377R1058



# REGLAMENTO (CEE) Nº 1058/77 DE LA COMISIÓN

**de 18 de mayo de 1977**

**relativo a las características de los aceites de oliva y de determinados productos que contienen aceite de oliva y por el que se modifica la nomenclatura del arancel aduanero común en lo que se refiere al aceite de oliva**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento nº 136/66/CEE del Consejo, de 22 de septiembre de 1966, por el que se establece una organización común de mercados en el sector de las materias grasas (1), modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) nº 1707/73 (2), y, en particular, el apartado 4 de su artículo 13 y el apartado 3 de su artículo 18,

Visto el Reglamento nº 162/66/CEE del Consejo, de 27 de octubre de 1966, relativo a los intercambios de materias grasas entre la Comunidad y Grecia (3), y, en particular el apartado 4 de su artículo 3 y su artículo 9,

Visto el Reglamento (CEE) nº 443/72 del Consejo, de 29 de febrero de 1972, relativo a las exacciones reguladoras aplicables al aceite de oliva que haya sufrido un proceso de refinado, así como a determinados productos que contienen aceite de oliva (4), y, en particular, su artículo 8,

Considerando que, en la actualidad, todos los aceites de oliva vírgenes se incluyan en la subpartida 15.07 A II a) del arancel aduanero común, que en consecuencia, se fija una única exacción reguladora para dichos productos; que, para que la exacción reguladora a la importación pueda alcanzar su objetivo, precede fijarla según los distintos tipos de aceite virgen y, con tal fin, distinguir los aceites de oliva según sus características fisicoquímicas; que es oportuno, en consecuencia, adaptar la nomenclatura del arancel aduanero común;

Considerando que la nomenclatura arancelaria resultante de la aplicación del Reglamento nº 136/66/CEE se recoge en el arancel aduanero común incorporado como anexo al Reglamento (CEE) nº 950/68 (5), modificado en último lugar por el Reglamento (CEE) nº 875/77 (6);

Considerando que, para garantizar el funcionamiento correcto del sistema de exacciones reguladoras aplicables a la importación de los orujos de oliva, procede prever un método único para la determinación del contenido en aceite de dichos productos;

Considerando que el Reglamento (CEE) nº 618/72 de la Comisión, de 29 de marzo de 1972, ralativo a las carelaterísticas de los aceites de oliva, así como de determina dos productos que contienen aceite de oliva (7), ha sido modificado en diversas ocasiones, en especial por el Reglamento (CEE) nº 3366/75 (8); que, habida cuenta de las nuevas modificaciones que deban introducirse en él, se considera oportuno derogarlo y recoger en un nuevo reglamento el conjunto de las disposiciones;

Considerando que las medidas previstas en el presente artículo se ajustan al dictamen del Comité de gestión de materias grasas,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

*Artículo 1*

1. Unicamente será considerado aceite de oliva, con arreglo a la subpartida 15.07 A del arancel aduanero común, el aceite de oliva que proceda únicamente del tratamiento de las aceitunas, excluido el aceite de oliva reesterificado y cualquier mezcla de aceite de oliva con aceites de otra naturaleza.

La detección de la presencia de aceite de oliva reesterificado o de aceites de otra naturaleza se efectuará mediante los métodos recogidos respectivamente en los Anexos VII y VIII.

2. Se incluirán en las subpartidas 15.07 A I a), 15.07 A I b) y 15.07 A I c) del arancel aduanero común los aceites que reúnan las características indicadas en los puntos 1, 2 y 3 del Anexo 1. Por la determinación de las características mencionadas anteriormente, se utilizarán los métodos descritos en los Anexos IV, V y VI.

3. Se incluirán en la subpartida 15.07 A II a) del arancel aduanero común los aceites que reúnan las características citadas en el punto 4 del Anexo I.

No se incluirán en la subpartida 15.17 A del arancel aduanero común los productos de la partida nº 15.17 que reúna las características indicadas en el Anexo II.

*Artículo 2*

1. El contenido en aceite de oliva de los orujos y de los demás residuos de la extracción del aceite de oliva incluidos en la subpartida 23.04 A se determinará de acuerdo con el método que figura en el Anexo IX.

(1) DO nº 172 de 30. 9. 1966, p. 3025/66.
(2) DO nº L 175 de 29. 6. 1973, p. 5.
(3) DO nº 197 de 29. 10. 1966, p. 3393/66.
(4) DO nº L 54 de 3. 3. 1972, p. 3.
(5) DO nº L 172 de 22. 7. 1968, p. 1.
(6) DO nº L 106 de 29. 4. 1977, p. 20.
(7) DO nº L 78 de 31. 3. 1972, p. 5.
(8) DO nº L 333 de 30. 12. 1975, p. 13.

2. El contenido en aceite de oliva contemplado en el apartado 1 se expresará en porcentaje de su peso con relación a la materia seca.

*Artículo 3*

Se modifica el arancel aduanero común incorporado como anexo al Reglamento (CEE) nº 950/68 del modo siguiente:

1. En la nota complementaria 1 del Capítulo 15, se sustituyen los términos «de la partida nº 15.07» por «de la subpartida 15.07 D».

2. Se sustituyen las notas complementarias 2, 3 y 4 del Capítulo 15 por las notas complementarias 2, 3 y 4 que figuran en el Anexo III del presente Reglamento.

3. Se sustituye la subpartida 15.07 A por el texto siguiente:

| Número del arancel | Designación de la mercancía | Tipo de los derechos | |
|---|---|---|---|
| | | autónomos % o exacciones reguladoras (E) | convencionales |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 15.07 | A. Aceite de oliva: | | |
| | I. sin tratar: | | |
| | a) Aceite de oliva virgen | 20 (E) | — |
| | b) Aceite de oliva virgen lampante | 20 (E) | — |
| | c) Los demás | 20 (E) | — |
| | II. que se hayan | | |
| | a) obtenido de los aceites de las subpartidas 15.07 A I a) o 15.07 A I b) incluso con adición de aceite de oliva virgen | 20 (E) | — |
| | b) Los demás | 20 (E) | — |

*Artículo 4*

En todos los actos comunitarios en que se haga referencia a las subpartidas 15.07 A II o 15.07 a I a) y b) del arancel aduanero común, dichas referencias se entenderán hechas respectivamente, según las características del producto afectado, a las subpartidas 15.07 A I a), b) y c) y 15.07 A II a) y b) del arancel aduanero común.

*Artículo 5*

Queda derogado el Reglamento (CEE) nº 618/72 de la Comisión.

*Artículo 6*

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

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

Hecho en Bruselas, el 18 de mayo de 1977.

