

PROYECTO MEJORA DE LAS ECONOMÍAS
REGIONALES Y DESARROLLO LOCAL

—
TÉCNICAS Y PRÁCTICAS
DE LABORATORIO PARA
EL ANÁLISIS DE ACEITE
DE OLIVA VIRGEN

CUADERNO TECNOLÓGICO N° 23

Autor:

María Luisa Ruiz Domínguez

Experto en análisis físico-químico y
sensorial
en Aceite de oliva virgen

Diciembre de 2015



INTI



Unión Europea

PROYECTO MEJORA DE LAS ECONOMÍAS
REGIONALES Y DESARROLLO LOCAL



Unión Europea

Delegación de la Comisión Europea en Argentina
Ayacucho 1537
Ciudad de Buenos Aires
Teléfono (54-11) 4805-3759
Fax (54-11) 4801-1594



INTI



Instituto Nacional de Tecnología Industrial
Gerencia de Cooperación Económica e Institucional
Avenida General Paz 5445 - Edificio 2 oficina 212
Teléfono (54 11) 4724 6253 | 6490
Fax (54 11) 4752 5919

www.ue-inti.gob.ar

CONTACTO

Información y Visibilidad: Lic. Gabriela Sánchez
gabriela@inti.gob.ar

PROYECTO MEJORA DE LAS ECONOMÍAS
REGIONALES Y DESARROLLO LOCAL

—
TÉCNICAS Y PRÁCTICAS
DE LABORATORIO PARA
EL ANÁLISIS DE ACEITE
DE OLIVA VIRGEN

CUADERNO TECNOLÓGICO N° 23

Autor:

María Luisa Ruiz Domínguez

Experto en análisis físico-químico y sensorial
en Aceite de oliva virgen

Diciembre de 2015



INTI



Unión Europea

ÍNDICE

1. PRESENTACIÓN.....	7
2. RESUMEN.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	10
3.1 La olivicultura.....	10
3.1.1 Origen y distribución	
3.1.2 La olivicultura en Argentina	
3.2 La aceituna, el aceite y su composición.....	13
3.3 La calidad del aceite de oliva.....	16
3.3.1 Clasificación de los aceites de oliva en función de la calidad	
3.3.2 Control de calidad de los aceites de oliva	
3.4 Factores que influyen en la calidad del aceite de oliva.....	18
3.4.1 Influencia de los factores agronómicos sobre la calidad del aceite de oliva	
3.4.2 Influencia de los factores relacionados con el proceso de elaboración sobre la calidad del aceite de oliva	
3.4.3 Influencia de los factores relacionados con el almacenamiento en bodega, el envasado y la comercialización sobre la calidad de los aceites de oliva	
4. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE LOS ACEITES DE OLIVA Y ORUJO DE OLIVA.....	26
4.1 Parámetros de calidad.....	26
4.1.1 Determinación de los ácidos grasos libres	
4.1.2 Determinación del Índice de Peróxidos	
4.1.3 Prueba espectrofotométrica en el UV	
4.1.4 Análisis sensorial del aceite de oliva virgen	
4.1.5 Determinación del contenido en los esteres etílicos y ceras	
4.2 Parámetros de pureza.....	40
4.2.1 Determinación de la composición de esteres metílicos de los ácidos grasos y los isómeros trans mediante cromatografía de gases con columna capilar.	
4.2.2 Determinación de la composición y del contenido de esteroides y dialcoholes triterpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar.	
4.2.3 Determinación del contenido de alcoholes alifáticos mediante cromatografía de gases con columna capilar.	
4.2.4 Determinación de los estigmastadienos en los aceites vegetales	
4.2.5 Determinación de la diferencia entre el contenido real y el contenido teórico en triglicéridos con ECN 42.	

4.3 Otros métodos analíticos.....	64
4.3.1 Determinación de la estabilidad oxidativa mediante Rancimat	
4.3.2 Determinación del contenido en polifenoles totales	
4.3.3 Determinación de biofenoles de los aceites de oliva por HPLC	

5. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO DE ACUERDO A LA NORMA ISO 17025.....	68
5.1 Estudio de validación de un método de ensayo.....	68
5.2 Control de calidad de un método de ensayo.....	69
6. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA.....	71

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1 - Distribución porcentual de la superficie mundial de olivar.
Figura 2 - Distribución porcentual de la composición de la aceituna.
Figura 3 - Valor porcentual de los factores condicionantes de las características cualitativas del aceite de oliva.
Figura 4 - Diagrama de flujo en la obtención de aceites de oliva.
Figura 5 - Esquema decisiones Aceite virgen extra.
Figura 6 - Esquema decisiones Aceite virgen.
Figura 7 - Inicio reacción de neutralización de los ácidos grasos libres.
Figura 8 - Final reacción de neutralización de los ácidos grasos libres.
Figura 9 - Exceso en la adición de solución de KOH 0.1N.
Figura 10 - Fases de la valoración con Tiosulfato sódico 0.01N.
Figura 11 - Sala de cata y cabina individual preparada para la cata.
Figura 12 - Cromatografía de Gases Bruker.
Figura 13 - Esquema de decisiones para determinar la pureza de aceites de oliva vírgenes.
Figura 14 - Capsulador, microvial y vial de cromatografía. Matraces.
Figura 15 - Batería de mantas calefactoras.
Figura 16 - Batería de embudos de decantación.
Figura 17 - Aplicador de placa Linomat.
Figura 18 - Rotavapor y desecador.
Figura 19 - Campana de vacío con T^a.
Figura 20 - Cromatógrafo de Gases Varian.
Figura 21 - Elución al vacío y elución manual .
Figura 22 - Equipo Rancimat para determinación de la estabilidad oxidativa.
Figura 23 - Cromatógrafo de Líquidos (HPLC).
- Tabla 1 - Composición mayoritaria de la aceituna en función de la parte del fruto.
Tabla 2 - Composición de ácidos grasos del aceite de oliva.
Tabla 3 - Valores límites para los parámetros químicos que clasifican los aceites por categorías de calidad.
Tabla 4 - Tiempos de retención relativos de los esteroides del aceite de oliva.

ABREVIATURAS

CG	Cromatografía de Gases
HPLC	Cromatografía de Líquidos de alta resolución
PA	Calidad para análisis
HMDS	Hexametildisilazano
TMCS	Trimetilclorosilano

1. PRESENTACIÓN

La Unión Europea y el INTI firmaron un convenio de financiación destinado a mejorar la competitividad de las miPyMEs del norte argentino acercando respuestas tecnológicas apropiadas al nuevo entorno productivo industrial. Los responsables de la ejecución del Proyecto "Mejora de las Economías Regionales y Desarrollo Local" son el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), en representación del Gobierno Nacional, y la Delegación de la Unión Europea en Argentina.

Durante más de medio siglo, el INTI ha construido capacidades profesionales e infraestructura tecnológica de relevancia, que lo posicionan hoy como actor importante para aportar innovación tecnológica aplicada a los procesos productivos de toda la economía y para el desarrollo de soluciones industriales, que incrementen la productividad y la competitividad de la industria nacional.

Con la ejecución de este proyecto, se busca acercar la tecnología y las capacidades técnicas a las regiones de menor desarrollo relativo del país, poniendo a disposición de las miPyMEs y Pymes los medios para satisfacer las demandas de mejora de eficiencia y calidad de sus productos y/o servicios, para dar un salto cualitativo en cada una de las provincias del NOA y NEA.

Por tanto, a través de un diagnóstico y evaluación de necesidades tecnológicas, hecho en articulación con los gobiernos provinciales, se diseñó un plan de acción sectorial que se implementó entre el 2011 y el 2015, en cinco sectores industriales determinados como prioritarios: industrialización de alimentos, curtiembre, textil, y metalmecánica junto a la gestión medioambiental, como eje transversal a los sectores industriales anteriores.

El proyecto Mejora de las Economías Regionales y Desarrollo Local surgió como parte de las acciones de vinculación internacional del INTI, en donde la cooperación técnica con organismos públicos y privados del mundo -presentes en el campo tecnológico- favorecen el intercambio de conocimientos como elemento fundamental para el desarrollo industrial local.

En esa dirección, uno de los componentes de este proyecto fue la convocatoria de especialistas en diversas temáticas, para cumplir con misiones de trabajo en nuestro país. El objetivo de cada misión es brindar capacitaciones específicas a técnicos de las provincias norteñas, de acuerdo con la especialidad de cada experto, a grupos de trabajo de Centros Regionales de Investigación y Desarrollo, así como a Unidades Operativas que conforman la red INTI, y brindar asistencia técnica a las miPyMEs que acompañen el desarrollo de las actividades del proyecto. Además, mantienen entrevistas con actores locales, quienes constituyen un recurso esencial y estratégico para alcanzar los objetivos planteados.

La publicación que se dispone a conocer ha sido concebida como resultado de una misión técnica de uno de los expertos intervinientes en este proyecto. Los expertos, al finalizar su trabajo en el país, elaboran un informe técnico con recomendaciones para el fortalecimiento del sector para el cual fue convocado y que da lugar a la presente producción, publicada con el propósito de divulgar los conocimientos a partir de las necesidades detectadas y los resultados del intercambio efectivo hecho en territorio, conjugando los basamentos teóricos con la realidad local.

Dra. Graciela Muset

DIRECTORA DEL PROYECTO MEJORA DE LAS ECONOMÍAS REGIONALES Y DESARROLLO LOCAL

Este documento ha sido realizado con la ayuda financiera de la Comunidad Europea. Su contenido es responsabilidad exclusiva del autor y, en ningún caso, se debe considerar que refleja opinión oficial de la Unión Europea.

2. RESUMEN

Este Cuaderno Tecnológico trata de recopilar la información presentada durante la misión realizada en Argentina dentro del Proyecto "Mejora de las Economías Regionales y Desarrollo local en la República Argentina" financiado por la Unión Europea, como complemento al informe final realizado.

Pretende ser un manual de consulta para los técnicos del INTI, de forma particular para los técnicos del centro INTI La Rioja, en su misión de puesta en marcha de un laboratorio para análisis de aceite de oliva, cuyo objetivo es ser centro de referencia de la zona, realizando labores de asesoramiento y apoyo técnico al sector olivícola de la región.

En este cuaderno se presenta información de los métodos de análisis del Consejo Oleícola Internacional y la Unión Europea, tanto para el control de calidad del aceite de oliva como para la determinación de genuinidad del mismo, que se han trabajado durante la misión. Se pretende dar pautas concretas y concisas que faciliten su puesta a punto en el laboratorio y la elaboración de los correspondientes procedimientos normalizados de trabajo, incluyendo información de referencias comerciales y material de laboratorio a emplear.

Asimismo, el cuaderno incluye la información que se ha transmitido al personal de INTI, las empresas, instituciones y miembros del sector, con objeto de profundizar en el conocimiento del aceite de oliva virgen, tratando no solo los aspectos relacionados con la metodología analítica y su aplicación sino también todos aquellos factores del cultivo y la elaboración que van a ser determinantes de la obtención de un producto de alta calidad.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 LA OLIVICULTURA

3.1.1 Origen y distribución

El origen del olivo se remonta al 3000-4000 a.C., en Asia Menor y el Oriente Próximo, su cultivo dio lugar a una de las primeras actividades postrecolectoras de la humanidad, que estableció lo que se denominó centros de domesticación del olivo al este de Siria e Irán y en Nubia. En un principio fue introducido en la Península Ibérica por los fenicios, en el siglo IX a.C., que comerciaban en diversos puertos del Mediterráneo. La difusión del cultivo se realizó de oriente a occidente a través de las dos orillas del Mediterráneo, llegando a ser el árbol más representativo de dicha cuenca. En la actualidad, el olivo está extendido por todo el mundo, mayoritariamente en la Unión Europea, pero también se cultiva en otras zonas como América, Australia y Sudáfrica.

El olivo (*Olea europaea* L.) es una especie arbórea originaria del Mediterráneo oriental (Asia Menor), expandiéndose posteriormente por todas las riberas mediterráneas. En la actualidad, el cultivo del olivo está presente en cerca de cuarenta países de todo el mundo, teniendo especial relevancia en todo el arco mediterráneo. En general, su extensión al resto del planeta coincide con zonas en las que se dan condiciones similares a este biotopo.

La superficie de cultivo en la Unión Europea es de 4.4 millones de hectáreas, lo que supone el 47% de la superficie dedicada al olivar en todo el mundo. España es el país que más superficie dedica a este cultivo, suponiendo el 48% de la superficie de la UE y el 22% de la mundial. Sólo Italia y Túnez superan ampliamente el millón de hectáreas de olivar.

La evolución de las superficies de cultivo de olivar en los últimos años ha sido claramente positiva, con aumentos significativos a nivel mundial de casi el 21% en los últimos veinte años, excepto para los países de la UE, donde o se ha mantenido o incluso ha descendido (6-8%) la superficie en los últimos 6 años, dependiendo del período de tiempo analizado.

En cuanto a la producción de aceite de oliva la más alta corresponde a España (60.3% del total), seguida de Italia (23.9%), Grecia (13.6%), Portugal (1.8%), y de otros países como Francia, Chipre, Eslovenia y Malta que aportan el 0.4% de la producción en la Unión Europea. España es el primer país productor de aceite de oliva en la UE y del mundo.

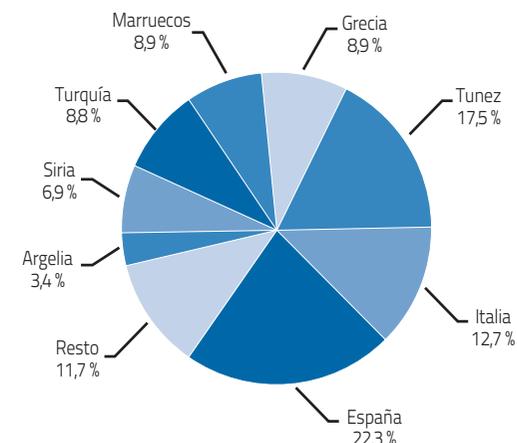


Figura 1. Distribución porcentual de la superficie mundial de olivar

3.1.2 La olivicultura en Argentina

La cultura del olivo se introdujo en la Argentina en la época colonial. Los conquistadores españoles que provenían del Alto Perú realizaron las primeras plantaciones en lo que hoy es la provincia de La Rioja, más precisamente en Arauco. Esta localidad dio su nombre a la variedad homónima, resultado de la selección realizada por sus habitantes.

El desarrollo de la olivicultura ha sido lento y ha seguido de manera paralela el desarrollo de la población, en particular en la zona de la cordillera, sobre los actuales territorios de las provincias de La Rioja, Catamarca, Salta, Mendoza y San Juan.

La guerra civil española (1936/1939) originó en Argentina problemas para la importación de aceite de oliva y aceitunas de mesa lo que llevó al gobierno argentino a promover un programa de promoción del sector oleícola, a partir del cual las provincias en las que las precipitaciones fueran inferiores a 400 mm por año y que presentaran posibilidades de irrigación fueron favorecidas y reconvertidas al sector oleícola.

Hacia 1965 la Argentina contaba con casi cinco millones de plantas de olivo distribuidas en distintas provincias caracterizadas por diferencias agrarias y climáticas singulares, entre ellas las zonas de Mendoza, San Juan, San Luis, Catamarca, La Rioja y otras como Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos.

La superficie cultivada en la actualidad es de alrededor de 110.000 ha, estimándose un promedio de 350 plantas por ha. Argentina es el décimo productor mundial de aceites de oliva, ocupando el primer lugar en el continente americano. La producción nacional representa casi el 1% del total mundial.

Las principales provincias productoras son:

- **Catamarca:** La producción olivícola en esta provincia es muy reciente pero la provincia es la principal productora de aceite de oliva del país. Alrededor del 80% de las variedades cultivadas son aceiteras, entre las que se destacan Arbequina, Frantoio, Barnea y Coratina. El 20% restante corresponde a las de doble propósito, como Manzanilla y Empeltre.
- **La Rioja:** La olivicultura se desarrolla principalmente en el departamento de Arauco, lugar de origen de la variedad de este nombre, que es una de las de mayor difusión en el país, y el resto de la producción se concentra en los alrededores de la capital y en los valles de Chilecito y Famatina. La principal variedad en toda la provincia es la Arauco, con 70% de la superficie plantada siendo el resto variedades aceiteras como Arbequina, Manzanilla, Frantoio, Empeltre, Picual, Barnea y Farga.
- **Mendoza:** El olivo es uno de los cultivos más destacados de la provincia. Se elaboran conservas y aceites de oliva de reconocida calidad. Solo el 40% se destina a la fabricación de aceites de oliva, principalmente de las variedades Arbequina, Farga, Empeltre y Frantoio.
- **San Juan:** Posee un 60% de variedades aceiteras como Arbequina, Picual, Frantoio y Empeltre, 22% de aceitunas de mesa de la variedad Changlot Real y 19% de variedades de doble propósito como Arauco y Manzanilla.
- **Córdoba:** En la provincia, la superficie cultivada alcanza las 6.000 hectáreas. En general, se trata de plantaciones de más de 25 años que mayormente producen aceituna para conserva y aceites de oliva orgánicos. Las principales variedades dedicadas a la producción de aceites son Arbequina y Frantoio.
- **Buenos Aires:** La zona olivícola se encuentra en el sudeste de la provincia, donde la superficie cultivada supera las 3.000 hectáreas, con olivos de más de 40 años en la zona de Coronel Dorrego donde se elabora aceite de oliva orgánico certificado. El 80% de dicho aceite se destina a exportación y el resto se comercializa en el mercado interno. La variedad Arbequina es la más abundante, y también hay presencia de Frantoio y Nevadillo.

