifra decimal.

⁽¹⁾ Pueden abstenerse de catar un aceite cuando aprecien por vía olfativa directa algún atributo negativo sumamente intenso, en cuyo caso deberán registrar en la ficha de cata esta circunstancia excepcional.

La clasificación del aceite se hace comparando el valor de la mediana de los defectos y de la mediana del atributo frutado con los intervalos de referencia expuestos a continuación. Los límites de estos rangos han sido establecidos teniendo en cuenta el error del método, por lo que son considerados como absolutos. Los programas informáticos permiten visualizar la clasificación en un cuadro de datos estadísticos o gráficamente.

- (a) Aceite de oliva virgen extra: la mediana de los defectos es igual a 0 y la del atributo frutado es superior a 0;
- (b) Aceite de oliva virgen: la mediana de los defectos es superior a 0 pero inferior o igual a 3,5 y la del atributo frutado es superior a 0;
- (c) Aceite de oliva lampante: la mediana de los defectos es superior a 3,5, o bien, la mediana de los defectos es inferior o igual a 3,5 y la del atributo frutado es igual a 0.

Nota 1:

Cuando la mediana del amargo y/o picante sea superior a 5,0, el jefe de panel lo señalará en el certificado de la prueba.

Figura 1

FICHA DE CATA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Intensidad de percepción de los defectos	
Atrojado/borras (*)	
Mohoso/húmedo/terroso (*)	
Avinado/avinagrado ácido/agrio (*)	
Aceitunas congeladas (madera húmeda)	
Rancio	
Otros atributos negativos:	
Descriptor:	Metálico <input type="checkbox"/> Heno <input type="checkbox"/> Gusano <input type="checkbox"/> Basto Salmuera <input type="checkbox"/> Cocido o quemado <input type="checkbox"/> Alpechín Esparto <input type="checkbox"/> Pepino <input type="checkbox"/> Lubricante
(*) <i>Bórrase lo que proceda</i>	
Intensidad de percepción de los atributos positivos	
Frutado	
	Verde <input type="checkbox"/> Maduro <input type="checkbox"/>
Amargo	
Picante	
Nombre del catador:	Código del catador:
Código de la muestra:	Firma:

Apéndice

Método de cálculo de la mediana y de los intervalos de confianza

Mediana

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

La mediana se define como el número real X_m , caracterizado por el hecho de que la probabilidad (p) de que los valores de la distribución (X) sean inferiores a ese número (X_m) es inferior o igual a 0,5 y de que, simultáneamente, la probabilidad (p) de que los valores de la distribución (X) sean inferiores o iguales a X_m es superior o igual a 0,5. Otra definición más práctica es que la mediana es el percentil 50 de una distribución de números ordenados de modo creciente. Dicho de otro modo, representa el valor central de una serie ordenada impar o la media de los dos valores centrales de una serie ordenada par.

Desviación típica robusta

Para obtener una estimación fiable de la variabilidad que se produce en torno a la mediana, es necesario referirse a la estimación de la desviación típica robusta según Stuart y Kendall (4). La fórmula indica la desviación típica asintótica robusta, es decir, la estimación robusta de la variabilidad de los datos considerados, en la que N es el número de observaciones e IQR el intervalo intercuartil, el cual abarca exactamente el 50 % de los casos de una distribución de probabilidad cualquiera.

$$s^* = \frac{1,25 \times \text{IQR}}{1,35 \times \sqrt{N}}$$

El cálculo del intervalo intercuartil se efectúa calculando la magnitud de la diferencia entre el percentil 75 y el 25.

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

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

$$\text{Percentil} = [p (X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p (X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

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

En este método los percentiles se computan basándose en los valores reales que figuran en la matriz de datos (procedimiento de cómputo de percentiles).

Coficiente de variación robusto (en %)

El $CVr\%$ representa un número puro que indica el porcentaje de variabilidad de la serie de números analizada. Por esta razón este coeficiente resulta muy útil para comprobar la fiabilidad de los miembros del panel.

$$CV_r = \frac{s^*}{Me} \times 100$$

Intervalos de confianza al 95 % sobre la mediana

Los intervalos de confianza al 95 % (valor del error de primer tipo igual a 0,05 o 5 %) representan el intervalo en el que el valor de la mediana podría variar si fuese posible repetir infinitas veces un experimento. En la práctica, indica el intervalo de variabilidad de la prueba en las condiciones operativas adoptadas, partiendo de la hipótesis de que es posible repetirlo varias veces. El intervalo ayuda a evaluar, como en el caso del $CVr\%$, la fiabilidad de la prueba.

$$IC_{sup} = Me + (c \times s^*)$$

$$IC_{inf} = Me - (c \times s^*)$$

donde $C = 1,96$ en el caso del intervalo de confianza al 95 %.