*Por la Comisión*

Finn GUNDELACH

*Vicepresidente*

*ANEXOS*

**Indice**


| | | Páginas |
|---|---|---|
| ANEXO I: | Características de los aceites de oliva | 124 |
| ANEXO II: | Productos de la subpartida 15.17 A | 125 |
| ANEXO III: | Notas somplementarias 2, 3 y 4 del capítulo 15 del arancel aduanero común | 125 |
| ANEXO IV: | I. Tratamiento de la muestra por la alúmina activada | 127 |
| | II. Neutralización y decoloración del aceite de oliva en laboratorio | 127 |
| ANEXO V: | Investigación de la presencia de aceite de orujos de oliva en los aceites de oliva | 129 |
| | A. Método llamado «de Bellier» | 129 |
| | B. Método llamado «de Vizern modificado» | 129 |
| ANEXO VI: | Investigación de jabones para evidenciar la alcalinidad | 131 |
| ANEXO VII: | Investigación de la presencia de los aceites reesterificados | 131 |
| ANEXO VIII: | Investigación de la presencia de otros aceites dentro del aceite de oliva: análisis de la fracción estereolítica de las materias grasas | 135 |
| ANEXO IX: | Contenido en aceite de los orujos de oliva | 139 |

*ANEXO I*

## CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

1. Sólo se considera «aceite de oliva virgen», para la aplicación de la subpartida 15.07 A I a), el aceite de oliva natural obtenido únicamente por procedimientos mecánicos, incluida la presión y con exclusión de cualquier mezcla con aceite de oliva obtenido de diferente modo, y que presente las características siguientes:

   a) un contenido de ácidos grasos libres, expresado en ácido oleico, de 3 % como máximo;

   b) un coeficiente de extinción $K_{270}$ [absorbancia en un espesor de un centímetro de una disolución de un gramo de aceite en 100 mililitros en isooctano (2,2,4 trimetilpentano) para la longitud de onda de 270 nanometros] no superior a 0,25 y, después de tratar la muestra de aceite con alúmina activa, no superior a 0,11;

   c) una variación del coeficiente de extinción en la zona de 270 nanómetros no superior a 0,01.

      Esta variación se define como sigue:

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

      $K_m$ designa el coeficiente de extinción a la longitud de onda del máximo de la curva de absorción en la zona de 270 nanómetros,

      $K_{m-4}$ y $K_{m+4}$ designan los coeficientes de extinción a las longitudes de onda inferior y superior en 4 na nómetros a la de $K_m$;

   d) reacciones de Beller y de Vizern modificada negativa, efectuadas con arreglo a los métodos descritos en el Anexo V, A y B;

   e) prueba de jabones negativa, efectuada con arreglo al método descrito en el Anexo VI.

2. Sólo se considera «aceite de oliva lampante» para la aplicación de la subpartida 15.07 A I b), cualquiera que sea la acidez, el aceite de oliva que presente las características siguientes:

   a) Un coeficiente de extinción $K_{270}$ superior a 0,25 y, después de tratar la muestra con alúmina activada no superior a 0,11.

      Los aceites con un contenido de ácidos prasos libres, expresado en ácido oleico, superior a 3 % pueden tener, después de pasar sobre alúmina activada, un coeficiente de extinción $K_{270}$ superior a 0,11. En tal caso, después de neutralizarlos y decolorarlos en el laboratorio, deberán tener las características siguientes:

      — un coeficiente de extinción $K_{270}$ no superior a 1,10,

      — una variación del coeficiente de extinción en la zona de 270 nanómetros superior a 0,01 y no superior a 0,16;

   b) reacciones de Beller y de Vinzern modificadas negativas, efectuadas con arreglo a los métodos descritos en el Anexo VI, A y B;

   c) prueba de jabones negativa, efectuada con arreglo al método descrito en el Anexo VI.

3. Sólo se consideran «productos de la subpartida 15.07 A I c)» los aceites, principalmente el aceite de «orujo de aceituna», que presenten las características siguientes:

   a) un contenido de ácidos grasos libres, expresado en ácido oleico superior a 3 %;

   b) reacciones de Beller y/o Vozern modificada positivas, efectuadas con arreglo a los métodos decritos en el Anexo V, A y B,

   c) prueba de jabones negativa, efectuada con arreglo al método descrito en el Anexo VI.

4. La subpartida 15.07 A II a) incluye el aceite de oliva obtenido por tratamiento de los aceites de las subpartidas 15.07 A I a) y/o A I b), incluso con adición de aceite de oliva virgen, que presente las siguientes características:

   a) un contenido máximo del 3 % de ácidos grasos libres expresado en ácido oleico;

   b) prueba de jabones positiva, efectuada con arreglo al método descrito en el Anexo VI.

o:

— un coeficiente de extinción $K_{270}$ superior a 0,25 y no superior a 1,10 y, después de tratar la muestra con alúmina activada, superior a 0,11,

y

— una variación del coeficiente de extinción en la vecindad de 270 nanómetros superior a 0,01 y no superior a 0,16.

Esta variación se define por:

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

$K_m$ designa el coeficiente de extinción a la longitud de onda del máximo de la curva de absorción en la zona de 270 nanómetros,

$K_{m-4}$ y $K_{m+4}$ designan los coeficientes de extinción a las longitudes de onda inferior y superior en 4 nanómetros a la de $K_m$;

c) reacciones de Beller y de Vizern modificada negativas, efectuadas con arreglo a los métodos descritos en el Anexo V, A y B.

---

*ANEXO II*

## PRODUCTOS DE LA SUBPARTIDA 15.17 A

Se excluyen de la subpartida 15.17 A:

a) Los residuos procedentes del tratamiento de grasas que contengan aceite cuyo índice de yodo, determinado por el método Wijs sin catalizador, sea inferior a 70 o superior a 100;

b) Los residuos procedentes del tratamiento de grasas que contengan aceite cuyo índice de yodo esté comprendido entre 70 y 100 pero en los que la superficie del pico con el volumen de retención de beta-sitosterol, determinada de acuerdo con las disposiciones del anexo VIII, represente menos del 93 % de la superficie total de los picos de los esteroles.

---

*ANEXO III*

## NOTAS COMPLEMENTARIAS 2, 3 y 4 DEL CAPÍTULO 15 DEL ARANCEL ADUANERO COMUN

2. A. Sólo se considera «aceite de oliva», para la aplicación de la subpartida 15.07 A, el aceite que proceda exclusivamente del tratamiento de aceitunas, con exclusión del aceite de oliva reesterificado y de cualquier mezcla de aceite de oliva con aceites de otra naturaleza.

B. Se consideran «aceite de oliva sin tratar» los aceites definidos en los apartados I, II y III siguientes.

I. Sólo se considera «aceite de oliva virgen», para la aplicación de la subpartida 15.07 A I a), el aceite de oliva natural obtenido únicamente por procedimientos mecánicos, incluida la presión, y con exclusión de cualquier mezcla con aceite de oliva de diferente modo, y que presente las características siguientes:

a) un contenido de ácidos grasos libres, expresado en ácido oleico, de 3 % como máximo;

b) un coeficiente de extinción $K_{270}$ (absorbancia en un espesor de un centímetro de una disolución de un gramo de aceite en 100 mililitros en isooctano (2,2,4 trimetilpentano) para la longitud de onda de 270 nanómetros no superior a 0,25 y, después de tratar la muestra de aceite con alúmina activada, no superior a 0,11;

c) una variación del coeficiente de extinción en la zona de 270 nanómetros no superior a 0,01.

Esta variación se define como sigue:

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

$K_m$ designa el coeficiente de extinción a la longitud de onda del máximo de la curva de absorción en la zona de 270 nanómetros,

$K_{m-4}$ y $K_{m+4}$ designan los coeficientes de extinción a las longitudes de onda inferior y superior en 4 nanómetros a la de $K_m$;

d) reacciones de Beller y de Vizern modificada negativas;

e) prueba de jabones negativa.