3.2 LA ACEITUNA, EL ACEITE Y SU COMPOSICIÓN

El fruto del olivo, la aceituna, es una drupa de forma ovalada de tamaño variable en función de las variedades, suelos, climatologías, etc. En la aceituna se distinguen principalmente dos partes bien diferenciadas, el pericarpio y el endocarpio.

El pericarpio está compuesto por el epicarpio que es un tejido superficial que sirve de envoltura, que representa entre el 2 y el 2.5% del peso del fruto y el mesocarpio que es la parte carnosa de la aceituna al que corresponde la mayor parte del peso del fruto, entre el 70% y el 80%. El endocarpio, también llamado hueso, supone entre el 17% y el 23% de la aceituna y encierra a la semilla con el embrión (2% a 5.5% de peso del fruto).

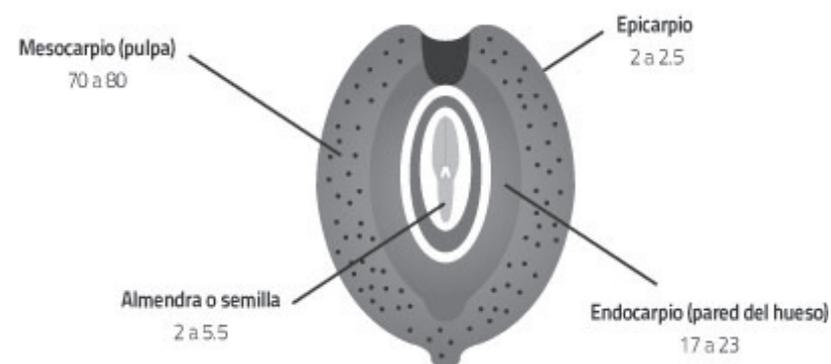


Figura 2. Distribución porcentual de la composición de la aceituna.

Para la elaboración de aceite, la composición que debe tener el fruto en el momento de la recolección es entre un 40 y 55% de agua de vegetación, de 18 a 32% de aceite, de 14 a 22% de hueso, de 1 a 3% de semilla y del 8 al 10% el epicarpio y resto de la pulpa.

En las aceitunas maduras, además del agua y el aceite, se encuentran otros componentes químicos como azúcares, proteínas, pectinas, ácidos orgánicos, taninos, oleuropeína y componentes inorgánicos, entre otros (tabla 1), cuyas proporciones varían con los cultivares, con las circunstancias climáticas, con el grado de madurez, etc.

Tabla 1. Composición mayoritaria de la aceituna en función de la parte del fruto.

Parte	Materia nitrogenada	Materia grasa	Celulosa bruta	Extracto no nitrogenado	Materia mineral
Epicarpio	9.8	3.4	2.4	82.2	1.6
Mesocarpio	9.6	51.8	12.0	24.2	2.3
Endocarpio	1.2	0.8	74.1	22.7	1.2

La práctica totalidad del aceite está contenido en el mesocarpio, mientras que en el endocarpio predomina la celulosa bruta.

El aceite de oliva está compuesto principalmente por triglicéridos o ésteres de glicerina con ácidos grasos y en menor proporción (entre 0.5 y 1.5%) por constituyentes no glicéridos entre los que destacan: fosfolípidos, alcoholes de cadena larga, esteroides, hidrocarburos y ceras. Los componentes minoritarios son importantes para la estabilidad, sabor y aroma del aceite de oliva, así como para su tipificación.

Todos los compuestos de los que está constituido el aceite de oliva se pueden dividir en dos grandes grupos de sustancias químicas, la fracción saponificable y la insaponificable. El equilibrio y la armonía entre estas dos fracciones serán de gran influencia en las cualidades del aceite.

- **Fracción saponificable:** representa entre el 98.5 y el 99.5% del peso del aceite de oliva. Esta fracción está formada por triglicéridos, ácidos grasos libres, ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos saturados de cadena lineal que se conocen como ceras, ésteres de esteroides y, finalmente, alcoholes terpénicos.

Los ácidos grasos suelen ser los componentes fundamentales y mayoritarios de un aceite o grasa. No se encuentran normalmente como ácidos grasos libres, cuando lo están es tan sólo en pequeñas cantidades, comunicando a la grasa cierta acidez. Normalmente los ácidos grasos están formando ésteres, habitualmente con la glicerina, para dar lugar a los glicéridos (mono, di y triglicéridos) y fosfátidos.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos del aceite de oliva

ÁCIDOS GRASOS		
Ácidos grasos saturados	Mirístico	C 14:0
	Palmítico	C 16:0
	Heptadecanoico	C 17:0
	Esteárico	C 18:0
	Araquídico	C 20:0
	Behénico	C 22:0
	Lignocérico	C 24:0
Ácidos grasos monoinsaturados	Palmitoleico	C 16:1
	Heptadecenoico	C 17:1
	Oleico	C 18:1
	Eicosenoico	C 20:1
Ácidos grasos poliinsaturados	Linoleico	C 18:2
	Linolénico	C 18:3

- **Fracción insaponificable:** supone entre el 1.5% y el 0.5% del peso del aceite de oliva. Encierra una gran cantidad de componentes menores que son muy importantes para el comportamiento y la calidad de los aceites. Esta fracción ha sido muy útil en la autenticación del aceite de oliva o la caracterización de aceites de oliva vírgenes monovarietales. Por otra parte estos compuestos le añaden propiedades sensoriales y biológicas únicas. Los constituyentes principales de esta fracción son hidrocarburos, tocoferoles, alcoholes con estructura triterpénica, 4,4-metil-esteroides, esteroides, dialcoholes terpénicos, compuestos fenólicos y flavonoides, pigmentos y compuestos volátiles.

En el aceite de oliva hay presentes más de cuarenta hidrocarburos diferentes cuyas concentraciones en más del 50% de los casos es inferior a 1 ppm, excepto el escualeno que aparece entre 800-12000 ppm que es el principal constituyente de la materia insaponificable.

Los tocoferoles contribuyen de forma importante a dar estabilidad al aceite de oliva, y tienen un papel biológico beneficioso como antioxidantes siendo el α -tocoferol el que tiene mayor actividad vitamínica (vitamina E).

Los esteroides son alcoholes superiores monovalentes, entre los que predomina el β -sitosterol. Constituyen la huella analítica que permite la autenticación del aceite de oliva. Dentro de los dialcoholes triterpénicos destacan el eritrodiol y uvaol. Las cantidades totales de eritrodiol más uvaol en el aceite de oliva, varían de 1 a 20 mg/100 g de aceite.

El aceite de oliva virgen contiene sustancias fenólicas que afectan a su estabilidad, sabor y aroma. Los compuestos fenólicos encontrados en el aceite de oliva pueden ser ligeramente diferentes a los presentes en las aceitunas. La oleuropeína es la responsable del sabor amargo de las aceitunas y es el principal glicósido presente en el aceite de oliva.

La concentración de los compuestos fenólicos en la que se encuentra en los aceites depende fundamentalmente de tres factores, la variedad de la aceituna, la madurez de la misma y la tecnología y condiciones de la extracción del aceite. La concentración de fenoles totales, varía normalmente entre 50 y 200 mg L⁻¹, pero se pueden encontrar aceites con contenidos de hasta 1000 mg L⁻¹.

En el aceite de oliva aparecen dos clases de pigmentos naturales, las clorofilas y feofitinas, y los carotenoides. Las clorofilas a y b, y las feofitinas a y b, son las responsables del color. Su contenido en el aceite de oliva varía entre 1 y 20 mg L⁻¹. Las clorofilas y feofitinas tienen un efecto prooxidante sobre los lípidos en presencia de luz, mientras en la oscuridad actúan como antioxidantes.

Los compuestos volátiles son responsables del aroma del aceite de oliva y los forman alcoholes, cetonas, ésteres, derivados furánicos, etc. La variedad de olivo es de gran importancia en la composición de compuestos volátiles del aceite de oliva así como el grado de madurez.

3.3 LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA

Una de las definiciones clásicas de calidad pertenece a Kramer y Twigg (1973): "La calidad es el conjunto de aquellas características de atributos individuales de un producto que son significativos para determinar el grado de aceptación que aprecia el consumidor". Según estos autores, los atributos se clasifican en dos posibles grupos, los atributos sensoriales y los atributos ocultos. Los atributos ocultos son los relacionados con:

- Valor nutricional.
- Toxicidad.
- Ausencia de adulterantes.

El análisis sensorial del aceite de oliva es de mucha importancia puesto que muestra los atributos fácilmente apreciados por los consumidores, a la vez que clasifica la categoría comercial en aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, aceite de oliva virgen corriente o aceite de oliva lampante.

Los parámetros analíticos más importantes que proporcionan información sobre la calidad del aceite o su degradación, son entre otros, el grado de acidez, el índice de peróxidos y la absorción de luz en la región ultravioleta del espectro. Es importante resaltar que estos parámetros están relacionados con el estado de la materia prima, el proceso de elaboración, así como el sistema y tiempo de almacenamiento y envasado.

3.3.1 Clasificación de los aceites de oliva en función de la calidad

Según el Consejo Oleícola Internacional, el aceite de oliva es el producto procedente exclusivamente del fruto del olivo, con exclusión de los aceites obtenidos utilizando disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza.

La Norma COI, COI/T.15/NC n° 3/Rev. 7 " Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva", así como el Reglamento CEE 2568/1991 (última modificación, RCE 1348/2013) relativo a las características de los aceites de oliva y orujo de oliva y a sus métodos de análisis, establecen las siguientes denominaciones y clasificación de los aceites de oliva:

- **Aceite de oliva virgen:** es el obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos, en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan alteración del aceite. Para este tipo de aceites, la aceituna sólo soportará los tratamientos de lavado, decantación, centrifugación y filtrado. El aceite de oliva virgen puede a su vez clasificarse en:
 - **Aceite de oliva virgen extra** es aquel cuya evaluación organoléptica presenta una mediana del atributo frutado (Mf) mayor de cero, la mediana del defecto (Md) igual a cero y la acidez libre expresada en ácido oleico no superior a 0.8%, además de respetar los otros criterios fijados en la norma (tabla 3).
 - **Aceite de oliva virgen** es aquel en el que la evaluación organoléptica presenta una mediana del atributo frutado (Mf) mayor a cero, la mediana de defecto (Md) es menor o igual a 3.5, y la acidez libre como máximo será del 2.0%, además de respetar los criterios fijados en la norma (tabla 3).

- **Aceite de oliva corriente** es aquel cuya evaluación organoléptica presenta una mediana de defecto (Md) mayor a 3.5 y menor de 6.0, o bien aquel cuya mediana de defecto (Md) es menor a 3.5 pero con una (Mf) de cero y la acidez libre como máximo será del 3.3%. Nota: Esta categoría no se contempla en la Unión Europea.

- **Aceite de oliva lampante** es aquel cuya evaluación organoléptica presenta una mediana de defecto (Md) mayor a 6 o una la acidez libre mayor del 3.3%. Es el aceite de oliva virgen no apto para el consumo en la forma en que se obtiene.

- **Aceite de oliva refinado:** es aquel obtenido en refinería a partir de aceites de oliva virgen lampante por procesos de decoloración, desodorización, neutralización y filtración.
- **Aceite de oliva:** es el aceite compuesto por la mezcla de aceite de oliva refinado y aceite de oliva virgen cuya acidez libre será menor o igual a 1% además de cumplir los requisitos establecidos en la norma (tabla 4).
- **Aceite de orujo de oliva crudo:** obtenido a partir del orujo de aceituna, mediante la extracción con disolventes.
- **Aceite de orujo de oliva refinado:** obtenido a partir de aceites de orujo de oliva crudo tras ser sometido al proceso de refinado. Siendo su acidez como máximo de 0.3%.
- **Aceite de orujo de oliva:** mezcla de aceites de orujo de oliva refinados y aceite de oliva virgen, su acidez libre no será superior al 1% y debe cumplir los requisitos establecidos en la norma (tabla 3).

Dentro de esta clasificación sólo son aptos para el consumo humano el aceite de oliva virgen extra, el aceite de oliva virgen, el aceite de oliva y el aceite de orujo de oliva.

Tabla 3. Valores límites para los parámetros químicos que clasifican los aceites por categorías de calidad.

Denominación	Acidez (%)	Índice de Peróxidos (meqO/kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK	Esteres Etilicos (mg/kg)	Evaluación sensorial
Oliva Virgen Extra	≤0.8	≤20	≤2.50	≤0.22	≤0.01	≤30	Md = 0 Mf > 0
Oliva Virgen	≤2.0	≤20	≤2.60	≤0.25	≤0.01	-	Md ≤ 3.5 Mf > 0
Oliva Corriente	≤3.3	-	-	≤0.30	≤0.01	-	3.5 < Md ≤ 6.0
Oliva Lampante	>3.3	-	-	-	-	-	Md > 6.0
Oliva Refinado	≤0.3	≤5	-	≤1.10	≤0.16	-	-
Oliva	≤1.0	≤15	-	≤0.90	≤0.15	-	-
Orujo de Oliva Refinado	≤0.3	≤5	-	≤2.00	≤0.20	-	-
Orujo de Oliva	≤1.0	≤15	-	≤1.70	≤0.18	-	-

3.3.2 Control de calidad de los aceites de oliva

El control de calidad del aceite de oliva comprende la realización de una serie de determinaciones que se refieren directamente a la evaluación de la calidad por un lado y por otro al control de cualquier posible adulteración. Por lo tanto, en el control de calidad de los aceites de oliva se puede distinguir entre parámetros de calidad y parámetros de pureza.

- **Parámetros de calidad:** hacen referencia a los parámetros que más influyen en el deterioro del aceite, y dependen de tres causas fundamentales; el mal estado de la materia prima, el proceso de extracción y el proceso de conservación. Asimismo, desde el punto de vista químico, la alteración del aceite se puede sintetizar en dos procesos reactivos degenerativos; los procesos hidrolíticos y los procesos oxidativos.

Los procesos hidrolíticos son los que afectan al grado de acidez mientras que los oxidativos se reflejan en el índice de peróxidos y en la absorbancia en el ultravioleta.

- **Grado de acidez:** indica el porcentaje de ácidos libres presentes en el aceite, expresado como porcentaje de ácido oleico ya que este es el mayoritario en el aceite de oliva. Los triglicéridos, que constituyen el 98% del aceite, están formados por los ésteres de los ácidos grasos y la glicerina. La glicerina reacciona con moléculas de ácidos grasos dando lugar a monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos en el proceso de esterificación. Este proceso es reversible y por ello, en determinadas condiciones van apareciendo ácidos grasos libres, enriqueciéndose el medio en estos compuestos.

- **Índice de peróxidos:** es la cantidad de peróxidos, expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de aceite, presentes en un aceite. La oxidación de los ácidos grasos insaturados, por el oxígeno del aire, es un proceso complejo con reacciones que llevan la aparición de radicales libres, dando lugar a nuevas reacciones y multitud de compuestos, muchos de ellos responsables del característico olor a rancio. Los peróxidos son los primeros compuestos en formarse una vez empezado el proceso oxidativo, también se les llama productos de la oxidación primaria.

- **Absorbancia en el ultravioleta:** la prueba espectrofotométrica en el ultravioleta proporciona indicaciones sobre la calidad del aceite y su estado de conservación.

Los compuestos resultantes de la oxidación secundaria, absorben luz en la región del ultravioleta del espectro. Los cromóforos formados por las α -dicetonas y las cetonas α -insaturadas absorben en la región de los 270 nm. Mientras que los de tipo peróxido, procedentes del ácido linoleico, absorben en la región de los 230-235 nm.

La determinación del contenido en esteres alquílicos ha sido el último parámetro legislado. Esta determinación pretende detectar aceites de oliva virgen de baja calidad por lo que puede indicar por ejemplo la presencia de aceites que han sufrido un proceso de desodorización en condiciones controladas.

Además de los parámetros descritos, que son los utilizados por el Consejo Oleícola Internacional y la Unión Europea para la clasificación de los aceites de oliva por calidades, el COI establece el control de otros parámetros, como son la determinación de humedad y materias volátiles, la determinación de impurezas insolubles en éter y la presencia de trazas metálicas. Asimismo existen otros parámetros también utilizados para valorar la calidad, como el contenido en polifenoles, la determinación de biofenoles y la estabilidad oxidativa. La estabilidad oxidativa está relacionada con la resistencia a la oxidación dependiente de la cantidad de antioxidantes naturales y la composición del aceite. Los polifenoles, antioxidantes naturales, contribuyen a dar estabilidad al aceite y están relacionados con el amargor de los mismos.

Análisis sensorial: el aceite de oliva virgen es uno de los pocos alimentos en cuya reglamentación se incluye el análisis organoléptico, siendo el único que posee un método de valoración organoléptica oficial (Reglamento 2568/1991 modificado por el reglamento CE 1348/2013) (COI, 2015). El método solo es aplicable a los aceites de oliva vírgenes, en función de la intensidad de los defectos percibidos y del frutado, determinados por un grupo de catadores seleccionados, entrenados y cualificados, constituidos en panel.

El análisis organoléptico permite medir sensaciones. Las sensaciones son las respuestas que da el cerebro de una persona ante un estímulo percibido por los sentidos. También permite juzgar elementos que son difícilmente detectables de forma instrumental o analítica clásica, como algunas sustancias responsables de olores y sabores desagradables que están presentes en cantidades muy pequeñas y son difíciles de detectar por métodos físico-químicos. Por todo ello, el análisis organoléptico tiene unas características que lo hacen hoy por hoy, insustituible.