Puede encontrarse un ejemplo de la hoja de cálculo en el anexo I de la norma COI/T.20/Doc. N° 15.

Bibliografía

- (1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL.SYSTAT Inc.
 - (2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
 - (3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
 - (4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
 - (5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. The American Statistician, 32, (2), 12-16.
 - (6) COI/T.28/Doc. N° 1 Septiembre de 2007, Directrices para la acreditación de los laboratorios de análisis sensorial de aceite de oliva virgen en particular, según la norma ISO/IEC 17025:2005
 - (7) COI/T.20/Doc. N° 14.
 - (8) COI/T.20/Doc. N° 15.
 - (9) ISO/IEC 17025:05.»
-

ANEXO VI

«ANEXO XXa

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ACEITES AJENOS EN LOS ACEITES DE OLIVA**1. OBJETO**

Este método se emplea para detectar la presencia de aceites vegetales ajenos en los aceites de oliva. En este tipo de aceites pueden detectarse aceites vegetales con alto contenido en ácido linoleico (soja, colza, girasol, etc.) y algunos aceites vegetales con alto contenido en ácido oleico (avellana, girasol con alto contenido en ácido oleico y aceites de orujo de oliva). El nivel de detección depende del tipo de aceite ajeno y de la variedad de aceituna. En el caso del aceite de avellana, el nivel de detección suele oscilar entre un 5 % y un 15 %. El método no permite identificar el tipo de aceite ajeno y únicamente indica si el aceite de oliva es o no auténtico.

2. PRINCIPIO

Se purifica el aceite mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de gel de sílice. La composición en triglicéridos (TG) se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, utilizando un detector de índice de refracción y empleando propionitrilo como fase móvil. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) se preparan a partir del aceite purificado mediante metilación en frío con una solución metanólica de KOH (anexo X B) y a continuación se analizan los ésteres por cromatografía de gases con columna capilar de alta polaridad (anexo X A). La composición teórica en triglicéridos se calcula a partir de la composición en ácidos grasos con un programa informático, suponiendo una distribución aleatoria de los ácidos grasos en las posiciones 1,3 y 2 del triglicérido, con restricciones en el caso de los ácidos grasos saturados en posición 2. El método de cálculo es una modificación del procedimiento descrito en el anexo XVIII. Se calculan distintos algoritmos matemáticos a partir de la composición teórica y la composición real en triglicéridos (HPLC) y los valores resultantes se comparan con los que contiene una base de datos creada para los aceites de oliva auténticos.

3. MATERIALES Y REACTIVOS**3.1. Purificación del aceite**

3.1.1. Matraces cónicos de 25 ml.

3.1.2. Tubos de ensayo de tapón roscado con junta PTFE, de 5 ml.

3.1.3. Cartuchos de gel de sílice, 1 g (6 ml), para extracción en fase sólida (por ejemplo, Waters, Massachusetts, EE.UU.).

3.1.4. *n*-hexano, de pureza analítica.

3.1.5. Mezcla disolvente de hexano/éter dietílico (87:13) (V/V).

3.1.6. *n*-heptano, de pureza analítica.

3.1.7. Acetona, de pureza analítica.

3.2. Análisis de los triglicéridos mediante HPLC

3.2.1. Microjeringas (50 µl) y agujas para inyección en HPLC.

3.2.2. Propionitrilo, extra puro o de calidad HPLC (por ejemplo, ROMIL, Cambridge, Reino Unido), utilizado como fase móvil.

3.2.3. Columna HPLC (25 cm × 4 mm de diámetro interno), con fase RP-18 (tamaño de partículas: 4 µm).

3.3. Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos

(Véase el anexo X B)

3.3.1. Metanol con un contenido en agua igual o inferior al 0,5 %.

3.3.2. Heptano, de pureza analítica.

3.3.3. Solución metanólica 2N de hidróxido potásico. Disolver 1,1 g de hidróxido potásico en 10 ml de metanol.

3.3.4. Tubos de ensayo de 5 ml con tapón roscado provisto de junta PTFE.

3.4. Análisis de los FAMES mediante cromatografía de gases

(Véase el método para la determinación de los ácidos grasos insaturados *trans* por cromatografía de gases con columna capilar que se recoge en el anexo X A).