II. Se considera «aceite de oliva virgen lampante» para la aplicación de la subpartida 15.07 A I b), cualquiera que sea la acidez, el aceite de oliva que presente las características siguientes:

a) un coeficiente de extinción $K_{270}$ superior a 0,25 y, después de tratar la muestra con alúmina activada no superior a 0,11. Los aceites con un contenido de ácidos grasos libres, expresado en ácido oleico, superior a 3 % pueden tener, después de pasar sobre alúmina activada, un coeficiente de extinción $K_{270}$ superior a 0,11. En tal caso, después de neutralizarlos y decolorarlos en el laboratorio, deberán tener las características siguientes:

— un coeficiente de extinción $K_{270}$ no superior a 1,10,

— una variación del coeficiente de extinción en la zona de 270 nanómetros superior a 0,01 y no superior a 0,16;

b) reacciones de Beller y de Vizern modificadas negativas;

c) prueba de jabones negativa.

III. Se consideran «productos de la subpartida 15.07 A I c)» los aceites, principalmente el aceite de «orujo de aceituna», que presenten las características siguientes:

a) un contenido de ácido grasos libres, expresado en ácido oleico superior a 3 %;

b) reacciones de Beller y/o Vizern modificada positivas;

c) prueba de jabones negativa.

C. La subpartida 15.07 A II a) incluye el aceite de oliva obtenido por tratamiento de los aceites de las subpartidas 15.07 A I a) y/o A I b), incluso con adición de aceite de oliva virgen, que presente las siguientes características:

a) un contenido máximo del 3 % de ácidos grasos libres expresado en ácido oleico;

b) prueba de jabones positiva

o

— un coeficiente de extinción $K_{270}$ superior a 0,25 y no superior a 1,10 y, después de tratar la muestra con alúmina activada, superior a 0,11,

y

— una variación del coeficiente de extinción en la vecindad de 270 nanómetros superior a 0,01 y no superior a 0,16.

Esta variación se define por:

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

$K_m$ designa el coeficiente de extinción a la longitud de onda del máximo de la curva de absorción en la zona de 270 nanómetros,

$K_{m-4}$ y $K_{m+4}$ designan los coeficientes de extinción a las longitudes de onda inferior y superior en 4 nanómetros a la $K_m$;

c) reacciones de Beller y de Vizern modificada negativas.

3. Se excluyen de la subpartida 15.17 A:

   a) Los residuos procedentes del tratamiento de grasas que contengan aceite cuyo índice de yodo, determinado por el método Wijs sin catalizador, sea inferior a 70 o superior a 100;

   b) Los residuos procedentes del tratamiento de grasas que contengan aceite cuyo indice de yodo esté comprendido entre 70 y 100 pero en los que la superficie del pico con el volumen de retención de beta-sitosterol, determinada le acuerdo con las disposiciones del anexo VIII del Reglamento mencionado en la nota complementaria 4 siguiente, represente menos del 93 % de la superficie total de los picos de los esteroles.

4. Los métodos de análisis para la determinación de las características de los productos contemplados anteriormente son los previstos respectivamente en los anexos del Reglamento (CEE) nº 1058/77.

---

*ANEXO IV*

## I. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA POR LA ALÚMINA ACTIVADA

1. Introducir 30 g de alúmina básica, obtenida según el procedimiento descrito en el apartado 2, dentro de una columna de cromatografía de 35 mm de diámetro aproximadamente y de 450 mm de longitud, provista de un tubo de salida de 10 mm de diámetro aproximadamente.

   Aplastar mecánicamente la alúmina, dejando caer suavemente la columna mantenida vertical petidamente, sobre una superficie de madera. Introducir, dentro de la columna así preparada, 100 ml de una solución al 10 % de aceite en el hexano.

   Recoger el elegido y evaporar el disolvente a una temperatura inferior a 25 °C.

   Sobre el aceite obtenido así deberá hacerse inmediatamente la determinación del coeficiente de extinción a 270 nm.

2. Se obtendrá el aluminio básico de actividad Brockmann (0 % de agua) calentado durante tres horas a 380-400 °C de la alúmina básica (para cromatografía) de granulometria entre 30 µm y 130 µm (80 µm de media). A 100 g de dicho producto se añadirán 5 ml de agua destilada para obtener de la alúmina básica de una actividad Brockmann comprendida entre II y III. Agitar frecuentemente y dejar reposar una noche en un recipiente cerrado herméticamente.

   **Verificación de la actividad de la alúmina**

   Introducir 30 g de alúmina básica (obtenida de la forma indicada anteriormente) en una columna para cromotografía de 35 mm de diámetro aproximadamente y de 450 mm de longitud, hacer pasar a través de dicha columna, en las condiciones especificadas por el método, una mezcla del 95 % de aceite de oliva virgen con un coeficiente de extinción $K_{270}$ inferior a 0,18 y del 5 % de un aceite de cacahuete tratado durante su refinado por las tierras decolorantes que tenga un coeficiente de extinción $K_{270}$ no inferior a 4. Si la mezcla presentara un coeficiente de extinción superior a 0,11, la alúmina será aceptable. Si la elusión de los trienes conjugados sobre dicha alúmina no se produjera, será necesario utilizar una alúmina más hidratada, después de haber visto si satisface las exigencias del test precedente.

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

### A. NEUTRALIZACIÓN DEL ACEITE

1. **Equipo**

   — vaso de 300 ml de forma alta,
   — centrifugadora de laboratorio con tubos de 100 ml,
   — vaso de 250 ml,
   — matraces de 100 ml,
   — ampolla de decantar de 1 litro.

2. **Reactivos**

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

3. **Modo de operar**

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

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

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

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

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

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

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

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

B. DECOLORACIÓN DEL ACEITE NEUTRALIZADO

1. **Equipo**

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

2. **Modo de operar**

Pesar en el matraz de 3 cuellos cerca de 100 g del aceite neutralizado. Insertar el termométro y el agitador, volver a unir a la bomba de vacío y calentar hasta 90 °C agitándolo,

Mantener dicha temperatura, siempre bajo agitación, hasta que el aceite que deba analizarse este completamente liberado de su humedad (treinta minutos aproximadamente).

Interrumpir entonces el vacío y añadirle 2 a 3 g de tierra activada. Restablecer el vacío hasta obtener una presión residual de 15-30 milibares y, siempre con una temperatura de 90 °C, agitar durante 30 minutos a 250 vueltas por minuto aproximadamente.

Filtrar a continuación en caliente en un baño termoestático (50-60 °C)

*ANEXO V*

## INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE ACEITE DE ORUJOS DE OLIVA EN LOS ACEITES DE OLIVA

### A. MÉTODO LLAMADO DE BELLIER

1. **Material**

— matraz de 100 ml, provisto de un refrigerante de reflujo,

— pipeta de 5 ml graduado en décimas

— sistema calentador que permita alcanzar la temperatura de 80 °C aproximadamente

— termómetro de 15 a 60 °C.

2. **Reactivos**

— solución hidro-alcohólica de potasa (42,5 g de KOH disuelto en 72 ml de agua destilada, el volumen se completará a 500 ml con alcohol etílico a 95°),

— solución de alcohol etílico graduado a 70°,

— solución acuosa de acido acético 1 + 2 (en volumen), ajustado de forma que 1,5 ml neutralicen exactamente 5 ml de la solución hidroalcohólica de hidróxido de potasio en presencia de fenolftaleina.

3. **Preparación de la muestra**

El aceite se privará de agua por decantación y filtración sobre papel efectuados a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión de determinados constituyentes concretos que se habrian podido separar de la materia grasa fluida.

