

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 1**

**LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES.  
REQUISITOS RELATIVOS A LA ESTRUCTURA. REQUISITOS DEL PROCESO.  
REQUISITOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025**

- 1.1. INTRODUCCIÓN
- 1.2. ESTRUCTURACIÓN DE LA NORMA
- 1.3. EVOLUCIÓN DE LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025
- 1.4. NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025. VERSIÓN 2017

### **2. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES**

- 2.1. ORGANIZACIÓN DE LA NORMA
- 2.2. REQUISITOS GENERALES DE LA NORMA

### **3. REQUISITOS RELATIVOS A LA ESTRUCTURA**

### **4. REQUISITOS DEL PROCESO**

- 4.1. REVISIÓN DE SOLICITUDES, OFERTAS Y CONTRATOS
- 4.2. SELECCIÓN, VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS
- 4.4. MUESTREO
- 4.4. MANIPULACIÓN DE LOS ÍTEMS DE ENSAYO O CALIBRACIÓN
- 4.5. REGISTROS TÉCNICOS
- 4.6. EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN
- 4.7. ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS
- 4.8. INFORME DE RESULTADOS
- 4.9. QUEJAS
- 4.10. TRABAJO NO CONFORME
- 4.11. CONTROL DE LOS DATOS Y GESTIÓN DE LA INFORMACIÓN

### **5. REQUISITOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN**

- 5.1. OPCIONES
- 5.2. DOCUMENTACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN
- 5.3. CONTROL DE DOCUMENTOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN
- 5.5. CONTROL DE REGISTROS
- 5.5. ACCIONES PARA ABORDAR RIESGOS Y OPORTUNIDADES

5.6. MEJORA

5.7. ACCIONES CORRECTIVAS

5.8. AUDITORÍAS INTERNAS

5.9. REVISIONES POR LA DIRECCIÓN

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025.**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 es una norma internacional desarrollada por un comité de expertos en la que se establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración para que su competencia técnica sea evaluada por parte de un organismo de acreditación, en el caso de España, por ENAC.

Fue publicada por la Organización Internacional de Normalización (ISO) en 1999, con el objetivo principal de crear una norma que armonizase los criterios de calidad para el adecuado funcionamiento de los laboratorios. Se revisó posteriormente en 2005 y en 2017.

Se trata de una norma de calidad cuyo objetivo es dar respuesta a este concepto en el ámbito de los laboratorios de ensayo y calibración. Asumiendo que éstos son capaces de cumplir con unas especificaciones previas y que garantizan que los resultados de los ensayos son correctos, son comparables con los resultados de otros laboratorios y que la implantación de esta norma genera la implantación de un Sistema de Calidad aplicable a todas las áreas implicadas directa o indirectamente en la obtención de estos resultados.

### **1.2. ESTRUCTURACIÓN DE LA NORMA**

ISO (Organización Internacional de Normalización) e IEC (Comisión Electrotécnica Internacional) forman el sistema especializado para la normalización mundial. Los organismos nacionales miembros de ISO e IEC participan en el desarrollo de las Normas Internacionales por medio de comités técnicos establecidos por la organización respectiva, para atender campos particulares de la actividad técnica. En el campo de la evaluación de la conformidad, el Comité de ISO para la evaluación de la conformidad (CASCO) es responsable del desarrollo de Normas y Guías Internacionales.

Los Proyectos de Normas Internacionales se envían a los organismos miembros para su votación. La publicación como Norma Internacional requiere la aprobación por al menos el 75% de los organismos nacionales con derecho a voto.

Las normas EN (Normas Europeas) y las normas UNE (Una Norma Española) pueden ser documentos meramente europeos o nacionales, o también pueden ser fruto de la adopción de textos internacionales o europeos (sólo en el segundo caso).

### **1.3. EVOLUCIÓN DE LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025**

La primera edición (1999) fue producto de la amplia experiencia adquirida en la implementación de la Guía ISO/IEC 25 y de la Norma EN 45001, a las que reemplazó.

La primera norma de amplia difusión sobre los requisitos de competencia técnica para la realización de ensayos data del año 1978 y se trata de la primera edición de la Guía ISO/IEC 25. Posteriormente se editaron nuevas versiones de la Guía en los años 1982 y 1990, en las que se actualizaban y completaban algunos requisitos, ampliando su campo de aplicación a los laboratorios de calibración.

El grupo de Guías ISO/CEI referentes a competencia técnica y requisitos de calidad para la realización de ensayos fueron tomadas por la Comisión Europea como base para la preparación de la norma europea EN 45001:1989 “Criterios generales para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo”. Esta Norma europea ha sido la Norma de referencia para los laboratorios del ámbito de la UE y la base para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración por parte de las Entidades de Acreditación integradas en la actual EA (European Accreditation).

Por tanto, hasta final del año 1999 han existido dos normas internacionales sobre competencia técnica relativa a los laboratorios de ensayo y calibración, la Guía ISO/CEI y la Norma EN 45001, ambas muy similares en su contenido. En 1999 se publica la primera versión de la norma 17025, que contiene todos los requisitos que tienen que cumplir los laboratorios de ensayo y de calibración si desean demostrar que poseen un sistema de gestión, son técnicamente competentes y son capaces de generar resultados técnicamente válidos.

La primera edición hacía referencia a las Normas ISO 9001:1994 e ISO 9002:1994. Dichas normas han sido reemplazadas por la Norma ISO 9001:2000, lo que hizo necesario alinear la Norma ISO/IEC 17025, publicando su segunda versión en 2005. Los objetivos perseguidos fueron la consecución de una Norma única de ámbito internacional, unificada con la 9001.

La segunda versión de la norma incorpora todos los requisitos de las ISO 9001 de 2000, junto con los requisitos técnicos necesarios para asegurar la competencia técnica de los laboratorios. Esto implica, que un laboratorio que cumpla los requisitos de la Norma ISO 17025 cumple los requisitos de las Normas ISO 9001. La relación no es recíproca, dado que un laboratorio que cumpla con la ISO 9001 no demuestra, por esta única vía, la competencia técnica para producir datos y resultados técnicamente válidos.

La tercera y actual versión de la norma (2017) ha sufrido algunos cambios, los cuales se han centrado principalmente en la adaptación de su estructura y clasificación al de todas las normas de sistemas de gestión, siguiendo una uniformidad en cuanto a textos, terminología y definiciones. Se ha establecido un pensamiento basado en el riesgo y una mayor flexibilidad respecto a la edición anterior en los requisitos de procesos, procedimientos, información documentada y responsabilidades organizacionales.

#### **1.4. NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025. VERSIÓN 2017.**

La Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 desarrollada por ISO/IEC y adoptada por CEN/CENELEC y por tanto, automáticamente, por UNE se encuentra en la versión de noviembre de 2017. Según el Reglamento (UE) 2017/625 los laboratorios oficiales, laboratorios Nacionales de Referencia o laboratorios Europeos de referencia deberán funcionar de acuerdo con la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 y deberán estar acreditados de acuerdo con dicha norma por un organismo nacional de acreditación que funcione de conformidad con el Reglamento 765/2008.

Los laboratorios de ensayo y calibración con sistemas de calidad basados en la norma ISO/IEC 17025 pretenden demostrar:

- Que operan un sistema de gestión de la calidad eficaz y en mejora continua.

- Que son técnicamente competentes y demuestran competencia técnica del personal, instalaciones y condiciones ambientales adecuadas, métodos validados, equipos y patrones fiables con trazabilidad.
- Que son capaces de obtener resultados de ensayo o calibración de confianza, implementan programas de aseguramiento de la calidad de sus resultados y generan resultados técnicamente válidos.

La norma ISO/IEC 17025 es aplicable a cualquier tipo de laboratorio de ensayo o calibración, independiente de su tamaño o actividad; y se integra por una serie de requisitos agrupados en diferentes secciones. En esta última versión, existen requisitos generales, relativos a la estructura, relativos a los recursos, requisitos de proceso y requisitos del sistema de gestión. Requisitos que deben cumplirse por aquellos laboratorios que quieran acreditarse bajo esta norma.

## **2. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES**

La norma UN-EN ISO/IEC 17025:2017 se ha desarrollado con el objetivo de promover la confianza en los laboratorios. Contiene requisitos que permiten a los laboratorios demostrar que operan de forma competente y que tienen la capacidad de generar resultados válidos. Como ya se ha comentado, los laboratorios que cumplen con este documento también operarán en general de acuerdo con los principios de la Norma ISO 9001.

Se requiere que el laboratorio planifique e implemente acciones para abordar los riesgos y las oportunidades y así incrementar la eficacia del sistema de gestión, lograr mejores resultados y prevenir efectos negativos. El laboratorio es responsable de decidir qué riesgos y oportunidades es necesario abordar.

El uso de este documento y la acreditación bajo esta norma facilitará la cooperación entre los laboratorios y otros organismos, y ayudará al intercambio de información y experiencia, así como también a la armonización de normas y procedimientos. La aceptación de resultados entre países se facilita si los laboratorios cumplen con el presente documento.

La norma establece los requisitos generales para la competencia, la imparcialidad y la operación coherente de los laboratorios. Es aplicable a todas las organizaciones que desarrollan actividades de laboratorio, independientemente de la cantidad de personal. Los clientes del laboratorio, las autoridades reglamentarias, las organizaciones y los esquemas utilizados en evaluación, los organismos de acreditación y otros utilizan este documento para confirmar o reconocer la competencia de los laboratorios.

### **2.1. ORGANIZACIÓN DE LA NORMA**

La norma 17025 en su versión de 2017 se organiza en diferentes apartados. En los primeros, se establece la introducción, objeto y campo de aplicación de la norma, diferentes referencias normativas y algunos términos y definiciones necesarios para su mejor entendimiento.

Como apartados principales, podemos destacar cuatro ya comentados. Los requisitos generales, requisitos relativos a la estructura, requisitos relativos a los recursos, requisitos del proceso y requisitos del sistema de gestión.

En cuanto a los requisitos generales, se establece la importancia de la imparcialidad y de la confidencialidad. En cuanto a los requisitos relativos a la estructura, hace referencia a la importancia de la necesidad de responsabilidad en todos los niveles del laboratorio. Los requisitos relativos a los recursos hacen referencia, entre otros, al personal, instalaciones, equipos, trazabilidad metrológica o productos y servicios externos. Los requisitos del proceso se refieren a la revisión de solicitudes, selección del método de ensayo y su validación, el muestreo y manipulación de las muestras, evaluación de la incertidumbre o el aseguramiento de la validez de los resultados, así como el informe de resultados, las quejas o los trabajos no conformes.

El apartado de requisitos del sistema de gestión establece la intención del laboratorio de establecer, documentar, implementar y mantener un sistema de gestión que sea capaz de apoyar y demostrar el logro coherente de los requisitos de la norma y asegurar la calidad de los resultados.

## **2.2. REQUISITOS GENERALES DE LA NORMA**

Como se ha comentado, la norma, en su apartado cuatro hace referencia a la imparcialidad, y a la confidencialidad.

La imparcialidad, entendida como objetividad, debe estar presente en cualquiera de las actividades del laboratorio, en la dirección de éste y en las relaciones comerciales y financieras que puedan establecerse. El laboratorio es responsable de identificar cuáles son los riesgos que puedan afectar a esta imparcialidad, desde las actividades, relaciones o personal, y además debe tener capacidad de hacer frente a dicho riesgo.

También se hace referencia a la confidencialidad de las actividades de dicho laboratorio, ya que toda la información obtenida o creada en el laboratorio es responsabilidad del propio laboratorio, habiendo informado previamente, sobre qué información será de carácter público. Si por algún motivo legal, el laboratorio fuera requerido para informar sobre información confidencial, se debe informar también al cliente. Igualmente, cualquier tipo de información, obtenida por fuentes diferentes al cliente, también cumplirá con el principio de confidencialidad. Si alguna persona o entidad actuase en nombre del laboratorio, también cumplirá confidencialidad.

Dentro de los diferentes laboratorios, estos requisitos se aplican mediante la firma de documentos que incluyan declaraciones de imparcialidad y/o confidencialidad. En algunos puestos de trabajo, la descripción del propio puesto, ya lleva intrínsecamente asociado el cumplimiento de estos principios. Cualquier situación de incumplimiento de estos requisitos deberá ser notificada a la dirección del laboratorio.

## **3. REQUISITOS RELATIVOS A LA ESTRUCTURA**

En el punto 5 de la norma, se establece la necesidad de que el Laboratorio debe ser una entidad legal, indicando de quién es la responsabilidad general y estableciendo cuáles son las actividades de dicho laboratorio, así como su alcance y siempre cumpliendo los requisitos establecidos en la norma de calidad UNE-EN ISO/IEC 17025.

El laboratorio debe contar con personal y recursos para desarrollar su actividad, estableciendo responsables sobre distintas tareas como pueden ser la implementación, mantenimiento y mejora del sistema de gestión, la identificación de mejoras o el desarrollo de acciones para prevenir o minimizar desviaciones. Además, la dirección general debe controlar que se llevan a cabo estas actividades, que la comunicación es eficaz y que se implementa el sistema de gestión, manteniendo su integridad cuando se realice algún cambio.

Para cumplir este punto de la norma, los laboratorios cuentan con un coordinador técnico y/o director sobre los que recae la responsabilidad global del laboratorio. Además, cuentan con un departamento de Garantía de Calidad, que asume la responsabilidad directa de coordinar la implementación de los diferentes puntos de la norma de calidad, apoyada por los Jefes de Departamento, los cuales son responsables directos sobre aquello que ocurre en cada departamento, apoyados siempre de todo el personal. Además, para el correcto funcionamiento del Laboratorio, se dispone de un listado de sustituciones, de forma que las responsabilidades del laboratorio queden cubiertas en todo momento.

Además, el laboratorio para poder llevar a cabo el cumplimiento de este punto, pueden contar con diferente documentación que ayuda a su cumplimiento, como puede ser, entre otros:

-Política de Calidad. Declaración que establece el compromiso del laboratorio del cumplimiento de diferentes objetivos y formas de trabajo, asumiendo por tanto el cumplimiento de los diferentes puntos de la norma de calidad 17025.

-Manual de Calidad. Documento de carácter general que resume los compromisos del Laboratorio en materia de calidad para el cumplimiento de diferentes aspectos de la norma y de la política de calidad, cumpliendo por tanto, los requisitos especificados en el Reglamento 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales.

-Procedimientos Normalizados de Trabajo. Documentos escritos que describen la secuencia específica de operaciones y métodos que deben aplicarse en el laboratorio para una finalidad determinada.

#### **4. REQUISITOS DEL PROCESO**

El punto 7 de la norma habla sobre los requisitos del proceso, dividiendo estos en 11 puntos.

##### **4.1. REVISIÓN DE SOLICITUDES, OFERTAS Y CONTRATOS**

El laboratorio debe establecer procedimientos para la revisión de solicitudes, ofertas y contratos con los clientes, para asegurar que los requisitos están definidos, son revisados y entendidos por ambas partes, se dispone de los recursos necesarios para poder llevarlo a cabo y los métodos son adecuados.

Si por algún motivo se utilizaran proveedores externos, el cliente deberá ser informado y se necesitará la aprobación de éste. También se informará al cliente en el caso de que el laboratorio considere que el método solicitado no es el adecuado.

Cualquier desviación o diferencia que exista entre la solicitud y el contrato deberá solventarse antes de llevar a cabo las actividades por parte del laboratorio, habiendo informado

previamente al cliente y habiendo recibido su confirmación, de tal forma que queden establecidos todos los aspectos necesarios para llevar a cabo correctamente todas las actividades solicitadas.

#### **4.2. SELECCIÓN, VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS**

Se deben aplicar métodos y procedimientos apropiados para todas las actividades del laboratorio, incluso la incertidumbre cuando sea necesario. Éstos deberán estar periódicamente actualizados y ser disponibles para todo el personal, asegurándose siempre que se trata de la última versión.

Si el cliente no lo detalla, el laboratorio selecciona el método que considere más apropiado, informando siempre al cliente. Todos los métodos han sido previamente verificados.

Según la norma, el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificado de otra forma. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación. Cualquier cambio que se produzca sobre un método, debe ser analizado para ver la influencia de su alcance, y si se requiere, realizar una nueva validación.

Los registros deben ser conservados ya que en ellos se detalla el procedimiento utilizado, la especificación de requisitos, las características, los resultados obtenidos y la declaración de validez del método.

Para ello, es importante que el laboratorio desarrolle una metodología a seguir que sea similar en todas las situaciones sobre cómo proceder ante la solicitud de un ensayo por parte de un cliente, y además, la sistemática a seguir en caso de necesidad de validar o verificar un método de ensayo nuevo.

#### **4.3. MUESTREO**

En caso de que se realice el muestreo, se debe tener un plan y método de muestreo, de tal forma que se asegure la validez de los resultados.

#### **4.4. MANIPULACIÓN DE LOS ÍTEMS DE ENSAYO O CALIBRACIÓN**

Se debe disponer de un procedimiento para el transporte, recepción, manipulación, identificación, protección, almacenamiento, distribución, conservación y disposición o devolución de los ítems de ensayo y calibración.

Una vez que han llegado al laboratorio, se debe disponer de un sistema inequívoco de identificación de los objetos de ensayo y calibración. La identificación debe permanecer mientras el objeto de ensayo se encuentre en el laboratorio, debe ser inequívoca, de tal forma que nunca se confundan objetos ni tanto físicamente como cuando se haga referencia a ellos en registros u otros documentos. Se deberán almacenar y conservar en las condiciones requeridas.

A su llegada también se debe comprobar la idoneidad de la muestra mediante inspección visual, comprobar la apertura del embalaje, comprobar que la muestra va acompañada de

la solicitud de análisis, si la codificación de la muestra es correcta y además, en función de los análisis que se vayan a realizar, comprobar que la cantidad de muestra es suficiente. También se debe disponer de un registro en el que quede reflejado cualquier tipo de anomalía o desviación sobre el estado del ítem.

#### **4.5. REGISTROS TÉCNICOS**

Se debe asegurar que los registros técnicos deben tener la información suficiente para facilitar la identificación de factores que afectan al resultado de la medición. El laboratorio debe disponer de una sistemática que garantice la conservación adecuada de toda la información obtenida al llevar a cabo el análisis y que sea suficiente para la reconstrucción de los ensayos.

También se debe disponer de una sistemática que indique cuál es la información que debe aparecer en un boletín de ensayo.

#### **4.6. EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN**

El laboratorio debe identificar las diferentes contribuciones a la incertidumbre, incluidas las calibraciones. Si la evaluación de ésta no puede llevarse a cabo con rigurosidad, se debe hacer una estimación de la incertidumbre. El laboratorio deberá disponer de una sistemática general que indique cómo se debe proceder para calcular las incertidumbres de los métodos de ensayo y calibración.

#### **4.7. ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS**

El laboratorio dispondrá de un procedimiento de control de calidad para realizar seguimiento de la validez de los resultados. La norma 17025 establece que este seguimiento debe incluir, aunque no limitarse al uso de materiales de referencia certificados y controles internos, uso de instrumentos alternativos calibrados, comparaciones interlaboratorios o ensayos de aptitud, repetición de ensayos o calibraciones, revisión de resultados informados, ensayos de muestras ciegas, etc.

Los resultados obtenidos deberán registrarse y evaluarse, y a través de un análisis de los mismos a lo largo del tiempo, pueden detectarse tendencias, para ello en la medida de lo posible se emplearán técnicas estadísticas.

Para ello, se debe disponer de un procedimiento que describa la sistemática que se lleva a cabo. Este procedimiento debe indicar las operaciones de aseguramiento de la validez de los resultados externas e internas que se vayan a realizar, su programación en el tiempo, los criterios de evaluación de estas actividades, e indicar cómo proceder en caso de su incumplimiento.

#### **4.8. INFORME DE RESULTADOS**

Los resultados se deben revisar y autorizar previamente antes de su liberación, de tal forma que la información dada sea exacta, clara, inequívoca y objetiva, usualmente en un informe. El informe de resultados debe contener toda la información necesaria para que el cliente pueda hacer una correcta interpretación de los resultados.

Se indicarán los siguientes aspectos: la identificación inequívoca del informe con los datos del laboratorio, la información del cliente, los datos de la muestra suministrados por el cliente, la descripción de la muestra por parte del laboratorio, las fechas de inicio y finalización del análisis, la identificación del método de ensayo, los resultados en las unidades correspondientes, los decimales adecuados, la incertidumbre en caso necesario, y la declaración de que el análisis sólo da fe de la muestra recibida.

#### **4.9. QUEJAS**

Se trata de una reclamación presentada por una persona u organización relacionada con las actividades o resultados del laboratorio, para la cual se espera una respuesta.

Se debe tener un proceso documentado para recibir, evaluar y tomar decisiones sobre las quejas, de tal forma que se asegure el correcto recibimiento de éstas y su correcto tratamiento, que garantice su resolución.

#### **4.10. TRABAJO NO CONFORME**

El trabajo no conforme es cualquier incidencia o desviación de los requisitos especificados en el sistema de gestión de calidad o de los requisitos establecidos por el cliente. Este puede ser puntual, sin afectar a análisis previos, ni cuestionar la sistemática del laboratorio, o repetitivo, afectando a elementos previos y cuestionando la capacidad del laboratorio.

El Laboratorio debe desarrollar un procedimiento para detectar, tratar y resolver las incidencias que incluya, responsables, acciones, evaluación de la importancia, notificación al cliente, anulación y reanudación del trabajo en el caso que sea necesario.

#### **4.11. CONTROL DE LOS DATOS Y GESTIÓN DE LA INFORMACIÓN**

Se debe asegurar la correcta gestión de la información tanto informática como no informática del laboratorio. El acceso a ésta debe ser posible, pero siempre de forma controlada y protegida frente a personal no autorizado, de tal forma que se asegure la integridad de la información.

### **5. REQUISITOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN**

#### **5.1. OPCIONES**

El laboratorio debe establecer, documentar, implementar y mantener un sistema de gestión que sea capaz de apoyar y demostrar el logro coherente con los requisitos. Un sistema de gestión incluye el tratamiento de documentación, control de documentos y registros, acciones para abordar riesgos y oportunidades, mejora, acciones correctivas, auditorías internas y revisiones por la dirección.

La propia norma establece dos opciones, aunque siempre, el sistema de gestión debe incluir, la documentación del sistema de gestión, el control de sus documentos y registros, las acciones para abordar riesgos y oportunidades, la mejora, las acciones correctivas, las auditorías internas y las revisiones por la dirección.

Un laboratorio que ha establecido y mantiene un sistema de gestión de acuerdo con los requisitos de la Norma ISO 9001, también cumple con algunos de los requisitos anteriormente mencionados, por lo tanto ya los tiene incluidos en su sistema de gestión.

## **5.2. DOCUMENTACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN**

Desde la dirección, se debe establecer, documentar y mantener políticas y objetivos que demuestren el cumplimiento de los requisitos de la Norma, que evidencien la competencia, imparcialidad y la operación coherente del laboratorio.

Todo el personal involucrado debe tener accesos a las partes de la documentación del sistema de gestión y a la información relacionada que sea aplicable a sus responsabilidades.

Para ello, el laboratorio cuenta con el Manual de Calidad y Procedimientos Normalizados de Trabajo sobre las diferentes actividades que se llevan a cabo que garanticen que el laboratorio trabaja bajo los requisitos de la norma 17025.

## **5.3. CONTROL DE DOCUMENTOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN**

El laboratorio debe controlar los documentos (internos y externos) relacionados con el cumplimiento de la norma. Los documentos deben estar aprobados por personal autorizado, revisados periódicamente, los cambios realizados de una versión a otra debidamente identificados, versiones vigentes disponibles y una correcta identificación de la documentación obsoleta.

Para ello el laboratorio cuenta con un listado de todos los procedimientos que están en vigor, estando únicamente accesibles las versiones en vigor, y las antiguas controladas. Cuenta también con un procedimiento para la realización y aceptación de los cambios en los procedimientos, o con un control sobre las copias de trabajo.

## **5.4. CONTROL DE REGISTROS**

Se deben establecer y conservar registros legibles para demostrar el cumplimiento de los requisitos de la norma. Se deben implementar los controles necesarios para la identificación, almacenamiento, protección (hojas Excel protegidas), copia de seguridad (en un disco externo con una frecuencia determinada), archivo, recuperación, tiempo de conservación y disposición de sus registros.

## **5.5. ACCIONES PARA ABORDAR RIESGOS Y OPORTUNIDADES**

Se debe llevar a cabo una consideración de los riesgos y oportunidades asociados con las actividades del laboratorio con el objetivo de asegurar que el sistema de gestión consiga sus objetivos y los objetivos del laboratorio. Así mismo, se deben planificar las acciones para abordar riesgos y oportunidades de tal forma que tengan un impacto positivo sobre la validez de los resultados del laboratorio.

## **5.6. MEJORA**

El laboratorio debe identificar y seleccionar oportunidades de mejora e implementar cualquier acción necesaria. Una de las vías más eficaces para ello es la comunicación con los clientes, buscando una retroalimentación, tanto positiva como negativa.

## **5.7. ACCIONES CORRECTIVAS**

Si hay una no conformidad, el laboratorio debe reaccionar ante ella (acciones para controlarlas y corregirlas), evaluarla (causas, consecuencias y extensión) e implementar las acciones necesarias. Las acciones correctivas deben ser apropiadas a los efectos de las no conformidades y se debe evaluar su eficacia.

## **5.8. AUDITORÍAS INTERNAS**

Las auditorías internas se deben llevar a cabo en intervalos planificados para obtener información sobre si el sistema es conforme con los requisitos del propio laboratorio y de la norma

El laboratorio debe establecer un procedimiento que defina la sistemática establecida para realizar las auditorías internas del sistema de gestión de calidad implantado, para verificar el cumplimiento y la eficacia de las actividades definidas en dicho sistema o detectar las desviaciones y establecer las acciones correctivas necesarias para subsanarlas.

## **5.9. REVISIONES POR LA DIRECCIÓN**

La dirección debe revisar su sistema de gestión a intervalos planificados, con el fin de asegurar su conveniencia, adecuación y eficacia, incluidas las políticas y objetivos establecidos relacionados con el cumplimiento de la norma.

Las revisiones por la dirección se deben registrar y deben incluir los cambios, cumplimiento de objetivos, adecuación de políticas y procedimientos, estados de las acciones de revisión, correctivas, las quejas, eficacias de las mejoras, ...

También deben registrarse todas las decisiones y acciones tomadas tras la revisión.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Norma UNE-EN ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Diciembre 2017.
- Curso Sistemas de Calidad en Laboratorios de Ensayo y Calibración. Fundación para el conocimiento madri+d. Abril 2017.
- <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v1:es>
- REGLAMENTO (UE) 2017/625 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO
- <https://www.enac.es/>
- Procedimiento de Acreditación PAC-ENAC Rev. 5. ENAC.
- No conformidades y toma de decisión NO-11 Rev. 9. ENAC.
- Criterios para la utilización de la marca ENAC o referencia a la condición de acreditado CEA-ENAC-01 Rev.22. ENAC.
- Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 CGA-ENAC-LEC Rev. 10. ENAC.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 2**

**EL SISTEMA DE GESTIÓN MEDIOAMBIENTAL.  
NORMA INTERNACIONAL UNE-EN-ISO-14001.  
PRINCIPIOS APLICABLES EN EL LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

- 1. INTRODUCCIÓN AL SISTEMA DE GESTIÓN AMBIENTAL**
  - 1.1. ASPECTOS AMBIENTALES Y SUS ASOCIADOS IMPACTOS AMBIENTALES**
  
- 2. LA NORMA INTERNACIONAL ISO-14001 : 2015, PRINCIPIOS Y ESTRUCTURA**
  - 2.1. INTRODUCCIÓN,**
  - 2.2. PRINCIPIOS**
  - 2.3. ESTRUCTURA DE LA NORMA**
    - 0. INTRODUCCIÓN**
    - 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN**
    - 2. REFERENCIAS NORMATIVAS**
    - 3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES**
    - 4. CONTEXTO DE LA ORGANIZACIÓN**
    - 5. LIDERAZGO**
    - 6 PLANIFICACIÓN**
    - 7. APOYO (o SOPORTE)**
    - 8. OPERACIÓN (o FUNCINAMIENTO)**
    - 9. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO**
    - 10. MEJORA**
  
- 3. PRINCIPIOS APLICABLES A LABORATORIO**
  
- 4. BIBLIOGRAFIA**

## 1. INTRODUCCIÓN AL SISTEMA DE GESTIÓN AMBIENTAL (SGA)

En los últimos años, (a partir de finales del siglo pasado) la preocupación por el cuidado del medio ambiente (MA) se ha hecho más evidente para todos, y se empieza a movilizarse para tomar medidas, con el agravamiento de varios problemas.

- CALENTAMIENTO GLOBAL (con emisiones de CO<sub>2</sub>, con el agotamiento de recursos)
- CAMBIO CLIMÁTICO
- Y OTROS PROBLEMAS DE CONTAMINACIÓN (consumos de energía, evolución Industrial/social)

Se ha convertido en un interés a nivel mundial. Y con esa mentalización se ha entendido que las organizaciones pueden contribuir de una manera muy directa en el cuidado ambiental y en la resolución de dichos problemas.

Con el surgimiento de patrones de comportamiento como de La ECONOMÍA CIRCULAR es un modelo de producción y consumo que implica compartir, reutilizar, reparar y reciclar materiales y productos todas las veces que sea posible para crear un valor añadido. De esta forma, el ciclo de vida de los productos se extiende.

Todas las organizaciones producen efectos sobre el medio en todas sus actividades, al tomar recursos de este y depositar en él sustancias de desecho, las cuales se incorporan a la atmósfera, al agua superficial subterránea y al suelo.

El conocimiento de los efectos que se produce sobre el medio ambiente es una herramienta indispensable para adoptar estrategias adecuadas que permitan reducir de forma eficaz, planteándose objetivos ambientales para ir resolviendo efectos significativos.

**Los laboratorios analíticos producen ciertos impactos sobre el medio ambiente** y aunque las actividades que desarrollan pueden ser muy distintas, las repercusiones negativas sobre el medio ambiente pueden resumirse en las siguientes:

- + Contaminación atmosférica por emisión de sustancias peligrosas;
- + Vertidos de sustancias peligrosas a la red de saneamiento;
- + Generación de residuos peligrosos y no peligrosos;
- + Consumo de materias primas y recursos como agua y electricidad.

**Las actividades de los laboratorios tienen ciertas peculiaridades** que los diferencian del sector industrial o de otros servicios, entre otras las siguientes:

- Se manipula una gran variedad de sustancias químicas, muchas de ellas peligrosas y en diferentes grados de concentración;
- Se emplean pequeñas cantidades de esas sustancias en comparación con las que se manejan en la industria;
- A diario se realizan operaciones muy variadas;
- Existe alta probabilidad de producirse sustancias desconocidas o que no se controlan;
- La formación del personal suele ser elevado.

**Un Sistema de Gestión** es un conjunto de elementos de una organización interrelacionados o que interactúan para establecer políticas, objetivos y procesos para lograr estos objetivos.

**Un Sistema de Gestión Ambiental (SGA)** , es

un sistema que controla todos los procesos de una organización, que están involucrados con el medio ambiente y que tiene una repercusión sobre él.

**Un Sistema de Gestión Ambiental (SGA)** , está constituido por

una estructura organizativa, responsabilidades, procedimientos, procesos y recursos que pueden destinarse en una organización para cumplir con los objetivos de proteger el medio ambiente en el desarrollo de sus actividades.