- **Parámetros de pureza: además de los parámetros analíticos que determinan la calidad del aceite de oliva virgen existe otra serie de análisis cuyo fin es poder detectar una posible adulteración en los aceites.** Entre los parámetros de pureza destaca la determinación de la composición de los ácidos grasos, la composición de la fracción de esteroides y el contenido en dialcoholes triterpenicos, la determinación del contenido en estigmaestadienos, del contenido en ceras y la diferencia entre valor teórico y determinado de triglicéridos con número de carbono 42 (Δ ECN42).

La composición de la fracción de ácidos grasos varía mucho según variedades, en cuanto a los ácidos grasos mayoritarios (palmítico, oleico y linoleico). Sin embargo los ácidos grasos minoritarios (mirístico, hexadecanoico, hexadecenoico, linolenico, araquídico, eicosenoico, behénico y lignocérico) son los que atestiguan la posible adulteración o adición de otro tipo de aceite.

Igualmente la composición de la fracción esteróica indica la posible presencia de otras grasas o aceites tanto vegetales como animales, encontrándose legislados los límites mínimos para el esteroil mayoritario del aceite de oliva, β -sitosterol, como β -sitosterol aparente y los límites máximos para los esteroides minoritarios (colesterol, brasicasterol, campesterol, estigmasterol y Δ -7-estigmastenol).

El contenido en estigmastadienos es un claro indicador de la presencia de aceite que ha sufrido proceso de refinado, pudiendo corresponder tanto a la presencia de aceite de oliva refinado como a otro aceite de semillas (girasol, maíz, soja, etc.) refinado.

Otras determinaciones, como el contenido en ceras y el contenido en eritrodil y uvaol sirven para detectar el aceite de repaso y la presencia de aceite de orujo.

3.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA

Se puede decir que la calidad de un aceite depende fundamentalmente de la variedad y de las técnicas de cultivo empleadas, así como del medio donde se desarrolla el olivar. Todas las etapas del proceso de obtención del aceite de oliva virgen influyen de una forma u otra en la calidad final del producto que llega al consumidor. Los factores que inciden sobre la calidad están relacionados con las prácticas agronómicas, el proceso de elaboración, el almacenamiento o conservación, el envasado y la comercialización.

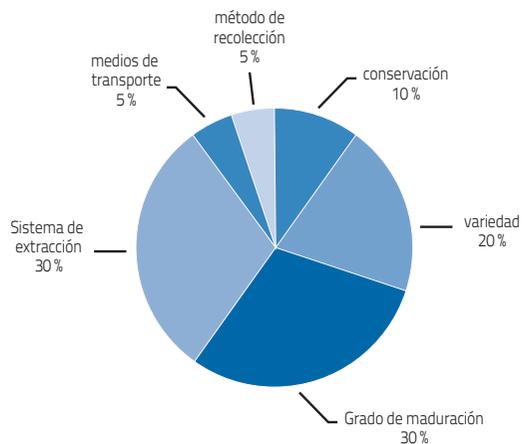


Figura 3. Valor porcentual de los factores condicionantes de las características cualitativas del aceite de oliva.

3.4.1 Influencia de los factores agronómicos sobre la calidad del aceite de oliva

Los factores agronómicos son los que afectan directamente sobre la aceituna y según la facilidad con que pueden ser controlados, se clasifican en factores intrínsecos, que son aquellos que difícilmente pueden modificarse, y factores extrínsecos, que serían los fácilmente controlables por las prácticas agronómicas.

- **Factores intrínsecos:** son los factores vinculados principalmente a la variabilidad genética de la aceituna. En principio las aceitunas de cualquier variedad cultivada en cualquier medio agronómico pueden dar aceites de oliva virgen extra de buena calidad siempre que los frutos estén sanos y recolectados en el momento óptimo de maduración de forma adecuada, sin dañar el fruto. A pesar de esto existen grandes diferencias entre la calidad de los aceites procedentes de aceitunas de las distintas variedades y cultivadas en distintos medios.

La variedad es la responsable de la composición de ácidos grasos y del contenido en polifenoles. Existen variedades de alto contenido en ácido oleico como Picual y variedades con alto contenido en linoleico como la Arbequina, asimismo los aceites de Cornicabra y Picual presentan un alto contenido en polifenoles.

El origen geográfico de los aceites juega un papel fundamental en la definición de los componentes del perfil volátil de los aceites de oliva y por lo tanto en la contribución a la calidad de los mismos. Al comparar aceites de las mismas variedades procedentes de distintas ecologías, también se observan diferencias en el contenido de los principales ácidos grasos. Así, en el caso de Arbequina cultivada en Argentina y en España se aprecia un descenso del contenido en el ácido oleico y aumento en linoléico y palmítico, dando una baja relación monoinsaturados/poliinsaturados.

- **Factores extrínsecos:** son aquellos factores que pueden ser controlados por el manejo. Dentro de este grupo se pueden incluir las técnicas culturales, los tratamientos fitosanitarios, la recolección y el transporte.

Las técnicas culturales influyen directamente sobre la producción del árbol y por tanto sobre la producción de aceite. Las técnicas culturales que más influyen en la obtención de un buen aceite de oliva son la protección contra plagas y enfermedades y la recolección.

- **Influencia del riego en la calidad del aceite de oliva:** el contenido en humedad del suelo es muy importante, ya que las épocas secas retrasan la maduración del fruto. Los componentes químicos más influenciados por el riego son los fenoles, los cuales afectan tanto a la estabilidad oxidativa como a las características sensoriales, especialmente al atributo del amargo, mostrando en ambos casos una relación inversa con la cantidad de agua aplicada en los árboles.
- **Influencia de la sanidad vegetal sobre la calidad del aceite de oliva:** la sanidad vegetal es una de las prácticas de cultivo que más influencia puede tener en la calidad del producto final. Es imposible obtener aceites de calidad si no se parte de frutos perfectamente sanos y que hayan permanecido en el árbol hasta el momento de la recolección.
- **Influencia de la poda en la calidad del aceite de oliva:** la poda actúa de forma directa en la maduración de los frutos ya que cuanto más luz llegue a todas las zonas del árbol más rápida y homogénea será la maduración y por tanto habrá una influencia en las características organolépticas del aceite obtenido.
- **Influencia de las técnicas de producción sostenibles sobre la calidad del aceite de oliva:** las técnicas de producción integrada y de agricultura ecológica también influyen en la calidad final de los aceites. Las técnicas de producción integrada

han demostrado que aportan concentraciones más altas de esteroides totales y tocoferoles y mayor estabilidad, a la par que menor contenido de fenoles totales en los aceites de oliva. Los resultados de estudios realizados con técnicas de producción ecológica confirman que el aceite de oliva virgen ecológico tiene mayor cantidad de compuestos fenólicos individuales (hidroxitirosol, ácidos fenólicos y flavonoides)

- **Influencia de la maduración sobre la calidad del aceite de oliva:** se considera como periodo de maduración el tiempo transcurrido desde la aparición de las manchas violáceas hasta la coloración definitiva de la piel de la aceituna. El periodo de maduración es variable, estando afectado por las condiciones climáticas y las características varietales. Durante el periodo de maduración se producen variaciones en las características de los aceites obtenidos. Así, la composición ácida de los aceites evoluciona. se observa una disminución de la proporción de ácido palmítico y un aumento del porcentaje en ácido linoleico, permaneciendo sensiblemente constante la proporción de ácido oleico, por lo que la relación entre monoinsaturados y poliinsaturados tiende a disminuir a medida que avanza la maduración.

- **Influencia de la recolección sobre la calidad del aceite de oliva:** el momento más apropiado para la recolección de las aceitunas destinadas a la extracción de aceite, es cuando el fruto alcanza su maduración óptima, en ese momento, el contenido en aceite y la calidad el mismo, se encuentran a su nivel más alto. Las cosechas muy tempranas o muy tardías tienen efectos negativos tanto sobre la calidad como sobre la cantidad. Las características organolépticas del fruto empeoran a medida que la recolección se retrasa, obteniéndose los aceites más afruitados y aromáticos al comienzo del periodo de maduración, incluso con un apreciable porcentaje de frutos verdes.

- **Influencia del transporte, recepción y almacenamiento en la almazara sobre la calidad del aceite de oliva:** las aceitunas deben ser transportadas hasta la almazara en condiciones tales que sufran el menor daño físico posible, los golpes, las magulladuras y aplastamientos producidos por manipulaciones violentas, contenedores inapropiados o excesiva altura de carga, generan en los frutos transformaciones enzimáticas inadecuadas que producen alteraciones organolépticas, como la pérdida del aroma.

Durante el almacenamiento, como consecuencia del grado de humedad propio y de la evolución biológica del fruto, da comienzo el proceso fermentativo de la materia orgánica y como resultado la desintegración de la estructura celular, produciéndose durante este tiempo una serie de reacciones hidrolíticas, lipolíticas, enzimáticas endógenas y microbianas, motivadas principalmente por la acción de mohos y levaduras que se desarrollan conjuntamente y que afectan considerablemente a la calidad y a las características organolépticas del aceite.

3.4.2 Influencia de los factores relacionados con el proceso de elaboración sobre la calidad del aceite de oliva

El aceite de oliva es el zumo oleoso de las aceitunas separado de los demás componentes de este fruto. Cuando se obtiene por sistemas de elaboración adecuados y procede de frutos de buena calidad, sin defectos ni alteraciones, y con la adecuada madurez, el aceite de oliva posee excepcionales características de aspecto, fragancia y sabor delicado, y es prácticamente el único entre los aceites vegetales que puede consumirse crudo, conservando su contenido de vitaminas, ácidos grasos esenciales y otros productos naturales de importancia dietética.

El deterioro del aceite se produce casi exclusivamente como consecuencia de una manipulación defectuosa de los frutos, y de un proceso de elaboración mal conducido. La técnica de extracción tiene por objeto separar el aceite de oliva, en forma de fase oleosa continua, sin alteraciones de su composición y de sus características organolépticas, de los demás componentes de la aceituna, para ello es necesario realizar diferentes procesos y cada uno de ellos es importante para obtener aceite de calidad.

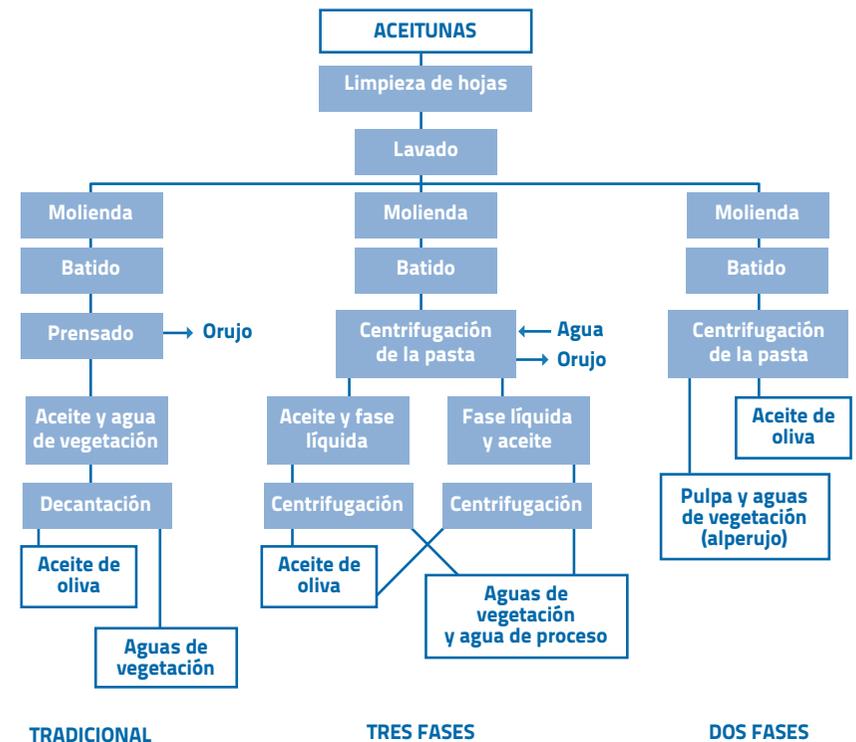


Figura 4. Diagrama de flujo en la obtención de aceites de oliva

- **Influencia del lavado de frutos sobre la calidad del aceite de oliva:** el lavado de las aceitunas, tiene por finalidad limpiar los frutos de impurezas de origen vegetal, como hojas y ramillas, y las de origen mineral, como polvo, tierra, piedras, además de posibles restos de sustancias indeseables procedentes de la producción. El lavado puede resultar inadecuado en el caso de aceitunas recogidas en avanzado estado de maduración, porque la acción mecánica podría arrancar trozos de pulpa, con la consiguiente pérdida de aceite. El proceso de lavado con agua tiene cierta influencia, en función del estado físico de los frutos, del grado de escurrido, y fundamentalmente del estado de limpieza del agua. Esta operación suele producir una ligera elevación de la acidez y sobre todo un fondo organoléptico a humedad.

- **Influencia de la molienda sobre la calidad del aceite de oliva:** la molienda consiste en la murturación de las aceitunas para destruir la estructura de los tejidos vegetales que la forman. El cizallamiento aplicado durante la murturación, desgarrar las membranas celulares y va dejando en libertad a los glóbulos de aceite. Estos glóbulos libres van reuniéndose entre sí, formando gotas de tamaño variable, las cuales entran en contacto directo con la fase acuosa presente en la pasta, procedente del agua de vegetación y de los residuos de agua con que los frutos se han tratado previamente a su molienda.

En función del tipo de aceituna debe regularse el grado de molienda, si la aceituna es de principio de campaña estará más dura por lo que la molienda debe ser más fina con objeto de garantizar la rotura de las celdillas donde se aloja la materia oleosa. En el caso de aceituna más madura la molienda debe ser más gruesa ya que si no se forman sistemas coloidales y emulsiones que pueden dar lugar a una alteración de la calidad organoléptica por exceso de contacto del aceite con el agua de vegetación.

- **Influencia del batido sobre la calidad del aceite de oliva:** la operación de batido de la pasta de aceitunas consiste en un removido lento y continuo de la misma que se efectúa en recipientes de acero inoxidable o batidoras de forma semicilíndrica o semiesférica, provistos de un sistema de calentamiento apropiado. Su función es reunir las gotas líquidas dispersas con el fin de facilitar la separación sólido-líquido en las siguientes operaciones de elaboración. En este proceso, no conviene sobrepasar los 30 °C ya que temperaturas más elevadas pueden provocar pérdida de aromas. La duración del batido debe ser suficiente para conseguir el mayor rendimiento de aceite, pero si este tiempo se alarga se pueden producir pérdidas de componentes volátiles.

- **Influencia de la separación sólido-líquido sobre la calidad del aceite de oliva:** la etapa de separación o extracción constituye la parte fundamental de la obtención del aceite y está basada en la separación de los líquidos contenidos en la pasta de aceitunas.

Aunque hoy en día está en desuso, la extracción por presión ha sido el procedimiento más antiguo y tradicionalmente empleado para obtener el aceite de oliva. Prácticamente la totalidad de las almazaras utilizan sistema de extracción en continuo, bien en dos o en tres fases. El sistema se denomina en tres fases cuando disponen de dos salidas para líquidos (una para aceite y otra para alpechín) y otra para sólidos (orujo). El sistema es de dos fases cuando se dispone sólo de una salida para líquidos (aceite) y otra por donde se desvía la fase intermedia (alpechín) y el sólido (orujo), llamada alperujo.

Respecto a la calidad del aceite obtenido no existen diferencias notables. La maquinaria puede influir en las características organolépticas del aceite, en función del caudal y temperatura del agua de fluidificación, del ritmo de inyección y del grado de aireación que provocan en el aceite, como consecuencia de la elevada velocidad de rotación de la centrífuga. En el sistema de dos fases el contenido en polifenoles es mayor al precisar menor adición de agua que solubiliza estos compuestos, sin embargo presenta valores de acidez e índice de peróxidos ligeramente superiores. En el análisis sensorial los aceites de dos fases presentan una mayor puntuación en el amargor mientras que en los de tres fases se dan puntuaciones superiores en el dulce.

- **Influencia de la separación líquido-líquido sobre la calidad del aceite de oliva:** tras el proceso de extracción los líquidos obtenidos necesitan una rápida separación de la fase acuosa o separación líquido-líquido. Esta separación puede realizarse por decantación o por centrifugación.

Los factores a tener en cuenta para conseguir buenos resultados en esta operación son la temperatura, limpieza, adición de agua y tiempo. El tiempo de contacto entre alpechín y aceite y una mala limpieza de los decantadores durante el proceso, son las causas fundamentales por las que se suelen deteriorar los aceites, anulando y enmascarando los atributos positivos de un aceite de calidad y apareciendo aromas no deseables en el aceite (borras).

3.4.3 Influencia de los factores relacionados con el almacenamiento en bodega, el envasado y la comercialización sobre la calidad de los aceites de oliva

El aceite producido debe pasar a unos receptores para su clasificación, y en función de su composición y características organolépticas, almacenarse en los depósitos correspondientes a su calidad, para su posterior expedición. Las condiciones de almacenamiento de aceite son esenciales para mantener sus características de calidad. Hay tres factores fundamentales que favorecen el proceso de deterioro de aceites durante el almacenamiento, la luz, el aire y las altas temperaturas.