4. **Modo de operar**

Introducir en el matraz alrededor de 1 ml de aceite preparado como se indica en el apartado 3. Añadir 5 ml de solución hidro-alcohólica de potasa. Adaptar el refrigerante a reflujo y ponerlo a hervir durante diez minutos agitando de vez en cuando. Dejar que se refrigere hasta la temperatura ambiente. Añadir 1,5 ml de solución acuosa de acido acético y 50 ml de solución de alcohol etílico previamente llevado a la temperatura de 50 °C. Mezclar por agitación, introducir el termometro y dejar que se refrigere, observando el aspecto de la solución desde el momento que alcance la temperatura de 45 °C. Cuando se forme un precipitado, coposo a una temperatura superior a 40 °C, la reacción será positiva. En ausencia de un precipitado coposo caracterizado, mantener el líquido a una temperatura ambiente, que deberá estar comprendida entre 20 °C y 22 °C durante al menos veinticuatro horas, y si fuere necesario durante cuarenta y ocho horas. Observar de nuevo la solución, la formación de un precipitado coposo en suspensión en medio del líquido indicará igualmente que la reacción es positiva.

*Expresión de los resultados*

Investigación del aceite de orujos (método de Bellier) positiva o negativa.

### B. MÉTODO LLAMADO DE VIZERN MODIFICADO

Lo insaponificable del aceite que deberá analizarse se aislará y su comportamiento en solución en el alcohol a 85° se estudiará bajo determinadas condiciones.

1. **Material**

— matraces de 300 ml de un cristal resistente a los alcalinos y provisto de un refrigerante de reflujo,

— ampollas de decantación de 500 ml o de 1 000 ml,

— vaso de 300 ml y de 250 ml,

— probeta de cristal.

2. **Reactivos**

— solución alcohólica de hidroxido de potasio 2N,

— éter de petróleo,

— alcohol etílico al 50 %,

— alcohol etílico a 96° medido por alcoholímetro,

— agua oxigenada a 10 volúmenes,

— alcohol etílico a 85° medido por alcoholímetro,

3. **Modo de operar**

Pesar alrededor de 5 g de la muestra que deba analizarse dentro de un matraz de 300 ml. Añadir 50 ml de la solución alcohólica de hidróxido de potasio 2 N. Montar el refrigerante de reflujo y llevar a una ebullición ligera. Agitar después de una hora de calentamiento, refrigerar a 30-50 °C y trasladar a una ampolla de decantación utilizando 50 ml de agua destilada.

Lavar cuidadosamente el matraz con 50 ml de éter de petróleo, repetir la operación varias veces. Trasladar el éter de petróleo a una ampolla de decantación. Agitar enégicamente el contenido un poco más de un minuto. Después de la decantación, eliminar la fase acuosa trasladándola a una segunda ampolla de dacantación. Añadir todavía 50 ml de éter de petróleo, agitar enérgicamente el contenido un poco más de un minuto y dejar decantar. La fase acuosa se trasladará a una tercera ampolla de decantación a la que se añadirá 50 ml más de éter de petróleo. Agitar enérgicamente a continuación y dejar decantar.

Recoger en una ampolla de decantación los extractos etéreos procedentes de las distintas extracciones de lo insaponificable y lavar al menos tres veces con alcohol al 50 % (50 ml cada vez) hasta que el líquido de lavado no dé más reacción alcalina a la fenolftaleina.

Filtrar la solución de lo insaponificable en un vaso de 300 ml, lavar el filtro con éter de petróleo y eliminar el disolvente por destilación. Añadir 10 ml de alcohol a 96 % y después de un calentamiento moderado (cerca de 40 °C) filtrar en un vaso de 100 ml.

Lavar el vaso de 300 ml con 10 ml de alcohol a 96° y filtrar a continuación en un segundo vaso.

En un vaso de 100 ml que contenga los extractos alcohólicos de lo insaponificable, añadir 5 ml de agua oxigenada a 10 volúmenes, calentar al baño maría hasta la completa evaporación. Añadir aún 50 ml de alcohol a 96° y 5 ml de agua oxigenada, dejar de nuevo evaporar completamente.

Retirar el vaso del baño maría y añadir 20 ml de alcohol a 85°. Calentar al baño maría prestando mucha atención de no provocar pérdidas de alcohol para no disminuir la concentración. Se trata de un elemento muy importante que no debe descuidarse.

Filtrar sobre papel, refrigerar y examinar el comportamiento de la solución al cabo de una hora, después de cuatro horas. Si después de una hora, la solución es absolutamente transparente, el análisis será negativo, o sea que no habrá aceite de orujos.

Si después de una hora la solución está turbia, repetir la operación cuatro horas mas tarde.

Si al cabo de cuatro horas, la solución está todavía turbia, pero no presenta copos, el análisis será también negativo. Por el contrario, si se observa la formación de copos, el análisis será positivo y entonces se tratará de aceite de orujos.

*Expresión de los resultados*

Investigación del aceite de orujos (método de Vizern modificado): positivo o negativo.

*Observaciones*

Los aceites de oliva darán una solución transparente o como máximo ligeramente opalino durante todo el ensayo. Los aceites de orujos puros o mezclas presentarán copos característicos que permanecerán en suspensión como pequeñas nubes y que terminarán por depositarse al cabo de varias horas de reposo.

*ANEXO VI*

## INVESTIGACIÓN DE LOS JABONES POR LA DETECCIÓN DE LA ALCALINIDAD

**Principio del método**

Detección de los jabones alcalinos por acción sobre el azul de bromofanol.

**Reactivos**

— solución al 0,1 % de azul de bromofenol en el etanol al 96 % (v/v),

— acetona destilada, con un 2 % de agua (v/v) añadido.

La acetona al 2 % de agua deberá presentar una tintura amarilla verdosa en presencia de algunas gotas de la solución de azul de bromofenol.

**Material**

Tubo de ensayo de 150 mm × 15 mm.

**Modo de operar**

Introducir en el tubo de ensayo 10 ml de acetona y una gota de solución de bromofenol. La solución deberá virar al amarillo. Si no, enjuagar el tubo y el tapón con acetona hasta la desaparición de la coloración azul. Introducir 10 g de aceite en el tubo obturarlo con ayuda de un tapón que corresponda, agitar y dejar reposar. Un viraje al azul en la capa superior de acetona indicará la presencia de jabón.

**Expresión de los resultados**

Los resultados se expresarán como positivos o negativos.

---

*ANEXO VII*

## INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE ACEITES REESTERIFICADOS

El método tiene por fin determinar, dentro de los aceites y grasas, la composición de la fracción de los ácidos grasos que se esterifican en la posición 2 (posición B o posición interna) del glicerol, los aceites de oliva reesterificados que contengan más ácido palmítico en posición B que los aceites de oliva no reesterificados.

**Principio**

Este método se basa en la hidrólisis parcial y específica de los triglicéridos por la lipasa pancreática con formación preferente de mono-2 glicéridos. Dicha hidrólisis conducirá a una mezcla que contendrá, junto a triglicéridos no hidrolizados, glicéridos, de los mono-2 glicéridos y de los ácidos grasos libres. Dicha mezcla se dividirá por cromotografía en capa fina y se aislarán los monoglicéridos. Estos monoglicéridos se meranolizarán y los ésteres metilicos obtenidos se analizarán por cromotografía en fase gaseosa.