**Un Sistema de Gestión Ambiental (SGA)** , consiste en:

- ♦ Definir y documentar las metodologías para llevar a cabo las actividades de forma controlada siempre desde la perspectiva de mejorar el comportamiento ambiental, controlando impacto ambiental.
- ♦ Abordar eficazmente sus riesgos y oportunidades mediante la integración de la gestión ambiental a sus procesos de negocio, dirección estratégica y forma de decisiones, incorporando la gobernanza ambiental a su SGA.

La gestión ambiental en las organizaciones y sobre todo en un laboratorio no es algo del todo voluntaria, por la gran cantidad de leyes medioambientales (y sus desarrollos) a cumplir. Para cumplir con esos requisitos legales cada organización tendría que concebir una herramienta, que ya está inventada y da unos resultados enormes que es la norma internacional ISO-14001.

**El objetivo del SGA** es contribuir al pilar ambiental de la Sostenibilidad y la Responsabilidad Social.

El concepto de “SOSTENIBILIDAD” o “DESARROLLO SOSTENIDO” o “CRECIMIENTO SOSTENIBLE” proviene del informe Brundtland (publicado en 1987), viene a decir de forma coloquial de las siguientes formas:

“La Tierra no es un legado de nuestros padres, sino algo que nos han prestado nuestros hijos”.

“Desarrollo o crecimiento que satisface las necesidades de la generación presente sin comprometer las necesidades y capacidades de generaciones futuras”.

“Consolidando el presente, asegurando el futuro”.

“Desarrollo o crecimiento que consume los recursos naturales (RRNN) por debajo de la tasa de regeneración”.

“No te comas las semillas con las que has de sembrar la cosecha de mañana”

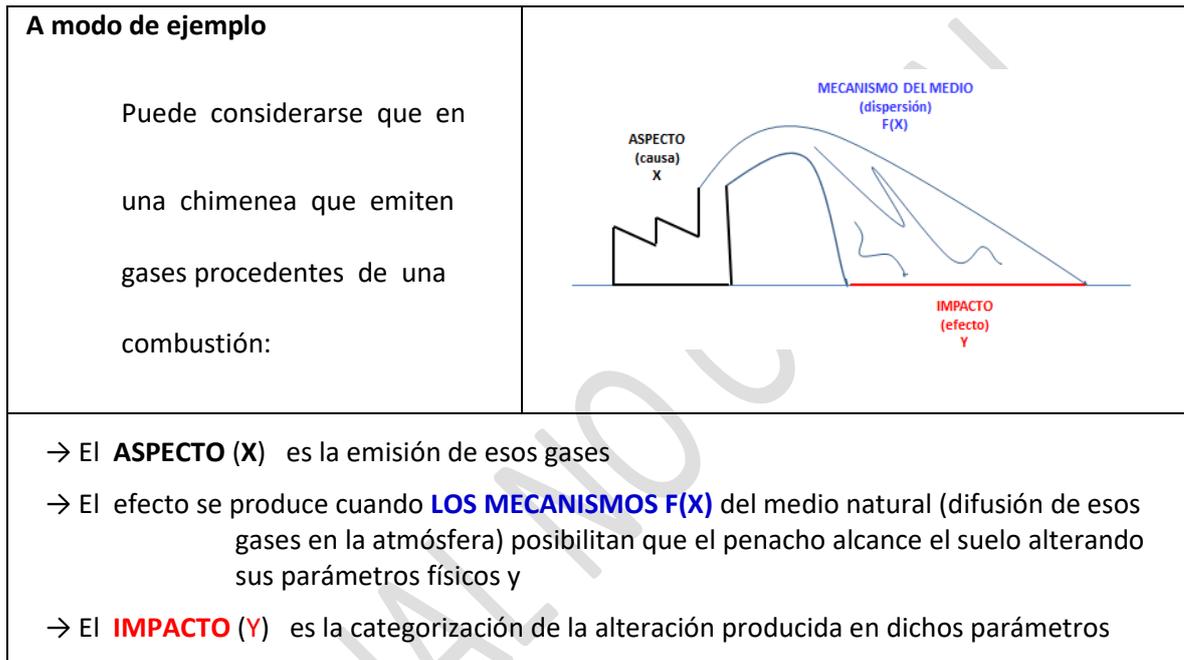
### **1.1. ASPECTOS AMBIENTALES Y SUS ASOCIADOS IMPACTOS AMBIENTALES**

En toda metodología de análisis del medio ambiente es fundamental entender las definiciones de aspectos ambientales y sus asociados impactos ambientales. Previamente se debe hacer un análisis de las

actividades, que hace la empresa en cuestión. Con la finalidad de identificar los aspectos e impactos que genera la organización y que afectan al medioambiente.

**ASPECTO AMBIENTAL** .- el elemento de las actividades, productos o servicios de una organización que interactiva o puede interactuar con el medio ambiente. Se identifica con la CAUSA.

**IMPACTO AMBIENTAL** .- el cambio en el medio ambiente, ya sea adverso o beneficioso, como resultado total o parcial de los aspectos ambientales de su organización. Se identifica con el EFECTO.

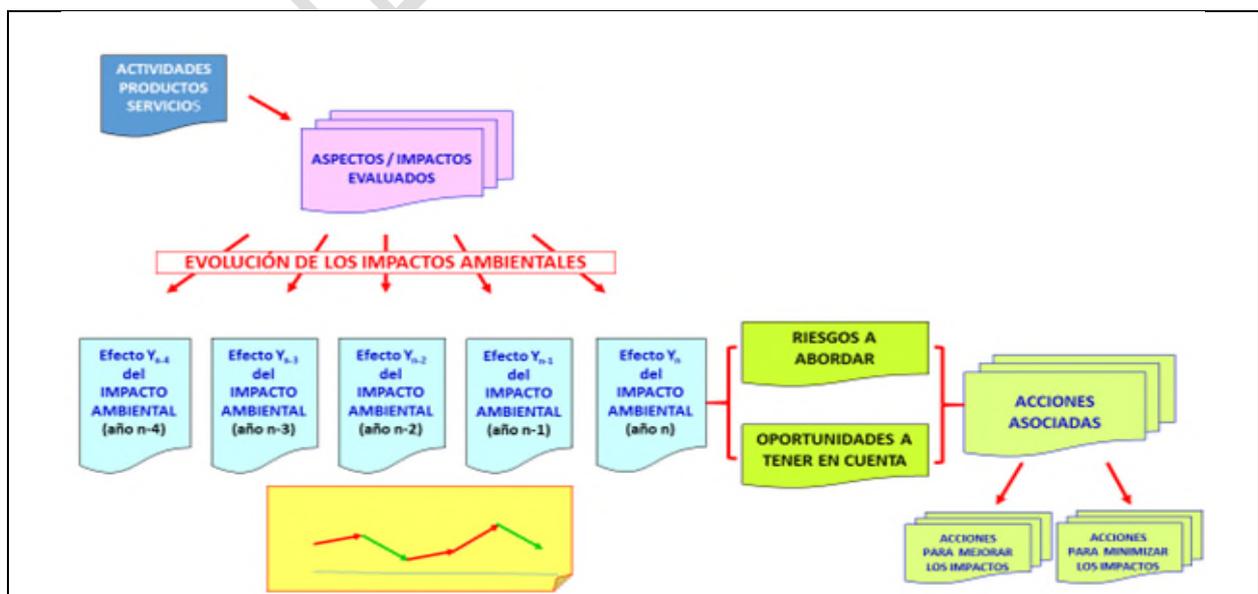
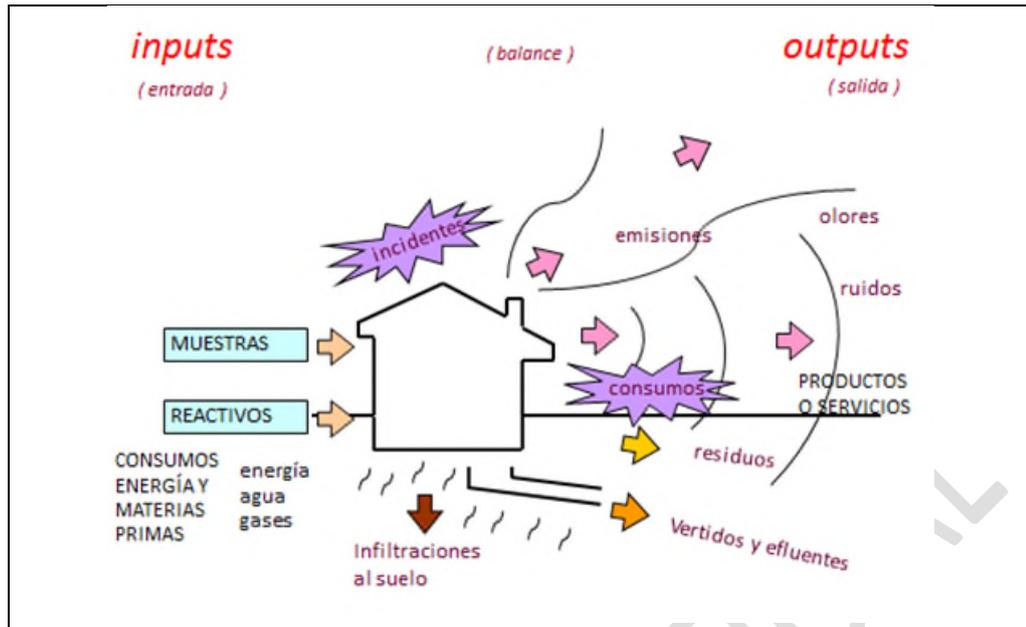


El impacto ambiental es el EFECTO determinado que causa la actividad humana sobre el medio ambiente y que puede ser positivo o negativo.

Los impactos ambientales que en la organización se considere significativos deben ser previamente evaluarlos, mediante un proceso similar a la evaluación de riesgos laborales, con la finalidad de implantar medidas correctoras.

**Los aspectos ambientales que pueden causar impactos directos en los laboratorios**, junto con sus efectos negativos principales, pueden resumirse en:

- Consumos: inciden negativamente en el agotamiento de recursos e indirectamente en la contaminación ambiental;
- Vertidos de líquidos a la red de saneamiento: contaminación de agua e indirectamente de otro medio;
- Emisiones a la atmósfera: contaminación del aire e indirectamente de otro medio;
- Generación de residuos: contaminación del suelo, agua superficial y subterránea.



| ÁREA DE INCIDENCIA<br>(vectores ambientales) | CAUSA<br>(aspecto ambiental) |  | EFFECTO<br>(impacto ambiental)  |
|--|------------------------------|--|---|
| RESIDUOS                                     | }                            | Residuos peligrosos  | <ul style="list-style-type: none"> <li>CONTAMINACIÓN DEL SUELO</li> <li>CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS</li> <li>DETERIORO DE LA BIODIVERSIDAD</li> <li>BIODURABILIDAD</li> <li>RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA</li> </ul> |
| Residuos inertes o inertizados               |                              |  |   |
| Residuos urbanos o municipales               |                              |  |   |
| ATMÓSFERA                                    | }                            | Emisiones  | <ul style="list-style-type: none"> <li>DESTRUCCIÓN DE LA CAPA DE OZONO</li> <li>EFFECTO INVERNADERO</li> <li>LLUVIA ÁCIDA</li> <li>SMOG</li> <li>RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA</li> </ul>  |
| Inmisiones                                   |                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Focos fijos</li> <li>Focos móviles</li> </ul>                           |   |
| AGUA   | }                            | Captación de agua  | <ul style="list-style-type: none"> <li>EUTROFIZACIÓN</li> <li>DISMINUCIÓN DE LA BIODIVERSIDAD</li> <li>MUERTE DE ESPECIES ACUÁTICAS</li> <li>RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA</li> </ul>  |
| Vertido de aguas residuales                  |                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Manantial, pozo o río</li> <li>Río, mar o red de saneamiento</li> </ul> |   |
| AMBIENTE EXTERIOR                            | }                            | Ruido y vibraciones  | <b>EFFECTOS LÓCALES:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>GENERACIÓN RUIDOS/ VIBRACIONES / OLORES / HUMOS</li> <li>RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA</li> </ul>  |
| Olores                                       |                              |  |   |
| SUSTANCIAS PELIGROSAS                        | }                            | Almacenamiento   | <ul style="list-style-type: none"> <li>CONTAMINACIÓN DEL SUELO</li> <li>CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS</li> <li>CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA</li> <li>RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA</li> </ul>                             |
| Transporte                                   |                              |  |   |
| RECURSOS NATURALES                           | }                            | Consumo de agua  | <b>AGOTAMIENTO DE RECURSOS NATURALES:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>ENERGÍA</li> <li>AGUA</li> <li>MATERIAS PRIMAS</li> </ul>  |
| Consumo de energía                           |                              |  |   |
| Consumo de combustibles                      |                              |  |   |
| Consumo de papel y cartón                    |                              |  |   |
| SUELOS                                       | →                            | Contaminación del suelo  | <ul style="list-style-type: none"> <li>CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS</li> <li>CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUPERFICIALES</li> <li>PÉRDIDA BIODIVERSIDAD</li> <li>RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA</li> </ul>                |

La **Gestión Ambiental** abarca los esfuerzos de una organización por controlar su interacción con el entorno y los efectos que causa sobre el mismo, con el fin de minimizar los impactos ambientales adversos y aprovechar los impactos ambientales positivos.

Un **Sistema de Gestión Ambiental (SGA)** es un enfoque utilizado por las organizaciones desde la década de 1990 para gestionar sus interacciones con el entorno de una forma planificada y sistemática. Comprende un conjunto integral de procesos usados por la organización para establecer sus políticas y objetivos. Estos procesos abarcan estructura organizacional, roles y responsabilidades, planificación, operaciones y evaluación del desempeño ambiental. Cuando se implementa conjuntamente, este sistema de procesos se concreta en hacer que las mejoras se incrementen a lo largo del tiempo.

En sí, un **Sistema de Gestión Ambiental** es una combinación de procesos que permiten a una organización reducir sus impactos ambientales y aumentar su eficiencia para conseguir mejoras tanto económicas como ambientales y operativas.

Los riesgos de dañar el medio ambiente por parte de las organizaciones son muy diversos. Pueden ir desde los peligros que se relacionan con materias primas, vertidos o emisiones a accidentes de mayor envergadura.

Entre las herramientas para llevar a cabo esas necesidades de cuidado ambiental surgió utilizar un sistema de gestión preventivo específico para ello, al igual que en otros campos cada uno comenzaba a utilizar, como ejemplos:

**En riesgos laborales**, → utilizar un sistema de gestión de prevención de riesgos laborales.

**En calidad**, → utilizar un sistema de gestión para el aseguramiento de la calidad

Esa herramienta fue la norma internacional ISO-14001, pensada para cualquier organización independiente-mente de su tamaño, del sector de su actividad, o de la ubicación en a que se encuentre (de país o continente).

### Herramientas para implementar un SGA

- Norma internacional ISO-14001
- REGLAMENTO EUROPEO EMAS (cumpliendo previamente ISO-14001)

## 2. LA NORMA INTERNACIONAL ISO-14001 : 2015, PRINCIPIOS Y ESTRUCTURA

### 2.1. INTRODUCCIÓN,

La versión última de 2015 de esta norma (ISO-14001) destaca:

- Mayor protección ambiental de la organización;
- Inclusión del MA como elemento estratégico;
- Más atención al ciclo de vida del producto/servicio;
- Más protagonismo de la dirección en el SGA, a través del liderazgo.

El SGA pretende, el control y la gestión de emisiones, vertidos y residuos:

- Al evitar la utilización y manejar de forma segura materiales peligrosos o contaminados;
- Al reducir la generación de residuos;
- Al conservar los recursos naturales (incluyendo el agua, el suelo y materiales valiosos);
- Al realizar iniciativas ambientales.

La norma internacional ISO-14001 proporciona el marco para la mejora continua de la gestión ambiental. Incorpora técnicas probadas implementadas en todo el mundo, y es aceptado internacionalmente.

La norma internacional ISO-14001 consigue un equilibrio entre los tres pilares:

- ◆ Medio ambiente;
- ◆ Sociedad; y
- ◆ Economía.

Alcanzando la sostenibilidad (desarrollo sostenible) de las organizaciones y del medio ambiente.

El estándar internacional ISO-14001 es una norma, que pertenece a la serie de la familia ISO-14000, y que establece las políticas de estandarización internacional para las organizaciones en lo relativo a temas ambientales.

Como el resto de las normas de la serie ISO-14000, están formuladas por la Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization) y establecen los requisitos a cumplir para certificar una serie de reglas en materia de gestión ambiental.

La serie de la familia ISO-14000 es un sistema de gestión ambiental por excelencia, que contiene las guías generales sobre principios, sistemas y técnicas de soporte, para lograr que una organización se certifique.

La aplicación de esta norma se lleva a cabo sin hacer distinción entre el tamaño ni la cantidad que produce la organización que desea la certificación.

La norma ISO-14001 ayuda a las organizaciones a controlar los impactos que producen sus actividades en el medio ambiente, minimizarlos o incluso eliminarlos. En general, el estándar incluye los requisitos que se necesitan para poner en marcha un Sistema de Gestión Ambiental en una organización. Gracias a esto, las organizaciones pueden desarrollar tecnologías limpias y cumplir con la legislación ambiental. Se debe contar con una certificación en ISO 14001 permite a una organización demostrar su compromiso con el medio ambiente y el desarrollo sostenible.

La norma ISO-14001, en su última versión (en 2015), promueve un enfoque metodológico de **gestión de riesgos y oportunidades**, establece cómo se deberán identificar los riesgos, pero no obliga a hacer una evaluación de riesgos. Se define el RIESGO como *el efecto de la incertidumbre*, es decir, que engloba efectos potenciales adversos y efectos potenciales beneficiosos.

Para tener en cuenta estos riesgos y oportunidades la norma ISO-14001 insta a identificar los aspectos ambientales significativos. Junto a esto, es necesario tener en cuenta los requisitos legales aplicables y otros riesgos y oportunidades de negocio que interfieren con el SGA. Sobre esta base se planificarán todas las acciones para abordar los riesgos ambientales.

Se puede considerar que el propósito de la gestión de riesgos ambientales según la norma ISO-14001 ha de ser:

- Asegurar los resultados previstos del SGA, es decir, que cumple con todos los resultados que se espera.
- Prevenir o minimizar efectos no deseados sobre el medioambiente, y los efectos potenciales de la organización.
- Conseguir la mejora continua del sistema y por tanto de la organización.

**Los métodos sistemáticos utilizados** pueden variar en sus detalles, pero habitualmente incluyen los elementos siguientes:

- Planificación
- Operación y control
- Seguimiento y revisión
- Actuación para la mejora

## **2.2. PRINCIPIOS DE LA NORMA ISO-45001:2015**

## **PRINCIPIOS DE LA ISO-14001**

Existen **principios generales** que, en materia administrativa, estipula la norma ISO 14000, los cuales se nombran brevemente a continuación:

- Reconocer la gestión ambiental como una prioridad;
- Trabajar desde la perspectiva de riesgos y oportunidades;
- Favorecer el enfoque de procesos;
- Mantener una eficiente comunicación entre todas las partes interesadas.
- Determinar los requerimientos legislativos del proceso productivo, así como de los bienes y servicios.
- Compromiso en la protección ambiental de toda a organización y la asignación específica de responsabilidades.
- Impulsar la planeación ambiental mediante el análisis de los ciclos de vida de productos.
- Crear una disciplina administrativa encaminada a alcanzar lo planteado.
- Enfocar al uso eficiente de los recursos y el entrenamiento.
- Evaluar el desempeño comparado con las políticas, objetivos y metas ambientales planteados.
- Establecer un sistema que permita la verificación y llevar a cabo un monitoreo con auditorías internas que permitan detectar áreas de oportunidad y estar en posibilidades de aplicar la mejora continua.
- Impulsar a los proveedores a llevar a cabo políticas de gestión ambiental.

### 2.3. ESTRUCTURA DE “ALTO NIVEL” DE LA NORMA DE GESTIÓN

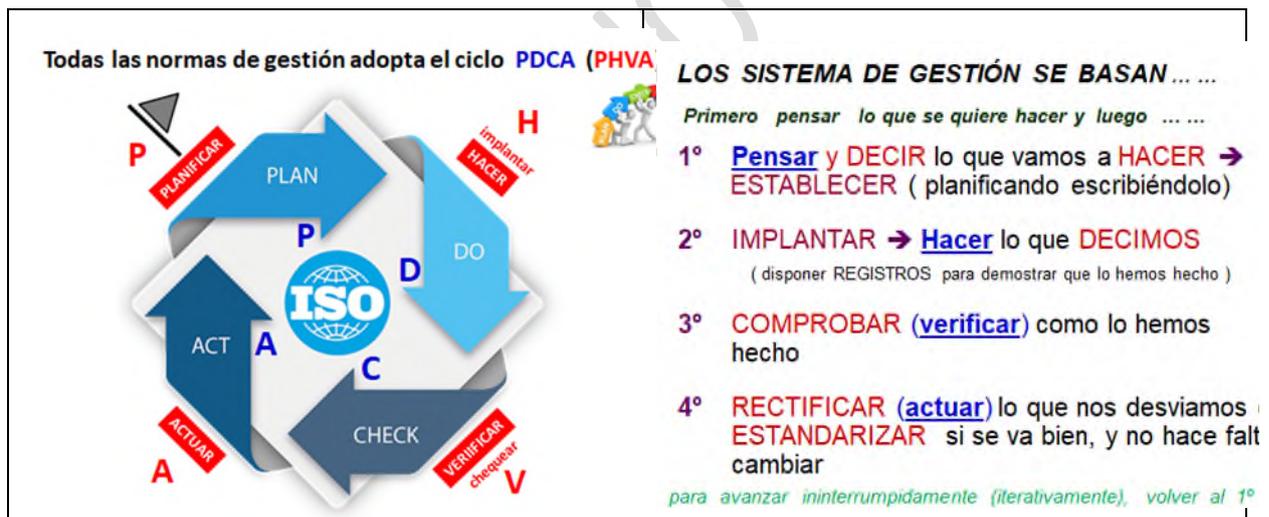
La norma ISO-14001:2015 se ajusta a los requisitos de ISO para todas las normas de los sistemas de gestión. Tiene una “Estructura de Alto Nivel” (en inglés, **HLS = High Level Structure**).

Esta **Estructura de Alto Nivel del Anexo SL de la ISO** implicó que todas las normas de sistemas de gestión que se revisen o creen a partir de su publicación deberán tener un texto base, unos términos y unas definiciones comunes. Es decir la Organización Internacional de la Estandarización (ISO) por fin se estandarizó.

Este anexo SL ha sido publicado por ISO, en el año 2012, en sustitución de la anterior Guía 83.

**El Anexo SL** constituye el pilar actual de la normalización de los estándares de sistemas de gestión para lograr una estructura uniforme, un marco de sistemas de gestión genérico, que sea fácil de manejar y otorgue un beneficio a aquellas organizaciones que cuenten con varios sistemas de gestión integrados.

La norma de gestión se basa en un enfoque de mejora continua PHVA (PDCA) es fundamental para la correcta comprensión de lo que una organización puede lograr con el SGA y de lo que su adopción le va exigir.



Este enfoque divulgado por Demming y Sherwhart (el de los gráficos de control) a mediados del siglo pasado y aplicado a los sistemas de gestión, la humanidad lleva haciéndolo desde siempre.

También se le conoce como el **método PHVA (Planificar-Hacer-Verificar-Actuar)** proporciona un proceso continuado e iterativo que conduce a la mejora continua del proceso. Se trata de una metodología probada que permite a la organización establecer compromisos en sus políticas y actuar de manera sistemática para cumplir con esos compromisos. Este modelo es el enfoque subyacente usado en los estándares ISO para los sistemas de gestión, y por tanto la ISO-14001. Es un proceso que puede ser aplicado al SGA como un todo y a cada uno de sus elementos individuales para mejorar de forma continua el desempeño ambiental.

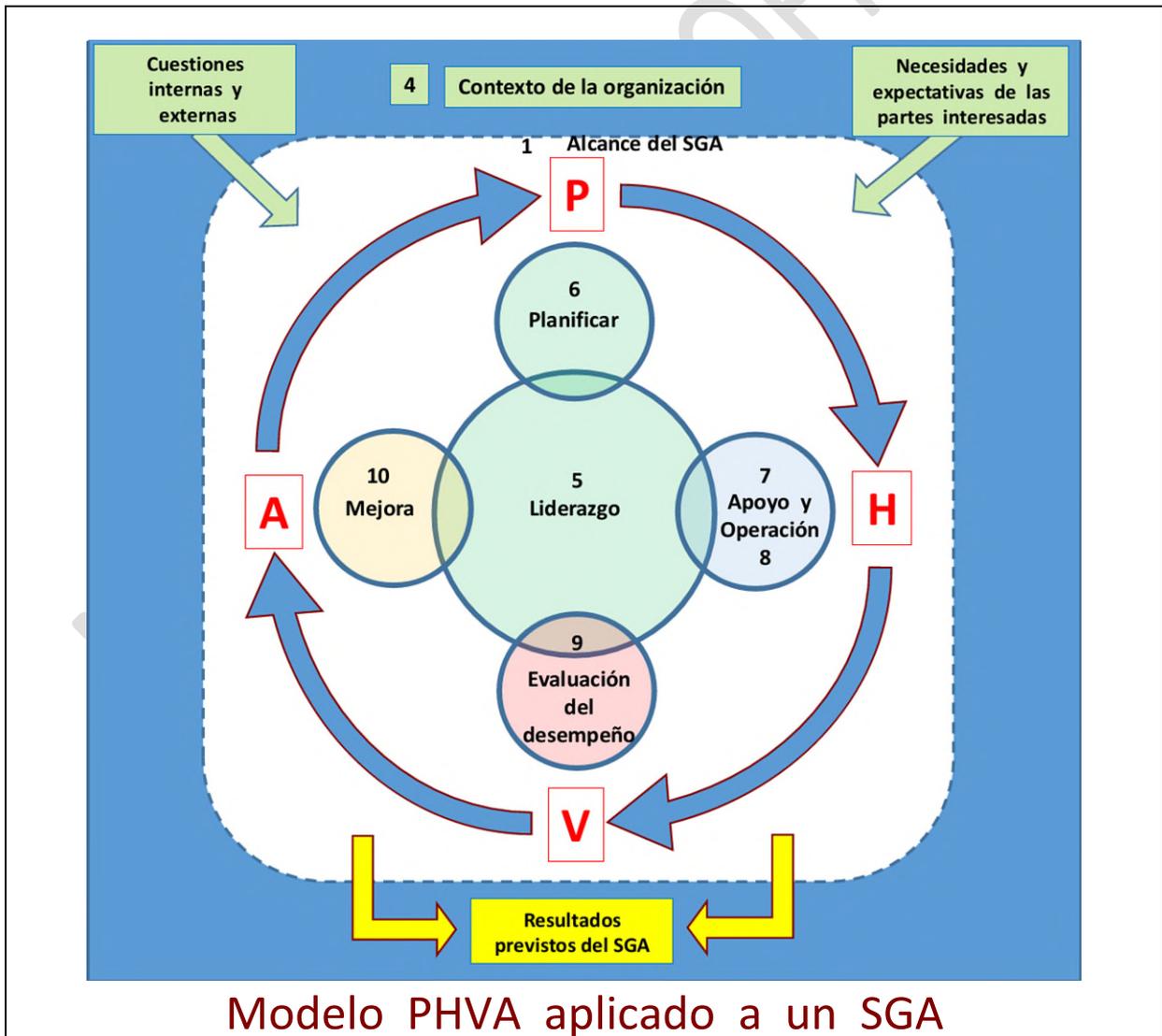
La estructura de alto nivel, contiene 10 apartados (o cláusulas) principales, más una (cero) de introducción:

|                   |  |   |
|-------------------|--|---|
| <b>Genéricos</b>  | <b>0. INTRODUCCIÓN</b>                 |   |
|                   | <b>1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN</b> |   |
|                   | <b>2. REFERENCIAS NORMATIVAS</b>       |   |
|                   | <b>3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES</b>      |   |
| <b>Requisitos</b> | <b>4. CONTEXTO DE LA ORGANIZACIÓN</b>  | → |
|                   | <b>5. LIDERAZGO</b>                    | → |
|                   | <b>6. PLANIFICACIÓN</b>                | → |
|                   | <b>7. APOYO (o SOPORTE)</b>            | → |
|                   | <b>8. OPERACIÓN (o FUNCIONAMIENTO)</b> | → |
|                   | <b>9. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO</b>     | → |
|                   | <b>10. MEJORA</b>                      | → |

|                         |
|-------------------------|
| PLANIFICAR              |
| HACER (o IMPLANTAR)     |
| VERIFICAR (o CONTROLAR) |
| ACTUAR                  |

Las primeras son cláusulas genéricas, y desde la 4ª hasta la última (10ª) son de requisitos de la norma.



**COMPONENTES CLAVES DE LA NORMA ISO-14001 : 2015**

|            |   |   |
|------------|---|---|
| PLANIFICAR | 4 | Comprender <b>la organización y su contexto</b> , incluidas las condiciones ambientales   |
|            |   | Comprender <b>las necesidades y expectativas de las partes interesadas</b> , y determinar con cuáles de ellas cumplirá la organización  |
|            |   | Determinar <b>el alcance</b> (es decir, límites y aplicabilidad) del SGA  |
|            |   | Establecer e <b>implementar el SGA</b>  |
|            | 5 | Obtener <b>el compromiso de liderazgo</b> de la alta dirección  |
|            |   | Establecer <b>una política ambiental</b>  |
|            |   | Asignar <b>responsabilidades y autoridades</b> para los roles pertinentes   |
|            | 6 | Identificar <b>los aspectos ambientales y sus impactos ambientales asociados</b> , tomando en consideración el ciclo de vida del producto/servicio  |
|            |   | Determinar <b>la aplicabilidad de sus requisitos</b> legales y otros requisitos y tratarlos dentro del SGA  |
|            |   | Determinar <b>los riesgos y oportunidades</b> (R&O) prioritarios para los resultados pretendidos del SGA, incluidos los relacionados con aspectos ambientales (sobre todo los significativos), requisitos legales y otros requisitos, y otras cuestiones y requisitos |
|            |   | Planificar <b>la toma de acciones para abordar aspectos ambientales</b> (sobre todo los significativos), requisitos legales ambientales y otros riesgos y oportunidades prioritarias  |
|            |   | Planificar <b>cómo integrar las acciones</b> en sus procesos de su quehacer y cómo evaluar la eficacia de esas acciones   |
|            |   | Establecer uno o más <b>objetivos ambientales y un plan para lograrlos</b> , incluyendo indicadores para el seguimiento del proceso   |

**COMPONENTES CLAVES DE LA NORMA ISO-14001 : 2015**

|       |   |  |
|-------|---|--|
| HACER | 7 | Proporcionar <b>los recursos necesarios</b> para implementar y mantener el SGA   |
|       |   | Determinar <b>las habilidades y conocimientos</b> necesarios para el SGA para obtener la competencia precisa, incluyendo cualquier <b>formación</b> requerida            |
|       |   | Suscitar <b>la toma de conciencia y motivación</b> sobre el SGA  |
|       |   | Establecer, implementar y mantener los procesos necesarios para las <b>comunicaciones internas y externas</b> del SGA  |
|       |   | Crear, actualizar y controlar <b>la información documental (documentación y registros)</b> necesaria para la eficacia del SGA, así como la requerida por la propia norma |
|       | 8 | Planificar, implementar y <b>controlar las operaciones y procesos</b> necesarios para cumplir los requisitos del SGA   |
|       |   | Prepararse para <b>situaciones de emergencia y responder</b> a ellas   |

**COMPONENTES CLAVES DE LA NORMA ISO-14001 : 2015**

|           |   |   |
|-----------|---|---|
| VERIFICAR | 9 | Hacer seguimiento, medir, analizar y evaluar <b>el desempeño ambiental</b>                  |
|           |   | Evaluar <b>el cumplimiento de los requisitos</b> legales y otros requisitos                 |
|           |   | Realizar <b>auditorías internas</b> periódicas del SGA                                      |
|           |   | <b>Revisar por la dirección el SGA</b> para asegurar su conveniencia, adecuación y eficacia |

**COMPONENTES CLAVES DE LA NORMA ISO-14001 : 2015**

|                |    |  |
|----------------|----|--|
| AC<br>CORREGIR | 10 | Realizar <b>mejoras</b> mediante la toma de medidas para lograr los resultados previstos en el SGA |
|                |    | Adoptar <b>medidas para abordar</b> las no conformidades y evitar su repetición                    |

**Actuar para la mejora continua** de la conveniencia, adecuación y eficacia del SGA, concentrándose en elementos que mejoren el desempeño ambiental

## 0. INTRODUCCIÓN

En la introducción se describe el marco de la norma con el desarrollo sostenible y de qué manera la adopción de un SGA puede ayudar a las organizaciones a cumplir las expectativas de la sociedad en este ámbito, contribuyendo al pilar ambiental de la sostenibilidad.