La causa principal del deterioro de aceite de oliva durante el almacenamiento son las reacciones de oxidación e hidrólisis y los productos resultantes son la pérdida de antioxidantes naturales, una variación en el contenido de pigmentos naturales (fundamentalmente clorofila y carotenos), un incremento de estado oxidativo, así como de impurezas, etc. Esta pérdida de la calidad del aceite se acentúa en los primeros tres meses de almacenamiento, y poco después permanece casi constante. Para reducir o eliminar el contacto con el aire es recomendable tapar todos los depósitos, inertizarlos y realizar los trasiegos por las bocas inferiores de los depósitos. Aunque en el aceite almacenado, tienen poca importancia los procesos hidrolíticos si se ha eliminado el agua de vegetación antes de enviar el aceite a bodega, pueden producirse fermentaciones de partículas solidas, ricas en azúcares, que no se han separado en la centrifugación y decantación; es por tanto muy importante que los aceites lleguen a bodega lo más limpios posible.

Para eliminar impurezas del aceite se puede realizar un proceso de filtrado. Actualmente se comercializan aceites sin filtrar o en rama, debiendo cuidar en extremo la higiene en el envasado y permitiendo una decantación adecuada en el almacenamiento. La dificultad que lleva consigo envasar estos aceites radica en los largos periodos de caducidad que exigen las cadenas de distribución. Sin embargo el consumo de estos aceites debe ser muy rápido, antes de que aparezcan los sedimentos, para garantizar así la calidad del producto.

El material del envase debe ser inalterable e inerte. Es preferible que el vidrio sea de color oscuro. Los envases de cartón laminados de plástico y los de hojalata son, posiblemente, los de menor uso actualmente en la comercialización. Sin embargo, serían los más apropiados para mantener la calidad del aceite de oliva, por lo menos durante seis meses. Ambos protegen contra la luz y los gases.

En el llenado de los envases es muy importante evitar los espacios de cabeza ya que el oxígeno del aire favorece la oxidación. El aceite envasado se almacenará en lugar fresco, aislado de la luz. La conservación del aceite envasado es fundamental para garantizar que mantenga sus características de calidad hasta su consumo.

4. METODOLOGIA DE ANÁLISIS DE LOS ACEITES DE OLIVA Y ORUJO DE OLIVA

4.1 PARÁMETROS DE CALIDAD

Con objeto de poder comprobar la conformidad de una muestra de aceite de oliva con la categoría declarada se aplicará el siguiente esquema de decisiones

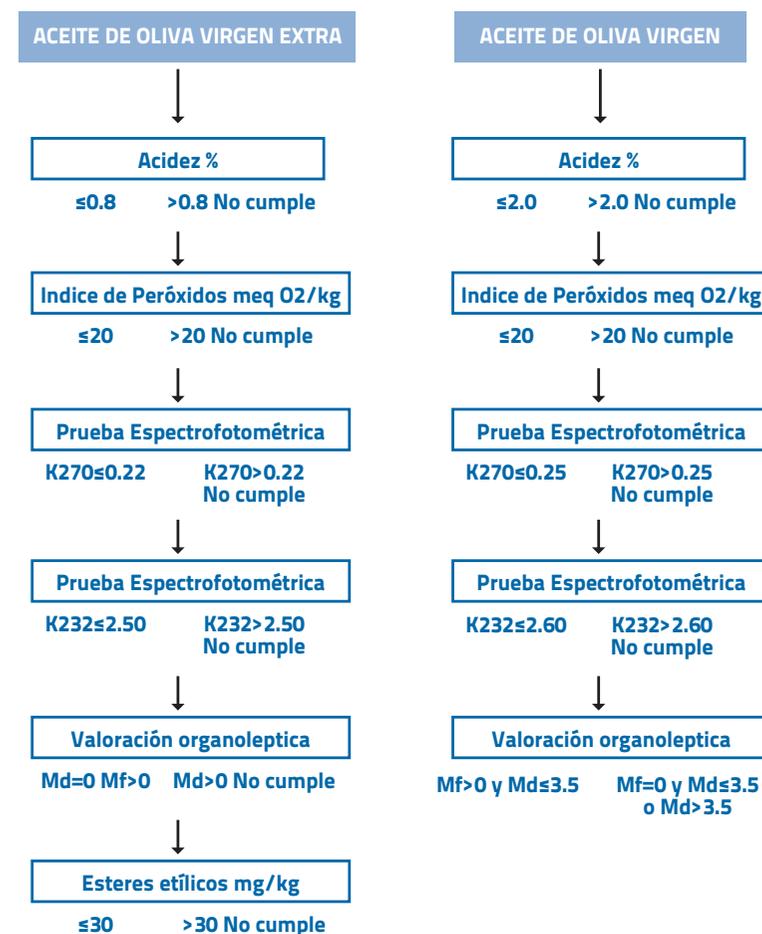


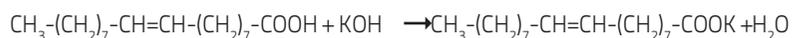
Figura 5. Esquema decisiones Aceite virgen extra

Figura 6. Esquema decisiones Aceite virgen

4.1.1 Determinación de los ácidos grasos libres. Método en frío

Principio del método: la grasa biológicamente sintetizada es neutra, por lo que la presencia de ácidos grasos libres es una anomalía, resultante del mal estado de los frutos, de un proceso incorrecto de elaboración o de una mala conservación. El aceite de oliva, como el resto de grasas, está compuesto mayoritariamente por triglicéridos. Los triglicéridos están formados por los ésteres de los ácidos grasos y la glicerina. El proceso de esterificación es reversible, por ello en determinadas condiciones van apareciendo ácidos grasos libres, enriqueciéndose el medio en estos compuestos. Los ácidos grasos se liberan por ruptura de las moléculas de los triglicéridos a través de sus enlaces esteres.

El índice de acidez o grado de acidez permite determinar, mediante valoración ácido-base, el contenido en ácidos grasos libres en los aceites de oliva, expresándolo en porcentaje de ácido oleico. La muestra se disuelve en una mezcla de éter-etílico/etanol neutralizada y se valora con una solución etanólica de hidróxido potásico 0.1 N en presencia de fenolftaleína como indicador.



Material y reactivos

Reactivos

- Solución de éter etílico / etanol (95%-96%) en proporción 1:1.
- Solución etanólica de fenolftaleína de ~ 10 g/l.
- Solución etanólica de hidróxido potásico 0,1N (0,1M) (solución valorada comercial)
- Solución valorada de ácido clorhídrico 0.1N (0.1M) (solución valorada comercial para factorizar periódicamente el Hidróxido potásico).

Materiales

- Balanza-granatarario capaz de pesar con precisión de 0,01g.
- Matraces erlenmeyer de 250 ml.
- Agitador magnético
- Bureta de 10 ml. (con divisiones de 0.05 ml) Clase A.
- Pipetas Pasteur.

Procedimiento analítico

- Tomar ≈ 10 g de muestra exactamente pesada en un matraz erlenmeyer.
- En el caso especial de aceites con una acidez superior a 2%, se repetirá el ensayo con un peso de muestra inferior a 5 g. (con esto se mantiene la proporción peso de muestra/volumen de solución valorante descrita en la norma).
- Disolverla añadiendo aproximadamente 50 ml de la mezcla de éter etílico / etanol (1:1) previamente neutralizada con KOH 0,1N (utilizando unas gotas de la solución de fenolftaleína como indicador).

- Colocar en el agitador y añadir unas gotas de la solución de fenolftaleína.
- Añadir gota a gota la solución de KOH 0,1 N desde la bureta hasta viraje del indicador (el color rosado debe permanecer unos 10 segundos).

Nota: Si se produce turbidez durante la valoración se recomienda repetirla añadiendo un volumen mayor de la mezcla éter etílico / etanol (1:1)

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



Figura 7: Inicio



Figura 8: Punto final



Figura 9: Exceso de KOH 0.1N

Cálculos y expresión de resultados

El cálculo de la acidez se realiza mediante la fórmula:

$$\% \text{ acidez} = \frac{V \times C \times M}{10 \times P}$$

Donde:

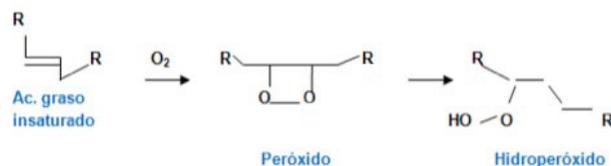
- V: volumen en ml de KOH consumidos
- C: concentración de la solución de KOH
- M: peso molecular del ácido oleico (M=282)
- P: peso de muestra utilizada

La acidez se expresa en % de ácido oleico y el resultado se dará con dos cifras decimales para valores ≤1.00% y con una sola cifra decimal para valores superiores.

4.1.2 Determinación del Índice de Peróxidos

Principio del método : el proceso de oxidación del aceite es un proceso natural e irreversible, la oxidación de los ácidos grasos insaturados, por el oxígeno del aire, es un proceso complejo con reacciones que llevan la aparición de radicales libres, dando lugar a nuevas reacciones y multitud de compuestos. El proceso oxidativo tiene tres fases diferenciadas, la iniciación, propagación y terminación siendo los peróxidos los primeros compuestos en formarse una vez empezado el proceso oxidativo, también se les llama productos de la oxidación primaria. La característica que se utiliza para la determinación de estos productos es ser oxidantes.

El índice de peróxidos es la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg. de grasa) de peróxidos presentes en una muestra, que ocasionan la oxidación del yoduro potásico, en unas condiciones determinadas. Este índice permite estimar el grado de oxidación y, por tanto, la alteración del aceite. Para ello, la muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con disolución de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con disolución de concentración conocida de tiosulfato sódico.



Material y reactivos

Reactivos

- Cloroformo (calidad P.A.)
- Acido Acético glacial (calidad P.A.)
- Solución cloroformo / Acético (1/1,5)
- Solución acuosa saturada de yoduro potásico que se guardará en frasco topacio.
- Solución acuosa de almidón de ≈ 10 g/l.

- Solución acuosa de tiosulfato sódico 0,01N. La solución se prepara a partir de ampollas Titrisol Merck (llevar el contenido de la ampolla a un litro con agua destilada en aforado clase A de 1000 ml.) y se guarda en frasco topacio.
- Iodo 0,02N (solución valorada comercial, para factorizar periódicamente el tiosulfato)

Materiales

- Balanza-granatario capaz de pesar con precisión de 0,01 g.
- Matraces con cuello y tapón esmerilados de 250 ml.
- Bureta de 10 ml. clase A.
- Pipetas Pasteur
- Agitador magnético.
- Matraz aforado de 1000 ml.

Procedimiento analítico

- Tomar aproximadamente 2 g. de muestra exactamente pesada (con precisión de 0,01 g) en un matraz con tapón.
- Añadir aproximadamente 25 ml. de la solución cloroformo/acético (1/1,5) para disolver la muestra.
- Añadir aproximadamente 1 ml. de solución saturada de yoduro potásico.
- Cerrar rápidamente el matraz, agitar durante 1 minuto y mantenerlo en la oscuridad 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 75 ml. aproximadamente de agua destilada.
- Valorar con tiosulfato 0,01N, tras añadir unas gotas de la solución de almidón como indicador, hasta viraje del indicador (el color debe ser blanco lechoso, no apareciendo tonalidades violáceas o azuladas).
- En cada serie de muestras se realizará un ensayo en blanco. Cuando el ensayo en blanco supera 0,05 ml. de tiosulfato 0,01N se sustituirán los reactivos.



Figura 10: Fases de la valoración con tiosulfato sódico 0.01N

Cálculos y expresión de resultados

El cálculo del índice de peróxido se realiza mediante la fórmula:

$$\text{Índice de peróxidos} = \frac{V \times N \times 1000}{P}$$

Donde:

V= Volumen de tiosulfato sódico (0,01N S.V.) empleados en el ensayo y corregidos con los ml. consumidos en el ensayo en blanco.

N= Normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico.

P= Peso en gramos de la muestra.

El índice de peróxidos se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kg.

El resultado se expresa con una cifra decimal para valores ≤ 20 meq O₂ /kg y sin cifras decimales para valores superiores.

4.1.3 Prueba espectrofotométrica en el UV

Principio del método: la prueba espectrofotométrica en el ultravioleta proporciona indicaciones sobre la calidad del aceite, su estado de conservación y sobre las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos.

Los compuestos resultantes de la oxidación secundaria, la mayoría de tipo carbonílico, absorben luz en la región del ultravioleta del espectro. En particular, los cromóforos formados por las α -dicetonas y las cetonas α -insaturadas absorben en la región de los 270 nm. La cuantificación de la luz absorbida es lo que se conoce como K_{270} .

Los cromóforos o asociaciones moleculares, de tipo peróxido, procedentes del ácido linoleico, absorben en la región de los 230-235 nm. Cuando se cuantifica la luz absorbida a 232 nm se obtiene la denominada K232.

La materia grasa se disuelve en ciclohexano y se determina la extinción de esta solución a las longitudes de onda requeridas (270, 232, 266 y 274 nm) respecto al ciclohexano. A partir de los valores espectrofotométricos se calcula las extinciones específicas.

Material y reactivos

Reactivos

- Ciclohexano (calidad para espectrofotometría)

Materiales

- Gradilla y tubos de ensayo.
- Embudos.
- Matraces aforados de 10 y 50 ml Clase A
- Filtros de papel de pliegues.
- Cubetas de cuarzo con paso óptico de 1 cm.
- Pipetas Pasteur.

Instrumental

- Balanza analítica capaz de pesar como mínimo $\pm 0,0001$ mg.
- Espectrofotometro UV/Vis que permita medidas de extinción del ultravioleta entre 220 y 360 nm.

Procedimiento analítico

Operaciones previas

Comprobar que las cubetas que se van a emplear estén perfectamente limpias. Si no es así se limpiarán empleando alcohol/acetona (1:1) y agua destilada para posteriormente dejar secar.

Encender el espectrofotómetro como mínimo 15 minutos antes de efectuar las lecturas para que la lámpara esté en régimen de trabajo.

La muestra debe estar exenta de impurezas en suspensión y ser perfectamente homogénea, para ello se filtrarán los aceites con papel de filtro sobre un tubo de ensayo empleando un embudo.

Proceso analítico

- Pesar con precisión de $0,20g \pm 0,001g$ entre 0,10g - 0,20g de muestra en un matraz aforado de 10 ml. Enrasar con ciclohexano y homogeneizar. Si presenta opalescencia o turbidez filtrar con papel de filtro (Solución A).
- Repetir la operación pesando $\approx 0,10g$ en un matraz aforado de 50 ml. (Solución B). Anotar los pesos.
- Seleccionar en el "menú" del equipo las longitudes de onda a las que queremos determinar las extinciones (266, 270 y 274 nm.) .Hacer "zero" con la cubeta llena con el ciclohexano empleado en la preparación de la muestra.

- Llenar la cubeta con la solución problema (solución A) e introducirla en el equipo y efectuar las correspondientes lecturas.
- Limpiar la cubeta.
- Seleccionar la longitud de onda 232 nm y repetir el proceso con la "solución B".
- Los valores de absorbancia deben estar comprendidos entre 0,1 y 0,8, de no ser así se prepararán soluciones más concentradas o más diluidas según el caso.

Nota: Para la determinación de K232 es conveniente trabajar con absorbancias superiores a 0,3.

Nota: Es importante no disolver la muestra en ciclohexano hasta el momento de su lectura en el espectrofotómetro.

Cálculos y expresión de resultados

Las extinciones específicas o coeficientes de extinción a las diversas longitudes de onda se calcula según:

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

Siendo:

K_{λ} = Extinción específica a la longitud de onda λ

E_{λ} = Extinción medida a la longitud de onda λ

c = concentración de la disolución preparada en g/100 ml.

e = espesor de la cubeta en cm ($e=1'0$).

Los cálculos deben realizarse con tres cifras decimales y los resultados deben expresarse con dos cifras decimales y son adimensionales.

La prueba espectrofotométrica del aceite de oliva requiere la determinación de la extinción específica a 232 y 270 nm y la determinación de ΔK definido como:

$$\Delta K = k_m - \frac{k_{m-4} + k_{m+4}}{2}$$

Donde: k_m = Estimación específica a la longitud de onda m , longitud de onda de máxima absorción (270nm).

Este resultado se expresara con tres cifras decimales

4.1.4 Análisis sensorial

Principio del método: el método de análisis se basa en la valoración de la percepción de los estímulos olfativos-gustativos del aceite de oliva virgen. Cada catador valorará en una escala numérica la intensidad de percepción de los atributos positivos encontrados en la muestra de aceite de oliva virgen, así como los negativos si los hubiera.

La clasificación de cada muestra se realizará con la medida de la intensidad de sus defectos y atributos percibidos por el conjunto de los catadores constituidos en panel.