El producto analizado deberá considerarse comi si se le hubiera añadido aceite reesterificado cuando el porcentaje de ácido palmítico observado en la posición 2 de los triglicéridos sea superior al 2 %.

1. **Material**

— ampolla de decantación de 500 ml,

— columna de cristal para cromotografía de 13 mm de diámetro inferior y de 400 mm de longitud, equipado con una placa de cristal calcinada y de una espita,

— matraz de 250 ml de cuello largo,

— matraz de 100 ml,

— tubo de centrifugadora de 10 ml, con tapón,

— jeringa hipodérmica de 1 ml, equipada con una aguja fina,

— matraz de 25 ml, con refrigerante de aire de cerca de 1 m de longitud con manguito,

— vaso de 50 ml,
— bureta de 5 ml, graduado a 1/20 ml,
— dispositivo para cromatografía en capa fina con places de vidrio de 20 × 20 cm,
— microjeringa de gotas de 3-4 ml,
— tina de revelado para cromatografía en capa fija,
— evaporizador rotativo,
— bāno regulable a 103 ± 2 °C,
— termostato regulable entre 30 °C y 45 °C a ± 0,5 °C,
— agitador eléctrico que vibre y que posibilite una agitación eléctrica de tuno de centrifugadora,
— pulverizador para cromatografía en capa fina,
— lámpara ultravioleta para el examen de las placas cromatográficas,
— agitador de laboratorio, de un tipo conveniente para la dispersión y la mezcla de materiales heterogéneos,
— pH-metro, medidor de PH,
— agitador de hélice,
— cronómetro.

2. **Reactivos**

— solución acuosa de hidróxido de sodio al 12 % (m/v),
— solución al 1 % (m/v) de fenolftalina en el etanol a 95 % (v/v),
— oxido dietílico, exento de peróxidos,
— alcohol isopropílico, o alcohol etílico al 95 % (v/v) para análisis,
— alumina activada para cromatografía neutra de grado de actividad Brockmann I, recientemente activada durante diez horas a 260 °C y conservada en un desecado,
— hexano, o en su defecto eter de petroleo (Eb = 30-50 °C), para cromatografía,
— ácido fórmico al 98 % (m/m) am máximo,
— lipasa pancreática de actividad conveniente (nota 1, nota 2),
— solución tampón: solución acuosa 1 M de trihidrometil- aminometano llevado haspa pH 8 por el ácido clorhídrico 6 N (controlado potencionétrico)
— solución acuosa al 0,1 % (m/v) de colate de sodio (evalidad encimática),
— solución de ácido clorhídrico 6 N,
— disolvente de revelado: hexano (o, en su defecto éter de petróleo)/oxido dietílico/ácido fórmico 70/30/1 (v/v/v),
— solución acuosa de goma arábica al 10 % (m/v),
— solución acuosa de cloruro de calcio ($CACI_2$) al 22 % (m/v),
— solución alcohólica al 0,2 % (m/v) de dicloro-2'7' fluoresceína ligeramente alcalizado por adición de una gota de hidróxido de sodio 1 N por 100 ml,
— silice en polvo, para cromatografía en capa fina,
— solución acuosa de colato de sodio al 20 % (m/v),
— solución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N,
— aceite vegetal neutralizado.

3. **Preparación de la muestra**

Muestra de acidez inferior al 3 %: neutralización directa sobre aluminio 3.2.

Muestra de actividad superior al 3 %: neutralización por las álcalis en presencia de disolvente según 3.1 después paso sobre alúmina según 3.2.

3.1. *Neutralización por los álcalis en presencia de disolvente*

Verter, en una ampolla de decantar de 500 ml, 10 g aproximadamente de aceite bruto, 100 ml de hexano, o en su falta, de eter de petróleo, 50 ml de alcohol isopropílico o de alcohol etílico a 95° algunas gotas de la solución de fenoltoleina y una cantidad de sorio al 12 % que corresponda a la acidez libre del aceite, mas un exceso del 0,3 %. Agitar energicamente durante un minuto: añadir 50 ml de agua destilada, agitar de nuevo y dejar reposar.

Después de la decantación, eliminar la capa inferior que contiene los jabones. Eliminar las posibles capas intermedias (nucílagos y sustancias insolubles), lavar la solución hexanica del aceite neutralizado con unas porciones sucesivas de 25 o 30 ml de una solución de alcohol isopropílico, o etílico, y de agua destilada 1-1 (v/v) hasta desaparición de la coloración rosada de la fenolftaleína.

Eliminar la mayor parte del hexano por destilación en vacío, y secar el aceite a 30-40 °C en vacio con ayuda de una corriente de nitrógeno puro hasta la eliminación total del disolvente.

3.2. *Paso sobre alúmina*

Preparar una suspensión de 15 g de alúmina activada en 50 ml de hexano o, en su defecto, de eter de petroleo, y verter, agitandolo, en una solumna de cristal para cromatografía. Regularizar el reparto de la alúmina y dejar salir el disolvente hasta 1-2 mm por encima del nivel superior del absorbente. Verter cuidadosamente en una columna una solución preparada unos quince minutos antes por disolución de 5 g. de aceite en 25 ml de hexano o, en su defecto, de eter de petroleo, y recoger la totalidad del líquido que salga de la columna en un matraz de 100 ml.

Eliminar la mayor parte del disolvente por destilación en vacio, después secar el aceite a 30-40 °C en vacío con la ayuda de una corriente de nitrógeno puro hasta la eliminación total del disolvente.

4. **Preparación**

Poner, dentro de un matraz de 250 ml de cuello largo, 30 g desílice en polvo y 60 ml de agua destilada, y agitar hasta la obtención de una pasta bien homogénea. Extraer el gas manteniendolo en el vacio de la trompa de agua durante un minuto.

Instalar en las condiciones habituales la pasta sobre las placas por medio de un instalador regulando el espesor de la capa a 0,25 mm.

La cantidad de pasta anterior será suficiente para la preparación de 5 placas 20 × 20 cm.

Dejar secar las placas al aire durante 15 minutos aproximadamente y, después, secarlas en una estufa a 103 °C ± 2 °C durante dos horas.

Conservar las placas así preparadas en un desecador.

5. **Modo de operar**

5.1. *Hidrólisis por la lipasa pancreática*

Pesar en el tubo de centrífuga de 10 ml aproximadamente 0,1 g de la muestra praparada.

Añadir 20 mg de lipasa y 2 ml de solución tampón. Agitar cuidadosamente y con precaución, y después añadir 0,5 ml de la solución de colato de sodio al 0,1 % y 0,2 ml de la colución de cloruro de calcio. Cerrar el tubo con el tapón esmerilado, sacudir con precaución (evitando moja el tapón) y poner inmediatamente el tubo en el termostato, ajustado a 40 °C ± 0,5 °C, agitando durante un minuto exactamente.

Retirar el tubo del termostato y agitar enérgicamente durante diez minutos exactamente.

Refrigerar en seguida bajo una corriente de agua: añadir 1 ml de ácido clorhídrico 6 N y 1 ml de óxido dietílico. Tapar y agitar energicamente. Dejar reposar y extraer la fase orgánica superior con la ayuda de la jeringa.

5.2. *Separación de los manoglicéridos por cromatografia en capa fina*

Depositar el extracto sobre la placa cromatografica a aproximadamente 1,5 cm del borde inferior en línea coninua y uniforme para obtener una línea de salida lo mas fina posible.