La norma viene a recordar que las expectativas de la sociedad son crecientes y abarcan ahora todos los aspectos de la protección ambiental, más allá de la prevención de la contaminación, el enfoque principal de ediciones anteriores de la norma.

También destaca el aumento de las expectativas de las partes interesadas.

En este marco, la nueva edición de la norma afirma su propuesta de valor de contribuir al pilar ambiental del desarrollo sostenible.

**La norma pretende contribuir al desarrollo sostenible a través de:**

- La protección del medio ambiente;
- La mitigación de riesgos para la organización;
- El cumplimiento de los requisitos legales y otros requisitos suscritos por la organización de obligado cumplimiento;
- La mejora del desempeño ambiental;
- La perspectiva de ciclo de vida;
- La obtención de beneficios financieros y operativos.
- La comunicación de la información ambiental (transparencia del SGA).

**El objetivo de la norma es**

“proporcionar a las organizaciones un marco para proteger el medioambiente y responder a los cambios de las condiciones ambientales, en equilibrio con las necesidades socioeconómicas”

La norma hace referencia a los beneficios de adoptar el enfoque sistemático a la gestión ambiental en una perspectiva estratégica y de largo plazo para las organizaciones.

**Recordatorios importantes:**

Se recuerda que

La adopción de la norma no es, por sí solo, garantía de un buen desempeño ambiental

Y que

Organizaciones similares en contextos diferentes pueden aplicar el SGA de modo distinto, obteniendo resultados diferentes. Sin embargo, ambas pueden estar en conformidad con los requisitos de la norma.

Por último, se recuerda que

El nivel de detalle y complejidad del SGA variará en función de la propia organización y de su contexto.

## 1. ALCANCE (Objeto y campo de aplicación)

Describe la finalidad que persigue la norma al definir los requisitos que las organizaciones deberán cumplir para adoptar este modelo de gestión ambiental.

El alcance establece los resultados esperados del SGA. Fija los límites del SGA.

| 1. ALCANCE (Objeto y campo de aplicación) |                                  |   |
|---|----------------------------------|---|
| OBJETO                                    | Resultados esperados (previstos) | <ul style="list-style-type: none"> <li>MEJORA del Desempeño Ambiental;</li> <li>CUMPLIMIENTO de los Requisitos Legales y Otros Requisitos;</li> <li>LOGRO de los Objetivos Ambientales.</li> </ul>                  |
| CAMPO DE APLICACIÓN                       |                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>a cualquier tipo de organización;</li> <li>a sus aspectos ambientales e impactos ambientales considerando su ciclo de vida</li> <li>mejorar la gestión ambiental.</li> </ul> |

## 2. REFERENCIA NORMATIVA

La inclusión de las referencias normativas como “elemento condicional (de la norma) que da una lista de documentos de referencia de tal manera que las hace indispensables para la aplicación del documento”. En otras palabras, al citar algo como referencia normativa, se considera como indispensables para la aplicación de dicha norma.

Puede haber normas en las que no existan referencias normativas (no es imprescindible), como ocurre en la última edición de la norma.

## 3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

En la norma reseña varios tipos de términos y los define:

| 3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES |  |
|----------------------------|--|
| 3.1.                       | Términos relacionados con organización y liderazgo             |
| 3.2.                       | Términos relacionados con planificación                        |
| 3.3.                       | Términos relacionados con apoyo (soporte) y operación          |
| 3.4.                       | Términos relacionados con el desarrollo del desempeño y mejora |

## ► 1ª Etapa: PLANIFICAR (PLAN)

### 4. CONTEXTO DE LA ORGANIZACIÓN

La organización (que aplica este modelo de la norma) determinará las cuestiones que desea resolver, planteará cuales son los impactos que genera y para obtener los resultados esperados.

En su cláusula 4 de la norma señala que para la planificación del SGA **es necesario conocer y comprender:**

- **La organización y su contexto.** Por lo tanto, se deben determinar las cuestiones externas e internas que afectan al propósito de la mejora continua y la prevención de la contaminación. Dentro de estas cuestiones han de incluirse las condiciones ambientales capaces de afectar o de verse afectadas por la organización.
- **Las necesidades y expectativas de las partes interesadas.** Un ejemplo de parte interesada podría ser la administración pública que regula legalmente la actividad. De esta manera, una necesidad sería el cumplimiento de los requisitos legales pertinentes.

Una vez conocidas las particularidades de la organización y de su contexto debe **establecerse el alcance** del sistema. Determinar el alcance es establecer los límites de la aplicabilidad del SGA. Estos límites tendrán que estar referidos a los productos o servicios ofrecidos y a los emplazamientos de la organización.

La determinación del contexto será la base u punto de partida de todo SGA.

| 4. CONTEXTO DE LA ORGANIZACIÓN |  |
|--------------------------------|--|
| 4.1.                           | Comprensión de la organización y de su contexto;                         |
| 4.2.                           | Comprensión de las necesidades y expectativas de las partes interesadas; |
| 4.3.                           | Determinación del alcance del sistema de gestión;                        |
| 4.4.                           | Sistema de gestión.  |

Lleva consigo:

► **Analizar del contexto de la organización**

**Cuestiones ambientales** son aquellas pertinentes para su propósito y que afectan a su capacidad para lograr los resultados previstos de su SGA

Examinar las condiciones o cuestiones ambientales que afectan a nivel:

- Interno: aspectos culturales, económicos, operativos, tecnológicos, de desempeño de procesos, ...
- Externo: aspectos técnicos, económicos, mercado, políticos, sociales, ...

► **Identificar las partes interesadas**

Dentro del contexto analizado, en base a su pertinencia, sus necesidades y sus expectativas. Y cuales de estas necesidades y expectativas son de obligado cumplimiento.

► **Determinar el alcance del SGA** (determinando sus límites y su aplicación)

- La dirección de la organización debe establecer una **estrategia para la gestión ambiental**. El sistema debe estar alineado con la estrategia y el alcance definido.

## 5. LIDERAZGO

Esta cláusula (5 de la norma) aporta referencia a la función y la responsabilidad de la Alta Dirección, la cual deberá tener un alto grado de participación en el SGA.

En esta cláusula establece como requisito fundamental **que la dirección ejerza el liderazgo** en el desempeño del SGA. Las principales tareas a realizar por la dirección son el establecimiento de la política ambiental, los objetivos y la designación de responsabilidades.

| 5. LIDERAZGO |  |
|--------------|--|
| 5.1.         | Liderazgo y compromiso;                                    |
| 5.2.         | Política del sistema ambiental;                            |
| 5.3.         | Roles, responsabilidades y autoridades en la organización. |

- **La alta dirección, ha de demostrar liderazgo y compromiso** con el sistema de gestión
  - Definiendo la "**Política ambiental**" (comunicada y debe mantenerse como información documentada, comunicarla y estar disponible para las partes interesadas);

- Definiendo “**Objetivos ambientales**”; “**Indicadores ambientales**”; “**Planes de acción**” para llevarlo a cabo que consideren requisitos legales e información relacionada;
- Estableciendo **roles, responsabilidades y autoridades**;
- Promoviendo el uso
  - Del “**enfoque a procesos**”;
  - Del “**pensamiento basado en riesgos**”;
  - De la “**planificación estratégica preventiva**”
- Asumiendo la **obligación de rendir cuentas para la eficacia** del SGA.

## 6. PLANIFICACIÓN

Esta cláusula 6 de la norma incluye el carácter preventivo del SGA, y trata los riesgos y oportunidades que enfrenta la organización.

La planificación del SGA ha de realizarse teniendo en cuenta los **aspectos ambientales**, los **requisitos legales aplicables** y las **posibles situaciones de emergencia**. La organización emprenderá acciones para atender a los riesgos y oportunidades derivados de los factores anteriores.

Finalmente, es necesario establecer objetivos de mejora coherentes con la policía ambiental. Estos objetivos han de ser medibles y deben ser seguidos y controlados periódicamente.

| 6. PLANIFICACIÓN |  |
|------------------|--|
| 6.1.             | Acciones para abordar riesgos y oportunidades;                   |
| 6.1.1.           | Generalidades;   |
| 6.1.2.           | Aspectos ambientales;  |
| 6.1.3.           | Requisitos ambientales y otros requisitos;                       |
| 6.1.4.           | Planificación de acciones;                                       |
| 6.2.             | Objetivos ambientales y planificación para lograrlos;            |
| 6.2.1.           | Objetivos ambientales;   |
| 6.2.2.           | Planificación de acciones para lograr los objetivos ambientales. |

### ► A Para planificar el SGA, se debe tomar en consideración:

- Contexto de la organización
- Requisitos de las partes interesadas
- Riesgos y oportunidades (R&O)

Estos **riesgos y oportunidades** deben identificarse en relación con:

- Los Aspectos ambientales significativos (sin olvidarse de los no significativos)
- Los Requisitos legales aplicables
- Las Obligaciones voluntarias
- Otros riesgos y oportunidades de negocio que interfieren con el SGA

Sobre esta base se deben **planificar las acciones destinadas** a abordar dichos riesgos y oportunidades, considerando:

- las opciones tecnológicas,
- los requisitos financieros,
- los requisitos operacionales y
- los requisitos de negocio;

Los **propósitos** que orientan la gestión de riesgos y oportunidades deben ser:

- Asegurar los resultados previstos del SGA
- Prevenir o reducir efectos no deseados
- Lograr la mejora continua

► **Objetivos ambientales y planificación para lograrlos**

La organización debe establecer “Objetivos de mejora” de los aspectos ambientales significativos, los requisitos legales y otros, y de los riesgos y oportunidades detectados.

**7. APOYO (o SOPORTE)**

En esta cláusula 7 de la norma es donde se agrupan todos los elementos auxiliares y de aporte que necesita el SGA para su adecuada implementación y mantenimiento.

- La dirección debe asegurarse de **que se aporten los recursos necesarios** para la implantación y el desempeño del SGA.
- Este apartado de la norma trata también sobre **la competencia y la toma de conciencia** necesaria de todo el personal de la organización.
- Para finalizar, en esta cláusula se presentan los requisitos para la **documentación y registros** del SGA.

| <b>7. APOYO (o SOPORTE)</b> |                          |
|-----------------------------|--------------------------|
| <b>7.1.</b>                 | Recursos;                |
| <b>7.2.</b>                 | Competencia;             |
| <b>7.3.</b>                 | Toma de conciencia;      |
| <b>7.4.</b>                 | Comunicación;            |
| <b>7.5.</b>                 | Información documentada; |

► **La alta dirección de la organización debe**

- Proporcionar los **recursos necesarios** para la mejora continua del SGA;
- Proporcionar la **formación necesaria** al personal en relación con el SGA;
- Promover la **toma de conciencia** y el **compromiso con el sistema** en toda la organización. Motivando la importancia del SGA;
- **Comunicar** todo lo necesario del SGA;
- Establecer la metodología para realizar las **comunicaciones internas y externas** relacionadas con el SGA implantado;
- Determinar la **información documentada** (documentos y registros) necesaria y su control, para cumplir los requisitos de la norma, y los adicionales que interese mantener bajo control.

► **2ª Etapa: HACER (DO)**

**8. OPERACIÓN**

Es esta la cláusula 8 de la norma en la que la organización planifica y controla sus procesos internos y externos, los cambios que se produzcan y las consecuencias no deseados de los mismos.

Se describe los requisitos que debe cumplir la organización respecto al manejo de los aspectos ambientales. Por ejemplo, será necesario **determinar los controles y pautas** para una correcta gestión de los residuos, las emisiones, vertidos, etc.

Dentro de esta apartado de operación también debe contemplarse la gestión de **las situaciones de emergencia**. Será necesario determinar planes de respuesta y planificar simulacros.

|                     |  |
|---------------------|--|
| <b>8. OPERACIÓN</b> |  |
| <b>8.1.</b>         | Planificación y del control operacional; |
| <b>8.2.</b>         | Preparación y respuesta ante emergencia. |

► **“Planificación y control operacional”. Establecimiento de criterios de operación para los procesos y su control:**

En “proceso de diseño y desarrollo” de productos/servicios:

- Establecer controles necesarios, considerando requisitos ambientales de cada etapa de su ciclo de vida;
- Determinar los requisitos ambientales para la compra de productos y servicios. Comunicar los requisitos ambientales a los proveedores
- Considerar la necesidad de informar acerca de los impactos ambientales potenciales significativos asociados con el transporte, entrega, uso, tratamiento al fin de vida útil y disposición final de productos/servicios.

► **“Preparación y respuesta ante emergencia”**

- Determinar las situaciones de emergencia, incluidas en las que pueden tener un impacto ambiental.
- Establecer, implementar y mantener procesos para prepararse y responder a situaciones potenciales de emergencia, realizar simulacros y evaluar y revisar los resultados obtenidos.

► **3ª Etapa: ► VERIFICAR (CHECK)**

**9. EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO**

Esta cláusula 9 de la norma define las **actividades necesarias para la verificación de los resultados del desempeño** del SGA.

Esta verificación será realizada por tres vías:

- En primer lugar, es necesario realizar una **evaluación del cumplimiento de los requisitos** legales y de los voluntarios suscritos por la organización.
- La siguiente herramienta de verificación es la **auditoría interna** al sistema.
- Finalmente, es necesaria la realización de la **revisión por la dirección** del sistema.

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>9. EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO</b> |   |
| <b>9.1.</b>                       | Seguimiento, medición, análisis y evaluación; |
| <b>9.2.</b>                       | Auditoría interna;                            |
| <b>9.3.</b>                       | Revisión por la dirección.                    |

► **El SGA implantado se debe revisar periódicamente su eficacia y cumplimiento**, a través de:

- Seguimiento, medición, análisis y evaluación del desempeño de los procesos.

Las actividades de seguimiento y medición son todas aquellas que permiten obtener información periódica y continua de la correcta aplicación y funcionamiento del SGA;

- Realizar las “**Auditorías internas**” a intervalos planificados, como instrumento de verificación del SGA;
- Realizar la “**Revisión por la dirección**” como rendición de cuentas del SGA para asegurar su conveniencia y eficacia continuas.

► **4ª Etapa: ► ACTUAR (ACT)**

**10. MEJORA**

La última cláusula (10) de la norma está relacionado con la **mejora del propio sistema** y del comportamiento ambiental. En base a los resultados de verificación y al desempeño de los procesos se deberán emprender **las no conformidades y acciones correctivas** oportunas.

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>10. MEJORA</b> |  |
| <b>10.1.</b>      | No Conformidades y acciones correctivas; |
| <b>10.2.</b>      | Mejora continua.                         |

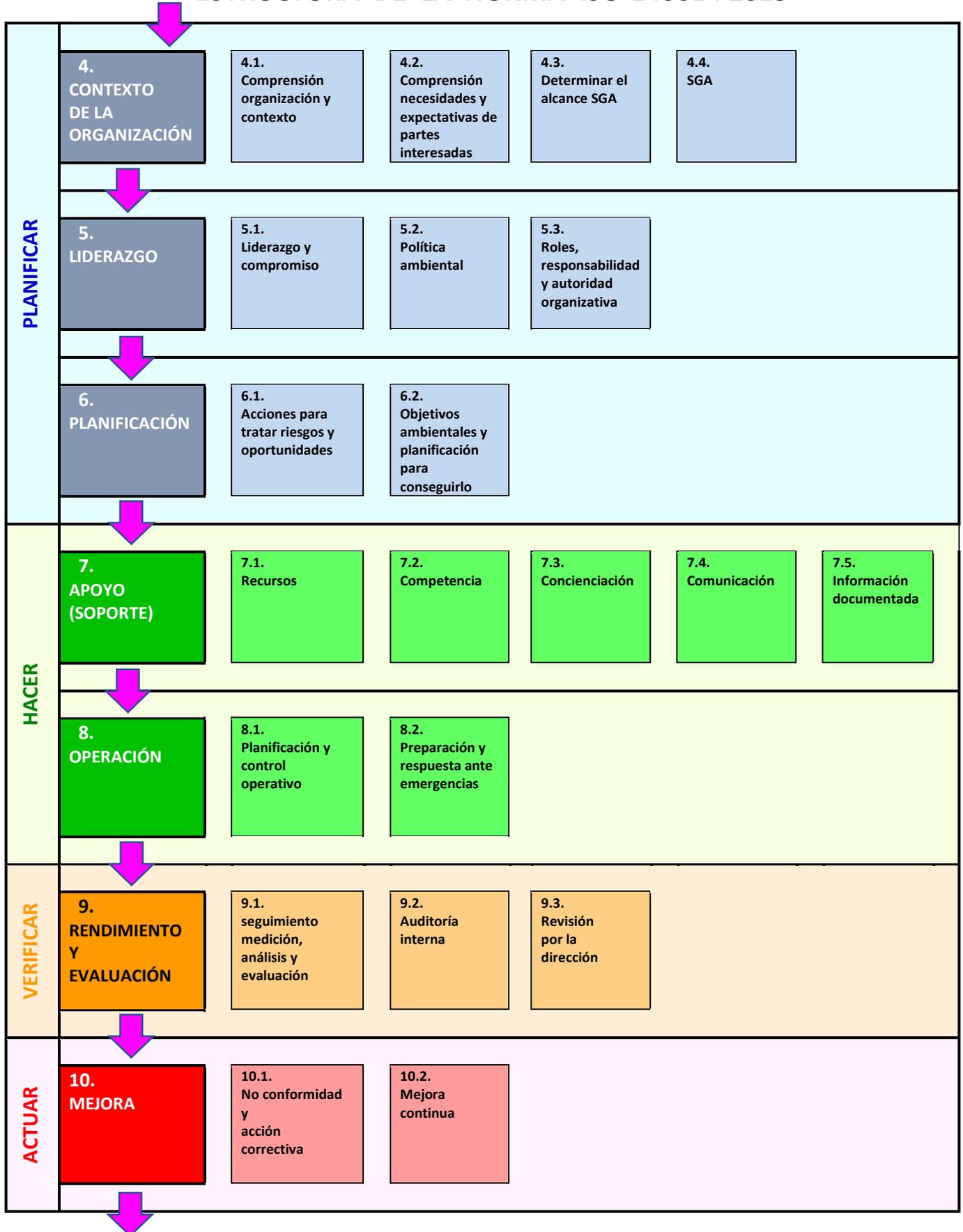
► **Se debe asegurar la mejora continua de la eficacia y eficiencia de los procesos:**

- La toma de acciones ante las No conformidades detectadas y mitigar los impactos. Poner en marcha las acciones correctivas oportunas ante desviaciones del sistema.

La norma no habla de “Acciones preventivas” pero no las prohíbe (en la última versión de 2015 no la menciona porque toda la norma entera es preventiva y se hace más hincapié sobre la gestión de riesgos y oportunidades.

- Aplicar el principio de mejora continua, mejorar continuamente la conveniencia, adecuación y eficacia del SGA.

## ESTRUCTURA DE LA NORMA ISO-14001 : 2015



### 3. PRINCIPIOS APLICABLES A LABORATORIO

#### PRINCIPIOS BÁSICOS DE UN SISTEMA DE GESTIÓN AMBIENTAL (SGA):

- **01:** Comprobar que existe un compromiso de la dirección del laboratorio con el SGA y también definir un Política Ambiental;
- **02:** Diseñar un plan de Acción para que se puedan cumplir con los requisitos establecidos en la política ambiental y exigidos por la norma;
- **03:** Revisar qué es lo que se requiere para cumplir con los objetivos y metas ambientales para así buscar las herramientas que se necesitan para seguir con la política ambiental;
- **04:** Compromiso de prevención de la contaminación;
- **05:** Realizar evaluaciones cualitativas y cuantitativas periódicamente para comprobar si todo lo que se está haciendo es conforme o no a la política ambiental de la organización;
- **06:** Comprobar e intentar mejorar la política ambiental, las metas, objetivos y las medidas que se han tomado. Es decir, buscar la mejora continua del desempeño ambiental de la organización;
- **07:** Buscar la efectividad y eficacia;
- **08:** Inculcar la transparencia, comunicación, importancia de las partes interesadas; motivación;
- **09:** Gestión estratégica;
- **10:** Utilización de la Mejor Tecnología Disponible (MTD.)

Seguidamente, se deberá establecer controles y proponer soluciones para intentar reducir esos impactos o controlarlos según lo que exige la norma.

#### FACTORES PARA LOGRAR LA SUPERACIÓN DE APLICAR EL SGA

A continuación se enumeran los factores de logro y los beneficios de la adopción de un SGA;

- Compromiso a todos los niveles y funciones de la organización;
- Participación de la alta dirección ejerciendo liderazgo;
- Mayores posibilidades con aumento de las oportunidades de prevenir o mitigar impactos adversos;
- Mayores posibilidades con aumento de las oportunidades de impactos beneficiosos;
- Tratamiento eficaz del riesgo u oportunidades;
- Alineación e integración con la estrategia, proceso de negocio y toma de decisiones;
- Confianza de las partes interesadas en la organización.

**El SGA concebido por la norma compromete a la organización que la aplica a:**

- ▶ Identificar los requisitos legales y otros requisitos en los que está obligado;
- ▶ Identificar los impactos ambientales que su actividad realiza;
- ▶ Fomentar la responsabilidad de la dirección y de los trabajadores, en la protección del medio ambiente;
- ▶ Aplicar el ciclo de vida para poder realizar actividades que no influyan negativamente sobre el medio ambiente;
- ▶ Generar sistemáticas que faciliten alcanzar objetivos ambientales;
- ▶ Fomentar el SGA en sus proveedores;
- ▶ Evaluar los resultados obtenidos, basados en la política ambiental de la organización y los objetivos fijados, para mejorar su desempeño ambiental.
- ▶ Reducir sus riesgos;
- ▶ Divulgar su información ambiental a las partes interesadas, siendo transparente su SGA.

**El nivel de detalle y complejidad del SGA de una organización** no será el mismo en todos los casos, sino que dependerá de varios factores:

- El contexto de la organización;
- El alcance del SGA;
- Los requisitos legales y otros requisitos que le afecten;
- La naturaleza de las actividades, productos y servicios;
- Sus aspectos ambientales y los impactos ambientales asociados.

#### **4. BIBLIOGRAFIA**

- ⇒ **ISO-14001:2015** “SGA – Requisitos con orientación para su uso.”
- ⇒ **ISO-14004:2016** “SGA – Directrices generales sobre principios, sistemas y técnicas de apoyo.”
- ⇒ **ISO-19011:2018** “Directrices para las auditorías de los sistemas de gestión”.
- ⇒ “**Guía para la aplicación de UNE-EN ISO-14001:2015**” AENOR (2016).
- ⇒ “**ISO-14001:2015 Para la pequeña empresa**” AENOR (2017)
- ⇒ “**ISO-14001:2015 Guía de implantación para sistemas de gestión medioambientales**” nqa

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 3**

**AUDITORÍAS: CONCEPTO Y TIPOS. DESVIACIONES Y TRABAJOS NO CONFORMES. ACCIONES CORRECTIVAS, REPARADORAS Y DE CONTENCIÓN.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

1. AUDITORIAS.
  - 1.1. INTRODUCCIÓN
  - 1.2. NECESIDAD Y OBJETIVOS DE LAS AUDITORÍAS
  - 1.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS AUDITORÍAS
2. TIPOS DE AUDITORÍAS: INTERNAS Y EXTERNAS
  - 2.1. AUDITORÍAS INTERNAS
  - 2.2. AUDITORÍAS EXTERNAS
  - 2.3. GESTIÓN DE UN PROGRAMA DE AUDITORÍAS
3. TRABAJOS NO CONFORMES.
4. NO CONFORMIDADES.
  - 4.1. CLASIFICACIÓN DE NO CONFORMIDADES
5. ACCIONES CORRECTIVAS, DE CONTENCIÓN Y REPARADORAS.
6. BIBLIOGRAFÍA

## 1. AUDITORIAS.

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Según la norma ISO 19011 *Directrices para la Auditoría de los Sistemas de Gestión*, se define **auditoría** como un proceso sistemático, independiente y documentado para obtener registros, declaraciones de hechos u otra información pertinente y evaluarlos objetivamente para determinar en qué medida se cumplen los requisitos especificados establecidos en un documento normativo. Esta Norma Internacional no establece requisitos, pero orienta en la programación de una auditoría del sistema de gestión, así como sobre la competencia y evaluación de un auditor y un equipo auditor. En su última versión añade a los principios de auditoría un enfoque basado en riesgos y oportunidades, enfoque que se traslada a la planificación, realización y presentación de informes que garantizan que la auditoría recoge cuestiones relevantes para la entidad que se va a auditar (Blog Calidad y Excelencia, 2018).

Por ser una actividad documentada, toda auditoría se lleva a cabo de acuerdo con procedimientos escritos y/o listas de chequeo para verificar, por medio de exámenes y evaluación de evidencias objetivas, que los principios establecidos en un programa de aseguramiento de la calidad han sido desarrollados, documentados y ejecutados de acuerdo con los requisitos que se establecen en él. (Gabinete de Servicios de la Calidad (GSC), 2015)

### 1.2. NECESIDAD Y OBJETIVOS DE LAS AUDITORÍAS

La norma UNE-EN-ISO/IEC 17025:2017 *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*, establece en su punto 8 **Requisitos del sistema de gestión**, que un laboratorio debe establecer, documentar, implementar y mantener un sistema de gestión que apoye y demuestre que se cumplen los requisitos establecidos en la norma, así como la calidad de los resultados del laboratorio. Dentro de este punto se incluyen, entre otros, las acciones correctivas y las auditorías internas. (UNE-EN ISO IEC 17025, 2017).

Los principales motivos para realizar una auditoría son:

1. Obtener evidencias del funcionamiento de la organización que permitan conocer cómo se lleva a cabo la gestión y tomar decisiones. Es recomendable realizar auditorías internas cuando:
  - Se realicen cambios importantes que puedan afectar al Sistema de Calidad
  - Cambios en el propio Sistema de Calidad
  - Cuando existan sospechas o se tenga la certeza de que no se cumplen los requisitos de Calidad establecidos.
2. Cumplimiento de los requisitos normativos (por ejemplo ISO 9.000 o ISO 17.025).
3. Realizar acciones de mejora y prevención de no conformidades.

### 1.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS AUDITORÍAS

1. Es un examen metódico y sistemático: debe ser planificada con tiempo suficiente y realizarse en un orden determinado, preparado por el auditor para asegurarse que no quedan puntos sin comprobar.
2. Independiente: los auditores no deben tener responsabilidad directa sobre las actividades y los resultados auditados para asegurar la imparcialidad y evitar prejuicios.
3. Completa: aunque puede realizarse en varias fases, debe aportar una información global sobre la capacidad del sistema para cumplir los objetivos previstos.
4. Documentada: sus conclusiones deben apoyarse en evidencias objetivas, por lo que es necesaria la documentación de los hallazgos obtenidos y establecer un archivo histórico, que permita verificar la situación del laboratorio a lo largo del tiempo.
5. Es un examen muestral: se elige una muestra representativa que suministre suficiente información para realizar un análisis global de la situación del laboratorio en el momento de la auditoría.

### 2. TIPOS DE AUDITORÍAS: INTERNAS Y EXTERNAS

En función de distintos criterios, pueden establecerse diferentes clasificaciones:

- 1) **En función de qué se audita:** puede ser de producto, de proceso, de sistema o de competencia técnica. Como ejemplos, en el ámbito de los laboratorios se sigue la norma UNE-EN ISO 17.025, para empresas según ISO 9.000 o referidos a Consejos Reguladores EN 45.011.
- 2) **En función de cómo se audita** (a criterio del auditor)
  - a) Horizontal: examen detallado de uno o varios elementos del sistema de calidad: formación del personal, equipos de medida y ensayo, actividades de control de calidad, procedimientos de ensayo....
  - b) Vertical: selección al azar de un número representativo de ensayos, certificaciones, etc.... que hayan sido realizadas por la entidad verificando cada aspecto asociado con ellos.

Dentro de los casos anteriores se pueden distinguir dos tipos:

- Auditoría de Adecuación: es la verificación de la documentación del Sistema de Calidad de la organización auditada para comprobar que cumple con la norma de referencia.
  - Auditoría de Conformidad: verificación "in situ" del Sistema de Calidad para ver que cumple tanto con la norma como con la documentación.
- 3) **En función de su alcance:** una auditoría siempre es completa, pero puede revisarse todo el sistema a la vez o en diferentes fases.

- a) Auditoría Parcial: Se verifican sólo algunos elementos del Sistema de Calidad.
- b) Auditoría Global: Se verifica todo el Sistema de Calidad.

4) **En función de cuando se audita:**

- a) Programada: como parte de un plan de auditorías previamente establecido.
- b) Imprevista: como consecuencia de alguna circunstancia imprevista.

Cuando se auditan al mismo tiempo más de un sistema de gestión (por ejemplo un sistema de gestión de calidad y un sistema de gestión ambiental) se denomina Auditoría Combinada.

Si dos o más organizaciones auditoras cooperan para auditar a una sola organización, se denomina Auditoría Conjunta.

La clasificación más habitual es la que viene establecida en base a quién audita, pudiendo tratarse de auditorías internas o externas:

### 2.1. AUDITORÍAS INTERNAS

La Auditoría Interna o de primera parte se realiza por o en nombre de la propia organización para la revisión por la dirección o con otros fines internos. Pueden constituir la base para una autodeclaración de conformidad de la organización. Se trata de una auditoría a un Sistema de Calidad implantado dentro de la propia organización y que está bajo su control. Cliente y auditado pertenecen a la misma organización, aunque el auditor puede pertenecer a otra. (Gabinete de Servicios de la Calidad (GSC), 2015)

Como características propias de las auditorías internas pueden mencionarse:

- La auditoría requiere un análisis global de la situación: no puede conformarse con la definición exclusiva de las desviaciones detectadas, sino que debe incidir en un análisis que determine los puntos fuertes y débiles del laboratorio con respecto a los requisitos establecidos previamente, interrelacionando desviaciones en los distintos apartados que puedan tener causas comunes.
- La auditoría interna puede tener aspecto consultivo: al pertenecer cliente y auditado a la misma organización, pueden establecerse cauces de colaboración en las que el auditor proponga acciones correctoras.