Material y equipos

Material

- Vidrios de reloj.
- Copas normalizadas de acuerdo a la norma COI/T.20/Doc.n°5
- Rotulador inoloro e indeleble para marcar las copas de cata
- Ficha de cata
- Manzanas
- Botella de agua a temperatura ambiente

Equipos

- Estufa de aire para atemperar las muestras
- Bloques de calefacción para copas de cata capaces de mantener la temperatura de la muestra a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Balanza-granatario de precisión $\pm 0.1\text{g}$
- Termómetro para control de temperatura ambiental
- Sonda termométrica para medida de temperatura de las muestras

Condiciones de ensayo

- Temperatura: Las muestras de aceite se mantendrán a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ colocadas en bloques de calefacción. La sala de cata se mantendrá a una temperatura de $20-25^{\circ}\text{C}$.
- Horario óptimo de cata: El período de óptima percepción para el gusto y el olfato es por mañana por lo que las sesiones de cata se realizarán entre las nueve y las trece horas.
- Tamaño de las muestras: Cada copa debe tener aproximadamente entre 12.8 y 14.6 gramos de muestra, que se pesarán en granatario, con una precisión de $\pm 0,1\text{g}$

Proceso analítico

- Colocar las muestras en la estufa de aire como mínimo media hora antes de su distribución en las copas de cata, a una temperatura aproximadamente de 30°C.
- Rotular las copas normalizadas de cata con códigos (formados por dos o tres letras o números al azar).
- Cada sesión consta de un máximo de cuatro muestras. Pudiéndose realizar hasta un máximo de tres sesiones en una misma jornada, con un descanso mínimo de quince minutos entre ellas.
- Poner entre 12.8 y 14.6 gramos de muestra en cada una de las copas pesados con balanza (con una precisión de +0.1g).
- Dejar en los bloques de calefacción para mantener la temperatura a 28±2°C.
- Cada catador proceder a oler la muestra y después a degustarla y rellenar la ficha de cata con la intensidad de los atributos positivos y negativos de la muestra a evaluar y clasificar. El catador utilizará los términos: atrojado/borras, moho-humedad, avinado-avinagrado/ácido-agrio, madera-húmeda, rancio y otros: metálico, quemado, heno, basto, lubricante, alpechín, salmuera, esparto, gusano, pepino. En el caso de percibir el carácter verde o maduro del atributo frutado, el catador marcará la casilla correspondiente de la ficha de cata.



Figura 11: Sala de cata y cabina individual preparada para la cata

Cálculos y expresión de resultados

Los resultados se introducirán en un programa informático (Hoja excel) conforme al método estadístico recogido en la Norma COI T20 Doc número 15.

La introducción de datos se hará en una matriz de nueve columnas correspondientes a los atributos positivos y negativos de cada una de las muestras y n filas, que serán cada uno de los catadores.

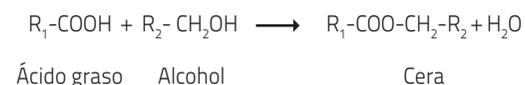
El resultado se expresa con una sola cifra decimal, como la intensidad de los atributos positivos (mediana de frutado) y negativos (mediana de defecto de mayor intensidad) de la muestra. Así como la clasificación correspondiente.

El valor del coeficiente de variación sólido para el atributo negativo de mayor intensidad y para el frutado debe ser inferior o igual al 20%.

En función de los resultados obtenidos el aceite se clasificará como virgen extra, virgen, corriente o lampante, siguiendo los criterios establecidos en la Norma COI.

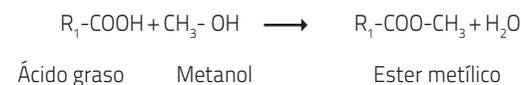
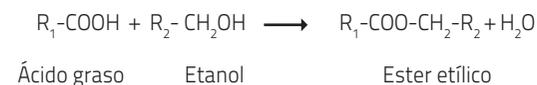
4.1.5 Determinación del contenido en esteres alquílicos y ceras

Principio del método: las ceras son esteres de alcoholes alifáticos con ácidos grasos. Suelen encontrarse en el hueso y en la piel de la aceituna, esta localización hace que en los aceites vírgenes su contenido sea mínimo mientras que en orujos es muy alto.



Los esteres alquílicos pueden ser de dos tipos, etílicos y metílicos. Los esteres etílicos se producen por la reacción de los ácidos grasos libres y el etanol que, a su vez, proviene de la fermentación etílica de los hidratos de carbono de la aceituna.

Estos esteres son un excelente marcador puesto que su presencia en dosis considerables implica que provienen de aceitunas que han sufrido fermentaciones.



Este procedimiento permite determinar mediante cromatografía de gases el contenido en ceras y en esteres metílicos y etílicos de los ácidos grasos mediante fraccionamiento de la grasa o aceite, a los que se habrá añadido los patrones internos adecuados, mediante cromatografía en columna de gel de sílice hidratado. Recuperación de la fracción eluida

en las condiciones de ensayo (cuya polaridad es inferior a la de los triglicéridos) y, a continuación, análisis directo mediante cromatografía de gases en columna capilar empleando un sistema de inyección on-column.

Puede utilizarse, para distinguir el aceite de oliva del obtenido mediante extracción (aceite de orujo de oliva) y del obtenido por repasado de la pasta de aceituna, siendo útil también para detectar mezclas fraudulentas de aceites de oliva virgen extra con aceites de menor calidad así como para determinar una posible desodorización realizada a presión y baja temperatura con objeto de eliminar aromas anómalos en el aceite de oliva virgen.

Material, reactivos y equipos

Materiales

- Matraz Erlenmeyer de 25 ml.
- Matraces de 250 ml.
- Probetas de 250 ml.
- Columna de vidrio para cromatografía de 1,0 cm de diámetro interno por 40 cm de longitud, provista de una llave de teflón. Para preparar la columna se añade un poco de lana de vidrio y se cubre con hexano, llenándose a continuación con una papilla de gel de sílice en hexano ($\approx 15\text{g}$ en 40 ml) mediante la ayuda de varias porciones de hexano. Se deja sedimentar la mezcla en reposo, completándose la sedimentación aplicando una ligera vibración. Finalmente eluir el exceso de hexano.
- Columna capilar de sílice fundida (0,32 mm de diámetro interno), recubierta con una película de 0,10 μm de espesor de la fase 5 %-difefenilmetilsilicona
- Viales para cromatografía

Reactivos

- Hexano para C.G.
- Éter etílico para C.G.
- n-Heptano para C.G.
- Gel de sílice 60 extrapuro para columna de cromatografía, de 70-230 mallas (referencia 7754 de Merck). El gel de sílice debe mantenerse un mínimo de 4 horas en el horno de mufla a 500 °C. Tras su enfriamiento, se añade un 2 % de agua respecto a la cantidad de gel de sílice utilizada. Se agita bien para homogeneizar la masa. Se mantiene en el desecador durante al menos 12 horas antes de su uso.
- Gas portador para cromatografía: helio de 99,9990 % de pureza.
- Gases auxiliares para el detector de ionización de llama: aire purificado e hidrógeno de 99,9990 % de pureza.
- Laurilaraquidato (SIGMA L-0506)
- Rojo Sudan 1 (1-fenil-azo-2-naftol). Preparar una solución de concentración $\approx 1\%$ en la mezcla de elución.
- Heptadecanoato de metilo (SIGMA)

Patrones

- Solución patrón de Laurilaraquidato en Heptano con una concentración aproximada de 500 mg/l (0.5 g /100 ml). Esta solución puede conservarse hasta dos meses en nevera.
- Solución patrón de Heptadecanoato de metilo en Heptano con una concentración aproximada de 200 mg/l (0.2 g/100 ml)

Instrumental

- Rotavapor
- Cromatografo de gases con detector FID y sistema de inyección on-column
- Horno mufla
- Balanza analítica capaz de pesar como mínimo $\pm 0'1$ mg

Procedimiento analítico

- Pesar $\approx 0.5 \pm 0.001\text{g}$ de muestra en un matraz de 25 ml, añadir 0.2 a 0.5 ml de patrón interno de ceras (según se trata de un aceite de oliva virgen o un orujo) y 0.25 de patrón interno de esteres.
- Transferir la muestra preparada a la columna cromatografía, que se habrá preparado como se indica en el punto anterior, con ayuda de dos porciones de 2 ml de n-hexano. Añadir 0.1 ml de la solución de Sudan.
- Dejar fluir el disolvente hasta que se sitúe a ≈ 1 mm por encima del nivel superior del absorbente. A continuación, iniciar la elución cromatográfica con una mezcla de n-hexano y éter etílico en la proporción de 99:1.
- Hacer pasar la mezcla de elución y recoger aproximadamente 220 ml de la mezcla a un ritmo de 15 gotas aproximadamente cada diez segundos (2.1 ml/minuto). (La elución de los esteres y las ceras concluye cuando la coloración roja del Sudan llega al fondo de la columna).
- Secar la fracción resultante en el rotavapor hasta que se haya eliminado casi todo el disolvente. Eliminar las últimas gotas mediante una corriente débil de nitrógeno y añadir a continuación 2ml de n-heptano en el caso de aceite de oliva y 4 ml en el caso de aceites de orujo y pasar a un vial de cromatografía.

Análisis cromatográfico de ceras

- Acondicionado de la columna de cromatografía: Cuando la columna se utiliza por primera vez es necesario acondicionarla, para ello se empleara un programa de temperatura lento, que partiendo de 50°C suba la temperatura 1 grado por minuto hasta alcanzar 350° y mantener esta temperatura dos horas.

Gases

- Gas portador : Helio 1ml/min (si se utiliza Hidrogeno puede aumentarse el caudal a 1,2 ml/min)
- Detector: Hidrogeno 30 ml/min / Aire 300 ml/min



Figura 12: Cromatografo de Gases Bruker

Condiciones de análisis

- Horno de columna:
- Detector: 350° Inyector: 50°
- Volumen de muestra inyectada 1µl



Nota: Para poner a punto el método deben inyectarse los dos estándares internos por separado, con objeto de identificar sus respectivos tiempos de retención.

Con carácter orientativo el Lauril araquidato tendrá un tiempo de retención de ≈20±3 min, si la columna es de 15 metros, o de ≈30±3 min si la columna es de 30 metros.

Deben identificarse los esterés metílicos y etílicos de los ácidos palmítico y oleico (C16 y C18), los esterés del ácido palmítico tendrán tiempos de retención inferiores al Heptadecanoato de metilo y los del ácido oleico los tendrán superiores.

En el caso de las ceras el orden de elución será: Lauril araquidato, C34, C36, C38, C40, C42, C44 y C46.

Nota: Dado el gradiente de temperatura que se utiliza es conveniente comenzar el análisis con una inyección de heptano. Esta inyección se realizara con la opción "línea base", de forma que pueda sustraerse la deriva de línea base debida al gradiente de temperatura y se facilite la correcta integración de los picos cromatográficos.

Cálculos y expresión de resultados

El contenido de las ceras se determina aplicando la fórmula:

$$\text{mg/Kg de ceras} = \frac{A_s \times M_C}{A_C \times M_S} \cdot 1000$$

en la cual:

A_s = área del pico de ceras.

A_C = área del pico del patrón interno.

M_C = peso de patrón añadido, en microgramos

M_S = peso de aceite empleado, en gramos

Se calculan los resultados de las distintas ceras agrupando el conjunto de isómeros de cada una de ellas. El resultado final corresponde a la suma de C-40, C-42, C-44 y C-46. En el caso de aceites de calidad virgen extra no se incluye C40. El contenido de esterés etílicos se determina aplicando la fórmula:

$$\text{mg/Kg esterés etílicos} = \frac{A_s \times M_C}{A_C \times M_S} \cdot 1000$$

en la cual:

A_s = área del pico de ester.

A_C = área del pico del patrón interno.

M_C = peso de patrón añadido, en microgramos

M_S = peso de aceite empleado, en gramos

Se cuantificaran los esterés etílicos de C16 y C18 (palmitato de etilo y oleato de etilo).

4.2 PARÁMETROS DE PUREZA

Con objeto de poder comprobar la genuinidad de una muestra de aceite de oliva virgen o virgen extra, y tras verificar el cumplimiento de los parámetros de calidad, se aplicara el siguiente esquema de decisiones

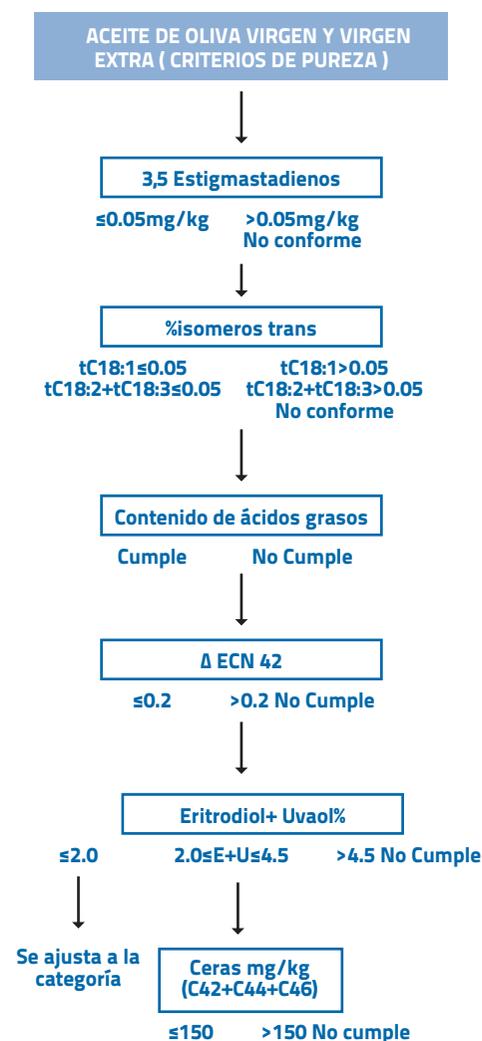
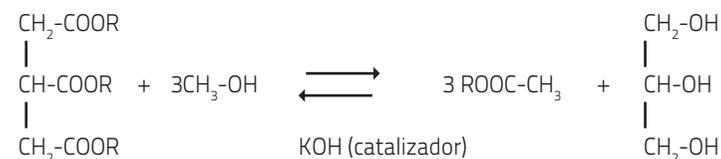


Figura 13: Esquema de decisiones para determinar la pureza de aceites de oliva vírgenes

4.2.1 Determinación de la composición de esteres metílicos de los cidos grasos y los isómeros trans mediante cromatografía de gases con columna capilar.

Principio del método: este método analítico permite determinar, mediante cromatografía de gases con columna capilar, la composición cualitativa y cuantitativa de la mezcla de esteres metílicos de ácidos grasos obtenidos mediante transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico.



Este método es aplicable a todo tipo de aceites con un contenido en ácidos grasos libres (acidez) < 3,3%. En el caso de muestras con ácidos grasos libres ≥3,3% se empleará una solución metanólica de ácido clorhídrico en ampolla cerrada a ≈ 100°C. Asimismo este método analítico permite determinar también el contenido de isómeros trans de los ácidos grasos oleico, linoleico y linolenico.

Este método analítico es por tanto útil para detectar procesos de refinado o adición de algún aceite refinado, ya que en este proceso se generan cantidades importantes de ácidos grasos trans, además de para detectar presencia de aceites distintos de oliva, ya que el perfil de ácidos grasos difiere significativamente según la grasa.

La muestra se encontrará a temperatura ambiente para que sea posible su manipulación en condiciones óptimas.

Material, reactivos y equipos

Reactivos

- Solución de ácido clorhídrico en metanol al 2%. Se prepara a partir de la solución comercial del 4% diluyendo en metanol al 50% o bien puede emplearse solución comercial al 2% (Panreac).
- Hexano para C.G.
- Heptano para C.G.
- Metanol con contenido en agua < 0,5%.
- Hidróxido potásico solución metanólica ≈ 2 N, (disolver ≈ 11,2 g de KOH en 100 ml de metanol)

Patrones

- Patrón mezcla de esteres metílicos de ácidos grasos: "Custom fame mix". (Restek. Ref 553985)
- Linoleic acid methyl ester cis/trans isomers SUPELCO (4-7791)
- Linolenic acid methyl ester isomer mix SUPELCO (4-7792)
- Trans-9-Elaidic methyl ester SUPELCO (4-6903)

Materiales

- Tubos de vidrio de paredes gruesas con cierre hermético.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas automáticas (volumen 200µl-1000µl)
- Viales para cromatografía. de 2 ml.
- Columna capilar para cromatografía. Ejemplo Rtx-2330. (Restek) (10% ciano propilfenil polioxilano) longitud 60 m, 0,25 mm de diámetro y 0,2 µm de espesor de film.

Instrumental

- Placa calefactora para tubos de vidrio capaz de superar los 100° C.
- Agitador de tubos.
- Cromatógrafo de Gases con inyector split y detector FID.
- Balanza analítica de precisión 0.0001 g

Procedimiento analítico

- Pesar aproximadamente 0,1 g de muestra en un tubo de metilación.
- Añadir 2 ml de heptano y agitar.
- Añadir 0,2 ml de solución metanólica ≈ 2 N de hidróxido potásico.
- Tapar y agitar enérgicamente durante ≈ 30 segundos.
- Dejar reposar hasta que la parte superior quede clara.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur tomar la capa superior que corresponderá al heptano (contiene los esteres metílicos).
- Llevar a un vial de cromatografía y trasladar al cromatógrafo de gases.

En el caso de muestras con acidez ≥ 3,3% se utilizará el siguiente procedimiento:

- Pesar aproximadamente 0,2 g de aceite en el tubo de metilación y añadir unos 2 ml de solución de clorhídrico en metanol al 2%.
- Cerrar herméticamente el tubo y mantener ≈ 40 minutos en la placa calefactora a una temperatura aproximada de 100° C.
- Dejar enfriar, abrir y añadir aproximadamente 2 ml de agua destilada y 1 ml de hexano.
- Agitar y dejar separar las fases extrayendo el hexano con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Llevar a un vial cromatográfico y trasladar al cromatógrafo de gases.