Introducir la placa en la cuba de revelado bien saturada y revelar con el disolvente de revelado hasta 1 cm aproximadamente del borde superior. El revelado de la place deberá hacerse a la temperatura de 20 °C aproximadamente.

Secar la placa al aire a la temperatura de la cuba y pulverizar la solución de dicloro-2'7' fruoresceína. Delimitar la banda de los monoglicéridos (Rf = 0,035 aproximadamente) bajo luz ultravioleta, recuperarlas con la ayuda de una espátula metálica (evitando levantar los componentes que hayan permanecido sobre la línea de salida) y recoger al sílice en un matraz de metilation de 25 ml.

Transformar los monoglicéridos en ésteres metílicos tratando directamente en las condiciones del metodo general de preparación de los metilésteres de los ácidos grasos indicados en el punto 7.3 el silice anteriormente recogido, después proceder a la cromatografía en fase gaseosa de los ésteres según el método indicado en el punto 7.4.

Determinar sobre la misma muestra de la composición de los ácidos grasos totales, cuya composición con la de los ácidos grasos en posición 2 será util para la interpretación de los resultados obtenidos.

6. **Expresión de los resultados**

Calcular la composición de los ácidos grasos en posición 2 en % con una cifra decimal (nota 3).

7. **Notas**

7.1. *Control de la actividad lipósica*

Preparar una emulsión de aceite agitando, en un mezclador adecuado durante alrededor de 10 minutos, una mezcla constituida por 165 ml de la solución de goma arábiga al 10 %, 15 gramos de hielo picado y 20 ml de un aceite previamente neutralizado.

Dentro de un vaso de 50 ml, meter sucesivamente 10 ml de la emulsión anterior; 0,3 ml de solución de colato de sodio al 20 % y 20 ml de agua destilada.

Colocar el vaso en un termostato regulado a 37 °C ± 0,5 °C e introducir en el vaso los electrodos de un ph-metro y un agitador a hélice.

Por medio de una bureta de 5 ml, añadir gota a gota una solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta la obtención de un pH de 8,5.

Añadir un volumen adecuado de una suspensión de polvo de lipasa en el agua (ver más adelante). Desde el momento en que el pH-metro indique un pH de 8,3 poner en marcha el cronometro y añadir la solución de hidroxido de sodio 0,1 N al ritmo necesario para mantener el pH en el valor de 8,3. Anotar cada minuto el volumen de solución alcalina consumida.

LLevar los datos obtenidos a un sistema de ejes de coordenadas, poniendo en las abcises los tiempos y en las ordenadas los ml de solución alcalina consumida para mantener el pH constante. Deberá obtenerse un gráfico lineal.

La suspensión de lipasa mencionada en el párrafo precedente es una suspensión al 1 % en peso en el agua. Tomar para cada ensayo la cantidad necesaria de dicha suspensión para que en cuatro o cinco minutos aproximadamente, se consuma 1 ml de solución alcalina. Normalmente, dicho resultado se obtendrá con 1 a 5 mg de polvo.

La unidad lipasa se definirá como la cantidad de encima que liberan 10 micro-equivalentes de ácido por minuto.

Actividad A del polvo utilizado, medido en unidades lipasa por mg:

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

V = número de ml de solución de hidróxido de sodio 0,1 N por minuto, calculado a partir del gráfico,

m = masa de la toma de muestra de polvo, en mg.

La lipasa utilizada deberá tener una actividad comprendida entre 0,8 y 2 unidades lipasa por mg.

7.2. *Preparación de la lipasa*

Existe en el comercio de las lipasas con una actividad lipasica satisfactoria. Puede prepararse en el laboratorio de la siguiente manera:

Refrigerar a 0 °C 5 kg de páncreas frescas de cerdo, a las que se les haya despojado previamente de la grasa sólida y del tejido conjuntivo que les rodea, triturarles en un molino de cuchillas para obtener una pasta fluida. Agitar dicha pasta fuida durante cuatro a seis horas con 2,5 l de acetona anhidro, después centrifugar. Extraer el residuo tres veces más con el mismo volumen de acetona, dos veces con una mezcla de acetona-óxido dietílico 1/1 (v/v), y dos veces con el óxido dietílico.

Secar el residuo durante cuarente y ocho horas en vacío para obtener un polvo estable que deberá conservarse en el refrigerador.

7.3. *Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos*

Según el método descrito en el punto II del anexo VI del Reglamento (CEE) nº 72/77 de la Comisión, de 13 de enero de 1977, por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 1470/68 relativo a la toma y reducción de muestras así como a la determinación del contenido en aceite en impurezas y en humedad de las semillas oleaginosas (1).

7.4. *Cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos*

Según el metodo descrito en el punto III del anexo VI del Reglamento (CEE) nº 72/77.

---

(1) DO nº L 12 de 15. 1. 1977, p. 11.

*ANEXO VIII*

## INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE OTROS ACEITES EN EL ACEITE DE OLIVA: ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN ESTEROLÍTICA DE LAS MATERIAS GRASAS

### Principio

Análisis por cromatografía en fase gaseosa de los esteroles preparados por cromatografía en capa fina a partir de lo insaponificable secado con precaución.

### Equipo

1. equipo para cromotografía en capa fina, comprendido en particularcuatro placas de cristal de 20 × 20 × 0,4 cm, dos de 20 × 5 × 0,4 cm y una microjeringa de 0,1 ml,
2. vasos de 50 ml,
3. filtros porosos, porosidad, 3 diámetro 1,5 mm,
4. matraz de 100 ml,
5. probeta de centrifugadora de fondo cónico de 10 ml, provista de tapón esmerilado,
6. pipetas graduadas de 1 ml,
7. aparato de cromatografía en fase gaseosa equipado con un detector de ionización de llama con un inyector de plata o de cristal o sistema de inyección directa sobre la columna y conectado a un aparato registrador,
8. columna de cromatografía en fase gaseosa, de cristal o de acero inoxidable en U o en espiral, de 1 a 2 m de largo y de 3 a 4 metros de diámetro interior, fase estacionaria de goma de silicono [tipo metil (1)] estable hasta al menos 300 °C, que impregne a un indice del 2 al 4 % tierra de Diatonea calcinada, lavada con ácidos y silanizada, de granulometría 80/100 o 100/120 mesh,

   Observación: Cuando determinados tipos de acero inoxidable puedan provocar resultados erróneos por deterioro de los esteroles se recomienda la utilización de cristal,
9. microjeringa que pueda aportar dosis de hasta 5 a 10 µl,

### Reactivos

1. cloroformo para cromatografía,
2. benceno para cromatografía,
3. heptano,
4. gel de sílice (por ejemplo Kieselgel G),
5. solución de referencia para la cromatografía sobre placa constituida por colesterol al 5 % en el cloroformo.

   6.acetona para cromatografía,
7. solución al 0,1 % en el alcohol etílico absoluto de sal sódica de 2'7' disclorofluoresceno,
8. piridina,
9. hexametildisilazano,
10. trimetil clorosilano,
11. solución para la prueba de sensibilidad: 1 mg de colesterol por ml de n-pentano,
12. solución para el test de la resolución de los picos: 0,9 mg de fitoesteroles de aceite de colza y 0,1 mg de colesterol por ml de n-pentano. Los esteroles deberán prepararse según el procedimiento descrito en en B del modo operativo,
13. solución para el test de referencia: 1 mg de fitoesteroles de aceite de girasol por ml de n-pentano, preparados como ello se describe en B del modo operativo,

### Preparación de las placas para cromatografía

Colocar en orden sobre el dispositivo, una placa de 20 × 5 × 0,4 cm, cuatro placas de 20 × 20 × 0,4 cm y una placa de 20 × 5 × 0,4 cm.