### 2.2. AUDITORÍAS EXTERNAS

Las Auditorías Externas incluyen lo que se denomina auditorías de segunda y tercera parte. Las auditorías de segunda parte se llevan a cabo por partes que tienen un interés en la organización (por ejemplo un cliente u otras personas en su nombre). Las auditorías de tercera parte se llevan a cabo por organizaciones auditoras independientes y externas, como aquellas que proporcionan el registro o la certificación de conformidad de acuerdo con los requisitos de las Normas ISO 9.001 o ISO 14.001. Las auditorías externas se realizan a un Sistema de Calidad implantado fuera de la organización y que no está bajo su control directo. Cliente y

auditado pertenecen y están bajo control de organizaciones diferentes (Gabinete de Servicios de la Calidad (GSC), 2015).

Para determinar la competencia técnica de los organismos evaluadores de la conformidad (OEC) la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), único Organismo Nacional de Acreditación en España, realiza diferentes evaluaciones a esos organismos. Para otorgar la acreditación a los organismos que así lo soliciten ENAC llevará a cabo una **primera auditoría como parte del proceso de acreditación**, cuyo objetivo es verificar el cumplimiento de los requisitos de acreditación. Además podrán realizarse visitas de acompañamiento durante las cuáles se presenciara la realización de actividades de evaluación de la conformidad.

El mantenimiento de la acreditación se estructura en un primer ciclo de cuatro años desde la fecha de acreditación, y ciclos posteriores de cinco años. Las actividades de mantenimiento de llevan a cabo de manera periódica dentro de cada ciclo y consisten en varias actividades de **seguimiento** y una **reevaluación** que se realiza antes de la finalización del ciclo.

La primera **auditoría de seguimiento** se realiza en un plazo inferior a 12 meses desde la acreditación, siempre que desde la realización de la auditoría inicial no hayan pasado más de 15 meses.

Las posteriores auditorías de seguimiento se realizarán no más tarde de 18 meses desde el anterior seguimiento en el primer ciclo de auditoría o 24 meses en los posteriores.

En las **auditorías de reevaluación** el objetivo es confirmar el cumplimiento con lo establecido en la norma de acreditación en su totalidad. El acreditado deberá enviar la solicitud de renovación 4 meses antes de la fecha prevista para la auditoría de reevaluación (ENAC, 2021)

### **2.3. GESTIÓN DE UN PROGRAMA DE AUDITORÍAS**

Según la norma ISO 19011:2011, un sistema de auditorías internas debe definir la forma en que deben realizarse una serie de actividades para conseguir que sean eficaces. Todas estas actividades se agrupan en un **programa** de auditorías.

El programa debe tener un responsable de su gestión y contemplar, al menos, las siguientes actividades:

- Definición de objetivos
- Definición de amplitud del programa: frecuencia de auditorías, número, importancia, complejidad y ubicación de las actividades, reglamentación y otros criterios contractuales, conclusiones de auditorías previas, cambios en la organización o sus operaciones...
- Definición del sistema de organización: responsabilidades, recursos y procedimientos de realización de actividades.

La plataforma informática sEgNAC es una herramienta para la gestión de los registros de auditoría. Permite a entidades y auditores enviar y consultar documentación que se genera

en el proceso de evaluación, como el Programa de Auditoría, el Informe de Auditoría y el Plan de Acciones Correctivas (PAC) y conocer el avance del proceso de evaluación mediante un sistema de avisos.

Algunos aspectos a tener en cuenta son:

Calendario de Auditorías: debe existir un documento donde se indique el calendario en que se realizarán las auditorías durante un año, cubriendo todos los elementos del sistema de forma periódica. La planificación corre a cargo del Responsable de Calidad y debe ser aprobado por la Alta Dirección.

Selección y formación de Auditores: Establecimiento de requisitos de titulación formación y experiencia y sistemática de cualificación.

Documentación: deben existir documentos de apoyo que indiquen: qué y cómo auditar, qué es incumplimiento y los formatos de recogida de información. Para ello se cuenta con documentación de referencia (normas, legislación...), de descripción de actividades (Normalizados de Trabajo (PNT) de Auditorías Internas) y formatos (cuestionario de auditoría, informe de auditoría, de No Conformidad...)

Sistema de Realización:

Las auditorías cuentan con cuatro etapas básicas:

1. Preparación: selección del equipo auditor, definición del objeto y alcance de la auditoría, recopilación de información (normativa, documentación del Sistema de Calidad, informes de No Conformidades abiertas...) preparación de los cuestionarios, fechas y plan de auditoría (lugar de realización).
2. Realización: la auditoría en sí constan de 4 pasos (Gabinete de Servicios de la Calidad (GSC), 2015):
  - 2.1. **Notificación:** comunicación a los responsables del área auditada y con antelación razonable.
  - 2.2. **Reunión inicial:** reunión inicial entre auditores y auditados cuyo objetivo es la confirmación del programa y la aclaración de dudas y dificultades. La reunión es conducida por el jefe del equipo auditor.
  - 2.3. **Desarrollo de Auditoría:** conlleva la recogida de evidencias objetivas para supervisar la realización de actividades, la implantación de procedimientos, el control de elaboración de registros y el cumplimiento de los requisitos.
  - 2.4. **Reunión Final:** su objetivo es presentar las conclusiones a los auditados, así como las desviaciones encontradas en la auditoría. Consta de dos etapas: la primera, la reunión de los miembros del equipo auditor, y la segunda entre auditores y auditados.

3. Informe de Auditoría: Documento generado con los resultados de la auditoría a fin de aportar información detallada de la bondad del sistema, tanto al responsable del área auditada como a la Dirección. Siempre irá fechado y firmado por el Auditor-Jefe
4. Registros de Auditoría: proporciona al laboratorio un historial de prestaciones e identificación de áreas especialmente conflictivas. Debe estar sometida al control y archivo de documentos del Sistema de Calidad del laboratorio.

Una quinta etapa consistiría en el Seguimiento, es decir, establecer un sistema de seguimiento de las desviaciones detectadas. Puede aplicarse un sistema similar al definido para no conformidades (seguimiento y cierre), a cargo del Responsable de Calidad, o bien, la programación de auditorías extraordinarias como sistema de comprobación de cierre de las no conformidades.

### **3. TRABAJOS NO CONFORMES.**

Se define Trabajo No Conforme como aquella desviación no repetitiva y que no afecta gravemente al Sistema. Puede resolverse sobre la marcha (corrección) y quedar constancia en los registros primarios del análisis.

La gestión de los Trabajos No Conformes se orienta al riesgo de tal manera que las acciones a tomar, que podrían ser la detención del trabajo, la repetición del mismo o la retención de los informes, se basan en los niveles de riesgo establecidos por el laboratorio.

Los Trabajos No Conformes están recogidos en el punto 7.10 de la Norma 17.025, y en ella se establece que los laboratorios deben contar con un procedimiento que se debe implementar cuando un aspecto de la actividad del laboratorio o de los resultados del trabajo no cumpla con los procedimientos internos o con los requisitos acordados por el cliente. Este procedimiento debe asegurar que:

- Queden definidas las responsabilidades y autoridades para la gestión de los trabajos no conformes.
- Las acciones se basen en niveles de riesgo establecidos por el laboratorio.
- Se haga una evaluación de la importancia del trabajo no conforme, incluyendo un análisis de impacto sobre los resultados previos.
- Se tome una decisión sobre la aceptabilidad del trabajo no conforme.
- Cuando sea necesario, se notifique al cliente y se anule el trabajo.
- Se defina la responsabilidad para autorizar la reanudación del trabajo.

El laboratorio debe conservar registros del trabajo no conforme y las acciones realizadas. Cuando la evaluación indique que el trabajo no conforme podría volver a ocurrir o exista duda acerca del cumplimiento de las operaciones del laboratorio con su propio sistema de gestión, el laboratorio debe implementar acciones correctivas.

#### **4. NO CONFORMIDADES.**

Según la Nota Operativa NO-11 se define **No Conformidad** como el incumplimiento de los requisitos de acreditación puesto de manifiesto por un conjunto de hechos identificados durante la auditoría (ENAC, 2020).

Los incumplimientos que dan lugar a no conformidades pueden estar referidos a requisitos:

- técnicos
- de gestión
- de acreditación

Las no conformidades se basan en hechos identificados en la auditoría que son comunicados a los interlocutores del Organismo Evaluador de la Conformidad (OEC) en el momento en que se detectan para permitir que se complete la información y se aclaren los puntos de duda o desacuerdo, facilitando la identificación del problema y su alcance. Cualquier discrepancia que pudiese tener el OEC sobre los hechos identificados por el equipo auditor debe ser justificada y puesta de manifiesto durante la auditoría.

Cualquier situación que, de no resolverse, pueda dar lugar a una no conformidad futura o situaciones con evidente potencial de mejora, se documentarán como comentario en el informe de auditoría.

Hay que tener en cuenta que es el OEC el que debe demostrar su competencia y el cumplimiento de los requisitos de acreditación, y es él quien solicita a ENAC que lo compruebe y lo declare públicamente. Por tanto la carga de prueba recae en el OEC, que debe facilitar al equipo auditor toda la información pertinente. La incapacidad de demostrar el cumplimiento de algún requisito es, en sí mismo, un incumplimiento.

##### **4.1. CLASIFICACIÓN DE NO CONFORMIDADES**

Las no conformidades se clasifican en mayores y menores de acuerdo a ciertos criterios:

- **No Conformidad Mayor (NCM)**

Pueden ser relativas a:

- a) **Requisitos técnicos:** si se cuestiona:
  - a. la competencia del personal
  - b. la validez de los métodos de evaluación de la conformidad
  - c. la validez de los resultados de la actividad acreditada
- b) **Requisitos de gestión,** si afecta a:
  - a. los resultados de la actividad acreditada
  - b. ponen en cuestión la actividad de evaluación a lo largo del tiempo
- c) **Requisitos del Proceso de Acreditación** si :
  - a. hay un incumplimiento sistemático de las obligaciones del OEC o si dificulta seriamente el control por parte de ENAC.

- b. si hay un incumplimiento de las normas relativas al uso de la marca de ENAC o a la referencia en su condición de acreditado y siempre que pueda suponer una competencia desleal con otros OEC acreditados.
- c. si hay manipulación, falseamiento u ocultación de registros que sirvan para demostrar el cumplimiento de los requisitos de acreditación.
- d. el incumplimiento de los compromisos con ENAC

Se considerará una NCM especialmente grave si se demuestra que el OEC conocía el problema y no tomó medidas para solucionarlo.

- **No Conformidad menor (NCm)**

Del mismo modo que las NCM, las NCm pueden ser relativas a requisitos **técnicos**, de **gestión** y del **Proceso de Acreditación**.

Las relativas a **requisitos técnicos** son aquellas que no cuestionan la competencia del personal, la validez de los métodos de evaluación de conformidad o la validez de los resultados de la actividad acreditada.

Las relativas a los **requisitos de gestión** se producen de manera puntual y no afectan a los resultados de la actividad ni ponen en cuestión el sistema de gestión ni la consistencia en la prestación de las actividades acreditadas.

Por último las relacionadas con los requisitos del **Proceso de Acreditación** son incumplimientos esporádicos de las obligaciones de los OEC siempre que no impidan o dificulten el control por parte de ENAC y no sea intencionado.

Todas las No Conformidades detectadas en una auditoría deben recibir un tratamiento adecuado coherente con su gravedad y estableciendo acciones para evitar que se repitan. Para ello el OEC debe proporcionar a ENAC suficiente información que justifique que las causas han sido identificadas, que se conoce la extensión del problema y que se han aplicado las acciones adecuadas. Todas las acciones, las decisiones tomadas, y las investigaciones realizadas para tomarlas deben quedar registradas y ENAC debe poder acceder a ellas en cualquier momento. El OEC podría presentar alegaciones a NC con las que no está de acuerdo.

## **5. ACCIONES CORRECTIVAS, DE CONTENCIÓN Y REPARADORAS.**

La definición de las acciones correctivas, de contención y reparadoras están establecidas en la NO-11:

- **Acción correctiva:** acción encaminada a eliminar las causas que han dado lugar a una NC con el fin de prevenir su recurrencia. El objetivo de las acciones correctivas es evitar la recurrencia de los problemas, y por ello es imprescindible la evaluación de las medidas propuestas. Si no fuesen eficaces esas medidas, el laboratorio es responsable de modificar la acción lo que sea necesario y mantener registros de todo ello.

- **Acción de contención:** Acción encaminada a contener o paliar los efectos del problema detectado y evitar su recurrencia y en especial sus efectos sobre la emisión de informes/certificados acreditados hasta que se haya demostrado la implantación de la acción correctiva. Estas acciones pueden incluir controles adicionales, procesos de supervisión reforzados, restricciones temporales de uso en equipos o en cualificaciones del personal. En caso de que el laboratorio presente acciones de contención deberá presentar evidencias de su implantación en un plazo máximo de 3 meses.
- **Acción reparadora:** Acción encaminada a corregir de manera inmediata el efecto provocado por una No Conformidad en el pasado (informes/certificados emitidos, etc.)

Como respuesta a una auditoría, el OEC aportará un **Plan de Acciones (PAC)**. Éste es evaluado por el equipo auditor para determinar si el tratamiento dado a las No Conformidades demuestra que se han resuelto los problemas. Para ello, partiendo de las causas y extensión del problema identificado por el laboratorio, evaluará la coherencia de las acciones y, para NCM, si las evidencias de la implantación aportan confianza. Además se evaluará si las acciones reparadoras son suficientes, adecuadas y, en caso de no haberse establecido, si está justificado. Respecto a las acciones de contención, se determinará si son pertinentes y coherentes con el análisis causas, su extensión y las acciones correctivas tomadas.

El análisis del equipo auditor es revisado por ENAC, y si fuese necesario modificar la clasificación de alguna NC hecha por el equipo auditor, se informará al OEC. Si se pasa una NCm a una NCM de dará un plazo complementario para completar el PAC.

Si en el plazo establecido no se hubieran recibido evidencias de la implantación de acciones para corregir una No Conformidad se realizará una revisión in situ de manera inmediata, que no podrá ser sustituida por una revisión documental.

ENAC podrá verificar el tratamiento dado por una entidad a las no conformidades en cualquier momento posterior a la finalización del plazo de implantación establecido. Si en el plazo establecido el OEC no hubiese aportado a sEgNAC la información solicitada se procederá de dos modos diferentes según el tipo de auditoría realizada:

1. En iniciales y ampliaciones: se dará por cerrado el proceso de evaluación una vez superado el plazo de validez del informe, que se reiniciará con una nueva evaluación cuando el OEC lo solicite.
2. En seguimiento y reevaluaciones: se iniciará el proceso de suspensión de acreditación. Si la información se recibiese antes de que la suspensión se haya ratificado no se hará pública, pero la evaluación de la documentación correrá a cargo del OEC.

Típicamente los procesos de evaluación del PAC y decisión tienen una duración de 40 días.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Blog Calidad y Excelencia. (17 de 07 de 2018). *www.isotools.org*. Obtenido de <https://www.isotools.org/2018/07/17/iso-190112018-vs-iso-190112011-cambios-de-la-nueva-version/>

ENAC. (Julio de 2020). No Conformidades y Toma de Decisión NO-11 Rev.9.

ENAC. (Abril de 2021). PAC-ENAC Procedimiento de Acreditación Rev.5.

Gabinete de Servicios de la Calidad (GSC). (2015). *Implantación de la norma UNE EN ISO/IEC-17025 en el laboratorio: Requisitos de Gestión y Técnicos*. San Fernando de Henares. San Fernando de Henares.

UNE-EN ISO IEC 17025. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*.

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 4**

### **VALIDACIÓN DE ENSAYOS. CRITERIOS DE VALIDACIÓN Y ETAPAS. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

- 1. VALIDACIÓN DE UN ENSAYO**
- 2. CRITERIOS FUNDAMENTALES DE VALIDACIÓN**
- 3. ETAPAS DE LA VALIDACIÓN**
- 4. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO**
- 5. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. VALIDACIÓN DE UN ENSAYO**

Por validación se entiende el conjunto de comprobaciones necesarias para asegurar que el método de ensayo es científicamente correcto en las condiciones en que va a ser aplicado. La validación de un método establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos.

Las características técnicas que pueden formar parte de la validación son: la exactitud, la precisión (repetibilidad, reproducibilidad), la selectividad y especificidad, el intervalo de trabajo, la linealidad, la sensibilidad, los límites de detección y de cuantificación.

Según la norma 17025, la validación es la confirmación a través del examen y aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Cuando aplique, la validación de un método debe incluir la estimación de la incertidumbre. Esta estimación también debe considerar aspectos como la homogeneidad y estabilidad de la muestra.

Los laboratorios, para la realización de sus análisis dentro del marco de la acreditación, disponen de la libertad de seleccionar los métodos que utilizan, en función de: necesidades del cliente, disponibilidad del equipo, aplicación de los resultados.

Los métodos analíticos se pueden clasificar en 5 grupos según su procedencia:

- Métodos internos (no normalizados).
- Métodos normalizados sin modificaciones y con características analíticas (precisión, exactitud, interferencias, etc.) perfectamente conocidas y documentadas.
- Métodos normalizados sin modificaciones pero sin información disponible.
- Métodos normalizados con modificaciones en su alcance, -utilizados fuera de su campo de aplicación, con ampliaciones en el rango de medida, con modificaciones en la sistemática de trabajo, etc.
- Métodos alternativos.

Según la norma 17025, el laboratorio debe validar los métodos normalizados, los métodos desarrollado por el laboratorio y lo métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados.

### Métodos internos

Se debe evaluar la idoneidad del método para su ámbito de aplicación, así como las actividades necesarias a realizar para garantizar su validez técnica ya que no siempre se dispondrá de información previa adecuada y reconocida sobre el funcionamiento.

Se considerará método interno los desarrollados por el laboratorio o por un fabricante o proveedor de equipos, de pruebas rápidas, de forma unilateral y que no disponen del reconocimiento de los métodos normalizados o de los métodos alternativos.

### Métodos normalizados.

Métodos publicados como normas internacionales o nacionales o por organizaciones técnicas reconocidas (ej: ISO, NF, NMKL, UNE, EN, AOAC, APHA, etc).

En la mayoría de los casos se puede considerar que en el desarrollo de los métodos normalizados se han tenido en cuenta todos los aspectos necesarios relativos a la validación y las características del método forman parte de la Norma o están publicadas y se dispone de la información pertinente.

En el caso de que el laboratorio aplique métodos normalizados que dispongan de información, y no se realicen modificaciones, se debe verificar la capacidad para realizar correctamente el ensayo, antes de iniciar los trabajos de rutina. Equivale a una puesta a punto tradicional en la que se ha comprobado que se cumplen los requisitos establecidos en el método oficial o norma, por ejemplo precisión y recuperación.

El uso de métodos normalizados que no disponen de información requiere la obtención de las características desconocidas.

### Métodos normalizados con modificaciones.

Requieren validación, completa o parcial dependiendo de la modificación realizada, así:

Ampliación del rango de medida: Validación de la extensión del rango.

Ampliación del producto / material a ensayar: Validación de la nueva matriz que se introduce.

Cambios en la sistemática de trabajo: Revalidación completa para estudiar el efecto provocado por el (los) cambio (s); aplican los mismos requisitos previstos para procedimientos internos.

### Métodos alternativos.

Son métodos que han sido validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado y son reconocidos formalmente como equivalentes al método de referencia por un organismo competente de acuerdo a unos datos experimentales (por ejemplo, obtenidos mediante ensayos colaborativos).

El Laboratorio debe confirmar que puede aplicar correctamente el método alternativo antes de utilizarlo y, además, se dispondrá de la información facilitada por el fabricante. Se aplicarán los requisitos establecidos para métodos normalizados.

## **2. CRITERIOS DE VALIDACIÓN**

A la hora de llevar a cabo la validación de un método, hay que tener en cuenta lo siguiente:

- Características de funcionamiento: características experimentales que demuestran la aptitud al uso que se destina
- Fiabilidad: Capacidad de mantener los criterios de validación a lo largo del tiempo
- Practicabilidad: Si es fácilmente realizable en la práctica

-Idoneidad: Garantizar que en el momento del análisis responde a los requisitos fijados en la validación

El primer paso en el desarrollo es definir el objetivo. Si se tiene en cuenta las variables que puedan afectar al rendimiento del proceso, se establecen así los criterios que deben tenerse en cuenta para la validación. Se pueden clasificar de la siguiente manera:

-Relativas a la muestra: si son individuales o agrupadas, la composición de la matriz y las interacciones con el analito.

-Relativas al sistema analítico, que incluyen factores físicos, químicos, biológicos y técnicos que afectan a la capacidad de la prueba de detectar en la muestra un analito específico.

-Relativos a la interpretación del resultado de la prueba.

Los criterios para el desarrollo y validación de una prueba son la definición de los propósitos, optimización, estandarización, repetibilidad, sensibilidad analítica, especificidad analítica, umbrales, sensibilidad diagnóstica, reproducibilidad, idoneidad.

Como se ha dicho, aun cuando se está adoptando un método normalizado, es necesario que el laboratorio realice una verificación inicial, y la mejor manera de llevar a cabo la verificación es usando un material de referencia.

### **3. ETAPAS DE LA VALIDACIÓN**

La validación analítica es una actividad planificada, por definición. El protocolo de validación es el plan de trabajo para llevar a cabo la validación o comprobaciones necesarias, según proceda, dirigidas a demostrar que se tiene capacidad para aplicar el procedimiento o norma en las condiciones en las que fue concebido, cumpliéndose de forma rutinaria los requisitos establecidos por el método o norma de referencia.

La diferencia entre “validación” y “comprobación” depende del método seleccionado.

El esquema de un protocolo de validación responderá al siguiente guión:

-Responsable de validación. Persona que planifica y aprueba la validación (pueden ser distintas).

-Objetivo del estudio.

-Disponer de procedimiento interno, original o desarrollando una norma, un método oficial, un método recomendado, una publicación científica, etc. Versión escrita del procedimiento que se desea validar/documentar. Puede ser un borrador previo que incluya el método operatorio, materiales requeridos, etc.

-Materiales y equipos requeridos o referencia al procedimiento que los relaciona.

-Alcance de la actuación. Matrices o familias de productos a las que se aplica el procedimiento. Matrices mínimas requeridas cuando se trata de cubrir un campo genérico tal como “alimentos”. Rango de medida que se pretende alcanzar. Analito/s al que se aplica el estudio.

- Niveles de concentración que hay que comprobar.
- Muestras requeridas para la validación. Identificación de necesidades. Descripción de las muestras (materiales de referencia, muestras preparadas internamente, adición de patrón, etc). La sistemática de preparación interna de muestra debe quedar plenamente documentada.
- Parámetros analíticos a validar en función de la técnica instrumental aplicada.
- Requisitos normativos, en su caso.
- Requisitos "a priori" que hay que cumplir.
- Sistemática de trabajo aplicable. Actividades concretas a realizar. Cálculo y tratamiento estadístico. Especial atención al número de repeticiones requeridas para estimar los parámetros de validación.
- Analistas que realizarán el trabajo experimental.
- Plazos
- Informe de validación.
- Responsables de la realización, revisión y aprobación
- Registros generados (datos primarios, hojas de cálculo, cuaderno de laboratorio, formatos,...) que deben conservarse durante 5 años.

#### **4. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO**

Para demostrar que un método es válido para el uso previsto, tanto la Norma UNE-EN ISO IEC 17025, como ENAC, propone una serie de parámetros a determinar en función del tipo del método utilizado: exactitud, precisión (repetibilidad, reproducibilidad), selectividad y especificidad, intervalo de trabajo, linealidad, LDD y LDQ o incertidumbre. Los valores que deben cumplir dichos parámetros dependerán de las necesidades de la aplicación y del uso previsto.

Los parámetros que es preciso determinar difieren según el alcance del método de ensayo a validar. Los tipos de análisis a considerar serán los siguientes:

- a) Métodos de identificación
- b) Determinación cuantitativa de un componente
- c) Determinación cualitativa de un componente.

##### Veracidad

Veracidad: grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido en una serie de medidas de un determinado material y el valor de referencia o valor considerado real.

Se puede expresar como:

### Recuperación %

$$R\% = \left(\frac{V_m}{V_R}\right) \times 100$$

### Índice compatibilidad o En

$$En = \frac{(V_m - V_R)}{\sqrt{U_m^2 + U_{VR}^2}} \leq 1$$

Siendo  $V_m$ , el valor obtenido en el laboratorio,  $V_R$  el valor de referencia,  $U_m$ , la incertidumbre expandida del laboratorio y  $U_{VR}$  la incertidumbre expandida del valor de referencia.

Para determinar la veracidad son posibles varios caminos. El orden no es casual, supone un orden de preferencia:

1. Analizando un material de referencia certificado (MRC) adecuado. Se obtiene el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor certificado. Se denomina MRC al material en el que se ha certificado una o más de sus propiedades mediante un procedimiento técnicamente válido, y que se acompaña o puede identificarse gracias a un certificado o cualquier otro documento expedido por un organismo autorizado para tal finalidad (BCR, NIST, ASTM, etc).
2. En ausencia del MRC, participando en un ejercicio de inter-comparación con otros laboratorios.
3. Cuando no se dispone de material de referencia certificado y no se han realizado ejercicios de intercomparación, se puede obtener una estimación de la exactitud mediante una muestra de concentración conocida, preparada en el laboratorio por adición de un patrón químico de calidad analítica, al menos, a una matriz lo más próxima posible al tipo de muestra que se desea analizar. Las preparaciones obtenidas constituyen la muestra de ensayo y puede considerarse un material de referencia. (El valor de este ensayo tiene carácter limitado ya que sólo puede utilizarse para determinar la exactitud de las fases del método posteriores a la adición de cantidades conocidas de analito).
4. Comparando los resultados frente a los obtenidos por un método de referencia (método validado o norma alternativa).

### Precisión

Grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento experimental repetidas veces bajo las condiciones establecidas.

-Repetibilidad

Precisión bajo condiciones en las que los resultados se obtienen con el mismo método, el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y durante un corto intervalo de tiempo.

-Reproducibilidad

Precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mensurando, con diferentes operadores, diferentes equipos de medida, en diferentes laboratorios, etc.

Está relacionada con la varianza de los resultados de nuestro ensayo sobre una muestra homogénea.

Es una de las contribuciones de la incertidumbre de ensayo y por tanto, es necesario conocerla y que esté por debajo de un nivel fijado a priori, dependiendo de la utilización que vayamos a hacer de nuestras medidas.

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analizan independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo analista y el mismo instrumento.

El número de repeticiones del análisis deberá ser superior a cinco y la concentración del analito en la muestra problema será similar a la esperada en las muestras a analizar.

Evaluar los posibles resultados dudosos. Eliminar, en su caso, los resultados que se hayan demostrado aberrantes.

A partir de los datos obtenidos se calcula el valor de la desviación estándar de repetibilidad,  $S_r$  y de reproducibilidad,  $S_R$ .

La precisión puede expresarse con el coeficiente de variación de repe y repro, y con la repetibilidad y reproducibilidad.

Coeficiente de variación % de repetibilidad y reproducibilidad:

$$CV_r = \left( \frac{S_r}{\bar{x}} \right) \cdot 100$$

$$CV_R = \left( \frac{S_R}{\bar{x}} \right) \cdot 100$$

Repetibilidad y reproducibilidad:

$$r = 2.83 \times S_r$$

$$R = 2.83 S_R$$

#### Rango de linealidad e Intervalo de trabajo

Proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta proporcionada por el equipo (métodos instrumentales).

Intervalo o rango de concentración de analito para el cual el método es satisfactorio.

- 1º Establecer el rango lineal de trabajo
- 2º Efectuar el análisis n número de veces
- 3º Obtención de la recta de regresión
- 4º Tratamiento estadístico de datos
- 5º Representación grafica
- 6º interpretación estadística

#### **Procedimiento**

-Preparar una serie de soluciones de analito de concentraciones crecientes, incluido un blanco.

-Analizar las soluciones como mínimo por triplicado.

-Hallar la recta de regresión (normalmente por el método de mínimos cuadrados). Normalmente, la recta de regresión es del tipo:

$$Y = a + b \cdot x$$

**Sensibilidad:** pendiente de la curva (b)

**Coefficiente de correlación:** normalmente entre 0,995 y 0,999

**Test de proporcionalidad:** Idealmente el término independiente  $a=0$ . Si en el intervalo de confianza del 95% de este término está incluido el cero se cumple la condición.

**Test de linealidad:**

- Coeficiente de variación de los factores respuesta

Factor respuesta (f) es la relación entre la señal proporcionada por el equipo y la concentración. Coeficiente de variación de f:

$$CV_f \% = \frac{S_f}{f} * 100$$

- Coeficiente de variación de la pendiente  $S_b$  o error (%) de la pendiente

$$S_b \% = \frac{S_b}{b} * 100$$

#### Límite de detección

Concentración mínima del analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada pero no cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.

#### Límite de cuantificación

Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión aceptable bajo condiciones analíticas específicas.

#### **Límite de cuantificación validado**

Es la mínima concentración de analito que se puede analizar con una veracidad y precisión que cumplan con los criterios preestablecidos, o lo que es lo mismo, es la mínima concentración de analito validada en una matriz, y será el punto más bajo del rango de trabajo.

#### Selectividad y especificidad

Capacidad de un método analítico para medir exactamente y específicamente el analito, sin interferencias ni impurezas.

Se puede determinar:

- Utilizando MCR
- Comparando los resultados del análisis de una muestra con y sin moléculas interferentes.

## 5. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

Uno de los requisitos de la 17025 es que los laboratorios dispongan de la incertidumbre asociada a sus métodos analíticos.

Incertidumbre: de una medida es una estimación de la parte del resultado completo que caracteriza al intervalo de valores dentro del cual se encuentra el valor verdadero de las cantidades medidas o mesurando.

Incertidumbre estándar: se expresa como desviación estándar. Es el intervalo de confianza del 65%. u pequeña

Incertidumbre expandida: intervalo que con una alta probabilidad ( $\geq 95\%$ ) incluye al valor verdadero. Se multiplica por un factor K (normalmente 2) la incertidumbre estándar. U mayúscula

La medición de la incertidumbre guarda relación con la “incertidumbre” asociada con los datos generados por un proceso de medición. En química analítica, se define generalmente como la incertidumbre asociada con el proceso de laboratorio pero puede incluir también un componente de incertidumbre asociado con el muestreo. Por tanto, la “estimación” de la incertidumbre describe el espectro en torno a un resultado comunicado o experimental dentro del cual puede esperarse que se encuentre el valor real dentro de un nivel definido de probabilidad.

Comunicando la incertidumbre se pretende proporcionar un mayor nivel de confianza en la validez del resultado comunicado. Las contribuciones a la incertidumbre de los datos son numerosas.