Análisis cromatográfico

- Acondicionado de la columna de cromatografía: Cuando la columna se utiliza por primera vez es necesario acondicionarla, para ello se empleará un programa de temperatura lento, que partiendo de 50°C suba la temperatura 1 grado por minuto hasta alcanzar 250° y mantener esta temperatura dos horas.
- Gases:
 - Gas portador : Helio 1ml/min (si se utiliza Hidrogeno puede aumentarse el caudal a 1,2 ml/min)
 - Detector: Hidrogeno 30 ml/min
Aire 300 ml/min
- Condiciones de análisis orientativas:
 - Horno de columna:
10° /min 10° /min
190° (14min) ----> 220° (1min) ----> 240° (6min)
 - Detector: 260° Inyector: 240°
 - Volumen de muestra inyectada 1µl
 - Relación de split: 1/100

Nota (1): Para comenzar el análisis debe inyectarse el patrón que contiene todos los ácidos grasos a cuantificar, con objeto de poder identificarlos correctamente. Estos ácidos son (por orden de elución): Mirístico, Palmítico, Palmitoleico (deben sumarse los dos isómeros), Heptadecanoico, Heptadecenoico, Estearico, Oleico, Linoleico, Araquidico, Linolenico, Eicosenoico, Behenico, Erucico y Lignocericico.

Nota (2): Las condiciones analíticas deben ajustarse de forma que exista una completa separación entre los picos de los ácidos Esteárico y Oleico

Nota (3): Para poder identificar los correspondientes isómeros trans deben inyectarse inicialmente los correspondientes patrones.

Cálculos y expresión de resultados

Composición de ácidos grasos

El resultado viene expresado en % para cada éster metílico considerando que el total

$$\% \text{ ac graso} = \frac{A}{\Sigma A}$$

donde:

A = área del pico de ester metílico del ácido graso

ΣA = suma de las áreas de todos los picos de los ácidos grasos que se tienen en cuenta para la normalización a 100% (todos los que se van a cuantificar).

Nota (4): Cuando se está determinando la composición de ácidos grasos deben sumarse los correspondientes isómeros para dar el porcentaje total de cada uno de ellos.

Dado que el análisis debe reunir las características adecuadas de precisión, exactitud, y sensibilidad para permitir expresar el resultado del Ac. Mirístico con dos cifras decimales, se expresarán el resto de los ácidos grasos con el mismo número de cifras decimales ya que este es el número de cifras significativas que se deben tener en cuenta para la normalización a 100%.

Cuantificación de isómeros trans

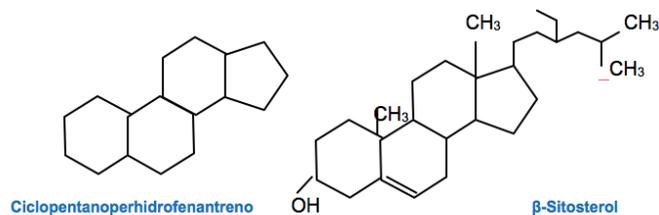
El resultado viene expresado en % para el isómero trans oleico y % para la suma de isómeros trans linoleicos y trans linolenicos considerando que el total de las áreas de picos identificados representan el 100%.

Los resultados se expresan con dos cifras decimales.

Nota (5): Los isómeros trans eluyen delante de los correspondientes isómeros cis.

4.2.2 Determinación de la composición y del contenido de esteroides y dialcoholes triterpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar.

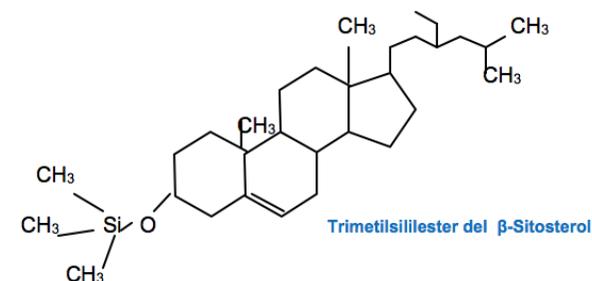
Principio del método: los esteroides son derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno



El β -Sitosterol es el esteroide mayoritario en el aceite de oliva.

Es un claro indicativo de pureza ya que el aceite de oliva posee una composición específica muy distinta del resto de los aceites vegetales.

Este procedimiento permite determinar mediante cromatografía de gases con columna capilar el contenido total, la composición de la fracción de esteroides y el contenido en dialcoholes terpenicos, obtenidos a partir de la saponificación de la materia grasa, a la que se ha añadido α -colestano como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico y posterior separación del insaponificable con éter etílico. La fracción de esteroides se separa del insaponificable mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica. Los esteroides recuperados del gel de sílice se transforman en trimetilsililesteres y se analiza por cromatografía de gases.



Determinamos la cantidad total así como el % relativo de los esteroides que indica la norma: Colesterol, Brasicasterol, 24 Metilencloesterol, 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.

Material, reactivos y equipos

Reactivos

- Solución etanólica de hidróxido potásico aproximadamente 2 N: pesar \approx 130 g. de hidróxido potásico (\approx 85%) y disolver en \approx 200 ml. de agua destilada, enfriar. Llevar a 1 litro con etanol. Preparar cuando se vaya a utilizar.
- Solución etanólica de hidróxido potásico aproximadamente 0.2N.
- Mezcla Hexano/Eter etílico 90:60 para el desarrollo de las placas de cromatografía
- Éter etílico calidad P.A
- Sulfato sódico anhidro calidad P.A.
- Hexano calidad CG

- Etanol calidad P.A.
- Acetato de Etilo calidad P.A.
- Acetona calidad CG
- Solución de 2.7-diclorofluoresceína al 0,2% en etanol.
- Reactivo de silanización: HMDS + TMCS + Piridina (3/1/9). (Supelco. 33038).
- Gases de laboratorio: Helio, Aire e Hidrogeno.

Patrones

- Colesterol (sigma C-8667). Solución ≈ 5% en cloroformo.
- Patrón de esteroides "plant sterols Mixture" Ref. 119. "Matreya. INC". Solución en cloroformo de una mezcla de esteroides 25 mg/ml.
- α-Colestanol .Solución al 0.2% en acetato de etilo (Sigma D-6128)
- Uvaol. (Sigma U-6628) Solución al 0.2% en cloroformo.

Materiales

- Matraces redondos de 250 ml. provistos de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- Embudos de separación de 500 ml. con tapón.
- Matraces de 250 ml.
- Matraces erlenmeyer de 50 ml. con refrigerantes de reflujo.
- Matraces corazón con junta esmerilada.
- Placas básicas de gel de sílice. (Merck ref. 105721 o similar)
- Embudos
- Filtros de papel de pliegues.
- Cubeta para desarrollo de placas de cromatografía de capa fina.
- Microviales para cromatografía.
- Micro jeringa de vidrio de 1000 µl.
- Columna capilar de 30 m. de sílice fundida 0,25 mm de diámetro interno, recubierta con una película de 0,20 µm de espesor de la fase 5%-difenilmetilsilicona.



Figura 14: capsulador, microvial y vial de cromatografía. Matraces

Instrumental

- Batería de mantas calefactoras.
- Aplicador de placa de cromatografía Linomat-Camag.
- Rotavapor.
- Cromatografo de gases con inyector automático y detector FID.

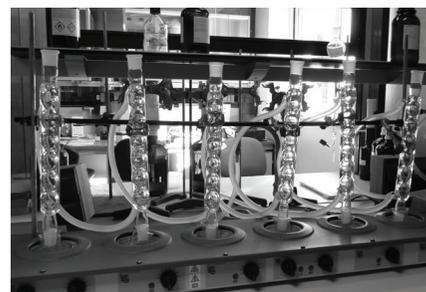


Figura 15: Batería de mantas calefactoras

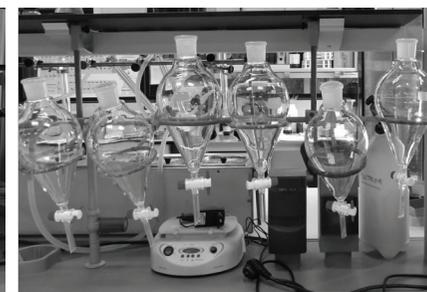


Figura 16: Batería de embudos de decantación

Procedimiento analítico

Preparación del insaponificable

Nota (1): Este procedimiento se utiliza para determinar la composición de la fracción de esteroides, cuando se emplea para cuantificarlos se empleara α-colestanol como patrón interno. Simultáneamente puede determinarse el contenido en Eritrodinol y Uvaol reintegrando el cromatograma obtenido para incluir estos dos picos.

- Pesar en un matraz redondo aproximadamente 10 gramos de muestra seca y filtrada y añadir 50 ml. de solución etanólica de KOH ≈ 2N. En caso de realizarse la determinación de esteroides totales añadir la solución de patrón interno adecuada según el tipo de aceite, (1ml para aceites de oliva y 2 ml para aceites de orujo), de forma previa a la pesada de la muestra y llevarlo a sequedad con corriente de aire.
- Adaptar el refrigerante de reflujo y calentar con manta calefactora hasta ligera ebullición. Mantener en ebullición ≈ 60 minutos agitando periódicamente el matraz.
- Añadir aproximadamente 50 ml. de agua destilada por la parte superior del refrigerante.
- Separar y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Transvasar cuantitativamente el contenido del matraz a un embudo de decantación de 500 ml. lavando con unos 50 ml. de agua destilada.
- Añadir aproximadamente 80 ml. de éter etílico, agitar y dejar reposar hasta separación de las dos fases.

- Separar la fase acuosa y recoger la fracción etérea sobre un matraz. (**Nota:** tener en cuenta que la fase etérea queda encima de la acuosa, ya que su densidad es menor).
- Realizar dos nuevas extracciones de la fase acuosa con unos 60-80 ml. de éter etílico.
- Reunir con la anterior fracción etérea en un embudo de decantación y lavarlas con unos 50 ml. de agua destilada al menos 3 veces.
- Eliminar las aguas de lavado, secar con sulfato sódico anhidro y filtrar con filtro de pliegues al que se ha añadido sulfato sódico anhidro.
- Destilar el éter en rotavapor hasta eliminar totalmente el disolvente, añadir unos ml de acetona para garantizar que se elimina la humedad.
- Separación de la fracción de esteroides:
 - Las placas empleadas no necesitan tratamiento básico, solo hay que activarlas y para ello se introducen en estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Las placas activadas se conservan en un desecador. Se activarán únicamente las placas que se prevea utilizar cada día. Si las placas no son básicas deberán tratarse previamente.
 - Tratamiento de las placas: Sumergir las placas con gel de sílice unos 4 cm en la solución etanólica 0,2 N de hidróxido potásico durante 10 segundos; dejar secar las placas en una campana durante dos horas y, por último, llevarlas a estufa.
 - Preparar la cubeta de desarrollo con una mezcla de Hexano/Eter etílico (90:60 v/v). Dejar transcurrir media hora como mínimo antes de introducir la placa. Cambiar la mezcla eluyente cada día que se vaya a utilizar.
 - Preparar una solución del insaponificable con 300 μl . de acetato de etilo y colocar 100 μl . de esta solución en la microjeringa del Linomat.
 - Colocar la placa de gel de sílice en el Linomat y apretar el botón de "Star" y "run".
 - Si no se dispone de aplicador de placa se realizara manualmente con ayuda de una microjeringa, de forma que se obtenga una línea lo más fina y homogénea posible.

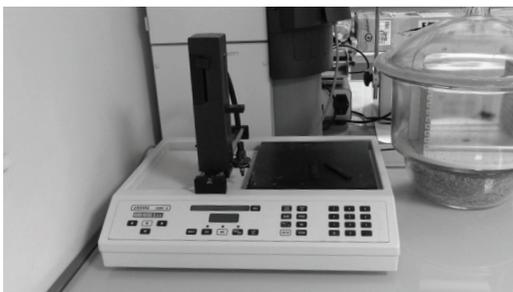


Figura 17: Aplicador de placa Linomat

- Colocar en el extremo de la placa 2-3 μl . de la solución de referencia, patrón de colesterol y patrón de uvaol, (caso de realizarse la determinación de dialcoles terpénicos), para poder así identificar la banda de esteroides una vez desarrollada la placa.
- Introducir la placa en la cubeta de desarrollo.

- Tapar y dejar hasta que el frente de disolvente se sitúe aproximadamente a 1 cm. del borde
- Sacar la placa de la cubeta y dejar secar.
- Pulverizar con 2,7-diclorofluoresceína y mirar la placa con luz ultravioleta, marcar la banda de esteroides con la ayuda de la solución de referencia, marcando los límites de la banda a lo largo de los márgenes de la fluoresceína

Nota: La banda de esteroides tiene un ancho de aproximadamente 1cm mientras que si se quiere determinar eritrodol y uvaol debe tener aproximadamente 2 cm.
- Rascar con una espátula o similar la banda de esteroides y recoger el raspado en un matraz de 50 ml. con boca esmerilada. Añadir ≈ 10 ml. de cloroformo caliente, mezclar y filtrar, recogiendo el filtrado en el matraz corazón seco y tarado.
- Lavar el residuo en el embudo tres veces con éter etílico (empleando cada vez unos 10 ml), recogiendo cada vez el filtrado en el mismo matraz
- Evaporar el disolvente en rotavapor. Añadir unas gotas de acetona para completar el secado.



Figura 18: rotavapor y desecador

- Secar totalmente con corriente de nitrógeno y bajo campana a vacío y pesar para determinar el peso de fracción esteroides. Nota: Si se utiliza estufa debe extremarse la precaución con la temperatura y el tiempo de secado (10 min a 105°), ya que pueden producirse alteraciones debido a la termolabilidad de estas moléculas. Es recomendable emplear estufa o campana de vacío para poder secar a 70° .
- Las muestras quedaran en desecador hasta el momento de la silanización previa al análisis cromatográfico.
- Análisis cromatográfico de la composición de la fracción de esteroides.
- Para preparar los trimetilsililesteres se añade al matraz corazón ≈ 50 μl . del reactivo de silanización por miligramo de esteroides. Se agita suavemente y se deja reposar a temperatura ambiente al menos 15 minutos.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur, trasvasar a un vial de cromatografía. Si la muestra queda turbia, filtrar con ayuda de una jeringuilla de 1 ml. desechable y un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ adaptable a la jeringa.

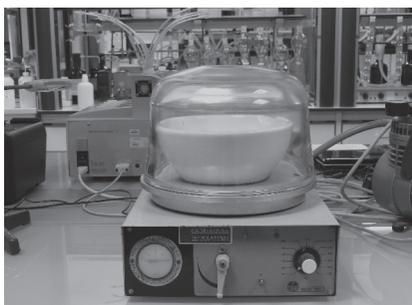


Figura 19: Campana de vacío con Tª

Análisis cromatográfico

- Acondicionado de la columna de cromatografía: Cuando la columna se utiliza por primera vez es necesario acondicionarla, para ello se emplea un programa de temperatura lento, que partiendo de 50°C suba la temperatura 1 grado por minuto hasta alcanzar 300° y mantener esta temperatura dos horas.

Nota: Si la columna comparte equipo con la determinación de ceras es recomendable acondicionarla hasta 350°

- Gases:
 - Gas portador : Helio 1ml/min (si se utiliza Hidrogeno puede aumentarse el caudal a 1,2 ml/min)
 - Detector: Hidrogeno 30 ml/min
Aire 300 ml/min
- Condiciones de análisis orientativas:
 - Horno de columna: 270°
 - Detector: 310 Inyector: 300°
 - Volumen de muestra inyectada 1µl
 - Relación de split: 1/50

Cálculos y expresión de resultados

El resultado viene expresado como porcentaje de cada uno de los esteroides.

$$\% \text{ esteroides } x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

donde:

Ax = área de pico del esteroide x

ΣA = suma de las áreas de todos los picos

El contenido en esteroides totales se determina empleando la formula:

$$\text{Esteroides totales mg/kg} = \frac{A_x m}{A.p} \times 1000$$

donde:

Ax = suma de áreas de todos los esteroides

A = área del patrón interno

m = peso de patrón interno añadido

p = peso de muestra

El porcentaje de diolcoholes terpénicos se determina de acuerdo a:

$$\% \text{ eritrodol + uvaol} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{esteroides}}} \times 100$$

donde:

A1 = área del pico del eritrodol

A2 = área del pico del uvaol

ΣAesteroides = suma de las áreas de los esteroides

Los resultados se expresan con una sola cifra decimal excepto en el caso de esteroides totales que no se emplean decimales.

En el caso de la composición de la fracción de esteroides se emiten resultados de: % Colesterol, % Brasicasterol, % Campesterol, % Estigmasterol, % β-Sitosterol, (ΣΔ.5.23-Estigmastadienol, Clerosterol, β-Sitosterol, Sistostanol, Δ-5-Avenasterol y Δ.5.24 Estigmastadienol), % Δ-7-Estigmastanol y %Δ-7-Avenasterol.

Los tiempos de retención relativos de los esteroides estarán en función de la columna empleada.

A modo orientativo son:

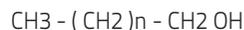
ESTEROL	TIEMPO DE RETENCIÓN
Colesterol	0,67
Colestanol	0,70
Brasicasterol	0,75
Campesterol	0,85
Estigmasterol	0,89
Δ -7- Campesterol	0,94
Δ -5, 23-Estigmastadienol	0,96
Clerosterol	0,97
β -Sitosterol	1,00
Sitostanol	1,02
Δ -5 Avenasterol	1,03
Δ -5-24-Estigmastidienol	1,08
Δ -7- Estigmastenol	1,12
Δ -7 Avenasterol	1,16
Eritrodiol	1.41
Uvaol	1.52

Tabla 4. Tiempos de retención relativos de los esteroides del aceite de oliva

4.2.3 Determinación del contenido de alcoholes alifáticos mediante cromatografía de gases con columna capilar.

Principio del método: los alcoholes alifáticos son compuestos lineales de C22 a C28, normalmente los de número impar se encuentran en menores cantidades respecto a los pares. Un alto contenido de los mismos indica la presencia de compuestos polares, inestables con el tiempo y las bajas temperaturas. Son los precursores de la formación de ceras.