(1) Por ejemplo SE 30.

En un matraz de 500 ml de cuello largo, verter 40 g de gel de sílice y aproximadamente 80 ml de agua. Agitar con una varilla de vidrio, y en caso con un agitador mecánico de vidrio hasta obtener una suspensión homogénea. Eliminar los eventuales gases practicando el vacío con ayuda de una trompa de vacío por lo menos durante un minuto. Pasar enseguida la suspensión al dispositivo, regulando el espesor a 0,5 mm, y recubrir uniformemente las placas. Dejar que las placas se seguen al aire durante 15 minutos aproximadamente y secar después en estufa a 105 °C durante dos horas. Conservar las placas así preparadas en un desecador al vacío.

## MODO DE OPERAR

### A. Preparación del insaponificable

*Introducción*

Se designan con el nombre de insaponificable las sustancias solubles en la materia grasa que, después de saponificación, son insolubles en agua y solubles en el solvente utilizado para la determinación. Comprende los componentes naturales de las materias grasas (esteroles, alcoholes, hidrocarburos), así como las sustancias orgánicas no volátiles a 100 °C (aceites minerales) distintas de las materias grasas, que contenga en su caso. Como solvente, se utiliza éter de petróleo o bien óxido de etilo. Hay que tener en cuenta que, en la mayor parte de los casos, los resultados con los dos solventes son diferentes y que con el óxido de etilo se obtienen contenidos en % más elevado. Para el aceite de oliva, teniendo en cuenta las condiciones climáticas en que se encuentran la mayoría de los laboratorios de análisis, el éter de petróleo ha sido reconocido como el solvente que debe emplearse.

**Método del éter de petróleo**

*Material*

— matraz de 150 ml, aproximadamente, que pueda adaptarse a un refrigerante de reflujo,
— ampollas de decantación de aproximadamente 500 ml,
— estufa regulada a 103 °C ± 2 °C.

*Reactivos*

— solución etanólica de KOH de aproximadamente 2 N en etanol al 95 % (v/v). El reactivo no debe tener un color más oscuro que el amarillo pajizo,
— éter de petróleo destilado entre 40 y 60 °C, con un índice de bromo inferior a 1, exento de residuo.

*Modo de operar*

Pesar exactamente 5 g, con una precisión de 0,01 g, de materia grasa en el matraz. Añadir 50 ml de la solución atanólica de KOH de aproximadamente 2 N. Adaptar al refrigerante de reflujo. Calentar durante una hora a ebullición ligera. Parar el calentamineto. Añadir por la parte superior del refrigerante aproximadamente 50 ml de ague destilada y agitar.

Trasvasar, después de enfriamiento, a una ampolla de decantación y enjuagar el matraz varias veces, con un total de 50 ml, aproximadamente, de éter de petróleo.

Agitar enérgicamente durante un minuto.

Dejar reposar hasta que se produzca la separación completa de las dos fases y recoger la solución jabonosa en una segunda ampolla de decantación. Si se forma, excepcionalmente, una emulsión, destruirla añadiendo pequeñas cantidades de etanol o de solución concentrada de hidróxido de potasio.

Retirar la extracción de la solución jabonosa otras dos veces, cada una de ellas con 50 ml, aproximadamente, de éter de petróleo.

Reunir las tres fracciones en una misma ampolla, y lavarlas tres veces con 50 ml, aproximadamente, de etanol al 50 % (v/v).

Por la parte superior de la ampolla, trasvasar, en varias veces si fuere necesario, cuantitativamente la solución de éter de petróleo a un matraz de 250 ml tarado (efectuando pequeños enjuagues de la ampolla con el éter de petróleo).

El solvente se elimina calentándolo prudentemente al vacío y los residuos se secan a temperatura inferior a 50 °C al vacío, para evitar oxidaciones indeseables.

B. **Separación de la fracción esterolítica por cromotografía sobre capa fina**

Introducir en la cubeta de revelado la mezcla heptano n/acetona 85/15 o benzol/acetona 95/5 (v/v) hasta la altura de 1 cm aproximadamente; cerrar con la ayuda de la tapadera y dejar reposar durante tres horas al menos de forma que el equilibrio/vapor se establezca. Se aconsejará igualmente fijar sobre las superficies interiores de la cámara bandas de papel filtro. Esta precaución ofrece la ventaja de reducir en un tercio la duración de migración del frente del líquido.

Preparar entretanto una solución al 5 % de insaponificable extraido al eter de petroleo en el cloroformo. Tomar 0,3 ml aproximadamente de dicha solución y depositarla con la ayuda de la microjeringa de 0,1 ml sobre la placa cromotográfica a 1,5 cm aproximadamente del borde inferior, en banda continua y uniforme de forma que se pueda obtener una linea de partida lo más delgada posible. Según la técnica habitual, depositar en una extremidad de la placa algunos milimetros de la solución de referencia que contenga colesterol para identificar el Rf de la fracción esterolítica.

Situar la placa en la cubeta de revelado preparada como se indica anteriormente. La temperatura ambiente deberá ser de 20 °C aproximadamente. Cerrar con la tapadera y revelar hasta que el frente del disolvente haya llegado a 1 cm aproximadamente del borde superior de la place. Retirar la placa de la cámara de revelado y dejar evaporar el disolvente en una corriente de nitrógeno caliente.

Revelar vaporizando uniformemente y con precaución la solución alcoholica de sal sódica de la 2'7' diclorofluoresceno sobre la placa. Examinando la placa por ultravioleta, se determinará la posición de los esteroles gracias al alineamiento con la mezcla de colesterol procedente de la solución de referencia. Recuperar arañando con la ayuda de una espátula metálica la banda de los esteroles. Introducir el gel de sílice separando en un vaso de 50 ml con 15 ml de cloroformo caliente, agitar y transferir la totalidad de gel de sílice sobre el filtro poroso y filtrar.

Lavar 3 veces el filtro cada vez con una porción de 15 ml de cloroformo caliente, recogiendo el filtrado en un matraz de 100 ml.

Evaporar la solución clorofórmica de 4 a 5 ml y verterla en la probeta para centrifugadora provista de un tapon esmerila do, lavado previamente. Secar evaporando el disolvente por un ligero recalentamiento en una corriente de nitrógeno y pesar la fracción esterolítica obtenida de esta manera.

C. **Análisis cromatográfico en fase gaseosa de los esteroles**

1. *Preparación de los trimetilsilésteres (TMSE)*

Por cada mg de esterol, añadir en la probeta 0,02 ml de reactivo para la silonización, conpuesta por una mezcla de piridina-hexametilazano-trimetilclorosilano 9/3/1 (v/v/v) poniendo cuidado de evitar cualquier resto de humedad. Colocar la probeta en un desecador durante treinta minutos aproximadamente, cerrar después, centrifugar durante algunos minutos. Tomar, para el análisis que deberá practicarse a continuación, la solución restante.

2. *Condiciones del análisis por cromatografía en fase gaseosa*

Temperatura de la columna 220 a 250 °C.