En el laboratorio, siempre se ha sido consciente de la variación de nuestros resultados debido a que en ellos influyen múltiples factores que nos e pueden controlar. De hecho, se clasificaron los errores de las medidas en dos grandes grupos:

### Errores sistemáticos

Que se producían siempre debido a imperfecciones del método, problemas de los equipos, malas prácticas, etc. Se caracterizan por tener un valor definido y una causa asignable y por tener el mismo signo y magnitud para las mediciones repetidas que se realizan exactamente de la misma forma. Se tratan de combatir o minimizar mediante la calibración de equipos y el empleo de patrones o MRs.

### Errores aleatorios

Se caracterizan por no tener un valor definido y una causa asignable. Sólo se podían definir por un rango de variación alrededor de un valor central, pero podían ser tratados según criterios estadísticos.

Para tratar de evaluar los rangos de variación, generalmente, el sistema empleado ha sido:

1. Repetición de ensayos
2. Cálculo de media y desviación estándar
3. Asignación de media como resultado
4. Designación de desviación estándar como índice de variabilidad.

#### CONTRIBUCIONES A LA INCERTIDUMBRE EN LA REPETIBILIDAD

Si sólo tenemos en cuenta la desviación estándar de las repeticiones realizadas sobre la medida, por una persona dentro de una serie de ensayos, estamos considerando exclusivamente una serie de contribuciones que podemos definir:

1. Variabilidad de la muestra
2. Variabilidad a corto plazo en operaciones
3. Variabilidad a corto plazo de respuesta de equipos.

#### OTRAS CONTRIBUCIONES A LA INCERTIDUMBRE

Estas contribuciones pueden ser muy variadas dependiendo del tipo de análisis, equipo, sistema de calibración, frecuencia, etc.

-Calibración

Mediante esta operación, podemos realizar correcciones sobre los valores obtenidos por nuestro equipo y establecer una relación entre respuesta y concentraciones, mediante una recta de calibración.

-Material de referencia o patrón

El valor que utilizamos para realizar nuestras correcciones, es el valor certificado, pero igualmente podría ser válido cualquier valor dentro del intervalo valor certificado  $\pm$  incertidumbre, por lo que importamos esta incertidumbre en nuestra medida al utilizarlo.

-Magnitudes de influencia

Son aquellas que no se miden en nuestro proceso, pero pueden tener influencia en el resultado final: temperatura, presión, humedad,...

-Derivas instrumentales

Si la calibración no se realiza inmediatamente antes de los ensayos o medidas, es lógico suponer que existen pequeñas variaciones en la respuesta de nuestro instrumento debidas al paso del tiempo.

-Métodos y personal

Algunos de los métodos utilizados, requieren la utilización de constantes o tablas, que en sí misma adolecen de un cierto rango de incertidumbre, o mantienen una aproximación simplificada de los métodos de cálculo, que pueden no haber sido compartidos por el resto de laboratorios.

Esto puede generar diferencias que deberán ser corregidas o incluidas en el cálculo de incertidumbre.

-Material

El material que empleamos puede presentar pequeñas diferencias de una a otra unidad, que pueden afectar al resultado, generando así, otra contribución a la incertidumbre.

### ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE

- **Modelo del paso a paso-BOTTOM UP**

Aproximación basada en la obtención de un modelo matemático del procedimiento de medida o ecuación, que relacione todas las contribuciones a la incertidumbre con el resultado final de la medida.

Implica la identificación y cuantificación individual de todas y cada una de las fuentes de incertidumbre que afectan al resultado para, posteriormente, combinarlas adecuadamente obteniendo así la incertidumbre combinada del mismo.

Para poder aplicar esta aproximación, es necesario:

- Conocer el método en profundidad
- Conocer todos los efectos que afectan al resultado
- Cuantificar estos efectos

- **Modelo Top Down o Caja negra**

Basado en los datos de validación del método.

A partir de la validación obtenemos datos de precisión y veracidad que se utilizarán para la estimación de la incertidumbre.

Sesgo (veracidad)

Precisión (reproducibilidad)

$$U(\%)=2 \cdot \sqrt{(CV_R)^2 + \left(\frac{E\%}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{CV_R}{\sqrt{n}}\right)^2 + U_{ad/MCR}^2}$$

Imprescindible demostrar mediante controles de calidad internos y externos que se sigue cumpliendo con los parámetros de validación a lo largo del tiempo.

Los requisitos de los controles de calidad deben ser coherentes con la incertidumbre declarada.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Norma UNE-EN ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Diciembre 2017.
- Curso Sistemas de Calidad en Laboratorios de Ensayo y Calibración. Fundación para el conocimiento Madrid. Abril 2017.
- Curso Validación, Calibración e Incertidumbre en laboratorios. GSC. Julio 2021.

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 5**

### **ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN: CONCEPTO Y TIPOS. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN**

### **2. ENSAYOS COLABORATIVOS**

### **3. ENSAYOS DE APTITUD**

### **4. ENSAYOS DE CERTIFICACIÓN**

### **5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO. GUÍA ENAC-14 Y NOTA TÉCNICA NT-03 DE ENAC**

#### **5.1. ASPECTOS A TENER EN CUENTA PARA LA EVALUACIÓN DE PROVEEDORES**

#### **5.2. ASPECTOS A EVALUAR EN LA PARTICIPACIÓN EN EJERCICIOS DE INTERCOMPARACIÓN**

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN**

La norma UNE-EN ISO/IEC 17043 define los ejercicios de intercomparación como la evaluación mediante mediciones o ensayos sobre el mismo ítem o ítems similares por dos o más laboratorios en condiciones predeterminadas.

La necesidad de confianza constante en el desempeño de los laboratorios no solo es esencial para el laboratorio y sus clientes sino también para otras partes interesadas, como las autoridades reguladoras o las entidades de acreditación de laboratorios. La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 marca como requisito para la acreditación de los laboratorios de ensayo y calibración que los laboratorios participen en ejercicios intercomparativos siempre que existan programas adecuados. Son una herramienta fundamental empleada para mantener y demostrar la competencia técnica de los laboratorios. La participación en ejercicios de interoperación debe formar parte de las actuaciones a realizar descritas por el sistema de calidad de los mismos.

Los ejercicios de intercomparación permiten a los laboratorios evaluar sus procedimientos de análisis, identificar posibles no conformidades y tomar las medidas correctoras necesarias para mantener y mejorar la calidad de sus técnicas. Además, orienta a los laboratorios en el control de sus métodos, calibración de los equipos y la capacitación de los técnicos.

Los laboratorios pueden, mediante estos ejercicios, compararse con otros laboratorios de similares características y ver las diferencias existentes entre los distintos métodos analíticos empleados.

La norma UNE-EN ISO 17025, en su apartado 7.7.2. recoge “El laboratorio debe hacer seguimiento de su desempeño mediante comparación con los resultados de otros laboratorios, cuando estén disponibles y sean apropiados.

Esta herramienta incide por un lado en la capacidad de los laboratorios para la realización de un ensayo concreto obteniendo información externa con la que el laboratorio asegura, en la medida de lo posible, que la validación de su procedimiento y su estrategia de control interno de calidad son suficientemente eficaces y por tanto, puede asegurar con cierto grado de confianza que no tiene un sesgo en sus resultados de rutina.

Los ensayos de intercomparación pueden clasificarse siguiendo muchos criterios, sin embargo, la clasificación más empleada se basa en la definición de los objetivos que persigue el ensayo, pudiendo dividirse en:

- Ensayos de aptitud (determinación de la exactitud de los resultados que se obtienen en el laboratorio).
- Estudios colaborativos (establecimiento de las características de funcionamiento de métodos).
- Ejercicios de certificación (asignación de valor a materiales de referencia).

## **2. ENSAYOS COLABORATIVOS**

Tienen como objeto evaluar un método analítico o una norma obteniendo información sobre sus propiedades. En la práctica, constituye un sistema de validación que da lugar a métodos normalizados. Tiene como objetivo diseñar y poner a punto un método de ensayo así como obtener valores de diversos parámetros del mismo.

La organización del ensayo es externa, de tal forma, que los laboratorios participan en este ensayo siguiendo las pautas marcadas (método analítico normalmente establecido), y si la realización del ensayo ha sido adecuada, el resultado suele ser un método normalizado, y por lo tanto, los laboratorios que han participado satisfactoriamente en dicho ensayo, su método se considera por lo tanto validado. Las normas internacionales suelen preocuparse exclusivamente de la exactitud, repetibilidad y reproducibilidad.

Los requisitos solicitados al laboratorio son diferentes y tendrán que asegurar fundamentalmente que el método se realiza de igual modo, por parte de los laboratorios, con personal entrenado y cualificado y con equipos técnicamente comparables.

Se pondrá especial énfasis en el control de todos los factores que puedan influenciar el resultado y en algunos casos se tratarán de realizar experimentos para obtener información sobre la robustez del método.

Para ensayos cuantitativos, los parámetros fundamentales son repetibilidad, reproducibilidad y sesgo; y para cualitativos, especificidad, sensibilidad, falsos negativos y falsos positivos.

Dentro de los ensayos colaborativos, es necesario el uso de la estadística en dos pasos fundamentales:

-Realización de pruebas de datos aberrantes

No es necesario eliminar aberrantes si tenemos una desviación estándar y el valor de referencia de antemano. Solo se calculan si se tienen en cuenta los resultados de los laboratorios para el cálculo de la desviación.

Hay test que eliminan valores alejados de la media (Dixon, Grubbs y h de Mandel) y los test que eliminan valores obtenidos con un excesivo grado de variabilidad, con respecto al resto (Cochran y la k de Mandel). La norma UNE 82009 establece que primero se eliminan por la varianza y luego por diferencias con la media.

-Realización de cálculos para la determinación de parámetros como pueden ser la exactitud o precisión.

### **3. ENSAYOS DE APTITUD**

Los ensayos de aptitud representan un sistema interlaboratorio para comprobar con regularidad la exactitud que pueden obtener los laboratorios participantes.

En su formato habitual, los organizadores del programa distribuyen alícuotas de un material homogéneo a cada uno de los participantes, que analizan el material en las condiciones habituales de su laboratorio, y comunican el resultado a los organizadores.

Los organizadores recopilan y evalúan los resultados e informan a los participantes del resultado, generalmente en forma de una puntuación relacionada con la exactitud del resultado (Z-Score).

Se debe tener en cuenta que no sólo se obtiene información sobre el funcionamiento del sistema analítico sino también sobre otros aspectos: recepción y tratamiento de la muestra, tratamiento de los datos, informe de resultados, etc.

Principios claves:

- El rendimiento del laboratorio a lo largo de varias rondas y el análisis de tendencias es primordial para determinar el éxito de la participación.
- La documentación y los protocolos deben ser claros para que todas las partes comprendan cómo funciona el programa.
- El organizador debe estar abierto a posibles discusiones entre las partes para obtener un conocimiento más exacto del programa y de su funcionamiento.
- Los laboratorios deben considerar la participación como herramienta de formación, comunicando los resultados al personal y teniéndolos en cuenta para el proceso de mejora.

Usos adicionales:

- Identificación de problemas. Identificación de potenciales fuentes de error que pueden requerir corrección y que no se hubieran detectado de otro modo.
- Comparación de métodos. Métodos nuevos o de uso infrecuente vs. Rutinarios. El propio organizador puede dar datos comparativos de los métodos utilizados por los participantes.
- Intercambio de información con el organizador. Obtención de datos adicionales, reuniones de participantes.
- Mejora de la confianza del personal de laboratorio y dirección, clientes, entidad de acreditación, autoridades competentes.
- Incertidumbre de medida. Comprobación de la incertidumbre declarada; evaluación de incertidumbre.
- Uso de sobrantes. Uso como MR para control de calidad, entrenamiento de técnicos.
- Verificación del rendimiento del método: precisión.
- Evaluación de los resultados a largo plazo. Tendencias y gráficos.

Los laboratorios deben realizar los ensayos según sus métodos, en condiciones normales de trabajo, cumpliendo los requisitos de manipulación y almacenamiento prescritos.

Deben establecerse valores previos, valor asignado a la propiedad medida y un valor asignado a la precisión de las medidas.

La asignación del valor verdadero del ensayo de aptitud puede hacerse de diferentes formas según la norma 17043:

- Valor del material de referencia certificado o de muestra adicionada.
- Valor medio obtenido por un grupo de laboratorios expertos.

-Valor medio del conjunto de laboratorios participantes.

El valor de precisión también puede obtenerse por experimentación, por prescripción o por referencia a una metodología válida.

En estos ensayos se emplea el estadístico Z-SCORE que se utiliza para evaluar la capacidad técnica del laboratorio y clasificar al mismo dentro del conjunto de participantes, o frente a los valores asignados. Este test se basa en la relación entre la diferencia entre el valor del laboratorio y el valor asignado a la propiedad, dividido por la desviación estándar del proceso.

El valor de  $z$  puede ser positivo o negativo, por eso se toma para su análisis el valor absoluto.

- $Z \leq 2$ . El resultado es satisfactorio

- $2 < Z < 3$ . El resultado es cuestionable o sospechoso

- $Z > 3$ . El resultado no es satisfactorio o incorrecto

#### **4. ENSAYOS DE CERTIFICACIÓN**

Tienen como objetivo la certificación de un material de referencia, lo que supone utilizar un procedimiento técnicamente validado para obtener los valores de una o más propiedades de un material, trazables a una exacta realización de la unidad en la que los valores de las propiedades están expresadas y acompañadas de una estimación de la incertidumbre de dichos valores para un determinado nivel de confianza.

Suele organizarlo un laboratorio externo y lo realizan laboratorios de demostrada experiencia en el método. Podemos distinguir los siguientes:

- Certificación por un único método.
- Certificación por ensayo interlaboratorio con varios métodos.
- Certificación por un laboratorio de referencia.

La necesidad de obtener un valor fiable y la dificultad de utilizar métodos absolutos para la medición de elementos o sustancias en matrices complejas, ha llevado en muchos casos a realizar ejercicios de intercomparación entre un conjunto de laboratorios con el objetivo de obtener unos valores asignables a los materiales acompañados de una incertidumbre.

Las técnicas estadísticas en la certificación de materiales de referencia que se aplican en los diferentes pasos del proceso deben ser objetivas y no eliminan datos posiblemente erróneos.

Se realizan diferentes test:

- Test de homogeneidad y estabilidad. Están basados en contraste de hipótesis.
- Test de valores aberrantes y técnicas gráficas. Mediante la utilización de diagramas de frecuencias se puede verificar la existencia de series de valores que podrían hacer imposible la certificación.
- Cálculo de resultados, generalmente basados en el análisis de la varianza de ANOVA.

## 5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO. GUÍA ENAC-14 Y NOTA TÉCNICA NT-03 DE ENAC.

La Guía ENAC-14 y la NT-03 son documentos elaborados por parte de ENAC.

El objetivo de la Guía ENAC-14 es potenciar un uso profesional y sistemático de la participación en intercomparaciones por parte de los laboratorios acreditados, y ayudar a los laboratorios a que establezcan políticas y procedimientos robustos en relación con la evaluación tanto de la calidad de los ejercicios en los que participan como de la fiabilidad de sus resultados.

En cuanto a la NT-03, su objetivo es establecer la política de ENAC sobre la participación de los laboratorios acreditados en ejercicios de intercomparación, y cómo debe evaluarse y tenerse en cuenta tanto dicha participación como los resultados obtenidos en los procesos de acreditación.

El laboratorio debe disponer de un plan de participación en Intercomparaciones. Para elaborar dicho plan, el laboratorio puede clasificar todos los ensayos incluidos en su alcance de acreditación en familias de ensayo o calibración.

Una familia es un conjunto de ensayos en el que cualquiera de sus miembros es razonablemente representativo de los demás en cuanto a la evaluación de la calidad de los resultados obtenidos. Es decir, que el resultado de una intercomparación debe poder estar directamente correlacionado con los otros grupos de propiedades/productos incluidos en la misma familia. En los ensayos, la asignación de familias deberá tener en cuenta: el método de medida, el producto, parámetro, intervalo y condiciones de ensayo.

Una vez establecidas las familias, se deberá definir una frecuencia mínima de participación apropiada para cada una. Según la G-ENAC-14, el laboratorio deberá establecer una frecuencia de participación teniendo en cuenta la complejidad del método, la variabilidad en el tipo de matrices o posibilidad de interferencias de difícil control en la validación, el volumen de actividad y el histórico de intercomparaciones y sus resultados.

### 5.1. ASPECTOS A TENER EN CUENTA PARA LA EVALUACIÓN DE PROVEEDORES

Cuando un laboratorio decide su participación, debe seleccionar las posibles organizaciones capaces de suministrarle los ejercicios de intercomparación que le permiten cubrir los requisitos del programa de participación. Para seleccionarlos, deberá saber la información suministrada por éste: calendario y plazos, número de rondas, rango, nº participantes previstos, tipo de ítem, instrucciones, estadística empleada, etc.

-El **ítem suministrado** debe ser lo más aproximado posible a la que se ensaya en el laboratorio. Al proveedor se le debe solicitar que garantice que el ítem tenga la suficiente homogeneidad y estabilidad para el fin previsto.

-La organización debe asegurar que el **transporte** se realiza en las mejores condiciones posibles para evitar la degradación o cambio que puedan afectar a las características del ítem ensayado.

-El proveedor suministrará las **instrucciones** precisas y adecuadas que ayuden al laboratorio participante en la correcta realización del ejercicio.

-El laboratorio deberá evaluar, a partir de la información suministrada por el proveedor, la **metodología estadística** utilizada para el tratamiento de los datos recibidos, en concreto deberá considerar aspectos tales como:

-Procedimiento que utilizará para estimar el valor asignado del mesurando y su incertidumbre (valor consenso entre laboratorios expertos, valor consenso entre laboratorios y el número de participantes, valor de referencia, valor de preparación, etc.).

-Procedimiento utilizado para identificar los valores estadísticos atípicos (eliminación de datos aberrantes).

-Procedimiento empleado para la evaluación del rendimiento: Se recomienda la participación en ejercicios que determinan la evaluación del objetivo de precisión mediante fuentes externas (por ejemplo: a partir de documentos normativos, legislación...).

-Los **informes** deberán ser claros y comprensibles y deberán incluir, normalmente, la siguiente información:

A Datos proporcionados por el proveedor:

- Nombre y dirección de la organización que gestiona el programa.
- Identificación del informe
- Codificación de cada participante
- Detalle de las pruebas de homogeneidad y estabilidad
- Desarrollo y comentario de los criterios estadísticos utilizados
- Parámetros determinados en el ejercicio y características del ítem
- Calendario de actuaciones
- Exactitudes y precisiones asignadas por el organizador

B Datos proporcionados por los laboratorios participantes:

- Métodos de ensayo empleados e información complementaria.
- Valores de las medidas individuales, centrales e intervalos, incertidumbres, etc.

C Resultados del ejercicio:

- Identificación de laboratorios cuyos resultados se consideran aberrantes
- Número de laboratorios aceptados para el cálculo estadístico de cada parámetro
  - Valor asignado e incertidumbre
  - Desviación estándar del ejercicio
  - Estadística por métodos, si procede
  - Valor del rendimiento (z score, número E, etc...)

->Número de laboratorios participantes: Dada la influencia que el número de participantes tiene en el cálculo del valor asignado por consenso, debería tenerse en cuenta que un número bajo de participantes puede tener una validez estadística limitada y considerarse a modo informativo.

La documentación final, disponible para todos los participantes, debe asegurar que se conserva toda la información necesaria que permita evaluar la eficacia y validez del ejercicio.

## **5.2. ASPECTOS A EVALUAR EN LA PARTICIPACIÓN EN EJERCICIOS DE INTERCOMPARACIÓN**

La participación en ejercicios de intercomparación resulta poco eficaz si el participante no hace un uso completo de los resultados de cada ejercicio. Por este motivo, la evaluación que el laboratorio haga de su participación no debe limitarse al estudio del rendimiento (por ejemplo: valor de z-score, índices de compatibilidad...) realizado por el proveedor.

A continuación se desarrollan aspectos a evaluar tras la participación en un ejercicio de intercomparación y una vez que se ha recibido el informe de resultados.

-Calidad del ítem. Debe comprobarse si el ítem remitido finalmente fue adecuado en cuanto a sus características, nivel de concentración, presencia de interferencias, límites de cuantificación, o resultados de homogeneidad y/o estabilidad.

-Datos de los participantes. Es importante que en el informe se recoja toda la información remitida por los participantes, necesaria para poder llevar a cabo una adecuada evaluación de la participación (resultados excluidos, número de laboratorios con resultados inferiores al límite de cuantificación, capacidades óptimas de medida de los participantes, etc).

### -Tratamiento estadístico

#### **- Valor asignado**

De acuerdo con la norma ISO/IEC 17043 hay 5 formas de obtener el valor asignado:

-Valores conocidos. Con resultados determinados por una formulación específica del ítem.

-Valores de referencia certificados. Determinados por métodos de ensayo absolutos.

-Valores de referencia. Determinados por análisis, medida o comparación con un material de referencia o patrón, trazable a un patrón nacional o internacional.

-Valores consensuados por participantes expertos. Los expertos con experiencia demostrable en la determinación del analito en cuestión, empleando métodos validados conocidos por ser altamente exactos y comparables.

-Valores consensuados por los participantes. Utilizando métodos estadísticos establecidos para evaluar la distribución de los resultados y evitar la influencia de valores extremos evitando también posibles sesgos y estableciendo un número mínimo de participantes.

En los casos en los que el valor asignado se ha obtenido a partir de datos ajenos a los participantes (ejemplo: mediante formulación, material de referencia, proporcionado por el laboratorio de referencia, etc.) debe comprobarse que la incertidumbre de este valor es suficientemente pequeña para realizar una adecuada evaluación de los resultados de los laboratorios.

#### **-Dispersión de los resultados del conjunto de los participantes**

El valor de la dispersión de los resultados obtenidos por el conjunto de los participantes en un ejercicio de intercomparación es un excelente indicador de la calidad del ejercicio. En el caso en que el valor asignado se haya obtenido mediante consenso de los participantes, un valor elevado de dispersión puede influir significativamente en la incertidumbre del valor asignado y por tanto en la eficacia del ejercicio. Por lo que se debe evaluar la relación entre la dispersión obtenida en el ejercicio y la considerada como adecuada al fin pretendido, considerándose adecuada, si se cumple la siguiente expresión.

$$\hat{\sigma}_{ejercicio} > 1.2\sigma_p$$

$\sigma_{ejercicio}$  es la desviación estándar que describe la dispersión de resultados de los participantes.  
 $\sigma_p$  es la desviación estándar diana u objetivo establecida como adecuada al fin pretendido.

Puede suceder que o bien el conjunto de los laboratorios tiene dificultades para obtener la precisión requerida o que los resultados aportados no se corresponden con una distribución normal sino que representan dos o más poblaciones. En estos casos debe comprobarse que la distribución es unimodal y que, por tanto, la moda y la mediana no tienen diferencias significativas.

#### **-Incertidumbre del valor asignado**

El valor de la incertidumbre del valor asignado deberá ser aportado por el proveedor.

$$u_x = \hat{\sigma}_{ejercicio}/\sqrt{n}$$

La incertidumbre del valor asignado obtenida por consenso  $u_x$  en un ejercicio en el que participan  $n$  laboratorios y obtienen una dispersión de resultados que puede describirse mediante la desviación estándar ejercicio  $\hat{\sigma}_{ejercicio}$ , podría aproximarse al valor descrito a la izquierda.

Una relación adecuada entre la incertidumbre del valor asignado ( $U_{xa}^2$ ) y la desviación estándar diana u objetivo establecida como adecuada al fin previsto ( $\sigma_p$ ) sería la indicada a la derecha. Si la relación supera el valor de 0.5, la evaluación realizada debe considerarse solamente a título informativo.

$$u_{x_a}^2/\sigma_p^2 \leq 0.1$$

#### **-Evaluación del rendimiento**

En general, la evaluación del rendimiento se realiza mediante la relación entre dos aspectos diferentes. Por una parte la diferencia entre los resultados ofrecidos por el laboratorio frente al valor asignado considerado como verdadero y por otra un valor de referencia o diana de incertidumbre (habitualmente expresada como desviación estándar) y que utiliza el organizador para considerar que los resultados son adecuados.

A continuación se hace referencia a los dos sistemas de cálculo del rendimiento más extendidos por su aplicabilidad general y amplia aceptación:

**“z-score”** Se define de acuerdo con la ecuación:

$$Z = (x - x_a)/\sigma_p$$

$X_a$  es el valor asignado por consenso (la media robusta de los resultados remitidos por los laboratorios)  
 $\sigma_p$  es la desviación estándar diana o adecuada al fin pretendido.

**“Número E”**. Se define como:

$$E_n = \frac{|x - X|}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

$X$  es el valor asignado

$x$  es la medida del laboratorio participante

$U_{ref}$  es la incertidumbre expandida de  $X$

$U_{lab}$  es la incertidumbre expandida del participante para  $x$

Para llevar a cabo una adecuada evaluación del rendimiento, la incertidumbre de valor asignado no debe distorsionar la evaluación de los resultados. Es importante destacar que la evaluación del rendimiento no debe quedarse única y exclusivamente en comprobar los valores generalmente aceptados como satisfactorios para estos parámetros ( $|z| < 2$  y  $E_n < 1$ ), debiendo evaluarse además la adecuación de otros aspectos del ejercicio comentados anteriormente.

#### **-Evaluación realizada por el proveedor**

La evaluación de la participación en los ejercicios de intercomparación deber realizarse de manera objetiva y en profundidad. Por lo tanto, el laboratorio debe saber qué evaluación se ha llevado a cabo por parte del proveedor, para que los requisitos de calidad sean coherentes con los empleados en el laboratorio. Si el proveedor del ejercicio utiliza un criterio de precisión adecuado al fin pretendido para la evaluación de los resultados de los participantes, se podrá emplear directamente esta evaluación.

Es importante resaltar que este criterio está establecido antes de la realización del ejercicio y que, en ningún caso, depende de los resultados obtenidos por los participantes.

#### **-Informe de la evaluación**

El laboratorio deberá elaborar un informe que incluya la evaluación de los aspectos relevantes descritos anteriormente y las conclusiones obtenidas.

El empleo de un único resultado de evaluación del rendimiento supone una indicación valiosa para el laboratorio pero, sin duda, el seguimiento de un conjunto de resultados aporta una visión de mayor interés para evaluar la robustez del método y su evolución a lo largo del tiempo. En este contexto resultan útiles tanto las herramientas estadísticas como las gráficas.

Debe señalarse que, en general, no se recomienda el uso de puntuaciones combinadas a partir de parámetros de evaluación del rendimiento que provengan de diferentes análisis o parámetros. Asimismo en la interpretación de los resúmenes estadísticos que empleen puntuaciones combinadas debe tenerse precaución para evitar conclusiones incorrectas.

Por ello los cálculos estadísticos que puedan utilizarse (sumatorios cuadráticos, ponderados, etc.) deben tratarse con precaución para evitar la influencia de los valores extremos.

#### **-Actuaciones a llevar a cabo ante la obtención de resultados no satisfactorios**

Si, tras llevar a cabo la evaluación de acuerdo con el apartado anterior, el laboratorio llega a la conclusión de que el ejercicio de intercomparación es correcto y aun así ha obtenido resultados no satisfactorios, debe realizar una investigación que identifique y explique las causas, para poder así establecer las acciones que eviten la repetición de los problemas encontrados.

La investigación ante un resultado no satisfactorio debería incluir distintas etapas como:

- Comprobar que no se produjeron errores en la expresión de resultados o si se siguieron las instrucciones del organizador.
- Verificar que las medidas se realizaron siguiendo el procedimiento que se pretende evaluar y no hubo contaminaciones durante el desarrollo del mismo.
- Comprobar que el instrumento con el que se realizó la medida funcionó correctamente.
- Comprobar los resultados de los controles de calidad internos del método de medida (material de referencia, muestra duplicada, controles entre calibraciones...) y su evolución.
- Comprobar resultados de otros ítems similares ensayadas el mismo día que permita descartar, por ejemplo, falsos negativos/positivos, problemas de contaminación, etc.
- Comprobar los resultados obtenidos en anteriores ejercicios de intercomparación.

Si a pesar de realizar las comprobaciones anteriores el laboratorio, no encuentra el origen del problema, se deberán llevar a cabo estudios más exhaustivos, siempre que sea posible sobre el mismo ítem, que pueden consistir en:

- Si es posible, repetir el ensayo. Si en este segundo ensayo, el resultado es satisfactorio, se podría considerar un error puntual, que el control de calidad interno no hubiera detectado. No obstante, en estos casos, el laboratorio deberá verificar que no se han producido cambios en las condiciones de ensayo (equipos, reparaciones, personal, etc.) que pudieran haber causado el problema. Además será necesario realizar un seguimiento de resultados posteriores para asegurar que el problema no se vuelva a repetir.
- Realizar modificaciones sobre el método de ensayo o algunas de las etapas claves del mismo.

Una vez considerados todos los aspectos y etapas anteriores, el laboratorio debe establecer acciones correctoras, para solucionar el problema y evitar que se repita en el futuro. Así mismo se deberá valorar la eficacia de dicha acciones correctoras, por ejemplo mediante la participación en otro ejercicio de intercomparación.

Igualmente es crucial que el laboratorio tenga en cuenta y resuelva las consecuencias del problema detectado, puesto que durante el periodo transcurrido entre el envío de resultados y la recepción del informe por parte del organizador el laboratorio habrá emitido resultados que podrían haber sido incorrectos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Norma UNE-EN ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Diciembre 2017.
- Norma UNE-EN ISO/IEC 17043. Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los ensayos de aptitud. Noviembre 2010.
- Curso Sistemas de Calidad en Laboratorios de Ensayo y Calibración. Fundación para el conocimiento madri+d. Abril 2017.
- <https://www.enac.es/>
- Guía sobre la participación en programas de intercomparaciones. G-ENAC-14. Rev. 1. Septiembre 2008
- Política de ENAC sobre intercomparaciones. NT-03 Rev. 7 Abril 2021.
- Curso Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. 2021. GSC
- Curso Ensayos de Intercomparación de Laboratorios. GSC. 2021
- Curso Validación, Calibración e Incertidumbre en Laboratorios. GSC. 2021

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 6**

**ESTADÍSTICA. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS APLICADOS AL ANÁLISIS QUÍMICO. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSIÓN. VERACIDAD Y PRECISIÓN. TIPOS DE ERROR. REGRESIÓN LINEAL Y CORRELACIÓN. INTERVALOS DE CONFIANZA.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ESTADÍSTICA**

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

#### 1.2. CONCEPTOS GENERALES

### **2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS APLICADOS AL ANÁLISIS QUÍMICO. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSIÓN**

#### 2.1. MEDIDAS DE POSICIÓN

##### 2.1.1. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL

##### 2.1.2. MEDIDAS DE TENDENCIA NO CENTRAL

#### 2.2. MEDIDAS DE DISPERSIÓN

##### 2.2.1. MEDIDAS DE DISPERSIÓN ABSOLUTAS

##### 2.2.2. MEDIDAS DE DISPERSIÓN RELATIVAS

### **3. VERACIDAD Y PRECISIÓN**

### **4. TIPOS DE ERROR**

#### 4.1. ERRORES SISTEMÁTICOS

#### 4.2. ERRORES ALEATORIOS

### **5. REGRESIÓN LINEAL Y CORRELACIÓN**

### **6. INTERVALOS DE CONFIANZA**

## **1. ESTADÍSTICA**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

La estadística es una disciplina científica que se ocupa de la obtención, orden y análisis de un conjunto de datos con el fin de obtener explicaciones y predicciones sobre fenómenos observados.