3.4.1. Microjeringas (5 µl) y agujas para inyección de cromatografía de gases.

3.4.2. Hidrógeno o helio como gas portador.

- 3.4.3. Hidrógeno y oxígeno para detector FID.
- 3.4.4. Nitrógeno o helio como gas portador auxiliar.
- 3.4.5. Columna capilar de sílice fundido (50-60 m × 0,25 – 0,30 mm de diámetro interno) recubierta con fase de cianopropilpolisiloxano o cianopropilfenilsiloxano (SP-2380 o similar) con película de 0,20-0,25 µm de grosor.

4. APARATOS

- 4.1. Aparato de vacío para extracción en fase sólida.
- 4.2. Evaporador rotatorio.
- 4.3. Equipo de HPLC formado por:
 - 4.3.1. Desgasificador para la fase móvil.
 - 4.3.2. Válvula de inyección Rheodyne con bucle de 10 µL.
 - 4.3.3. Bomba de alta presión.
 - 4.3.4. Horno termostático para columna HPLC que permita mantener temperaturas subambiente (15-20 °C), (por ejemplo, tipo Peltier).
 - 4.3.5. Detector de índice de refracción.
 - 4.3.6. Sistema de adquisición de datos informatizado con programa integrador.
- 4.4. Equipo de cromatografía de gases con columna capilar, descrito en el anexo X A, provisto de:
 - 4.4.1. Inyector de fraccionamiento (*split*).
 - 4.4.2. Detector de ionización de llama (FID).
 - 4.4.3. Horno con temperatura programable.
 - 4.4.4. Sistema de adquisición de datos informatizado con programa integrador.
- 4.5. Ordenador con el programa Microsoft EXCEL.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Purificación del aceite

Colocar un cartucho de gel de sílice SPE en un aparato de elución a vacío y lavar bajo vacío con 6 ml de hexano. Liberar el vacío para evitar que se seque la columna y colocar un matraz cónico bajo el cartucho. Cargar en la columna una solución de aceite (0,12 g, aproximadamente) en 0,5 ml de hexano, pasarla a través de la columna y eluirla con 10 ml de la mezcla disolvente (3.1.5) de hexano-éter dietílico (87:13 V/V) bajo vacío. Homogeneizar el disolvente eluido y transferir aproximadamente la mitad de su volumen a otro matraz cónico. Evaporar por separado ambas soluciones hasta sequedad en un evaporador rotatorio bajo presión reducida a temperatura ambiente. Para el análisis de los triglicéridos, disolver uno de los residuos en 1 ml de acetona (véase el primer párrafo del punto 5.2) y transferirlo a un tubo roscado de 5 ml. Disolver el otro residuo en 1 ml de *n*-heptano y transferirlo a un segundo tubo roscado de 5 ml para preparar los ésteres metílicos de ácidos grasos.

Nota: La purificación del aceite puede realizarse utilizando una columna de gel de sílice, tal como se describe en el método IUPAC 2.507.

5.2. Análisis de los triglicéridos mediante HPLC

Poner en marcha el sistema HPLC, manteniendo la temperatura de la columna a 20 °C y utilizando propionitrilo como fase móvil a un caudal de 0,6 ml/min. Cuando la línea base se estabilice, inyectar el disolvente; si aparecen distorsiones en la línea base en la región comprendida entre 12 y 25 min, utilizar otro tipo de acetona o una mezcla de propionitrilo/acetona (25:75) para disolver la muestra.

Nota: Algunos tipos de acetona producen distorsiones de la línea base en la mencionada región.

Inyectar una alícuota de 10 µl de la solución de aceite purificado en acetona (5 %). La operación dura aproximadamente 60 min. La temperatura del horno y/o el caudal han de ajustarse para conseguir un cromatograma similar al presentado en la figura 1, en el que la trilinoleína (pico 1) es eluida a los 15,5 min, obteniéndose una buena resolución entre las parejas LLL/OLLn (picos 1 y 2) y OLL/OOLn (picos 4 y 5).