Su fórmula sería:



donde n=20 a 26 para los alcoholes mayoritarios que son objeto de cuantificación en este procedimiento.

Este procedimiento permite determinar mediante cromatografía de gases con columna capilar el contenido de alcoholes alifáticos en las materias grasas obtenidos a partir de la saponificación de la materia grasa, a la que se habrá añadido 1-icosanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico y posterior separación del insaponificable con éter etílico. La fracción de alcoholes alifáticos se separa del insaponificable

mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica. Los alcoholes recuperados de la gel de sílice se transforman en trimetilsililesteres y se analizan por cromatografía de gases.

Material, reactivos y equipos

Reactivos

- Solución etanólica de hidróxido potásico aproximadamente 2 N: pesar \approx 130 g. de hidróxido potásico (\approx 85%) y disolver en \approx 200 ml. de agua destilada, enfriar. Llevar a 1 litro con etanol. Preparar cuando se vaya a utilizar.
- Éter etílico calidad P.A.
- Sulfato sódico anhidro calidad P.A.
- Hexano calidad cromatografía.
- Acetona calidad cromatografía.
- Cloroformo calidad P.A.
- Mezcla Hexano/Éter etílico 65:35 para el desarrollo de las placas de cromatografía
- Solución de 2.7-diclorofluoresceína al 0,2% en etanol.
- Reactivo de silanización: HMDS + TMCS + Piridina (3/1/9). (Supelco. 33038).
- Gases de laboratorio: Helio, Aire e Hidrogeno.

Patrones

- Solución patrón de los alcoholes alifáticos de C20 a C28.
Es conveniente prepara una disolución al 0,1% en cloroformo de Docosanol (Sigma B-4755), Tetracosanol (Sigma L-3507), Hexacosanol (Sigma H-2139), y Octacosanol (Sigma O-3379) . Esta solución se utilizara como referencia en la placa de cromatografía para identificar la banda de alcoholes y también como referencia en el análisis cromatografico para identificar los picos de cada uno de los alcoholes que se van a cuantificar.
- 1-Eicosanol (Sigma A-8635), solución al 0.1% (m/v) en cloroformo (patrón interno)

Materiales

- Matraces redondos de 250 ml. con juntas esmeriladas, provistos de refrigerante de reflujo.
- Embudos de separación de 500 ml. con tapón.
- Matraces de 250 ml.
- Matraces erlenmeyer de 50 ml. con refrigerantes de reflujo.
- Matraces corazón con junta esmerilada.
- Placas de gel de sílice. Merck ref. 105721
- Embudos
- Filtros de pliegues.
- Cubeta para desarrollo de placas de cromatografía de capa fina.
- Microviales para cromatografía.
- Microjeringa de vidrio de 1000 μ l.
- Columna capilar de 30 m.de sílice fundida 0,25 mm de diámetro interno, recubierta con una película de 0,20 μ m de espesor de la fase 5 %-difefenilmetilsilicona

Instrumental

- Batería de mantas calefactoras.
- Aplicador de placa de cromatografía Linomat-Camag.
- Rotavapor.
- Cromatografo de gases con inyector automático y detector FID

Procedimiento analítico

Preparación del insaponificable

Nota (1): Este procedimiento se utiliza para determinar el contenido en alcoholes alifáticos, no obstante puede realizarse de forma conjunta con la determinación de esteroides, empleando el patrón o patrones internos correspondientes.

- Introducir, en el matraz de 250 ml, 500µl de solución de 1-eicosanol al 0.1% en cloroformo, (en caso de aceite de orujo se emplearan 1500 µl).

Nota: Si se va a realizar conjuntamente la determinación del contenido en esteroides se introducirá también 1 ml de la solución de α-colestanol.

- Evaporar en corriente de nitrógeno hasta sequedad y, a continuación, pesar con precisión, en el mismo matraz, 10 g de la muestra seca y filtrada (5 g en caso de aceite de orujo) y añadir 50 ml. de solución etanólica de KOH ≈ 2N.
- Adaptar el refrigerante de reflujo y calentar con manta calefactora hasta ligera ebullición. Mantener en ebullición ≈ 60 minutos, agitando periódicamente.
- Seguir los pasos descrito en el procedimiento para la determinación de esteroides.

Separación de la fracción de alcoholes

- Realizar la separación en placa de cromatografía siguiendo los pasos descritos en el procedimiento para la determinación de esteroides teniendo en cuenta colocar en el extremo de la placa 2-3 µl. de la solución de referencia, mezcla de alcoholes, para poder así identificar la banda de alcoholes alifáticos una vez desarrollada la placa.

Nota: Se marcaran la banda de alcoholes alifáticos y la banda inmediatamente superior que corresponde a los alcoholes triterpénicos, ya que esta incluye cantidades significativas de alcoholes alifáticos.

- Rascar con una espátula o similar la banda de alcoholes y recoger el raspado en un matraz de 50 ml. con boca esmerilada. Añadir ≈10 ml. de cloroformo caliente, mezclar y filtrar, recogiendo el filtrado en el matraz corazón seco y tarado.

- Lavar el residuo en el embudo tres veces con éter etílico (empleando cada vez unos 10 ml), recogiendo cada vez el filtrado en el mismo matraz.
- Evaporar el disolvente en rotavapor, secar totalmente con corriente de nitrógeno y en campana o estufa de vacío.
- Pesar el matraz para determinar los mg de alcoholes alifáticos que se han extraído
- Las muestras quedaran en desecador hasta el momento de la silanización, previa al análisis cromatografico.
- Para preparar los trimetilsililesteres se añade al matraz corazón 50 µl. del reactivo de silanización por mg de alcoholes, se agita suavemente y se deja reposar a temperatura ambiente al menos 15 minutos.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur, trasvasar a un microvial de cromatografía. Si la muestra queda turbia, filtrar con ayuda de una jeringuilla de 1 ml. desechable y un filtro de 0,45 µm adaptable a la jeringa o centrifugar.

Análisis cromatográfico

- Acondicionado de la columna de cromatografía: Cuando la columna se utiliza por primera vez es necesario acondicionarla, para ello se empleara un programa de temperatura lento, que partiendo de 50°C suba la temperatura 1 grado por minuto hasta alcanzar 300° y mantener esta temperatura dos horas.

Nota: Si la columna comparte equipo con la determinación de ceras es recomendable acondicionarla hasta 350°

Gases

- Gas portador : Helio 1ml/min (si se utiliza Hidrogeno puede aumentarse el caudal a 1,2 ml/min)
- Detector: Hidrogeno 30 ml/min
Aire 300 ml/min
- Condiciones de análisis orientativas:
- Horno de columna:
5°/min 10°/min
190° (5min) --> 260° (15 min) --> 290° (5min)
- Detector: 310 Inyector: 280°
- Volumen de muestra inyectada 1µl
- Relación de split: 1/50

Cálculos y expresión de resultados

Calcular del modo siguiente el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos, expresado en mg/Kg de materia grasa:

$$\text{mg/kg alcohol}_x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

Donde:

A_x = área del pico del alcohol x

A_s = área del pico del 1-eicosanol

m_s = peso de 1-eicosanol añadido, en mg

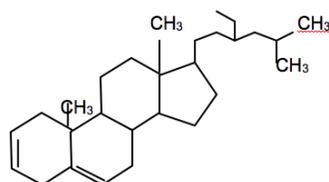
m = peso de la muestra tomada para la determinación en g.

Los resultados se expresan sin cifras decimales.

Se expresa el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos en mg/Kg de materia grasa y la suma de C_{22} , C_{24} , C_{26} y C_{28} como "alcoholes alifáticos totales".

4.2.4 Determinación de los estigmastadienos en los aceites vegetales por cromatografía de gases con columna capilar.

Principio del método: el estigmasta-3,5-dieno es un hidrocarburo esteroideo que se forma en el proceso de refinación por deshidratación a partir del beta-sitosterol (principal componente de la fracción de esteroides). Indica por tanto presencia de aceites refinados



Estigmasta-3,5-dieno

Este procedimiento permite determinar mediante cromatografía de gases la presencia de estigmastadienos, obtenidos a partir de la saponificación de la materia grasa con una solución etanólica de hidróxido potásico y posterior aislamiento de la materia insaponificable. Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos mediante cromatografía en columna de gel de sílice y análisis mediante cromatografía de gases en columna capilar.

Material, reactivos y equipos

Reactivos

- Hexano para C.G.
- Etanol absoluto P.A.
- Sulfato sódico anhídrido para C.G.
- Hidróxido potásico P.A.

- Solución alcohólica de hidróxido potásico al 10 %. Añadir 10 ml de agua a 50g de hidróxido potásico, agitar y diluir seguidamente la mezcla en etanol hasta un volumen de 500 ml. Debe prepararse diariamente.
- Gel de sílice 60 extrapuro para columna de cromatografía, de 70-230 mallas (referencia 7754 de Merck)
- Gas portador para cromatografía: helio de 99,9990 % de pureza.
- Gases auxiliares para el detector de ionización de llama: aire purificado e hidrógeno de 99,9990 % de pureza.
- Colesta-3,5-dieno (SIGMA C-6012)
- n-Nonacosano (SIGMA N-4254)

Patrones

- Solución madre (200 ppm) de colestas-3,5-dieno en hexano (10 mg en 50 ml)
- Solución patrón de colestas-3,5-dieno en hexano con una concentración de 20 ppm, que se obtiene diluyendo la solución anterior. Duración en nevera 4 meses.
- Solución de n-nonacosano en hexano con una concentración aproximada de 100 ppm.

Materiales

- Matraces redondos de 250 ml. provistos de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- Embudos de separación de 500 ml. con tapón.
- Matraces de 250 ml.
- Matraces corazón con junta esmerilada.
- Embudos
- Filtros de pliegues.
- Microviales para cromatografía.
- Columna de vidrio para cromatografía (1,0 cm de diámetro interno por 40 cm de longitud) provista de una llave de teflón. Para preparar la columna se añade un poco de lana de vidrio y se cubre con hexano, llenándose a continuación con una papilla de gel de sílice en hexano (≈ 15g en 40 ml) mediante la ayuda de varias porciones de hexano. Se deja sedimentar la mezcla en reposo, completándose la sedimentación aplicando una ligera vibración. Añadir sulfato sódico anhídrido hasta una altura de aproximadamente 0,5 cm y finalmente eluir el exceso de hexano.
- Columna capilar de sílice fundida 30 m de longitud, recubierta con una película de la fase 5 %-fenilmetilsilicona.

Instrumental

- Batería de mantas calefactoras.
- Rotavapor.
- Cromatografo de gases con inyector automático y detector FID.

Procedimiento analítico

Preparación del insaponificable

- Pesar 20 ± 0.1 g de aceite de oliva virgen en un matraz de 250 ml, añadir 1 ml de solución patrón de colest-3,5-dieno (20ppm) y 75 ml de potasa alcohólica al 10 %. En caso de aceites de cuya composición forme parte aceite refinado se pesarán 10 ± 0.1 g.
- Adaptar el refrigerante de reflujo y calentar con manta calefactora hasta ligera ebullición. Mantener en ebullición 30 minutos.
- Dejar enfriar y añadir aproximadamente 100 ml. de agua destilada por la parte superior del refrigerante. Separar y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Transvasar cuantitativamente el contenido del matraz a un embudo de decantación de 500 ml.
- Añadir 100 ml. de hexano, agitar y dejar reposar hasta separación de las dos fases.
- Separar la fase acuosa y recoger la fase orgánica sobre un matraz. Si se produce emulsión que no desaparece, añadir pequeñas cantidades de etanol.
- Realizar una nueva extracción de la fase acuosa con otros 100 ml. de hexano.
- Reunir con la anterior fase orgánica en un embudo de decantación y lavarlas con unos 100 ml. de una mezcla de etanol-agua destilada (1:1) al menos 3 veces.
- Eliminar las aguas de lavado, secar con sulfato sódico anhidro y filtrar con filtro de pliegues al que se ha añadido sulfato sódico anhidro.
- Destilar el hexano en rotavapor hasta eliminar totalmente el disolvente, ayudarse de una corriente de nitrógeno si hace falta.
- Añadir 1 ml de hexano y guardar en la nevera hasta su utilización.

Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos

- Introducir el residuo en la columna de fraccionamiento con ayuda de 1 ml de hexano, distribuir la muestra en la columna dejando que el nivel de solución descienda hasta la parte superior del sulfato sódico.
- Comenzar la elución cromatográfica con hexano a un flujo aproximado de 1 ml/min.
- Desechar los primeros 25-30 ml de eluido y recoger la fracción siguiente de 40-50ml.
Nota: Debe comprobarse el volumen de eluido óptimo para desechar ya que si no se desecha el volumen adecuado pueden aparecer picos correspondientes a hidrocarburos saturados que interferirán con el patrón interno, impidiendo una adecuada cuantificación de estigmastadieno.
- Evaporar esta fracción en el rotavapor hasta sequedad.
- Disolver inmediatamente el residuo en 0.2 ml de hexano y mantener la solución en la nevera hasta el momento de su análisis.

Análisis cromatográfico de estigmastadienos

- Acondicionado de la columna de cromatografía: Cuando la columna se utiliza por primera vez es necesario acondicionarla, para ello se empleará un programa de temperatura lento, que partiendo de 50°C suba la temperatura 1 grado por minuto hasta alcanzar 300° y mantener esta temperatura dos horas.

Nota: Si la columna comparte equipo con la determinación de ceras es recomendable acondicionarla hasta 350°

- Gases
 - Gas portador : Helio 1 ml/min (si se utiliza Hidrogeno puede aumentarse el caudal a 1,2 ml/min)
 - Detector: Hidrogeno 30 ml/min
Aire 300 ml/min
- Condiciones de análisis orientativas:
 - Horno de columna:
 $2^{\circ}/\text{min}$
 235° (10min) --> 285° (5 min)
 - Detector: 310° Inyector: 300°
 - Volumen de muestra inyectada $1\mu\text{l}$
 - Relación de split: 1/20



Figura 20: Cromatografo de Gases Varian

Nota: Para poner a punto el método cromatografico es conveniente comenzar inyectando el patrón interno y la solución de nonacosano para determinar sus tiempos de retención y garantizar una buena separación del pico de estigmastadieno.

Cálculos y expresión de resultados

El contenido de los estigmastadienos se determina aplicando la fórmula:

$$\text{mg/Kg de estigmastadieno} = \frac{A_s \cdot m_c}{A_c \cdot m_s}$$

donde:

A_s = área del pico de estigmastadienos.

A_c = área del pico del patrón interno.

M_c = peso de patrón añadido, en microgramos

M_s = peso de aceite empleado, en gramos

Los resultados se expresan con dos cifras decimales. Los tiempos de retención relativos en la columna empleada son:

Colestadieno → 17.8 ± 0.1

Estigmastadienos → 22.9 ± 0.1

4.2.5 Determinación de la diferencia entre el contenido real y el contenido teórico en triglicéridos con ECN 42.

Principio del método: es un parámetro que nos da una idea de la distribución de ácidos grasos en la formación de los triglicéridos, comparando la distribución esperada y la real.

El contenido teórico de triglicéridos con número de carbonos 42, ECN42, (calculado sobre la base de la determinación de la composición de ácidos grasos mediante CG) y el contenido de triglicéridos con ECN42 determinado mediante HPLC se corresponden dentro de unos límites en el caso de los aceites puros. Las diferencias superiores a los valores establecidos en la Norma, respecto a cada tipo de aceite, indican que el aceite contiene aceite de semillas.

Material, reactivos y equipos

Reactivos

- Eter dietílico calidad P.A
- Hexano calidad CG
- Disolvente de elución para la purificación del aceite: hexano / éter dietílico 87/13 (v/v)
- Cartucho de gel de sílice (1g / 6 ml)
- Heptano calidad CG
- Hidróxido potásico solución metanólica ≈ 2 N, disolver $\approx 11,2$ g de KOH en 100 ml de metanol.
- Acetona calidad HPLC

- Acetonitrilo o Propionitrilo calidad HPLC.
- Fase móvil: 100% A : 40 ml de acetonitrilo + 60 ml de acetona

Patrones

- Trilinoleína (T9517 SIGMA)

Materiales

- Tubos de ensayo de 15 ml
- Jeringas desechables de 20 ml
- Agujas, grifos y adaptadores del aparato de elución al vacío.
- Tubos de vidrio de paredes gruesas con cierre hermético.
- Pipeta Pasteur.
- Pipeta automática de volumen variable (200-1000 μ l)
- Viales para cromatografía. de 2 ml.
- Matraces corazón 25 ml
- Jeringas de desechables de 5 ml
- Filtros 0.45 μ m
- Botellas de vidrio Pyrex de 1000ml

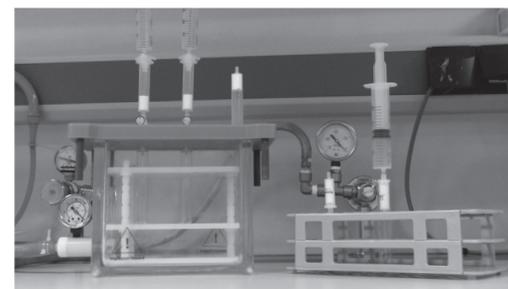


Figura 21: elución al vacío y elución manual

Instrumental

- Aparato de elución al vacío.
- Balanza analítica.
- Evaporador de rotación
- Agitador de tubos.
- Cromatógrafo de Gases con inyector automático y detector FID.
- Columna capilar Rtx-2330.(Restek)(10% ciano propilfenil polioxilano) 60 m, 0'25 mm de diámetro y 0'2 μ m de espesor de film.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con control termostático de la temperatura de la columna , sistema de inyección de volúmenes de 10 μ l. y detector: Índice de refracción

- Columna de acero inoxidable de 250 mm de longitud y 4.5 mm de diámetro interior, rellena de partículas de sílice de 5 µm de diámetro con un 22-23 % de carbono en forma de octadecilsilano. (Rp 18)

Nota: Si no se dispone de sistema de elución al vacío la operación puede realizarse manualmente con cartuchos de gel de sílice a los que se adaptan jeringas de plástico.