La metodología estadística se basa en la recopilación de datos representativos sobre la variable que se quiere estudiar, organización de éstos bajo algún criterio, su presentación en un orden lógico para el estudio, su análisis para lograr una explicación y finalmente su interpretación para llegar a tener ciertas conclusiones que permitan la toma de decisiones y la solución de problemas.

Un proceso de medida es un muestreo estadístico de valores posibles para un mesurando al que se le asigna un representante de los obtenidos.

Podemos diferenciar diferentes tipos de estadística:

#### **a) Estadística descriptiva**

Es la parte de la estadística que establece los modelos que determinan como se distribuye y qué probabilidad tienen los valores de una población. Se encarga de ordenar, presentar, sintetizar y organizar los datos de manera inteligible y científica. Puede hacer una afirmación de qué pasará con una muestra a partir de una población conocida.

#### **b) Estadística inferencial**

Trabaja con los datos de la estadística descriptiva. Permite establecer conclusiones de una población a partir de los datos estudiados de una muestra.

#### **c) Relación y correlación.**

Se determina cómo una variable está en relación con las otras y el grado de concordancia entre estas.

### **1.2. CONCEPTOS GENERALES**

El objetivo de la estadística es la estimación de un parámetro de la población analizando muestras reducidas y representativas. A continuación se describen algunos parámetros importantes de la rama.

#### **Población**

Llamamos población al conjunto de elementos o individuos que poseen una o más características comunes. Los parámetros de la población se muestran con letras griegas.

#### **Muestra**

Al enfrentarnos a una población, nuestra finalidad es conocer ciertas peculiaridades de ella y si su número es muy grande, no podemos analizar todos sus componentes y tenemos que realizar el análisis de una parte de ella y extrapolar los resultados a toda la población.

La muestra es una parte de la población, la cual tiene que ser representativa y aleatoria. Al ser aleatoria lleva asociado la noción de incertidumbre.

Se llama campo de variación al conjunto de valores que puede tomar una variable aleatoria. Si una variable puede tomar cualquier valor entre los límites del campo de variación, se considera de tipo continuo. Si solo puede tomar valores aislados, se considera de tipo discreto.

### Variables

Son las características susceptibles de estudio. Se clasifican en cualitativas o variables categóricas (representan una cualidad o atributo de la muestra) o cuantitativas o numéricas (expresan alguna cualidad que puede medirse o cuantificarse).

### Distribución de datos

Cuando se analiza un conjunto de datos, los datos que se obtienen pueden estar dispersos. Si estos se agrupan en intervalos o clases se tiene una distribución de frecuencias que aclara la forma en la que se produce la dispersión y se pueden ver tres propiedades: tendencia central, dispersión y forma.

#### -Distribución normal.

También llamada campana de Gauss. Se caracteriza por el valor mediano que aparece con mayor frecuencia y por los puntos de inflexión a ambos lados del valor central. La mayoría de las poblaciones analíticas siguen esta distribución. El valor máximo de la curva coincide con la media, que coincide con la moda y la mediana, y es simétrica con respecto a ésta.

#### -Distribución de Pearson

Es una función que para un número reducido de grados de libertad es asimétrica, pero al aumentar los grados de libertad, la distribución se asemeja cada vez más a la distribución normal.

#### -Distribución t de Student

Se utiliza para establecer el intervalo de confianza de numerosos parámetros estadísticos, así como para la comprobación de hipótesis utilizadas en análisis químico.

#### -Distribución de Fisher

Se utiliza principalmente para la comparación de varianzas de dos conjuntos de datos. Es la distribución asociada a una variable aleatoria continua, F, definida a partir de dos variables aleatorias. Existe una distribución F para cada par de valores.

#### -Distribución binomial

Es una distribución que se aplicará siempre que se conozca la probabilidad de aparición de un fenómeno biológico. Tenemos un número fijo de n experimentos y el resultado de cada experimento sólo puede tener dos valores (éxito y fracaso) y el resultado de cada uno es independiente de los anteriores y no influye en los posteriores.

#### -Distribución de Poisson

La distribución de Poisson es una distribución de probabilidad discreta que se aplica a las ocurrencias de algún suceso durante un intervalo determinado. Nuestra variable aleatoria  $x$  representará el número de ocurrencias de un suceso en un intervalo determinado, el cual podrá ser tiempo, distancia, área, volumen o alguna otra unidad similar o derivada de éstas.

## **2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS APLICABLES AL ANÁLISIS QUÍMICO. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSIÓN.**

Un parámetro estadístico es un valor que intenta resumir en un solo número una determinada característica de una variable estadística.

El parámetro estadístico es un pilar fundamental de la estadística. Gracias a los parámetros podemos conocer la situación de la realidad, pues permite interpretar y resumir un gran número de datos que se extraen al analizar una determinada muestra estadística.

Los parámetros estadísticos se dividen en medidas de posición y en medidas de dispersión.

### **2.1. MEDIDAS DE POSICIÓN**

Las medidas de posición son indicadores que permiten resumir los datos en uno solo, o dividir su distribución en intervalos del mismo tamaño.

Dentro de las medidas de posición, podemos encontrar las medidas de tendencia central y las medidas de posición no central.

#### **2.1.1. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL**

Las medidas de tendencia central nos indican el valor alrededor del cual se agrupan todos los datos. Las principales medidas de tendencia central son la media, la moda y la mediana.

-Media aritmética. Es el valor promedio. Se ve afectado por los valores extremos de la serie y si son valores anormales, éstos pueden distorsionar la media aritmética, haciéndola poco representativa.

-Mediana. Es el valor de la distribución ordenada de mayor a menor, que deja a su izquierda y a su derecha la misma frecuencia de observaciones. La mediana tiene la ventaja de que en ella no influyen los valores extremos.

-Moda. Valor más frecuente de la distribución

-Media geométrica. Es la raíz  $n$ -ésima del producto de todos los números. La media geométrica no se ve tan afectada por valores extremos como la media aritmética. El uso principal de la media geométrica es promediar porcentajes, índices y cifras relativas.

#### **2.1.2. MEDIDAS DE TENDENCIA NO CENTRAL**

Las medidas de posición no centrales son los cuantiles. Los cuantiles, para hacernos una idea, realizan una serie de divisiones iguales en la distribución ordenada de los datos. De esta forma, reflejan los valores superiores, medios e inferiores.

Los más habituales son:

Cuartil: Es uno de los más utilizados. Divide la distribución en cuatro partes iguales.

Quintil: Este divide la distribución en cinco partes.

Decil: Estamos ante un cuartil que divide los datos en diez partes iguales.

Percentil: Por último, este cuartil divide la distribución en cien partes.

## 2.2. MEDIDAS DE DISPERSIÓN

Las medidas de dispersión indican la variabilidad de los datos, es decir, si la diferencia entre los valores de los datos es grande o pequeña (distribución dispersa o concentrada).

Las medidas de dispersión permiten calcular la representatividad de una medida de posición. La media aritmética de un conjunto de datos será más representativa cuanto más agrupados estén en torno a ella los valores.

Dentro de las medidas de dispersión, podemos encontrar las medidas de dispersión absoluta y las medidas de dispersión relativas.

### 2.2.1. MEDIDAS DE DISPERSIÓN ABSOLUTAS

Las medidas de dispersión absolutas vienen dadas en las mismas unidades en las que se mide la variable.

-Recorrido. Diferencia que existe entre el valor máximo y el valor mínimo. Es una medida de dispersión absoluta, no está referida al promedio.

-Desviación media. Es la media aritmética de las desviaciones absolutas de cada valor con respecto a la media. A cada dato se le resta la media aritmética sin hacer caso de signos negativos y su suma se divide por el número total de muestras.

-Varianza. Se obtiene sumando las diferencias al cuadrado de cada uno de los datos respecto a su media y dividiendo al final dicho resultado por el número de individuos menos 1.

-Desviación típica. Es la raíz cuadrada de la varianza.

-Desviación estándar. Informa sobre la dispersión de los resultados alrededor del valor medio y tiene en cuenta los grados de libertad. Constituye el mejor índice de dispersión. Se puede considerar a una distribución suficientemente concentrada si su desviación típica no excede de la tercera parte de la media.

### 2.2.2. MEDIDAS DE DISPERSIÓN RELATIVAS

Las medidas de dispersión relativas nos informan de la dispersión, pero lo hacen en términos relativos, es decir, como un porcentaje. Entre las principales medidas de dispersión relativas que conocemos, destacan el coeficiente de variación, el índice de desviación respecto de la mediana, entre otras.

-Coeficiente de variación de Pearson. Es una medida de dispersión adimensional que permite comparar, desde un punto de vista descriptivo, la dispersión de dos o más variables entre sí o la dispersión de una variable en distintos grupos.

### **3. VERACIDAD Y PRECISIÓN**

Un valor medido puede estar desviado de un valor de referencia. El error de la medida es la diferencia entre un valor medido de una magnitud y un valor de referencia. El error de una medida se compone de un error sistemático y un error aleatorio.

El error sistemático es el componente del error de medida que permanece constante o varía de manera predecible y por ello puede aplicarse una corrección. Es el que hace que al midiendo se le otorgue siempre un valor mayor o menor del que realmente tiene. Se puede medir gracias a los valores o patrones de referencia.

Las causas que lo provocan son:

- Error de indicación de los equipos. Se calcula a través de la calibración del equipo.
- Accesorios o instalaciones del equipo.
- Condiciones ambientales

El error aleatorio es el componente de error de medida que, en mediciones repetidas, varía de manera impredecible. Es aquel que hace que al midiendo se le puedan atribuir diferentes valores. Representa la idea de dispersión.

Las causas que lo provocan pueden ser:

- Falta de repetibilidad
- Analista
- Tiempo
- Resolución del equipo de medida.

#### **Veracidad**

Se define veracidad como el grado de concordancia entre el valor medio obtenido a partir de una larga serie de resultados de ensayos y un valor de referencia aceptado.

Un valor de referencia puede ser un valor verdadero del mensurando o un valor asignado mediante un patrón de medida cuya incertidumbre de medida es despreciable.

Para estudiar la veracidad es necesario comparar una media de valores obtenidos con un valor convencionalmente verdadero. Este puede ser:

- El valor asignado a un material de referencia (junto con incertidumbre).
- El valor consenso obtenido en un ejercicio de intercomparación.
- El valor obtenido con un procedimiento de medida de referencia.

La veracidad se expresa numéricamente mediante el error sistemático, que es la diferencia entre la media de resultados de medida obtenidos y un valor convencionalmente verdadero.

#### **Precisión**

Se define la precisión de la medida como la proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

Es habitual que la precisión de una medida se exprese numéricamente mediante medidas de dispersión como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas, que puede ser de repetibilidad, reproducibilidad o condiciones de precisión intermedias.

No debe confundirse el término de precisión con el término de incertidumbre, ya que aunque ambos términos expresan dispersión de un conjunto de valores, la precisión se refiere a la dispersión obtenida experimentalmente en unas condiciones determinadas, es decir, es una variación debida al muestreo estadístico. Mientras que la incertidumbre se refiere a la dispersión de una colección de valores atribuibles al mensurando y teniendo en cuenta factores de variación que no tienen que haber sido evaluados experimentalmente.

#### **4. TIPOS DE ERROR**

La precisión de una medición se determina con facilidad al comparar los datos de experimentos replicados cuidadosamente. Sin embargo, no es tan sencillo obtener un estimado de la exactitud, ya que se debe conocer el valor real de la magnitud que se está midiendo, y es lo que realmente quiere determinarse en el análisis. Los resultados pueden ser precisos sin ser exactos o pueden también ser exactos sin ser preciso.

Es importante conocer que existen dos tipos de errores, el primero, llamado error aleatorio (o indeterminado), provoca que los datos se distribuyan de manera más o menos simétrica alrededor de la media.

Un segundo tipo de error, el llamado error sistemático (o determinado), provoca que la media en un conjunto de datos adquiera un valor diferente del valor aceptado.

Un tercer tipo de error es el error bruto (o grueso). Los errores brutos son diferentes de los indeterminados y de los determinados. Este tipo de errores ocurren ocasionalmente, por lo general son grandes, y pueden provocar que el resultado sea muy alto o muy bajo. Por lo común, son el producto de errores humanos. Los errores brutos provocan la aparición de datos atípicos.

##### **4.1. ERRORES SISTEMÁTICOS**

Los errores sistemáticos tienen un valor definitivo, una causa asignable, y son de la misma magnitud para un conjunto de mediciones de las réplicas analizadas de la misma manera. Este tipo de errores llevan a sesgos en los resultados de medición. Observe que el sesgo afecta de la misma manera a todos los datos en un conjunto y que lleva un signo. Si el sesgo provoca que los resultados sean bajos, tiene signo negativo; si provoca que los resultados sean altos, tiene signo positivo.

Hay tres tipos de errores sistemáticos:

- Los errores instrumentales son el resultado de un comportamiento instrumental no ideal, debido a calibraciones mal hechas o debidas al uso en condiciones inapropiadas de equipos e instrumentos.
- Los errores de método son el resultado del comportamiento físico o químico poco ideal de un sistema analítico.
- Los errores personales son el resultado de la falta de cuidado, la falta de atención o por limitaciones personales por parte del experimentador.

Los errores sistemáticos pueden ser constantes o proporcionales. La magnitud de un error constante permanece esencialmente igual conforme la magnitud medida varía. Para los errores constantes, el error absoluto no varía con el tamaño de la muestra, pero el error relativo varía siempre que se cambia el tamaño de la muestra. Los errores proporcionales aumentan o disminuyen de acuerdo con el tamaño de la muestra que se toma para el análisis. Con los errores proporcionales, el error absoluto varía con el tamaño de la muestra, pero el error relativo se mantiene constante cuando se cambia el tamaño de la muestra.

#### 4.2. ERRORES ALEATORIOS

Los errores aleatorios, o indeterminados, nunca son eliminados totalmente y suelen ser la mayor fuente de incertidumbre en una determinación. Los errores aleatorios son causados por las variables incontrolables que acompañan a cada medición. Incluso si identificáramos las fuentes de errores aleatorios, sería imposible medirlos, debido a que la mayoría de ellos son tan pequeños que no pueden ser detectados individualmente. El efecto acumulado de las incertidumbres individuales, causa que las réplicas fluctúen aleatoriamente alrededor de la media del conjunto.

### 5. REGRESIÓN LINEAL Y CORRELACIÓN

En muchas ocasiones, se desea conocer algo acerca de la relación o dependencia entre dos variables aleatorias, o más de una, consideradas sobre la misma población objeto de estudio. En muchos casos se sospecha que puede existir algún tipo de relación, y por consiguiente, se pretende saber, en el caso de que hay dos variables:

-Si ambas variables están relacionadas entre sí o son independientes.

-Si existe dependencia, es necesario conocer "el grado de relación".

-Si puede predecirse la variable que es considerada como dependiente a partir de los valores de la otra.

Las relaciones estadísticas se obtienen mediante una primera fase de exploración conocida como análisis de correlación. Este análisis da lugar a una función que describe estadísticamente la asociación o relación entre las variables en estudio, y por tanto, su fin no es calcular el error sino obtener predicciones del valor de una variable, para un valor dado de otra.

La correlación lineal es la prueba estadística que describe la relación que existe entre dos variables. Con dicha prueba se puede saber si dos variables están, de alguna forma relacionadas.

La correlación se considera el primer paso para llegar después a poder determinar la fórmula matemática que traduzca tal relación, y que permita estimar el valor en el mismo.

La representación gráfica de la relación entre dos variables forma lo que se denomina una nube de puntos, y el gráfico se denomina diagrama de dispersión.

Para cuantificar la tendencia del diagrama de dispersión se define la covarianza, que es la medida de variación conjunta entre dos variables.

Este coeficiente, llamado coeficiente de Pearson, sólo tiene potencia para analizar si la relación entre las dos variables es o no de tipo lineal. Si las variables son independientes, es un hecho de que el coeficiente de correlación debe ser cero. Sin embargo, si el coeficiente de correlación lineal es 0, no implica que las variables son independientes, simplemente que la relación no es lineal.

### **Regresión lineal**

El paso siguiente en el análisis de dos variables aleatorias es encontrar la función lineal que sirva para modelar la relación entre ellas.

Si existe regresión, a la ecuación que nos describe la relación entre las dos variables la denominamos ecuación de regresión.

La recta de regresión debe tener carácter de línea media, debe ajustarse bien a la mayoría de los datos, es decir, pasar lo más cerca posible de todos y cada uno de los puntos, es decir, que diste poco de todos y cada uno de ellos. Para ello se debe adoptar lo que se conoce como el método de mínimos cuadrados.

El criterio de mínimos cuadrados significa que la suma de los cuadrados de las distancias verticales de los puntos a la recta debe ser lo más pequeña posible. Estas distancias verticales se llaman errores o residuos. Con este método se encuentra la recta que mejor se ajusta a toda la nube de puntos, es decir, la recta que haga mínima la suma de desajustes, los cuales se elevan al cuadrado para evitar que estas diferencias puedan contrarrestarse de forma engañosa en función del signo que las acompaña.

## **6. INTERVALOS DE CONFIANZA**

Los parámetros poblacionales se pueden estimar a partir de los correspondientes estadísticos muestrales. La estimación de un parámetro poblacional dado por un número se denomina “estima de punto” del parámetro, mientras que la estimación por dos números entre los cuales se considera que se encuentra dicho parámetro se llama “estima del intervalo”.

Las estimas por intervalos indican la precisión o exactitud de la estimación y por tanto, son preferibles a las estimaciones puntuales.

El tamaño del intervalo que contenga la media poblacional dependerá por un lado del valor del error estándar que equivale al grado de fluctuación de las medias muestrales y por otro de la confianza con la que se quiera garantizar, que en efecto, el intervalo contenga al parámetro.

Cada estimador muestral tiene un error típico por lo que habrá que definir el intervalo de confianza en el cual se encuentra realmente el parámetro con un nivel o porcentaje de confianza.

El valor del error estándar se calcula a partir de la desviación típica de la muestra y del tamaño de la muestra y la confianza que se suele elegir es del 95%.

Para tamaños de muestra superiores a 30 se calcula el valor de la constante que multiplica la desviación típica a partir de la distribución normal que para un nivel de confianza del 95% corresponde con 1,96 y por esa cifra es necesario multiplicar la desviación típica para calcular el intervalo.

Para tamaños de muestra menores a 30 se emplea la distribución t de Student que es un valor más grande que permitirá conservar el intervalo de confianza 95% puesto que hay una mayor fuente de no confiabilidad. El valor de t de esta distribución depende de dos valores:

-grados de libertad para calcular la desviación típica, es decir cantidad de información utilizada para calcularla

-la confianza con la que se quiere determinar el intervalo (normalmente 95 %).

## **BIBLIOGRAFÍA**

-Curso Sistemas de Calidad en Laboratorios de Ensayo y Calibración. Fundación para el conocimiento madri+d. Abril 2017.

- <https://economipedia.com/>

-Curso calidad en la medida y en los laboratorios. GSC. Abril 2021.

- UNE 82009. Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición.

-Fundamentos de Química Analítica. Novena Edición. Skoog, West.

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 7**

**ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS ENSAYOS. CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS Y EXTERNOS. GRÁFICOS DE CONTROL: TIPOS Y APLICACIONES. EVALUACIÓN DE TENDENCIAS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS.**

1.1. REQUISITOS NORMATIVOS

1.2. SISTEMA DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS ENSAYOS

### **2. CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS Y EXTERNOS**

2.1. CONTROLES INTERNOS

2.2. CONTROLES EXTERNOS

### **3. GRÁFICOS DE CONTROL. TIPOS Y APLICACIONES.**

### **4. EVALUACIÓN DE TENDENCIAS.**

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS**

La evaluación de la calidad de los ensayos, también llamada aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos y calibraciones, es el conjunto de actividades que permiten garantizar que un laboratorio sigue dando resultados correctos en condiciones normales, al mismo tiempo que permite detectar errores existentes durante la realización de las operaciones. Por lo tanto, es una actividad que produce la detección de errores, la mejora continua de los resultados e incluso la realización de acciones preventivas antes de que se produzcan.

Es necesario controlar todo el proceso, no solo controlar los equipos sino controlar, que las demás etapas del proceso, se realicen en condiciones tales, que no se producen desviaciones que saquen nuestros resultados de los objetivos previstos. La calidad del resultado depende no sólo del resultado del equipo y su adecuada calibración, sino de la correcta ejecución de las operaciones previas.

Para confirmar que los resultados siguen siendo correctos se realizan actividades de evaluación de la calidad de los ensayos. Existe una relación estrecha entre validación, calibración y evaluación de la calidad de los ensayos.

La validación establece que al aplicar el método repetitivamente a una serie de muestras, se obtienen unos valores de parámetros adecuados al uso previsto de los resultados obtenidos con el método. Por lo tanto, los parámetros de validación, pueden servirnos para establecer intervalos de control para aplicar a las actividades de evaluación de la calidad de los ensayos, lo que garantiza el mantenimiento de las condiciones de validación.

### **1.1. REQUISITOS NORMATIVOS**

En la norma ISO 17025 se hace eco de la necesidad de establecer unos criterios normativos a la evaluación de la calidad. El laboratorio debe disponer de procedimientos de control de calidad para comprobar la validez de los ensayos y realizar el seguimiento. Los datos obtenidos en la realización de las actividades deben registrarse de manera que puedan detectarse tendencias, y aplicar cuando sea posible, técnicas estadísticas para analizar los resultados. Los controles deben ser planificados y revisados.

Además cita algunas posibles actividades que pueden utilizarse dentro del aseguramiento de la calidad de los ensayos, entre ellas:

- a) Uso de materiales de referencia o materiales de control de calidad.
- b) Uso de instrumentos alternativos que han sido calibrados para obtener resultados trazables.
- c) Comprobaciones funcionales del equipamiento de ensayo y de medición
- d) Uso de patrones de verificación o patrones de trabajo con gráficos de control, cuando sea aplicable.
- e) Comprobaciones intermedias en los equipos de medición.
- f) Repetición del ensayo o calibración utilizando los mismos métodos o métodos diferentes.
- g) Reensayo o recalibración de los ítems conservados.

- h) Correlación de resultados para diferentes características de un ítem.
- i) Revisión de los resultados informados.
- j) Comparaciones interlaboratorio.
- k) Ensayos de muestras ciegas.

La consecuencia de todo ello es que debe existir un procedimiento que describa como se planificarán y realizarán todas las acciones y sus responsables. Se debe establecer también las acciones correctivas que se tomarán en el caso de problemas.

Además de que ENAC exige que existan para cada ensayo o familia de ensayos, actividades planificadas, tanto de control interno, como externo.

## **1.2. SISTEMA DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS ENSAYOS.**

El objetivo general es asegurarse que los productos cumplan con las especificaciones establecidas, normalmente establecidas durante el periodo de validación de un método, a la hora de comprobar que éste es adecuado para el fin previsto.

Se establecen los criterios que se deben de cumplir en cuanto al aseguramiento de la calidad, se establecen las tolerancias para estos criterios, y además se establece la sistemática que se debe seguir en caso de incumplimiento de dichos criterios.

Cada método deberá ir acompañado de los controles de calidad que deberán realizarse, ya sean controles internos inmediatos dentro de la serie analítica, repetición de muestras, o algo esporádico o la evaluación a lo largo del tiempo (gráficos de control).

## **2. CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS Y EXTERNOS.**

Uno de los criterios primordiales para establecer un programa correcto de evaluación de la calidad de los ensayos, es el establecimiento de unos límites apropiados que deban cumplir nuestros resultados. Los límites establecidos, deberán fijarse de manera previa como objetivos a cumplir en el método en cuestión. Posteriormente, durante la validación del método, se establecerán los propios límites del método, siempre cumpliendo con los objetivos establecidos previamente.

Las actividades de control de calidad podemos clasificarlas en controles internos y controles externos.

El control de calidad interno se vale de muestras conocidas que se procesan de manera similar al resto de las muestras. De esta manera, se evalúa principalmente la precisión, ya que lo que se controla es la estabilidad del proceso, ya que normalmente se apela a las muestras corrientes, aunque si se tratara de un material de referencia certificado, también serviría para evaluar veracidad y exactitud. Otra manera usual de evaluar precisión es repitiendo muestras ya hechas con anterioridad y comparar los resultados.

El control de calidad externo necesita un organizador del ensayo interlaboratorio, que se encargue de preparar las muestras, controlar la homogeneidad y estabilidad de las muestras, y enviarlas a todos los laboratorios participantes. Los resultados son enviados al organizador, que luego elabora un informe y lo remite a los participantes, los que de esta manera pueden

saber cómo son los resultados en comparación con el resto de los laboratorios. En los ensayos interlaboratorios, se evalúa la veracidad, y también según el diseño del estudio, se puede evaluar precisión.

Las actividades de control interno periódico y de participación en ensayos de intercomparación deberán ser programadas. La frecuencia debe ser adecuada al número de muestras analizadas, de tal forma, que si la previsión varía, se deberá producir una adaptación de estas actividades.

La realización de estas actividades de aseguramiento de la calidad, tanto internas como externas, es un requisito establecido en la norma 17025, y necesaria para el mantenimiento de la acreditación.

De la misma forma, que se deberán definir las acciones que deben tomarse en caso de incumplimiento de estas actividades. Podrán ser acciones inmediatas o de corto alcance, o no inmediatas y se deberá estudiar el alcance de las muestras que puedan haberse visto afectadas.

Para poder medir la adecuación de las actividades, se establecen criterios y/o límites o intervalos de aceptación o rechazo, como pueden ser diferencias máximas entre resultados, valores de los blancos, diferencias frente a valores de referencia, inclusión en gráfico de control, correlación de magnitudes o aceptación frente a un conjunto de resultados.

## **2.1. CONTROLES INTERNOS**

El control de calidad interno consiste esencialmente en establecer los límites de aceptación para las muestras de control. Lo que se hace es medir periódicamente las muestras de control conjuntamente con las muestras incógnitas ensayadas, asumiendo que si las muestras de control dan resultados que están dentro de los límites de aceptación, entonces los resultados de las muestras incógnitas son confiables. En cada técnica analítica se define la metodología y frecuencia de análisis de las muestras de control.

El control de calidad interno permite estimar la exactitud y la precisión de los resultados de ensayo, mediante la aplicación de cálculos matemáticos y estadísticos a los valores analíticos obtenidos con la finalidad de detectar posibles anomalías o desviaciones del proceso del ensayo.

Un objetivo primordial será mantener el adiestramiento continuo del personal ya cualificado.

Para cada determinación se establecerá previamente el tipo de ensayo (cualitativo o cuantitativo), las características de la determinación (fiabilidad y dificultades del método, muestras y equipos,...), frecuencia de aplicación (métodos de rutina, esporádicos, autoanalizadores, manuales, etc.), disponibilidad de medios de control (tiempos de dedicación, muestras control, MR) y los niveles de exactitud requeridos (veracidad y precisión).

Los controles a realizar serán planificados (requisito de acreditación) y el programa estará sujeto a control de la documentación. Se podrán distinguir controles rutinarios en cada serie de trabajo y controles periódicos.

-Verificación del límite de detección del ensayo (en el caso de métodos cualitativos).

Se trata de comprobar en cada serie de trabajo, que el método es útil para poder dar un resultado positivo en los niveles del límite de cuantificación. Para ello, se refuerza una muestra a los niveles del LQ y su señal deberá ser 5 veces superior al ruido que presente el método.

-Realización de duplicados

Se trata de realizar una repetición del ensayo realizado en condiciones de repetibilidad (duplicado intradía). Se deben definir los criterios de aceptación y rechazo en función de las diferencias obtenidas en la validación del método.

Esta técnica pone de manifiesto los problemas derivados de la heterogeneidad de la muestra y los posibles errores accidentales, ya que no depende sólo de la medida instrumental, sino del proceso analítico completo, desde el principio.

Las diferencias máximas deben tener en cuenta la repetibilidad del proceso de análisis, y se pueden aplicar criterios como el coeficiente de variación, índice de compatibilidad o la inclusión en un gráfico de control.

-Repetición de ensayos

Se trata de volver a analizar una muestra ya analizada en condiciones de reproducibilidad (distintos analistas, distintos equipos,...).

La diferencia máxima admisible es la marcada por la reproducibilidad del proceso de análisis, aunque también puede evaluarse con el coeficiente de variación.

-Adición en muestras

Consiste en la evaluación de la exactitud obtenida en muestras adicionadas con una cantidad establecida del analito en cuestión. La recuperación máxima admisible es establecida en la validación del método.

-Comparación de los resultados obtenidos con el método de trabajo frente a un método de referencia.

Consiste en llevar a cabo el análisis por dos métodos diferentes. Las tolerancias establecidas están relacionadas con el índice de compatibilidad, considerándose adecuado, un IC menor que 1 al tener en cuenta las incertidumbres expandidas de ambos métodos.

-Análisis de muestras ciegas

Se trata de muestras preparadas por personal diferente a la persona que realizará dicho ensayos. Estableciéndose unos criterios de recuperación previamente para poder considerar como válido dicho control.

-Gráficos de control

Consiste en la representación de los resultados obtenidos en cada serie de trabajo para poder evaluar a posteriori la existencia de tendencias a lo largo del tiempo.

#### -Verificación de los blancos

Consiste en la comprobación de que la señal de los blancos es al menos, inferior a 1/3 del nivel del límite de cuantificación del analito.

Lo ideal es que el blanco consista en una muestra (blanco matriz) en la que no esté presente el analito buscado, sino fuera posible, se puede emplear un blanco de reactivos, que sufre el mismo proceso que la muestra, pero sin la propia muestra.

#### -Verificación de la función de calibrado

Comprobación de la linealidad con la evaluación del coeficiente de regresión y el estudio de los residuales de cada punto de la recta y la inyección de un punto del calibrado a final de secuencia para verificar que la linealidad se sigue cumpliendo a lo largo de toda la serie de trabajo.

#### -Valoración de la exactitud mediante el uso de materiales de referencia certificados.

Consiste en la evaluación de la exactitud obtenida en los materiales de referencia, ya que se dispone de un valor con el que se puede comparar. El criterio de comparación puede ser similar a los utilizados para cálculos de la exactitud durante la validación, puede ser con la recuperación o con la evaluación del índice de compatibilidad. Es necesario confirmar previamente que la incertidumbre del MR es adecuada al uso previsto para la realización de este tipo de pruebas.

En caso de no disponer de MRC como tal, pueden emplearse sobrantes de ejercicios de intercomparación, estableciéndose como valor “verdadero” el indicado en el informe del ejercicio.

#### -Correlación

Se trata de evaluar conjuntamente la información obtenida al analizar diversos parámetros para una muestra de ensayo.

Presupone que los resultados de los parámetros han sido obtenidos independientemente pero están relacionados, por lo que deben existir relaciones definidas y cuantificables en los mismos.

### **2.2. CONTROLES EXTERNOS.**

El laboratorio participa en rondas o circuitos de control de calidad externo para asegurar la calidad de sus ensayos. Esto le permite comparar sus resultados con laboratorios similares, monitorizar sus resultados a lo largo del tiempo, detectar tendencias y considerar acciones preventivas o correctivas cuando sea necesario.

La norma 17025 establece que el laboratorio debe tener procedimientos de control de calidad e incluye la participación en los ejercicios de intercomparación.

Esto permite al laboratorio obtener información externa con la que el laboratorio asegura, en la medida de lo posible, que la validación de su procedimiento y su estrategia de control

interno de calidad son suficientemente eficaces y por tanto puede asegurar con cierto grado de confianza que no tiene un sesgo en sus resultados de rutina.