La altura del pico 2 (OLLn+PoLL) ha de alcanzar como mínimo un 3 % del fondo de escala.

5.3. Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos

Añadir 0,1 ml de una solución 2 N de hidróxido potásico en metanol a la solución de aceite purificado en 1 ml de *n*-heptano. Poner el tapón al tubo de ensayo y cerrarlo bien. Agitar el tubo enérgicamente durante 15 segundos; dejarlo reposar hasta que la capa superior se vuelva nítida (5 minutos). La solución de *n*-heptano está lista para ser inyectada en el cromatógrafo de gases. La solución puede conservarse a temperatura ambiente durante un máximo de 12 horas.

5.4. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases

Se ha de utilizar el procedimiento descrito en el método para la determinación de los ácidos grasos insaturados *trans* (véase el anexo X A).

Programar el sistema de cromatografía de gases con una temperatura de horno de 165 °C. La temperatura de horno recomendada es: isoterma a 165 °C durante 10 min, aumento a continuación hasta 200 °C, a razón de 1,5 °C/min. Se recomienda que la temperatura del inyector esté entre 220 °C y 250 °C para minimizar la formación de ácidos grasos *trans* (véase el anexo X A). La temperatura del detector será de 250 °C. Se ha de utilizar hidrógeno o helio como gas portador, con una presión en la cabeza de la columna de aproximadamente 130 kPa. El volumen de inyección es de 1 µL en modo de fraccionamiento (*split*).

Se ha de obtener un perfil de cromatografía de gases similar al que se recoge en la figura 2. Se ha de prestar especial atención a la resolución entre C18:3 y C20:1 (el pico C18:3 tiene que aparecer antes que el pico C20:1). Para conseguirlo, ha de optimizarse la temperatura inicial y/o la presión de la cabeza de la columna. Ajustar las condiciones del inyector (temperatura, relación de fraccionamiento (*split*) y volumen de inyección) para minimizar la discriminación de los ácidos palmítico y palmitoleico.

La altura del pico C20:0 ha de ser de un 20 % del fondo de la escala para cuantificar los isómeros *trans*. Si el pico C18:0 está distorsionado, reducir la cantidad de muestra.

6. INTEGRACIÓN DE LOS PICOS CROMATOGRÁFICOS

6.1. Cromatograma de HPLC

En la Figura 1 se presenta un cromatograma de HPLC típico de los triglicéridos de un aceite de oliva purificado. Para la integración de los picos se han de trazar tres líneas base: la primera entre el inicio del pico 1 y el final del pico 3; la segunda entre el inicio del pico 4 y el valle anterior al pico 8; y la tercera entre el valle anterior al pico 8 y el final del pico 18.

El área total es la suma de las áreas de todos los picos (identificados y no identificados) desde el pico 1 al pico 18. El porcentaje de cada pico viene dado por

$$\text{TAG}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Los porcentajes deben expresarse con dos cifras decimales.

6.2. Cromatograma de gases

La figura 2 muestra un cromatograma de gases de los ésteres alquílicos de los ácidos grasos obtenidos de un aceite de oliva purificado. Deben calcularse los porcentajes de los siguientes ácidos grasos:

Palmítico;	P (C16:0)	=	éster metílico + éster etílico
Esteárico;	S (C18:0)	=	éster metílico
Palmitoleico;	Po (C16:1)	=	suma de los ésteres metílicos de los dos isómeros <i>cis</i>
Oleico;	O (C18:1)	=	suma de los ésteres metílicos de los dos isómeros <i>cis</i> + éster etílico + isómeros <i>trans</i>
Linoleico;	L (C18:2)	=	éster metílico + éster etílico + isómeros <i>trans</i>
Linolénico;	Ln (C18:3)	=	éster metílico + isómeros <i>trans</i>
Araquídico;	A (C20:0)	=	éster metílico
Eicosenoico (gondoico);	G (C20:1)	=	éster metílico

Los ésteres etílicos e isómeros *trans* no han de aparecer en el cromatograma de gases.