Temperatura del sistema de inyección cuando se caliente por separado: 20 a 40 °C por encima de la temperatura de la columna. Caudal del nitrógeno: 30 a 60 ml por minuto. Desconectar el detector y equilibrar las nuevas columnas en dichas condiciones durante dieciseis a veinticuatro horas. Conectar el detector, encender la llama y regular los caudales de hidrógeno, de oxígeno o de aire de forma que se obtenga una altura de llama y una sensibilidad convenientes. Poner en marcha el aparato y dejar desenrollar el papel a una velocidad apropiada; añadir el cero y el atenuador. Cuando la línea de baja sea estable, el aparato estará preparado para ser utilizado.

3. *Tests de sensibilidad*

Tomar 5 ml de la solución del test de sensibilidad, evaporar el disolvente, tratar como se indica en 1; inyectar de 0,1 a 0,2 µl de la solución preparada así (TMSE). Sólo aparecerá un pico de colesterol en el cromatograma.

Regular el atenuador de forma que se utilice aproximadamente toda la escala del aparato grabador.

4. *Tests de resolución de los picos*

Tomar 5 ml de la solución preparada para el test de resolución.

Evaporar el disolvente, tratar como se indica en 1.

Inyectar 0,1 a 0,2 µl de la solución preparada de esta manera (TMSE).

Los picos de colesterol, de brasicaesterol, de compesterol y de ß-sitosterol deben aparecer sobre el cromatograma. Medir las distancias de retención (distancia del punto de inyección al punto de máxima altura del pico) de los picos, $d_{CH}$ para el colesterol, $d_B$ para el brasicaesterol, $d_C$ para el campesterol y $d_S$ para el ß-sitosterol y las anchuras en la base de los picos (longitud de retención entre las intersecciones con la línea de base de las tangentes a los puntos de inflexión situados sobre los lados anterior y posterior del pico $\omega_{CH}$ para el colesterol y $\omega_B$ para el brasicaesterol. La resolución de los picos, expresada por la fórmula

$$PR = 2\,\frac{(d_B - d_{ch})}{\omega_B + \omega_{CH}}$$

Deberá ser igual al menos a 1.

Calcular los tiempos de retención relativos (colesterol = 1,00) para el brasicaesterol, el compesterol y ß-sitosterol.

5. *Prueba de referencia*

Tomar 5 ml de la solución de la prueba de referencia, evaporar el disolvente, tratar como se indica en 1, inyectar 0,1 a 0,2 µl de la solución preparada de esta manera (TMSE). Los picos de compesterol, de estigmastenol, de ß-sitosterol y Δ 7 estimastenol deberán aparecer sobre el cromatograma.

Medir las distancias de retención de los picos, $d_C$ para el compesterol, $d_{ST}$ para el estigmastend, $d_S$ para ß-sitosterol y $d_{ST}$ para Δ 7 estigmastenol.

Calcular los tiempos de retención, que serán aproximadamente:

| | |
|---|---|
| colesterol: | 1,0 |
| brasicasterol: | 1,1 |
| compesterol: | 1,3 |
| estigmasterol: | 1,4 |
| ß-sitosterol: | 1,6 (1) |
| Δ 7 estigmasterol | 1,8 (1) |

6. *Análisis*

Inyectar de 0,1 a 0,2 µl de la solución TMSE de los esteroles que deban analizarse y registrar el cromatograma.

D. **Expresión de los resultados**

Para la interpretación de la composición de la fracción esterolítica analizada, no será necesario seleccionar los picos que tengan tiempos de retención diferentes de los determinados experimentalmente para los 6 esteroles mencionados anteriormente.

El contenido en % en ß-sitosterol vendrá dado por la fórmula:

$$\frac{\text{Área del pico del ß-sitosterol}}{\text{Suma de las áreas de los seis picos de esteroles}} \times 100$$

El contenido en ß-sitosterol no debe ser inferior al 93 % con relación a la composición en % de los esteroles totales.

---

(1) Cuando otros esteroles tengan, como el 5 avenasterol, en dichas condiciones, el mismo volumen de retención que el ß-sitosterol, se contarán como ß-sitosterol.

(2) Cuando otros esteroles tengan, en dichas condiciones, el mismo volumen de retención que el Δ 7 estigmastenol, se contarán como del Δ 7 estigmastenol.

*ANEXO IX*

## CONTENIDO EN ACEITE DE LOS ORUJOS DE OLIVA

### Material

— aparato de extracción apropiado provisto de un matraz de 200 a 250 ml,

— baño por calefacción electrica (baño de arena, baño de agua, etc.) o placa calentadora.

— balanza analítica,

— estufa regulada a 80 °C como máximo,

— estufa de calefacción electrica provista de un dispositivo de termoregulación regulado a 103 °C ± 2 °C y que permita realizar una insuflación de aire o una presión reducida,

— triturador mecanico facil de limpiar y que permita el triturado sin calentamiento y sin disminución sensible de su contenido en agua y en aceite,

— cartucho de extracción y algodón hidrófilo o papel filtro, exentos de productos extraibles por el hexano,

— desecador,

— criba con agujeros de 1 mm de diametro,

— piedra pómez en pequeños granos, previamente secada.

### Reactivo

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

## MODO DE OPERAR

### Preparación de la muestra para ensayo

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

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

### Toma de muestra

Pesar a 0,01 g aproximadamente, desde el momento del final del triturado, alrededor de 10 g de la muestra para ensayo.

### Preparación del cartucho de extracción

Colocar la toma de muestra en el cartucho y taparlo con el tampon de algodón hidrofilo. En caso de haber utilizado un papel filtro, envolver la molienda en dicho papel.

### Presecado

Cuando el orujo este muy humedo (contenido en agua y en materias volátiles superior al 10 %), efectuar un presecado colocando durante un tiempo conveniente el cartucho lleno (o el papel filtro) en la estufa calentada a 8 °C como máximo, para llevar el contenido en agua y en materias colátiles por debajo del 10 %.

### Preparación del matraz

Pesar, a 1 g aproximadamente, el matraz que contenga 1 a 2 granos de piedra pomez, previamente secado en la estufa a 103 °C ± 2 °C y después refrigerado durante al menos una hora en el desecador.

### Primera extracción

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

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

**Segunda extracción**

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

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

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

**Eliminación del disolvente y pesada del extracto**

Expulsar por destilación sobre estufa de calefacción electrica la mayor parte del disolvente. Eliminar los últimos restos de disolvente calentando el matraz en la estufa a 103 °C ± 2 °C durante 20 minutos. Facilitar dicha eliminación, ya sea insuflando aire de vez en cuando o preferiblemente un gas inerte, o actuando bajo una presión reducida.

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

Calentar de nuevo 10 minutos en las mismas condiciones, refrigerar al desecador y pesar.

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

Efectuar dos determinaciones sobre la misma muestra para ensayo.

## EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

**Modo de cálculo y fórmula**

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

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

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

$m_0$ es la masa, en gramos, de la toma de muestra,

$m_1$ es la masa, en gramos, del extracto después de secado.

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

Expresar el resultado con un solo decimal.

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

$$S \times \frac{100}{100-U} = \text{extracto en \% grasa/seca}$$

donde:

S es el procentaje en masa de extracto del producto tal cual ver a),

U es su contenido en agua y en materias volátiles.

**Repetitividad**

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

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