Por otro lado, dicha participación incluye un alto potencial de mejora al obligar al laboratorio, al evaluar los resultados obtenidos después de una participación.

Existen diferentes tipos de ensayos de intercomparación:

-Ensayos de aptitud. Evalúan la competencia técnica del laboratorio. Son realizados en algunos casos a petición de organismo de acreditación, y tienen como fin aportar evidencias objetivas de que los resultados obtenidos por los laboratorios son correctos, dentro de los márgenes de incertidumbres declarados.

-Estudios colaborativos. Evalúan y/o validan un método analítico.

-Ejercicios de certificación. Certifican un material de referencia.

Se debe evaluar la idoneidad y la competencia de los organizadores de ejercicios de intercomparación, y si el proveedor no está acreditado, se debe efectuar un estudio más exhaustivo del informe emitido por dicho proveedor (evaluación de homogeneidad, estabilidad, cómo se ha establecido el valor asignado, etc).

Como se ha comentado, se deben evaluar los resultados obtenidos por el propio laboratorio tras la participación, haciendo uso, en algunos casos de la estadística.

-Estudio del informe y de los valores de Z-Score obtenidos

-Se debe evaluar si el ensayo es adecuado al fin pretendido (matriz y nivel de concentración del analito de estudio).

-Estudio de cómo se ha obtenido el valor asignado

-Número de participantes

-Conocer si se han descartado valores aberrantes.

-Conocer cómo se ha establecido la  $\sigma$  obj.

En el caso de que la evaluación no sea adecuada, se procederá a identificar las causas, se establecerán las medidas correctoras adecuadas, y en caso de que proceda, medidas preventivas.

### **3. GRÁFICOS DE CONTROL. TIPOS Y APLICACIONES.**

Los gráficos de control son un tipo de gráficos basados en el estudio de tendencias, necesarios para que el control de calidad de un laboratorio sea el adecuado.

Por ello, las características específicas de un control de calidad basado en tendencias son las siguientes:

a) Se analizan conjuntos de datos y no datos individuales.

b) Los criterios de aceptación y rechazo son más estrictos que los de datos individuales ya que estadísticamente la media tiene variaciones inferiores a las de los resultados individuales.

c) No se aplican acciones correctivas como consecuencia de incumplimiento de los parámetros de control, ya que se mantiene el resultado de la validación pero existe una alta probabilidad de que potencialmente con el paso del tiempo esto no se cumpla.

d) Utiliza los mismos datos que el control individual así como las mismas herramientas, control de calidad por tolerancias, control de calidad por gráficos de control o control de calidad mediante ensayos de intercomparación y se diferencian exclusivamente en el análisis que se realiza de los datos.

Los gráficos de control son una herramienta de evaluación de la calidad importante y consisten en representar gráficamente los resultados obtenidos al ensayar una muestra, consecutivamente en el tiempo dentro de un gráfico de características determinadas. Se basan en la asunción de que los datos siguen un modelo de probabilidad. Un gráfico de control es un dibujo para determinar si el modelo de probabilidad (variabilidad) es estable o cambia a lo largo del tiempo.

La evaluación de tendencias en el análisis de muestras con valor de referencia (materiales o muestras adicionales) se basa en la variabilidad de la media de los resultados obtenidos, que es inferior a la variabilidad de los resultados individuales.

Antes de su utilización, para definirlos, puede ser necesario hacer un número de experimentos (en torno a 15) en las condiciones de aplicación, para así obtener valores de variabilidad adecuados, o bien utilizar la precisión de validación.

La distribución de los resultados es aproximadamente normal, es simétrica respecto a la media y su varianza es finita (ambos valores conocidos).

Con estas suposiciones y en función de los conceptos estadísticos explicados anteriormente, podremos concluir que las variaciones producidas en el resultado de nuestra medida deberán estar dentro de ciertos límites, con un cierto grado de probabilidad seleccionada, si no existen otras influencias distintas de las causas de variabilidad "natural".

En caso contrario podremos deducir que existen influencias externas a nuestro proceso, que producen una variabilidad asignable.

La principal función de los gráficos de control reside en su capacidad de detectar desviaciones respecto del estado de control estadístico; no siendo una técnica diseñada para controlar la exactitud de resultados individuales.

Existen diversos tipos de gráficos, los habitualmente utilizados en el laboratorio son los de Shewart. En ellos, las variables de interés obtenida a partir del ensayo de la muestra o muestras analizadas, con respecto al tiempo pueden ser diferentes:

-Resultado único

-Media de resultados

-Desviación estándar de los resultados

-Recorrido

-Recuperación

Los gráficos de Control de Shewart se obtienen mediante la representación de los resultados obtenidos en el proceso a intervalos regulares, por tiempo (horas) o cantidad (lotes). Cada subgrupo consiste en un número determinado de resultados. En general, en análisis no se realizan repeticiones, por lo que los subgrupos tienen un número de resultados igual a 1.

El método del gráfico de control ayuda a evaluar si el proceso continúa bajo control estadístico a un nivel especificado y en el caso de los laboratorios, el mantenimiento de los criterios de validación.

Estos gráficos contienen una línea horizontal central que define la mejor estimación del valor de la variable elegida (VALOR CENTRAL). Alrededor de esta línea se localizan otras cuatro líneas que constituyen dos límites llamados comúnmente de aviso y de acción o control superiores e inferiores.

El valor central será el valor de referencia de la muestra, o de un material de referencia o sobrante de ejercicio de intercomparación, sino, será la media de los primeros resultados obtenidos en condiciones adecuadas de reproducibilidad.

En cuanto a los límites de aviso y acción, se tendrá en cuenta la variabilidad existente a la hora de construir este gráfico (primeros valores), y se establecerá el límite de aviso como  $\pm 2\sigma$  y los límites de acción como  $\pm 3\sigma$ , alrededor del valor central.

Estos gráficos también podrán construirse en términos relativos, aplicando como valor central la exactitud o recuperación media obtenida en validación, y como límites de aviso y acción  $2 \cdot CV(\%)$  y  $3 \cdot CV(\%)$ .

Además, se pueden construir gráficos que representen tendencias de distintos controles de calidad, como son los índices de compatibilidad, los Z-SCORE, y sus límites de aviso y control se corresponderán con los valores adecuados de estos parámetros para considerar que el aseguramiento de la calidad es adecuado.

De esta forma, cada vez que se realice un análisis de control, los datos se representarán en el gráfico de control, y con una inspección visual, el gráfico proporciona, sin necesidad de cálculos, información sobre la evolución de nuestro proceso a lo largo del tiempo, ya sea como tendencias sistemáticas, así como mejoras en la repetibilidad por aumento de la experiencia, o problemas existentes en determinados períodos de tiempo.

Existen una serie de reglas o normas que permiten desarrollar un seguimiento y aplicación de los gráficos de control. Todas ellas están basadas en la probabilidad que pueden tener una serie de sucesos de repetirse de forma independiente, y pueden variar dependiendo de la organización.

-Un resultado fuera de límite de aviso no requiere ninguna acción siempre que el siguiente esté dentro de los límites.

-Dos resultados fuera de los límites de aviso indican tendencias en el proceso: Si están en el mismo lado, indica una deriva o error sistemático. Si están en lados distintos indican aumento de las causas que producen error aleatorio.

-Un resultado fuera del límite de acción, indica que el sistema está fuera de control estadístico, lo que conlleva al establecimiento de una acción correctiva.

-Ocho puntos del mismo lado de la línea central indica la existencia de una tendencia en el análisis.

-Cinco puntos con desplazamiento en la misma dirección, indica también una tendencia en la realización del análisis.

Con la elaboración de estos gráficos de control se consigue una evaluación de la calidad a lo largo del tiempo para cada tipo de análisis, consiguiendo con ello, la detección de posibles tendencias que puedan existir.

#### **4. EVALUACIÓN DE TENDENCIAS**

Se llama serie temporal, serie cronológica, serie histórica o serie de tiempo a una sucesión de observaciones de una variable ordenadas en el tiempo que pueden representar la evolución de una variable a lo largo del tiempo. Interesa su análisis para posibilitar la descripción de la evolución histórica del fenómeno que expresa la serie.

El análisis de tendencias se usa para mostrar gráficamente las tendencias en los datos y ayuda a predecir valores fuera de la muestra de datos. Este tipo de análisis también se conoce como análisis de regresión, que es una forma de análisis estadístico usado para predecir.

Existen dos objetivos básicos para aislar el componente de la tendencia de una serie cronológica:

-Identificar la tendencia y utilizarla.

-Eliminar la tendencia, de manera que se puedan estudiar los otros componentes de una serie cronológica.

Normalmente, la mejor forma de comenzar a analizar los datos de una serie temporal es representar las observaciones vs. el tiempo a fin de detectar tendencias, patrones estacionarios, y outliers.

En el análisis de las series temporales se considera que las observaciones contienen: un patrón sistemático, y un componente de error aleatorio al que llamaremos ruido.

Los gráficos de control, ya explicados anteriormente, son un tipo de gráficos basados en el estudio de tendencias, necesarios para que el control de calidad de un laboratorio sea el adecuado. Se trata de la forma más habitual de controlar tendencias en los laboratorios de análisis de rutina de diferentes tipos de compuestos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

-Norma UNE-EN ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Diciembre 2017.

-Curso Sistemas de Calidad en Laboratorios de Ensayo y Calibración. Fundación para el conocimiento madri+d. Abril 2017.

-<https://www.enac.es/>

-Curso Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. 2021. GSC

-Curso Ensayos de Intercomparación de Laboratorios. GSC. 2021

-Curso Validación, Calibración e Incertidumbre en Laboratorios. GSC. 2021

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 8**

**MÉTODOS DE ANÁLISIS. TIPOS. ORGANIZACIONES IMPLICADAS EN LA NORMALIZACIÓN. TRASPOSICIÓN A LA LEGISLACIÓN COMUNITARIA Y NACIONAL**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS

### **2. NORMALIZACIÓN**

2.1. NORMAS EN EUROPA

2.2. TIPOS DE ORGANIZACIONES IMPLICADAS EN LA NORMALIZACIÓN.

2.3. TRASPOSICIÓN A LA LEGISLACIÓN COMUNITARIA Y NACIONAL.

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS**

### **1.1 INTRODUCCIÓN.**

De acuerdo con el Reglamento (UE) 2017/625, los métodos de análisis, ensayo y diagnóstico de laboratorio utilizados durante los controles oficiales cumplirán la normativa de la Unión por la que se establecen dichos métodos o sus criterios de funcionamiento. De no existir, los laboratorios oficiales utilizarán uno de los siguientes métodos, en función de su idoneidad para sus necesidades específicas de análisis:

- a)** los métodos disponibles que se ajusten a las normas o los protocolos pertinentes internacionalmente reconocidos, incluidos los aceptados por el Comité Europeo de Normalización (CEN), o los métodos pertinentes desarrollados o recomendados por los laboratorios de referencia de la Unión Europea y validados conforme a protocolos científicos aceptados a escala internacional.
- b)** de no existir las normas o protocolos mencionados previamente, se emplearán los métodos que cumplan las normas establecidas a escala nacional o, de no existir dichas normas, los métodos pertinentes desarrollados o recomendados por los laboratorios de referencia nacionales y validados conforme a protocolos científicos aceptados a escala internacional, o los métodos pertinentes desarrollados y validados con estudios de validación de métodos realizados por el laboratorio o entre varios laboratorios conforme a protocolos científicos aceptados a escala internacional.

Cuando sean necesarios con carácter de urgencia análisis, ensayos o diagnósticos de laboratorio y no exista ninguno de los métodos anteriormente mencionados, el laboratorio nacional de referencia o, si no existe laboratorio nacional de referencia, cualquier otro laboratorio designado podrá utilizar otros métodos diferentes hasta que se valide un método apropiado conforme a protocolos científicos internacionalmente aceptados.

Siempre que sea posible, los métodos utilizados para los análisis de laboratorio y los resultados de las mediciones se deben caracterizar por los siguientes criterios:

- Exactitud (veracidad y precisión).
- Aplicabilidad (matriz y gama de concentración).
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Precisión. Los valores de precisión se obtendrán de un ensayo colectivo realizado de acuerdo con un protocolo internacionalmente reconocido para este tipo de ensayo, como la ISO 5725 «Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos de medición y sus resultados», o bien, si se han establecido criterios de funcionamiento relativos a los métodos de análisis, se basarán en pruebas de cumplimiento de dichos criterios.
- Repetibilidad y reproducibilidad. Los valores de repetibilidad y reproducibilidad se expresarán en una forma reconocida internacionalmente, por ejemplo, intervalos de confianza del 95 %, tal como los define la norma ISO 5725.

- Recuperación.
- Selectividad.
- Sensibilidad.
- Linealidad.
- Incertidumbre de medición.
- Otros criterios que puedan adoptarse según las necesidades.

## **1.2. CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS.**

En la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 se establece que “El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto”. De este modo, el laboratorio debe tener en cuenta el ámbito de aplicación, la selección de los procedimientos de ensayo y su validación.

La CGA-ENAC establece una clasificación de los métodos de ensayo en función de su validez. La naturaleza y extensión de las actividades de validación, así como las características de funcionamiento a confirmar, dependerán del tipo de método seleccionado. De este modo, el nivel de actividades que ENAC requerirá a la hora de demostrar la validez de dichos métodos dependerá del nivel de confianza del método.

**a) Métodos normalizados.** Son métodos que gozan de reconocimiento nacional o internacional y son ampliamente aceptados. Se trata de métodos en vigor publicados:

- en normas internacionales, regionales o nacionales (UNE, EN, ISO, etc.)
- por organizaciones técnicas reconocidas que pueden ser centros de investigación, universidades, fabricantes, diseñadores, o compradores del producto a ensayar, la Administración, laboratorios de referencia oficialmente designados como tales, etc. y su aceptación por el sector técnico en cuestión debe estar fuera de toda duda para ser aceptados por ENAC como fuente fiable de elaboración de métodos normalizados.,
- en textos o revistas científicas pertinentes aceptados por el sector técnico en cuestión o los especificados por los fabricantes de equipos.

**b) Métodos internos basados en métodos normalizados.** Se trata de métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están claramente basados en métodos normalizados, por lo que su validez y adecuación al uso se justifican por referencia al método normalizado. no suponen una modificación técnica respecto del método de referencia que ponga en cuestión su validez técnica. Deben mantenerse actualizados en relación con el método de referencia en que se basan.

De acuerdo con la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, “el laboratorio debe verificar que puede llevar a cabo apropiadamente los métodos antes de utilizarlos, asegurando que se pueda lograr el desempeño requerido. Se deben conservar registros de la verificación. Si el método es modificado por el organismo que lo publicó, la verificación se debe repetir en la extensión necesaria”. Este requisito es de aplicación tanto para métodos normalizados como para métodos internos basados en métodos normalizados.

Para estos dos tipos de métodos no es necesario llevar a cabo una validación completa. Al laboratorio le basta con confirmar que es capaz de aplicar correctamente los métodos antes de utilizarlos para los ensayos, por lo que debe determinar las características de funcionamiento del método asegurando que proporcionan resultados con las calidades requeridas en relación a linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, etc.

**c) Métodos internos desarrollados por el laboratorio (in house).** Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio pero distintos de los anteriores. No disponen del reconocimiento de los métodos normalizados.

En el caso de métodos internos desarrollados por el laboratorio se requiere una validación completa. El laboratorio deberá disponer de evidencias de haber evaluado su idoneidad con el fin propuesto, empleando sistemáticas de validación reconocidas. ENAC deberá tener acceso a las evidencias que demuestren que dichos métodos han sido adecuadamente validados. El laboratorio deberá disponer información suficiente sobre el trabajo experimental realizado para la validación del método, así como de las evidencias de su adecuado funcionamiento en el laboratorio.

La elección de un método desarrollado por el laboratorio cuando existe un método normalizado debe ser justificada técnicamente. Además, en determinadas circunstancias y entornos técnicos, por ejemplo, cuando existe un amplio consenso científico sobre el método a seguir o cuando así lo aconseje el entorno regulatorio o las expectativas del mercado, ENAC puede no aceptar solicitudes de acreditación basadas en estos métodos.

## **2. NORMALIZACIÓN.**

### **2.1. NORMAS EN EUROPA.**

Las normas son directrices voluntarias por las que se establecen especificaciones técnicas aplicables a productos, servicios y procesos. Las normas las elaboran unas organizaciones privadas de normalización, generalmente por iniciativa de los interesados que ven la necesidad de aplicarlas.

Aunque las normas como tales son voluntarias, aplicarlas demuestra que los productos y servicios poseen un cierto nivel de calidad, seguridad y fiabilidad. Además, las normas contribuyen a proteger el medio ambiente y la salud de los consumidores y permiten mejorar el acceso a los mercados ya que, con ellas, los productos o servicios son compatibles y comparables.

El principal objetivo de la normalización es la definición de especificaciones técnicas o cualitativas voluntarias con las que pueden ser conformes actuales o futuros productos, procesos de producción o servicios.

La normalización europea se fundamenta en los principios reconocidos en el campo de la normalización por la Organización Mundial del Comercio (OMC): coherencia, transparencia, apertura, consenso, aplicación voluntaria, independencia respecto de los intereses particulares y eficacia.

## **2.2. TIPOS DE ORGANIZACIONES IMPLICADAS EN LA NORMALIZACIÓN.**

El Reglamento (UE) 1025/2012 sobre la normalización europea, establece normas relativas a la cooperación entre las organizaciones europeas de normalización, los organismos nacionales de normalización, los Estados miembros y la Comisión.

En este reglamento se define “norma” como una especificación técnica adoptada por un organismo de normalización reconocido, de aplicación repetida o continua, cuya observancia no es obligatoria, y que reviste una de las formas siguientes:

- a) norma internacional.** Norma adoptada por un organismo internacional de normalización: la Organización Internacional de Normalización (ISO), la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) y la Unión Internacional de Telecomunicaciones (UIT).
- b) norma europea.** Norma adoptada por una organización europea de normalización:
  - Comité Europeo de Normalización (CEN)
  - Comité Europeo de Normalización Electrotécnica (Cenelec)
  - Instituto Europeo de Normas de Telecomunicación (ETSI)
- c) norma armonizada.** Norma europea adoptada a raíz de una petición de la Comisión para la aplicación de la legislación de armonización de la Unión.
- d) norma nacional.** Norma adoptada por un organismo nacional de normalización. A nivel nacional, la normalización está gestionada por los organismos nacionales de normalización, que adoptan y publican normas en cada país, incorporan todas las normas europeas mediante normas nacionales idénticas y retiran cualquier norma nacional que entre en conflicto con ellas. Los Estados miembros notificarán sus organismos de normalización a la Comisión, la cual publicará una lista de los organismos nacionales de normalización y toda actualización de dicha lista en el Diario Oficial de la Unión Europea.

La **Asociación Española de Normalización (UNE)** es el único Organismo de Normalización en España, y como tal ha sido designado por el Ministerio de Industria Comercio y Turismo ante la Comisión Europea. UNE posee el reconocimiento oficial para emitir normas nacionales, denominadas normas UNE, y es el organismo de normalización español en el Comité Europeo de Normalización (CEN), en el Comité Europeo de Normalización Electrotécnica (CENELEC), en el Instituto Europeo de Normas de Telecomunicaciones (ETSI), en la Comisión Panamericana de Normas Técnicas (COPANT), así como en la Organización Internacional de Normalización (ISO) y en la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC).

### **2.3. TRASPOSICIÓN A LA LEGISLACIÓN COMUNITARIA Y NACIONAL.**

La Unión Europea se fundamenta en el Estado de Derecho. Por ello, las actuaciones de la UE tienen como base los Tratados democráticamente aprobados por sus miembros. La legislación de la UE contribuye a lograr los objetivos de los Tratados y lleva a la práctica las políticas de la UE.

Hay dos tipos principales de Derecho de la UE:

- 1) Derecho primario.** La legislación de la UE tiene su origen en los Tratados, que reciben por ello la denominación de Derecho primario. Estos acuerdos vinculantes entre los Estados miembros establecen los objetivos de la UE, las normas aplicables a sus instituciones, la manera en que se toman las decisiones y la relación entre la Unión y sus integrantes.
- 2) Derecho derivado.** Constituido por el corpus legislativo que emana de los principios y objetivos de los Tratados. Está integrado por:
  - **Reglamentos.** Actos jurídicos que se aplican de manera automática y uniforme en todos los países de la UE desde su entrada en vigor, sin necesidad de incorporación al Derecho nacional. Son obligatorios en los Estados miembros.
  - **Directivas.** Imponen a los Estados miembros de la UE la consecución de un determinado resultado, dándoles libertad para elegir los medios. Para alcanzar los objetivos fijados por cada directiva, los países de la UE deben adoptar medidas que permitan incorporarla al Derecho nacional (transposición). Las autoridades nacionales están obligadas a comunicar tales medidas a la Comisión Europea. La transposición al Derecho nacional debe producirse en el plazo establecido en la propia directiva, por lo general de dos años. En caso de que un Estado miembro no incorpore una directiva a su Derecho interno, la Comisión puede incoar un procedimiento de infracción.
  - **Decisiones.** Actos jurídicos vinculantes aplicables a uno o varios países, empresas o particulares de la UE. Deben notificarse a los interesados y surten efecto a partir de su notificación. No requieren transposición al Derecho nacional.
  - **Recomendaciones.** Permiten a las instituciones de la UE dar a conocer sus puntos de vista y sugerir una línea de actuación sin imponer obligaciones legales a quienes se dirigen. No son vinculantes.
  - **Dictámenes.** Instrumento que permite a las instituciones de la UE emitir una opinión, sin imponer obligación legal alguna sobre el tema al que se refiere. Los dictámenes no son vinculantes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Web oficial de la Unión Europea. [https://european-union.europa.eu/index\\_es](https://european-union.europa.eu/index_es)

<https://www.une.org/>

Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión de 22 De Marzo De 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE.

Reglamento (UE) 2017/625, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.

Reglamento (UE) 1025/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2012 sobre la normalización europea, por el que se modifican las Directivas 89/686/CEE y 93/15/CEE del Consejo y las Directivas 94/9/CE, 94/25/CE, 95/16/CE, 97/23/CE, 98/34/CE, 2004/22/CE, 2007/23/CE, 2009/23/CE y 2009/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y por el que se deroga la Decisión 87/95/CEE del Consejo y la Decisión n o 1673/2006/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.

Reglamento (CE) 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. CGA-ENAC-LEC Rev. 10, Marzo 2021.

Laboratorio de ensayos en el ámbito de la Sanidad Animal: Directrices para la acreditación. CEA-ENAC-22 Rev. 1, Mayo 2017.

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 9**

**NORMATIVA DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO APLICADA A LOS LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS.**

**FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD DE PRODUCTOS QUÍMICOS.**

**GESTIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS EN EL LABORATORIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

- ▶ **NORMATIVA DE SEGURIDAD E HIGIENE (SHT) EN EL TRABAJO APLICADA A LOS LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS.**
- ▶ **FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD (FDS) DE PRODUCTOS QUÍMICOS.**
- ▶ **GESTIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS (RRPP) EN EL LABORATORIO**

## **ÍNDICE**

### **1º ▶ AL APARTADO 1º (SHT)**

- 1.1. INTRODUCCIÓN A LA SHT (o a la PRL, o a la SST)
  - 1.1.1. PREVENCIÓN VERSUS PROTECCIÓN
- 1.2. PELIGRO Y RIESGO
- 1.3. PREVENCIÓN (PRL o a la SHT, o a la SST) EN EL LABORATORIO
  - 1.3.1. FACTORES DE RIESGO
  - 1.3.2. TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE PRL (o DE SST)
  - 1.3.3. PRINCIPIOS DE LA ACCIÓN PREVENTIVA
  - 1.3.4. PILARES BÁSICOS DE LA GESTIÓN PREVENTIVA EN LA ORGANIZACIÓN (LABORATORIO)

### **2º ▶ AL APARTADO 2º (FDS)**

- 2.1. INFORMACIÓN DE PPQQ
  - 4.1. ETIQUETADO DE PPQQ
  - 4.2. FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD (FDS) DE PPQQ

### **3º ▶ AL APARTADO 3º (RRPP)**

- 3.1. RESIDUOS PELIGROSOS GENERADOS EN LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS
- 3.2. CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS
- 3.3. GESTIÓN INTERNA DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS

### **4º ▶ BIBLIOGRAFIA**

## 1. APARTADO 1º (SHT)

### 1.1. INTRODUCCIÓN A LA SHT (o a la PRL, o a la SST)

En laboratorio como cualquier organización en todo el territorio nacional rige la Ley de Prevención de Riesgos Laborales (PRL) y todo un extenso y completo desarrollo de la misma en forma de Reales Decretos.

En la propia AGE, Administraciones Públicas decidió aplicar todo un Sistema de Gestión de Prevención de Riesgos Laborales (SG-PRL) propio a auditar por el antiguo INSHT (actual INSST).

La **Seguridad y Salud en el Trabajo “SST”** (también, **Seguridad y Salud Laboral, Seguridad y Salud Ocupacional**, entre otros términos actuales, y otros más en desuso, como **Seguridad e Higiene en el Trabajo SHT**) y posiblemente el que más se utiliza hoy día es, la **Prevención de Riesgos Laborales “PRL”**.

Todos los términos anteriores se podrían concretar que son un área multidisciplinar relacionada con la seguridad, salud y la calidad de vida de las personas en el trabajo. La seguridad y salud ocupacionales también protege toda persona que pueda verse afectada por el ambiente en el trabajo.

La **salud** se definió, en el preámbulo de la creación de la Organización Mundial de la Salud “OMS=WHO” (1946) como *el bienestar físico, mental y social, y no solamente como la ausencia de afecciones o enfermedades*.

También la **salud** puede definirse como *el nivel de eficacia funcional o metabólica de un organismo tanto a nivel micro (celular) como en el nivel macro (social)*.

**Salud Laboral** es promover y proteger la salud de las personas en el trabajo, evitando todo aquello que pueda dañarla y favoreciendo todo aquello que genere bienestar, tanto en el aspecto físico como en el mental y social.

**Riesgo Laboral** es la posibilidad de que un trabajador o trabajadora sufra un determinado daño derivado del trabajo, es decir, *la posibilidad de que se produzca un daño a las personas o bienes derivado de las actividades realizadas en el trabajo*.

Todo aquello que daña o pueda dañar la salud de las personas en el trabajo debe ser objeto de prevención y está en el ámbito de la Ley de Prevención de Riesgos Laborales.

**Prevención de Riesgos Laborales** es el conjunto de actividades o medidas, adoptadas o previstas en todas las fases de actividad de la organización (en nuestro caso, laboratorio), con el fin de evitar o disminuir los riesgos derivados del trabajo.

Hoy día se concibe la prevención como una actividad más que debe integrarse dentro de la gestión global de la organización (en nuestro caso, laboratorio), por lo que es común referirse a ella del mismo modo que a otras tareas como la calidad o el cuidado del medio ambiente y por tanto se alude a ella como **“gestión de la prevención”**.

La prevención debe planificarse con antelación y evaluarse cíclicamente en un proceso de mejora continuada.

La rama del conocimiento que se dedica al estudio de la seguridad y salud en el trabajo se denomina “Prevención de Riesgos Laborales” como se comentaba anteriormente al principio.

**Prevenir** significa actuar antes de que se produzca el problema, y poder evitar, así sus consecuencias. Esto implica conocer con antelación cuáles son los factores que han de coincidir para que el daño se produzca. NO SE PUEDE PREVENIR LO QUE NO SE CONOCE.

Prevenir es anticiparse, adelantarse, actuar para evitar que ocurra algo que no queremos que pase, incluso si pasase lo no deseado tener previsto que suceda con el menor daño, y el problema no vaya a más.

El propósito es promover un interés por la seguridad y favorecer la práctica de trabajo seguro en el laboratorio. Hay que estar familiarizado con las medidas adecuadas que se deben tomar para trabajar en el

laboratorio, o ante la exposición a cualquiera de las sustancias peligrosas. Se debe estar ante condiciones y acciones inseguras, y prestarles atención para que se corrijan lo antes posible.

### 1.1.1. PREVENCIÓN VERSUS PROTECCIÓN

**Prevención** es el conjunto de medidas adoptadas o previstas (con antelación) en la actividad de la organización (laboratorio) que tienen como objetivo evitar, o disminuir, los riesgos que se derivan del trabajo.

**Protección** es el conjunto de actividades (previstas con antelación) que tienden a eliminar, o disminuir, las consecuencias que los riesgos pueden ocasionar sobre los trabajadores.

En todos los casos en los que no se ha podido eliminar un riesgo, pero si se puede atenuar o evitar las lesiones que el empleado puede sufrir si el riesgo se actualizase, la prevención juega un papel esencial y no es sustituible por la protección, sino que esta última (la protección) es un complemento de aquella (la prevención). Es decir, La protección es una técnica complementaria a la prevención, al ser prevista con anticipación, por lo que en sí también no deja de ser una acción preventiva.

La protección es fundamental cuando los riesgos no han podido ser eliminados (y persisten condiciones inseguras) porque sirve para proteger a los trabajadores en el supuesto de que el riesgo se actualice.

Por tanto, se puede decir que

**La protección** es el conjunto de actuaciones y medidas que deben adoptarse para atenuar y disminuir las consecuencias sobre los trabajadores del riesgo actualizado en un accidente de trabajo, o enfermedad profesional.

#### TIPOS DE PROTECCIÓN:

- **PROTECCIÓN COLECTIVA** va destinada a proteger al conjunto o a varios trabajadores (vitriñas de extracción de humos y gases, ventilación y renovación de aire en las salas )
- **PROTECCIÓN INDIVIDUAL (o personal)** va destinada y dirigida a la protección de trabajadores individual (media mascarilla con filtro, gafas protectoras, ...)

### 1.2. PELIGRO Y RIESGO

**Riesgo** es la oportunidad que acecha la ocurrencia de daño, pérdida o lesión.

**Riesgo Laboral** es la posibilidad de que se produzca un daño a las personas o bienes derivado de las actividades realizadas en el trabajo.

Hay que subrayar que *siempre que se realice cualquier actividad existen riesgos*, aunque la probabilidad de que tenga lugar el daño sea muy baja, o las consecuencias de este sean muy leves.

Cualquier actividad entraña una serie de riesgos para la salud



La actividad laboral va a suponer ciertos riesgos

**Peligro, condición o situación peligrosa** es un aspecto de cualquier actividad que contribuye en mayor o menor medida a que los riesgos a los que está sujeta dicha actividad se materialicen.

**Peligro.-** fuente de posible lesión o daño para la salud.

Más general, **Peligro** es la característica propia de una situación, material o equipo capaz de producir daño para las personas, medio ambiente, flora, fauna o patrimonio.

Se dice que existe peligro si se dan una o varias condiciones peligrosas.

No debe confundirse riesgo con sus posibles consecuencias (producidas por lesión o daño), estos aparecen como consecuencia de la materialización del riesgo.

Todo ello tiene relación muy próxima, riesgo es toda posibilidad latente de peligro que si no es controlada puede producir lesiones o daños.

### 1.3. PREVENCIÓN (PRL o SHT o SST) EN EL LABORATORIO

**La organización del laboratorio debe permitir la correcta gestión de la prevención.** Partiendo del propio compromiso de la dirección, el laboratorio debe estar adecuadamente jerarquizado para que la aplicación del principio de la seguridad en línea se pueda establecer sin problemas.