El área total (AT) es la suma de todos los picos que aparecen en el cromatograma desde el C14:0 al C24:0, exceptuando el correspondiente al escualeno. El porcentaje de cada pico se calcula como sigue:

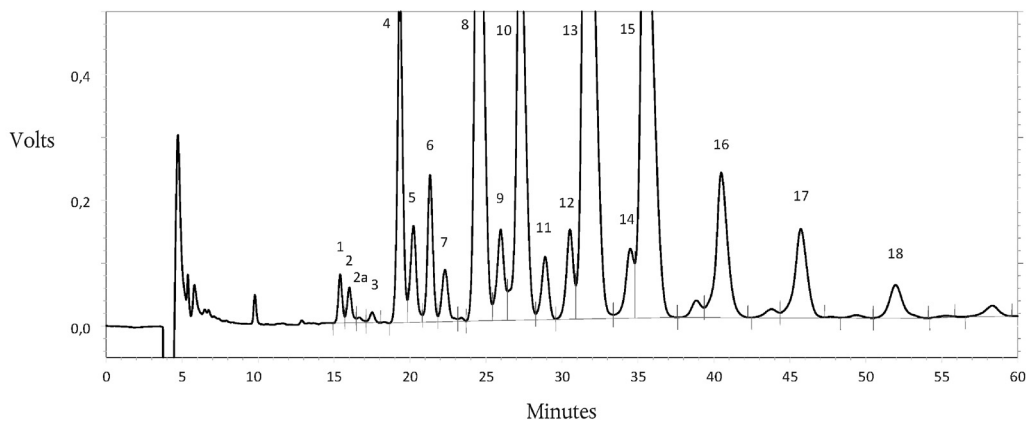
$$\text{FA}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Los resultados han de expresarse con dos cifras decimales.

Para los cálculos de los programas informáticos, no se precisa una normalización al 100 %, ya que se realiza automáticamente.

Figura 1

Cromatograma HPLC de los TG de un aceite de oliva virgen de «Chemlali». Principales componentes de los picos cromatográficos



- (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; (4) OLL; (5) OOLn+PoOL;
 (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PpoPo+PpoL; (8) OOL+LnPP; (9) PoOO;
 (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SpoL+SOLn+SpoPo; (12) PLP;
 (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; (17) SOO;
 (18) POS+SLS.

Cuadro 1

Datos de repetibilidad relativos a la determinación de los TG del aceite de oliva virgen mediante HPLC con una temperatura de la columna de 20 °C y utilizando propionitrilo como fase móvil