Procedimiento analítico

- Pesar aproximadamente 0,12 g de muestra en un tubo con tapa de rosca.
- Añadir 0.5 ml de hexano y agitar.
- Colocar las columnas en el aparato de elución al vacío (primero la aguja, luego la llave y la columna).
- Lavar la columna con 6 ml de hexano y desechar el hexano.
- Dejar de aplicar el vacío para evitar que se seque la columna.
- Introducir en la columna la solución de la muestra y aplicar de nuevo el vacío.
- Colocar en la columna el adaptador y la jeringa.
- Añadir 10 ml de eluyente (hexano/eter).
- Homogeneizar la totalidad de los eluidos y dividirlo en dos alícuotas similares, cada una se colocara en un matraz corazón de 25 ml.
- Evaporar en el rotavapor las dos alícuotas.
- A una de ellas se le añade 1 ml de heptano y se trasvasa a un tubo de metilación con ayuda de 1 ml de heptano, se agita para homogeneizar y se añade 0.2 ml de Hidróxido potásico metanólico, se agita durante 30 s y se deja reposar 30 min. Una vez separadas las dos fases se coge la de arriba y se pasa a un vial de cromatografía de 2 ml. La muestra esta lista para CG.
- A la otra se le añade 1 ml de acetona, se homogeneiza y se filtra por un filtro de 0.45 µm y se pasa a vial de 2 ml y queda lista para HPLC.

Análisis de los ácidos grasos por CG

- Realizar el análisis de la composición de ácidos grasos siguiendo el procedimiento descrito en el apartado correspondiente (2.2.1)

Análisis de los triglicéridos mediante HPLC

- Encender el equipo y comenzar a pasar la mezcla eluyente aumentando progresivamente el caudal hasta alcanzar el flujo de trabajo .
- Esperar hasta que se estabilice el detector y se consiga una línea base estable.
- Inyectar la muestra.

Nota: Para identificar los triglicéridos con ECN-42 se recomienda comenzar con la inyección del patrón de Trilinoleína. Para la puesta a punto de las condiciones cromatográficas se recomienda utilizar una muestra de aceite de girasol.

Cálculos y expresión de resultados

Se comparan el contenido teórico calculado a partir de la composición de ácidos grasos y el determinado por HPLC, que incluirá los picos correspondientes a los triglicéridos con ECN-42 (LLL+OLnL+PLnL).

Para realizar estos cálculos se emplea la hoja de calculo: "Computer program excel file", disponible en <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/224-testing-methods>.

Los ácidos grasos considerados para el cálculo son:

- Ácido palmítico (P)
- Ácido palmitoleico (Po)
- Ácido esteárico (S)
- Ácido oleico (O)
- Ácido linoleico (L)
- Ácido linoléico (Ln)

El resultado final se expresa con dos cifras decimales.

4.3 OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

Además de los métodos analíticos de control de calidad y genuinidad descritos en este cuaderno cabe reseñar otros métodos analíticos que son de interés ya que nos aportan una información importante sobre el grado de estabilidad de un aceite de oliva virgen de calidad.

Estos métodos son: estabilidad oxidativa, contenido en polifenoles totales y la determinación de biofenoles.

No se van a describir de forma exhaustiva estos métodos de análisis pero si que puede ser de interés conocer su fundamento y aplicación.

4.3.1 Determinación de la estabilidad oxidativa mediante Rancimat.

Principio del método: el Rancimat es un equipo que se basa en la detección conductimétrica de los productos de descomposición de las grasas, y permite la determinación automática del tiempo de estabilidad a la oxidación de aceites y grasas.

La degradación de las grasas y de los aceites origina el enranciamiento de los mismos. El término enranciamiento se aplica para describir el desarrollo de olores y sabores indeseables como consecuencia de determinados cambios en la fracción grasa de los alimentos.

La oxidación comienza con una fase de iniciación, lenta y sin manifestaciones externas medibles y después pasa a una fase rápida de propagación y finaliza en la descomposición en productos volátiles.

El procedimiento consiste en someter el aceite o grasa a condiciones extremas que inducen oxidación de forma rápida: elevadas temperaturas, y elevado caudal de aire. Las temperaturas habituales de medida son a 100°C, 110°C y 120°C. Siendo la más utilizada a 120°C y a un caudal de aire de 10 l/h.

Los gases liberados durante el proceso de oxidación, junto con el aire, circulan por un tubo que contiene agua desmineralizada o destilada y un electrodo para medir la conductividad. El electrodo está conectado a un aparato de medición y registro. Un incremento rápido de la conductividad indica el final del período de inducción, siendo la causa de este incremento acelerado la acumulación de ácidos grasos volátiles, producidos durante la oxidación. El rango habitual de trabajo a 120°C es de 0,0h-48,0h.

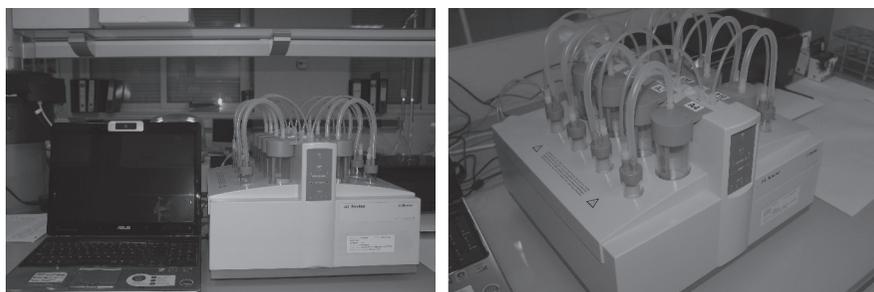


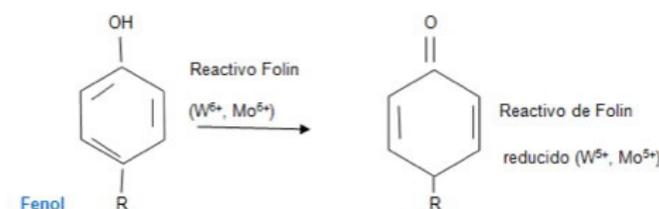
Figura 22. Equipo Rancimat para determinación de la estabilidad oxidativa

4.3.2 Determinación del contenido en polifenoles totales

Principio del método: los polifenoles son compuestos con propiedades antioxidantes gracias al bloqueo de radicales libres. Estos compuestos forman parte de la fracción polar de los aceites de oliva vírgenes, y hay evidencias de que la estabilidad de los aceites a la autooxidación es principalmente debida a los altos contenidos en estas sustancias, y particularmente a los ortodifenoles. Los compuestos fenólicos contribuyen también a la

astrogencia y sabores amargos de los aceites de oliva. La cantidad de polifenoles varía significativamente entre distintos aceites de oliva, dependiendo de la variedad y del estado de madurez de la aceituna, siendo la concentración más alta en el invierno.

La técnica para determinar los polifenoles en el aceite de oliva consiste en una extracción previa de los polifenoles contenidos en el aceite, con una mezcla metanol-agua y su posterior cuantificación a partir de una reacción colorimétrica. Se emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu que dará lugar a una coloración azul, debida a la reducción en medio alcalino de la mezcla de los ácidos fosfomolibdico y fosfowolframico por los compuestos fenólicos extraídos. La intensidad de esta coloración dependerá de la concentración de polifenoles en la disolución, y se determina mediante la medida de la absorbancia a 725 nm. Las absorbancias de las muestras deben estar dentro de la recta de calibrado, preparada a partir de ácido cafeico. La concentración de polifenoles se expresa en mg/kg de ácido cafeico



4.3.3 Determinación de Biofenoles de los aceites de oliva por HPLC

Principio del método: cuando un aceite se oxida se produce una pérdida significativa de polifenoles y un incremento de los productos de oxidación.

Los biofenoles del aceite de oliva virgen son un grupo de compuestos minoritarios pero que tienen importante actividad biológica. Están presentes en distintas cantidades según el tipo de aceite, pero mantienen un perfil característico y constante según la variedad, pero que desaparecen en el proceso de refinado.

La presencia de estructuras fenólicas y ortodifenólicas como el tirosol y el hidroxitirosol tiene una acción antioxidante natural como secuestrantes de radicales libres. La oleuropeína y el hidroxitirosol llegan a tener más capacidad antioxidante que la vitamina C. El hidroxitirosol juega un papel importante en el control de la oxidación de compuestos como el linoleato de metilo.

El procedimiento se basa en la extracción, mediante una solución metanólica, y la cuantificación de los componentes polares, de naturaleza biofenólica, como son los derivados naturales u oxidados de la oleuropeína y del ligustrósido, los lignanos, los flavonoides y los ácidos fenólicos presentes en el aceite de oliva.

La cuantificación se realiza mediante HPLC provisto de bomba ternaria, con detector de UV y DAD para el registro de espectros y su identificación. Se emplea una columna de 25 cm C18. El contenido en derivados naturales y/o oxidados de la oleuropeína y del ligustrósido, de los lignanos, de los flavonoides y de los ácidos fenólicos se determina a 280 nm, empleando ácido siríngico como patrón interno y el resultado se expresa en mg/kg de tirosol.



Figura 23: Cromatógrafo de líquidos (HPLC)

5. PARAMETROS DE CALIDAD DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO DE ACUERDO A LA NORMA ISO 17025.

La Norma ISO/IEC 17025 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración" hace referencia en su apartado 5.4 a los métodos de ensayo y su validación y en el apartado 5.9 establece el Aseguramiento de la calidad de los ensayos.

Estos dos apartados son de vital importancia en el momento de la puesta a punto de un método analítico y deben considerarse como prioritarios en la puesta en marcha de un laboratorio si se quiere integrar dentro de un sistema de gestión de calidad.

5.1 ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ENSAYO

El laboratorio debe utilizar métodos normalizados publicados como normas internacionales, nacionales o regionales y siempre en su última versión. La puesta a punto de un método analítico debe ser planificada, estableciendo a priori los requisitos que deben cumplirse y realizando una validación que permita garantizar que se cumplen los requisitos establecidos en la norma de referencia, (norma COI T20/Doc 42-2. "Valores de precisión de los métodos adoptados por el COI).

Con carácter general la validación debe incluir :

– Estudio de la precisión del método: repetibilidad y reproducibilidad:

Para realizar este estudio se efectuarán análisis sucesivos en condiciones de repetibilidad (misma muestra, mismo analista, mismo día), y análisis sucesivos en condiciones de reproducibilidad (misma muestra, analistas distintos, días distintos). El estudio debe abarcar todo el rango de trabajo establecido, por lo que deben emplearse muestras representativas de estos rangos.

La evaluación estadística de los resultados de estos ensayos (media , desviación estandar y coeficiente de variación) nos permite obtener valores de r y R , calculados como $2\sqrt{2} sr$ y

$2\sqrt{2} sR$. Los valores de r y R obtenidos deben ser coherentes con los establecidos en la Norma.

– Estudio de la exactitud:

Para realizar este estudio deben emplearse materiales de referencia, es decir muestras que tienen un valor y una incertidumbre asignados. La exactitud se calculará a partir de la fórmula

$$E = \frac{V_{Ri} - \bar{X}_i}{V_{ri}} \cdot 100$$

donde:

V_{Ri} = Valor de referencia de la muestra

\bar{X} = Valor medio de la muestra analizada en el laboratorio

Verificando previamente que se cumple

$$\frac{|V_{Ri} - \bar{X}_i|}{U_{vri}^2 + \left(\frac{t \cdot S_i}{\sqrt{n}} \right)^2} \leq 1$$

donde: U_{vri} = incertidumbre del valor de referencia

t = t de Student para n_R medidas con $\alpha = 0.05$

– Cálculo de límite de detección y cuantificación:

Con carácter general el límite de detección y cuantificación puede realizarse a partir del análisis en condiciones de repetibilidad de un blanco.

El límite de cuantificación se calculara como:

$$L.C. = \text{valor medio} + 10 \cdot S_r$$

La validación de todo método analítico concluye con el cálculo de la incertidumbre expandida que aunque normalmente se calcula y establece como porcentaje del valor analítico obtenido, que para un mismo método de ensayo suele ser diferente en función del rango de trabajo. En un informe de ensayo la incertidumbre de una determinación se expresa como valor absoluto, es decir como el valor que corresponde al resultado obtenido.

Normalmente la incertidumbre de los ensayos solo se incluye en los "Informes de ensayo" a petición explícita del cliente.

5.2 CONTROL DE CALIDAD DE UN MÉTODO DE ENSAYO

El laboratorio debe establecer un "plan de control de calidad de los ensayos" con objeto de garantizar la validez de los mismos.

Este "plan de control de la calidad" debe incluir las operaciones de control de calidad interno y control de calidad externo.

El control de calidad interno debe incluir:

- Análisis de muestras por duplicado en condiciones de repetibilidad
- Análisis de muestras en condiciones de reproducibilidad.
- Análisis de materiales de referencia (o muestras control cuando no se disponga de ellos)

El control de calidad externo hace referencia a la participación en ensayos de inter-comparación de forma programada y periódica.

Todos los resultados obtenidos en los distintos ensayos de control de calidad deben ser recogidos y evaluados, con objeto de poder aplicar tratamientos estadísticos adecuados, que nos permitirán evaluar si se cumplen los criterios y tolerancias establecidas y si existen "tendencias".

Los criterios de evaluación de los diferentes controles de calidad así como las tolerancias establecidas deben quedar descritos en este "plan de control de calidad de los ensayos" y deben ser coherentes con los resultados obtenidos en la validación de cada ensayo.

El objetivo final del control de calidad no es otro que evitar la emisión de resultados incorrectos.

6. DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- Norma COI/ T20/ Doc n°34 Nov-2015: "Determination of free fatty acids, cold method".
- Norma COI/ T20/ Doc n°33 Feb-2015 " Determination of fatty acid methyl esters by gas chromatography
- Norma COI/ T20/ Doc n°26 Feb-2015 "Determination of aliphatic and triterpenic alcohols content by capillary gas chromatography
- Norma COI/ T20/ Doc n°29 Nov-2009 " Determinación de los biofenoles de los aceites de oliva mediante HPLC"
- Norma COI/ T20/ Doc n°28- 2010 "Determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography"
- Norma COI/ T20/ Doc n°20- 2010 "Determination of the difference between actual and theoretical content of triacylglycerols with ECN 42".
- Norma COI/ T20/ Doc n°30 Nov-2013 "Determination of the composition and content of sterols and triterpene dialcohols by capillary column gas chromatography"
- Norma COI/ T20/ Doc n°11- 2001 "Determinación de los estigmastadienos en los aceites vegetales"
- Norma COI/ T20/ Doc n°19 Feb-2015 " Spectrophotometric investigation in the ultraviolet"
- Norma COI/ T15/ NC n°3 Mayo-2013 "Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva"
- Norma COI/ T20/ Doc n°42-2 Sep-2007 "Precision values of the methods of analysis adopted by the International Olive Council"
- REGLAMENTO (CEE) N o 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. (Texto consolidado)
- REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) N o 1348/2013 DE LA COMISIÓN de 16 de diciembre de 2013 que modifica el Reglamento (CEE) n o 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.
- Norma COI/ T20/ Doc n°14 Mayo-2013"Sensory analysis of olive oil standard guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil taster
- Norma COI/ T20/ Doc n°15 Nov-2015 " Sensory analysis of olive oil method for the organoleptic assessment of virgin olive oil"
- Graciani, E. "Los aceites y grasas: composición y propiedades" (Ed. Mundiprensa)
- Barranco, D.; Fernanadez-Escobar, R.; Rallo, L. 2008. 'El cultivo del olivo'. (Ed. MundiPrensa.)
- Cert, A.; Alba, J.; Pérez-Canimo, M.C.; Ruiz-Gómez, A.; Hidalgo, F.; Moreda, W.; Moyano, M.J.; Martinez, F.; Tubaileh, R.; Olías, J.M. 1999. 'Influencia de los sistemas de extracción sobre las características y los componentes menores del aceite de oliva virgen extra". Ciencia y técnica, 79: 41-50.
- Di Vaio, C.; Nocerino, S.; Paduano, A.; Sacchi, R. 2013. 'Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition". Journal of the Science of Food and Agriculture, 93: 1134–1139.
- Humanes, J. 1992. 'Producción de aceite de oliva de calidad. Influencia del cultivo". Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Serie Apuntes. 21/92.

PROYECTO **MEJORA DE LAS ECONOMÍAS
REGIONALES Y DESARROLLO LOCAL**

—
TÉCNICAS Y PRÁCTICAS
**DE LABORATORIO PARA
EL ANÁLISIS DE ACEITE
DE OLIVA VIRGEN**



INTI



Unión Europea

Instituto Nacional de Tecnología Industrial
Gerencia de Cooperación Económica e Institucional
Avenida General Paz 5445 - Edificio 2 oficina 212
Teléfono (54 11) 4724 6253 | 6490
Fax (54 11) 4752 5919
www.ue-inti.gob.ar



Ministerio de Producción
Presidencia de la Nación