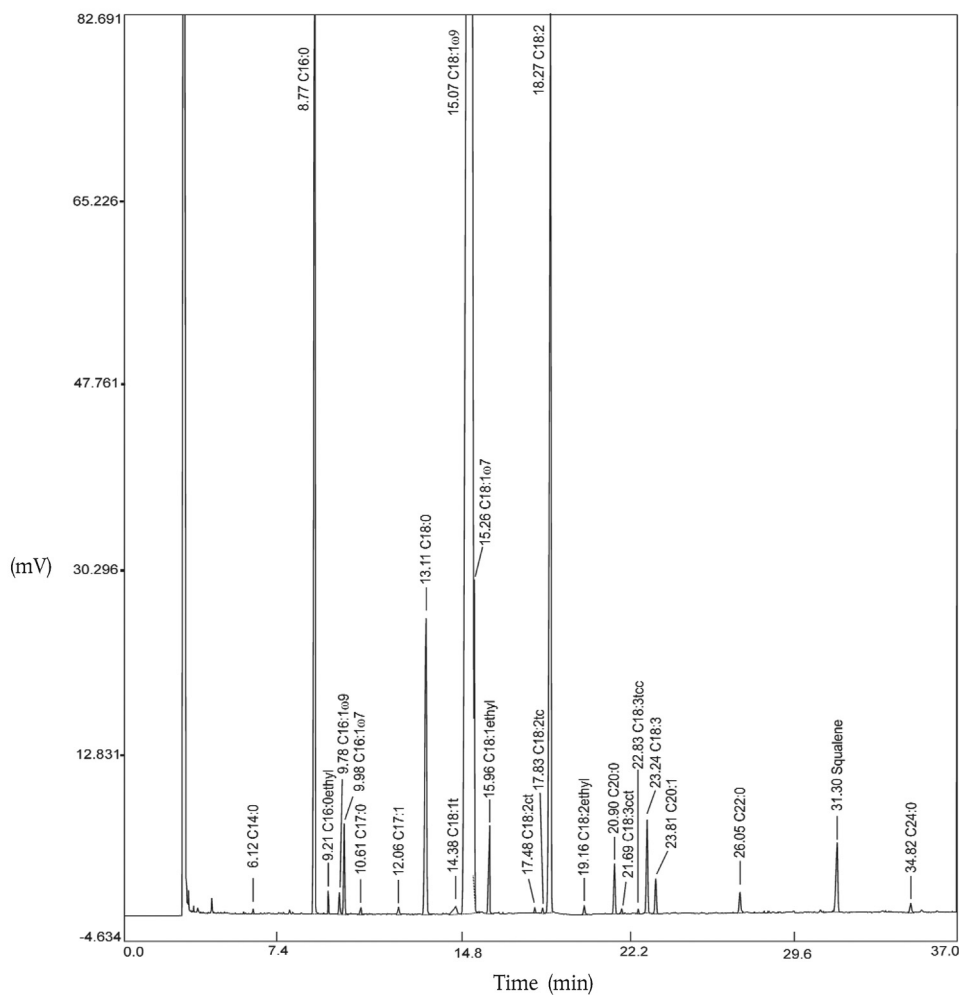
ECN	Picos HPLC	TG	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
			Media (%)	RSD _r (%)	Media (%)	RSD _r (%)	Media (%)	RSD _r (%)	Media (%)	RSD _r (%)	Media (%)	RSD _r (%)
42	1	LLL	0,020	7,23	0,066	5,18	0,095	4,10	0,113	0,95	0,34	1,05
	2	OLLn+ PoLL	0,085	7,44	0,24	1,78	0,26	2,25	0,35	2,02	0,50	2,83
	3	PLLn	0,023	15,74	0,039	5,51	0,057	5,62	0,082	4,35	0,12	6,15
44	4	OLL	0,47	1,52	1,53	0,42	2,62	0,98	3,35	1,05	4,37	1,13
	5	OOLn+ PoOL	1,07	2,01	1,54	0,46	1,61	0,71	1,72	1,07	1,77	2,40
	6	PLL+ PoPoO	0,11	12,86	0,24	4,37	0,65	1,32	1,35	0,73	2,28	1,24
	7	POLn+ Ppo-Po+ PpoL	0,42	5,11	0,49	2,89	0,55	2,01	0,85	1,83	1,09	1,96
46	8	OOL+ LnPP	6,72	0,63	8,79	0,31	11,21	0,42	13,25	0,33	15,24	0,23
	9	PoOO	1,24	2,86	1,49	0,95	1,63	0,85	2,12	0,45	2,52	0,56
	10	SLL+ PLO	2,70	0,65	4,05	0,70	6,02	0,65	9,86	0,53	11,53	0,31
	11	PoOP+ SpoL+SOLn+ SpoPo	0,64	4,42	0,69	3,02	0,79	1,23	1,53	0,89	1,70	1,66

ECN	Picos HPLC	TG	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
			Media (%)	RSD _r (%)	Media (%)	RSD _r (%)	Media (%)	RSD _r (%)	Media (%)	RSD _r (%)	Media (%)	RSD _r (%)
48	12+13	OOO+ PLP+ PoPP	49,60	0,07	48,15	0,06	42,93	0,06	33,25	0,10	24,16	0,06
	14	GAG	0,82	1,72	0,92	1,56	1,05	1,32	1,25	1,05	1,60	1,77
	15	POO	22,75	0,25	21,80	0,20	21,05	0,30	20,36	0,35	20,17	0,14
50	16	POP	3,05	0,46	4,56	0,42	4,98	0,52	5,26	0,41	5,57	0,38
	17	SOO	6,87	0,21	5,56	0,33	4,86	0,43	4,12	0,72	3,09	0,69
	18	POS+ SLS	1,73	1,23	1,65	1,10	1,54	0,99	1,49	1,10	1,41	1,00

n = 3 replicados
 RSD_r = Desviación típica relativa de la repetibilidad

Figura 2

Cromatograma GC de los ésteres alquílicos de los ácidos grasos obtenidos a partir de un aceite de orujo de oliva mediante transesterificación en frío con una solución metanólica de KOH



7. DETECCIÓN DE ACEITES AJENOS EN LOS ACEITES DE OLIVA

El método de cálculo para la detección de los aceites ajenos en los aceites de oliva por medio de la comparación de algoritmos matemáticos con una base de datos elaborada a partir de aceites de oliva auténticos se recoge en el anexo de la norma COI/T.20/Doc. N° 25.»