Es fundamental,

- En primer lugar, el control del cumplimiento de las normativas establecidas, no sólo las directamente relacionadas con la prevención de riesgos laborales sino también de los reglamentos específicos (radiactivos, cancerígenos, agentes biológicos, etc.), de seguridad industrial, de emisiones y vertidos, etc., sin perder de vista las abundantes normativas de carácter local existentes.
- En segundo lugar, la investigación de accidentes e incidentes, independientemente de la obligación legal que pueda afectar a los primeros, es una excelente herramienta preventiva, ya que la detección de las causas inmediatas y lejanas de un accidente e, incluso de un accidente blanco o incidente, muy abundante por otro lado en los laboratorios, permiten la prevención de sucesos parecidos al estudiado y de otros que aunque no parezcan relacionados directamente, lo pueden ser por cuestiones de tipo organizativo.
- En tercer lugar, también las inspecciones de seguridad, realizadas de manera periódica por personal interno y externo al laboratorio, son especialmente útiles para la detección de factores de riesgo.
- Finalmente, la utilización de mecanismos administrativos que permitan y fomenten la comunicación de riesgos por parte del personal del laboratorio, es también una herramienta que favorece manifiestamente la seguridad en el laboratorio.

**Un laboratorio de ensayo** tiene como función principal el análisis de muestras para dar unas determinaciones de unos determinados parámetros que nos solicita el cliente. Eliminar totalmente los riesgos supondría no realizar la determinación analítica, lo que evidentemente no es posible. Sin embargo, si se puede reducir la probabilidad de que se materialicen los riesgos implicados, eliminando o minimizando las condiciones de peligro, lo que puede abordarse conociendo la peligrosidad de sustancia usada, y equipos, manipulándolos cuidadosamente y utilizando sistemas de protección, entre otras medidas.

En el ámbito de la prevención de riesgos laborales se habla habitualmente de eliminación o reducción de riesgos aunque estrictamente esto no es posible, ya que en realidad la variable sobre la que se puede actuar es la condición o situación peligrosa. Es bueno convenir que cuando se hable de eliminación o reducción de riesgos, control de riesgos, etc., entendiéndose siempre que se alude a la situación o condición de peligro.

La eliminación de ciertas condiciones de peligro asociado al trabajo de laboratorio puede abordarse únicamente mediante la sustitución del proceso peligroso por otro que no lo sea, o bien cambiando una sustancia peligrosa por otra inocua, opciones que no siempre resultan viables (por ejemplo un método oficial impuesto por un reglamento no se puede modificar) y que además tampoco presentarían riesgo nulo.

Por ejemplo, puede sustituirse un disolvente como éter dietílico en una extracción líquido-líquido por otro disolvente como n-hexano, lo cual eliminaría la situación de peligro de inhalación de vapores de éter o la explosión por formación de peróxidos, pero a cambio se generaría una nueva situación de peligro, posiblemente menos grave, que es la inhalación de vapores de n-hexano.

(NOTA: lo tachado es para recalcar lo dicho. )

Según la Ley de PRL

**Procesos, actividades, operaciones, equipos o productos potencialmente peligrosos** son aquellos que, en ausencia de medidas preventivas específicas, originan riesgos para la seguridad y salud de los trabajadores/as.

Ejemplo de condiciones peligrosas en laboratorio:

instalaciones inadecuadas o en mal estado, equipos, útiles, elementos o materiales defectuosos, resguardos y protecciones inadecuadas o inexistentes en máquinas o instalaciones, condiciones ambientales peligrosas (ejemplo: por la presencia no controlada de polvo, gases, vapores, humos, ruidos, radiaciones, etc.), ausencia de delimitación de áreas de trabajo, de tránsito de vehículos, de personas, etc.

Siempre con algo desconocido se aplicará en laboratorio el principio de cautela o precaución.

**Principio de cautela o precaución.** Cuando una actividad se plantea como amenaza para la salud o el medio ambiente, deben tomarse medidas precautorias, aun cuando algunas relaciones de causa efecto no se hayan establecido de manera científica en su totalidad.

**Los factores de riesgos laborales** van a ser aquellos elementos o condiciones que pueden provocar un riesgo laboral.

**1.3.1. LOS PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO LABORAL** son los siguientes:

- ♦ Factores ligados a condiciones de seguridad (instalaciones, máquinas, equipos, etc.) son factores materiales que pueden influir sobre la materialización de accidentes.
- ♦ Factores ligados a las condiciones medioambientales Físicas. Químicas o Biológicas, existen unos valores adecuados para este tipo de factores que, en caso de no respetarse, pueden dar lugar a lesiones y/o alteraciones en la salud.
- ♦ Factores derivados de la carga de trabajo: determinados por las exigencias que impone la tarea.
- ♦ Factores derivados de la organización de trabajo.

**LA PREVENCIÓN**, entendida como «*el conjunto de actividades o medidas adoptadas o previstas en todas las fases de actividad de la empresa, con el fin de evitar o disminuir los riesgos derivados del trabajo*».

**1.3.2. TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE LA PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES (o DE LA SST):**

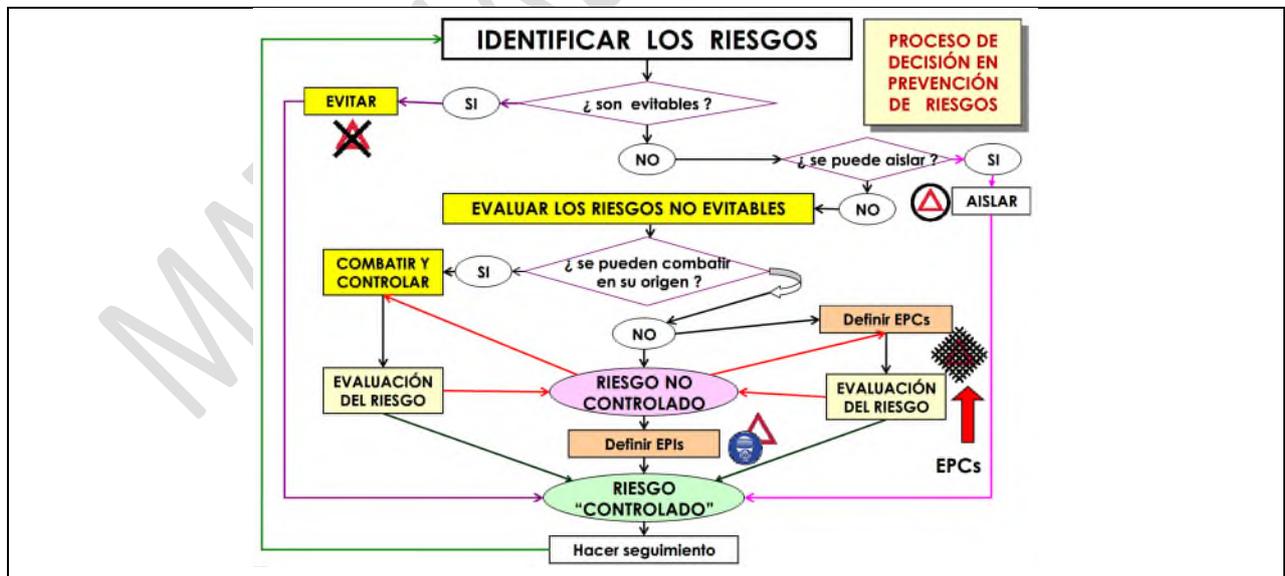
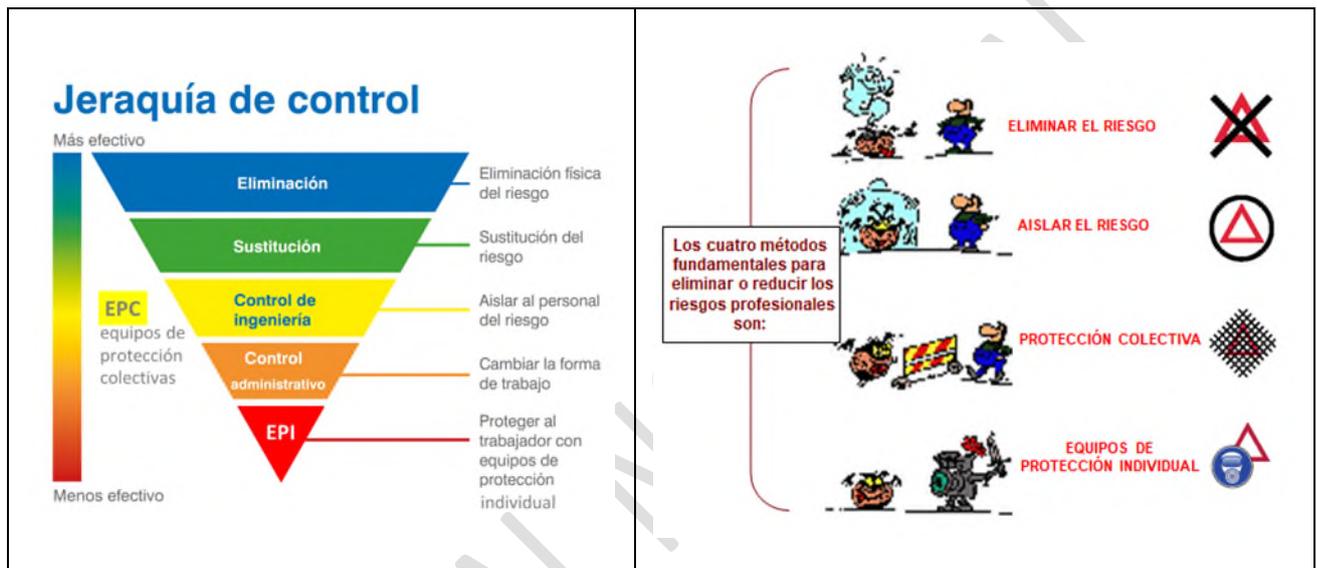
Para poder intervenir frente a esos factores de riesgo laborales y adoptar las medidas preventivas necesarias se requiere la actuación conjunta y programada de las técnicas específicas de la prevención de riesgos laborales:

- **Seguridad en el trabajo:** es el conjunto de técnicas y procedimientos que tienen por objeto eliminar o disminuir el riesgo de que se produzcan los accidentes de trabajo.
- **Higiene industrial:** es la técnica que previene la aparición de enfermedades profesionales, estudiando, valorando y modificando el medio ambiente físico, químico o biológico del trabajo.
- **Medicina del trabajo:** es la promoción de la salud (o prevención de la pérdida de salud), la curación de las enfermedades y la rehabilitación.
- **Ergonomía y Psicología:** En este apartado está la carga de trabajo física y mental de trabajo cuya principal manifestación dolencias osteomusculares, la fatiga, el estrés y la insatisfacción laboral.

**1.3.3. PRINCIPIOS DE LA ACCIÓN PREVENTIVA (Desarrollo de la acción preventiva):**

- **Identificar los peligros** (condiciones o situaciones peligrosas);
- **Evitar los riesgos;**
- **Evaluar los riesgos** de los peligros (o condiciones o situaciones peligrosas) **que no se han podido evitar;**
- **Combatir los riesgos en su origen;**

- Adaptar el trabajo a la persona;
- Tener en cuenta la evolución de la técnica;
- Sustituir lo peligroso por lo que entrañe poco o ningún peligro;
- Planificar la prevención (la actividad preventiva);
- Aplicar medidas planificadas;
- Reponer medidas preventivas;
- Adoptar medidas que antepongan la protección colectiva a la individual (es decir, priorizar la prevención colectiva a la individual)
- Dar las debidas instrucciones a los trabajadores;
- Seguimiento y verificación de la actividad preventiva;
- Mejora continua iterativa;



**En un buen número de actividades,**

si se cuenta con

- adecuadas instalaciones, y con técnicas estudiadas y bien implantadas (tanto a la calidad como a la prevención)
- el personal tiene una formación suficiente

se reducen los posibles situaciones de peligrosidad, y por tanto los riesgos asociados.

**en el laboratorio**

- Las instalaciones a veces inadecuadas, defectuosas (mal diseñadas), y en otras obsoletas (no se corresponde a su diseño inicial);
- El producto utilizado suele ser “peligroso” (reactivos) tanto en su manipulación, como en su almacenamiento;
- Las muestras a veces son contumaces
- El proceso u operaciones realizadas suelen ser
  - ♦ una reacción química o un cambio físico químico con sus exigencias de aportes energéticos, o bien,
  - ♦ Sus liberaciones de energía, a veces desconocimiento de las características de peligrosidad.
- Los hábitos de trabajo empleados los buenos suelen relajarse, y los malos hábitos empeoran.
- El material básico de utilización es el vidrio cuyas propiedades mecánicas no favorecen la seguridad. Los vidrios al boro-silicatos son más resistentes y seguros.

#### **1.3.4. PILARES BÁSICOS DE LA GESTIÓN PREVENTIVA EN LA ORGANIZACIÓN (LABORATORIO)**

De entre las obligaciones que recoge la Ley PRL se destacan las siguientes, como pilares básicos de toda acción preventiva:

- **Integrar** las actuaciones de prevención de riesgos laborales dentro del sistema de gestión general de la organización, al mismo nivel que la actividad productiva, de calidad, medioambiental, comercial, etc.
- Diseñar e implantar un **Plan de Prevención**, entendido éste como un sistema de gestión de la prevención de riesgos laborales, como instrumento de integración.
- **Evaluar los riesgos laborales** a los que están expuestos los trabajadores y **planificar la actividad preventiva** que se derive de dicha evaluación, como instrumentos esenciales de diseño e implantación del Plan de Prevención anterior.
- La debida **formación e información de los trabajadores** en materia de seguridad y salud laboral para que estén en condiciones de conocer los riesgos a los que están expuestos en su puesto de trabajo y poder combatirlos, así como para que puedan colaborar con el empresario en la mejora continua en esta materia.
- La **consulta y participación de los trabajadores** en todas aquellas cuestiones relacionadas con la seguridad y salud laboral en el ámbito de la empresa.

**En el laboratorio es importante** conocer las características, propiedades y riesgos que cada agente pueda afectar a la salud a los que trabajan en un laboratorio y según esto establecer unas normas preventivas de seguridad que deben seguirse en el laboratorio.

El trabajo en laboratorio es una actividad en la que se ven involucradas casi todas las ramas de la actividad preventiva. Dentro de un laboratorio se pueden detectar riesgos de muy diferente naturaleza:

- Riesgos asociados a la manipulación, traslado y almacenamiento de productos químicos, biológicos, etc.;
- Riesgo de incendio, de explosión o de implosión;
- Riesgo de tipo eléctrico;

En general, en el trabajo en Laboratorio, se puede hablar de:

- Unos riesgos específicos a las sustancias que se manipulan, almacenan, generan,
- Otros riesgos asociados a las operaciones que con ellos se realizan (métodos, procedimientos, ...)
- Otros riesgos más comunes, ligados al propio laboratorio y a sus instalaciones.

**Operaciones más habituales en un laboratorio (no exhaustiva):**

- Traslado de líquidos;
- Trasvase de líquidos;
- Operaciones de vacío:
  - + Evaporación,
  - + Destilación,
  - + Filtración,
  - + Secado;
- Mezcla o adición de productos;
- Operaciones peligrosas y reacciones químicas;
- Extracción con disolventes volátiles:
  - + Con extracción en caliente,
  - + Con extracción líquido-líquido,
  - + Con extracción sólido-líquido;
- Destilación;
- Evaporación – secado.
- Limpieza de vidrio;

**Otros tipos de reacciones consideradas peligrosas como:**

- ◆ Compuestos que reaccionan violentamente con el agua;
- ◆ Compuestos que reaccionan violentamente con el aire o el oxígeno (inflamación espontánea);
- ◆ Sustancias incompatibles de elevado afinidad;
- ◆ Reacciones peligrosas de los ácidos;
- ◆ Formación de peróxidos y sustancias fácilmente peroxidables;
- ◆ Reacciones de polimerización;
- ◆ Reacciones de descomposición.

**¿Qué objetivos se alcanzan cuando la organización gestiona adecuadamente la PRL?**

- Disminución de accidentes, incidentes y daños derivados del trabajo, así como sus consecuencias humanas, económicas y legales.
- Lugares seguros y saludables de trabajo.
- Trabajadores más satisfechos e implicados con la empresa. Mejora del clima laboral.
- Aumento de la productividad. Disminución de desperdicios productivos en sentido amplio.
- Aumento de la competitividad e imagen de empresa e impulsar el desarrollo del proyecto empresarial.
- Cumplir la legislación vigente en materia de seguridad y salud laboral y evitar las consecuencias legales de los incumplimientos de la misma.

Por lo que explica muy, muy resumida la responsabilidad de cualquier mando intermedio (y por tanto cualquier jefe de unidad) y de la dirección de un laboratorio la Sentencia del Tribunal Supremo de Justicia:

Jurisprudencia  
**SENTENCIA TRIBUNAL SUPREMO DE JUSTICIA**  
**(16 jul 1992)**

“Todas aquellas personas que **desempeñen funciones de dirección, o de mando** en una empresa y, por tanto, sean éstas superiores, intermedias o de mera ejecución, y tanto las ejerzan reglamentariamente como de hecho, **están obligadas a cumplir y a hacer cumplir** las normas destinadas a que el trabajo se realice en **las prescripciones elementales de seguridad.**”

La Ley de prevención cuando habla de empresa no solo a la empresa privada sino a la AGE.

En un laboratorio normalmente el jefe de departamento de análisis ordena la actividad ordinaria que se realizarán los analistas y técnicos a su cargo. Como superior tendrá que tener en cuenta la jurisprudencia señalada anteriormente.

## 2. APARTADO 2º (FDS)

### 2. INFORMACIÓN DE PPQQ (Productos Químicos)

Para prevenir los riesgos que ocasionan los agentes o productos químicos, es necesario conocer cuáles están presentes en el lugar de trabajo y qué daños pueden ocasionar a la salud de las personas y al medio ambiente.

Se puede obtener la información sobre la **peligrosidad intrínseca de los agentes químicos** teniendo en cuenta que la posibilidad de que en un laboratorio existan riesgos derivados de la presencia de estos agentes depende además:

- De la frecuencia o tiempo de exposición,
- De la cantidad de agente químico utilizado o presente,
- De la volatilidad o de la capacidad de formar polvo del agente químico,
- De la forma de uso,
- Del tipo de medidas de control.

La evaluación de los riesgos derivados de la presencia de agentes químicos, habida cuenta de todas las variables anteriormente expuestas, debe ser realizada por un técnico competente.

La peligrosidad intrínseca de los agentes químicos va a depender tanto de sus propiedades fisicoquímicas, directamente relacionadas con el riesgo de que se produzca un accidente, y de sus propiedades toxicológicas.

A principios de este siglo, en 2002 se publicó la primera edición del **SGA** (acrónimo de Sistema Globalmente Armonizado) o **GHS** (siglas en inglés de *Globally Harmonized System*) a nivel mundial.

Este documento fue promovido por las Naciones Unidas y contiene los requisitos para la clasificación y el etiquetado de sustancias y mezclas de productos químicos, así como las definiciones del formato y el contenido de las Fichas de Datos de Seguridad (FDS) de los productos químicos.

La información sobre las propiedades peligrosas de los agentes químicos puede obtenerse fundamentalmente de la **Etiqueta** y de la **Ficha de Datos de Seguridad (FDS)**; en estos últimos años se han

producido cambios legislativos importantes relativos a la comercialización, clasificación y etiquetado de los productos químicos peligrosos que se traducen en un nuevo sistema de clasificación y etiquetado (nueva etiqueta) y también en algunos cambios en la FDS.

Estos cambios derivan de la aprobación de **dos reglamentos europeos** (de aplicación directa para todos los países miembros) que han producido cambios importantes que afectan a la comercialización, clasificación y etiquetado de los productos químicos peligrosos:

**Reglamento (CE) nº 1907/2006** del Parlamento Europeo y del Consejo, del 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y preparados químicos (**Reglamento REACH**, acrónimo del inglés *Registration Evaluation Authorisation and Restriction of CHemicals*), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos.

**Reglamento (CE) nº 1272/2008** del Parlamento Europeo y del Consejo, del 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (**Reglamento CLP**, acrónimo del inglés *Classification, Labelling and Packaging*).

El Reglamento CLP modifica el Reglamento REACH pero no lo sustituye.

Ambos Reglamentos europeos son dos importantes instrumentos legales promulgados con el objetivo de asegurar el uso seguro de las sustancias, mezclas y artículos que contienen sustancias y proteger con ello la salud de las personas y los ecosistemas.

Dichos Reglamentos (REACH y CLP) introducen en la Unión Europea un nuevo sistema para clasificar y etiquetar productos químicos que está basado en el Sistema Globalmente Armonizado de las Naciones Unidas (SGA de la ONU).

## 2.1. ETIQUETADO DE PPQQ

Todos los recipientes de productos químicos peligrosos comercializados deben estar etiquetados de acuerdo con un modelo definido. Únicamente si el producto es suministrado a granel no dispondremos de dicha etiqueta (no obstante, si el producto fue transportado, dispondrá de un etiquetado específico para su transporte).

**El contenido de la etiqueta** permite obtener información sobre los siguientes puntos:

- Identificación del producto químico.
- Identificación del fabricante o suministrador.
- Peligros intrínsecos del producto debido a sus propiedades o efectos. **Incluye los siguientes datos:**

**Pictograma o pictogramas** (comentado en otro punto).

**Clasificación de los productos químicos** de acuerdo con 28 clases de peligro definidas (que se subdividen resultando en un total de 79 categorías, divisiones o subtipos). Esta clasificación se muestra en la etiqueta mediante una combinación de símbolos (pictogramas) e indicaciones de peligro (frases H).

**Palabras de advertencia:** indican y alertan sobre la gravedad de los peligros en general:

«**Peligro**» *Dr: Danger*, palabra de advertencia utilizada para indicar las categorías de peligro más graves  
y

«**Atención**» *Wng: Warning*, palabra de advertencia utilizada para indicar las categorías de peligro menos graves.

**Indicaciones de peligro** (frases H, del inglés *Hazard*): indican los riesgos específicos atribuidos a las sustancias y mezclas en función de su clasificación; se codifican mediante la letra H y un número de tres cifras. Substituyen a las frases R del sistema convencional (antigua).

**Consejos de prudencia** (frases P, del inglés *Precautionary*): asesoran sobre las medidas para prevenir o reducir al mínimo los efectos adversos para la salud y el medio ambiente derivados de los peligros inherentes a la sustancia o mezcla. Se codifican mediante la letra P y un número de tres cifras. Substituyen a las frases S (antigua).

La información que contiene la etiqueta se encuentra también en la Ficha de Datos de Seguridad (FDS), donde se amplía y complementa con otros datos de interés.

## 2.2. FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD (FDS) DE PPQQ

Ficha de Datos de Seguridad (FDS), o *Material Safety Data Sheets (MSDS)* en inglés

La **Ficha de Datos de Seguridad** es un elemento fundamental en la transmisión de la información sobre los peligros de una sustancia o de una mezcla. Proporciona información fundamental para evaluar los riesgos derivados del uso de agentes químicos en el trabajo. Complementa la etiqueta, ofreciendo información que pudiera no estar contenida en ésta.

El Reglamento CLP no legisla directamente sobre la FDS, es dominio del Reglamento REACH (artículo 31 y anexo II modificados por el Reglamento núm. 453/2010).

El **objetivo de la FDS** es informar de forma efectiva y suficiente al usuario profesional de la peligrosidad del producto:

- Para la salud,
- La seguridad y
- El medio ambiente.

Es **obligatorio suministrarla**:

- Para todas las sustancias susceptibles de ser clasificadas como peligrosas.
- Sustancias persistentes,
  - + Las bioacumulables y tóxicas, (**PBT**) y
  - + Las muy persistentes y muy bioacumulables **mPmB** (anexo XIII REACH).
- Otras sustancias altamente preocupantes (candidatas al anexo XIV del REACH).

Además, el destinatario puede solicitar la FDS de una mezcla no clasificada como peligrosa pero que contenga:

- Sustancias peligrosas ( $\geq 1\%$  peso o  $\geq 0,2\%$  en volumen).
- Sustancias altamente preocupantes ( $\geq 0,1\%$  peso).
- Sustancias con valor límite de exposición comunitario (establecidos en las directivas).

Estas fichas deben estar escritas, al menos en castellano y deben indicar la fecha de su emisión.

**Deben actualizarse:**

- Cuando se disponga de nueva información o se tenga constancia de nuevos peligros.
- Cuando se conceda o deniegue una autorización (Reg. REACH).
- Cuando se imponga una restricción (Reg. REACH).

**ESTRUCTURA DE LA FDS (Ficha de Datos de Seguridad) :**

La extensa información de las FDS debe estar estructurada en estas 16 secciones según indica el Reglamento REACH

| <b>Estructura de la FDS</b>  |  |
|--|--|
| <p><b>Sección 01: IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O LA MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA</b></p> <p>01.1. Identificación del producto<br/>01.2. Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados<br/>01.3. Datos del proveedor de la FDS<br/>01.4. Teléfono de emergencia</p> | <p><b>Sección 09: PROPIEDAD FÍSICAS Y QUÍMICAS</b></p> <p>09.1. Información sobre propiedades físicas y químicas básicas<br/>09.2. Información adicional L-133/22 DOUE 31.05.2010</p>  |
| <p><b>Sección 02: IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS</b></p> <p>02.1. Clasificación de la sustancia o de la mezcla<br/>02.2. Elementos de la etiqueta<br/>02.3. Otros peligros</p>   | <p><b>Sección 10: ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD</b></p> <p>10.1. Reactividad<br/>10.2. Estabilidad química<br/>10.3. Posibilidad de reacciones peligrosas<br/>10.4. Condiciones que deben evitarse<br/>10.5. Materiales incompatibles<br/>10.6. Productos de descomposición peligrosos</p>   |
| <p><b>Sección 03: COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES</b></p> <p>03.1. Sustancias<br/>03.2. Mezclas</p>  | <p><b>Sección 11: INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA</b></p> <p>11.1. Información sobre los efectos toxicológicos</p>  |
| <p><b>Sección 04: PRIMEROS AUXILIOS</b></p> <p>04.1. Descripción de los primeros auxilios<br/>04.2. Principales síntomas y efectos, agudos y de retardados<br/>04.3. indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente</p>                                  | <p><b>Sección 12: INFORMACIÓN ECOLÓGICA</b></p> <p>12.1. Toxicidad<br/>12.2. Persistencia y degradabilidad<br/>12.3. Potencia de bioacumulación<br/>12.4. Movilidad en el suelo<br/>12.5. Resultados de la valoración PBT y mPmB<br/>12.6. Otros efectos adversos</p>  |
| <p><b>Sección 05: MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS</b></p> <p>05.1. Medios de extinción<br/>05.2. Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla<br/>05.3. Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios</p>   | <p><b>Sección 13: CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN</b></p> <p>13.1. Métodos para el tratamiento de residuos</p>  |
| <p><b>Sección 06: MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL</b></p> <p>06.1. Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de urgencia<br/>06.2. Precauciones relativas al medio ambiente<br/>06.3. Métodos y material de contención y de limpieza<br/>06.4. referencia a otras secciones</p>         | <p><b>Sección 14: INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE</b></p> <p>14.1. Número ONU<br/>14.2. Designación oficial de transporte de las UN<br/>14.3. Clase(s) de peligro para el transporte<br/>14.4. Grupo de embalaje<br/>14.5. Peligros para el medio ambiente<br/>14.6. Precauciones particulares para los usuarios<br/>14.7. transporte a granel con arreglo al anexo II del Convenio Marpol 73/78 y del Código IBC</p> |
| <p><b>Sección 07: MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO</b></p> <p>07.1. Precauciones para una manipulación segura<br/>07.2. Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades<br/>07.3. Usos específicos finales</p>  | <p><b>Sección 15: INFORMACIÓN REGLAMENTARIA</b></p> <p>15.1. reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla<br/>15.2. Designación oficial de transporte de las UN</p>  |
| <p><b>Sección 08: CONTROLES DE EXPOSICIÓN / PROTECCIÓN INDIVIDUAL</b></p> <p>08.1. Parámetros de control<br/>08.2. Controles de la exposición</p>  | <p><b>Sección 16: OTRA INFORMACIÓN</b></p>   |
| <b>ANEXOS: Escenarios de exposición cuando proceda</b>   |  |

Los «escenarios» deben elaborarse para todas las sustancias y mezclas consideradas como peligrosas que se pongan en el mercado por encima de 10 t/año:

- a) Se trata de hacer una estimación de la exposición teórica (riesgo de generar efectos adversos) prevista teniendo en cuenta los efectos potenciales de la sustancia y las condiciones de utilización. Esto se debe hacer para cada uno de los usos que identifique el fabricante. Se adjuntan a la FDS en forma de anexos.
- b) Deben tener un título breve a partir del cual se dé una descripción general del uso.
- c) Deben describir el/los proceso/s, las medidas de gestión del riesgo aplicadas y las medidas de gestión del riesgo recomendadas por el fabricante.
- d) El usuario debe comprobar si el uso al que destina la sustancia está contemplado por el fabricante o importador y, en consecuencia, si dispone del correspondiente escenario de exposición que incluye todos los riesgos asociados a cada uso concreto de la sustancia y las correspondientes medidas de prevención y protección a aplicar.

Debido a la importancia de las FDS, deberá llevarse una adecuada **gestión de ellas (FDS) en el laboratorio** buscando su mejor utilización y aprovechamiento:

- a) Crear y mantener un registro actualizado de las FDS correspondientes a los diversos productos químicos utilizados en el laboratorio, para lo que se mantendrá el necesario contacto con los proveedores, incluso para solicitar información necesaria sobre productos de los cuales no se dispone de FDS.
- b) Contrastar la información contenida en las FDS con el etiquetado de los productos químicos y las condiciones de su utilización en el laboratorio; esta comparación será obligatoria siempre que se trate de una nueva FDS o una nueva versión de la FDS.
- c) Utilizar la información contenida en las FDS para:
  - Informar/formar a los trabajadores.
  - Dar las instrucciones de seguridad.
  - Elaborar procedimientos para emergencias (incluida la información conveniente para los servicios exteriores de auxilio).
- d) Ponerlas a disposición del servicio de prevención para su utilización en relación con las evaluaciones de riesgos y la vigilancia de la salud y con su posible consejo sobre procedimientos para emergencias.
- e) Tener siempre las FDS a disposición para ser consultadas por los trabajadores o por sus representantes.

### 3. APARTADO 2º (RRPP)

#### 3.1.RESIDUOS PELIGROSOS GENERADOS EN LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

Definición de **RESIDUO** (de la Ley de Residuos)

*.- "cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseche o tenga la intención o la obligación de desechar."*

Definición de **RESIDUO** (de la OCDE)

*.- "aquellas materias generadas en las actividades de producción y consumo que no han alcanzado un valor económico en el contexto en que son producidas".* Es decir, que no sirven ya.

Los laboratorios deben tener y mantener uno o varios procedimientos

Que tengan por objeto de establecer las normas generales para

el control, la identificación, la segregación, el envasado, el etiquetado, la recogida y el registro y el almacenamiento de los residuos generados (o producidos) como consecuencia de las actividades realizadas en el Laboratorio,

Con el fin de

dar cumplimiento a la legislación vigente, y a los requisitos derivados de las autorizaciones y permisos del laboratorio.

**La gestión de los residuos del laboratorio** tiene una problemática diferenciada de los industriales ya que, en general, se generan en pequeñas cantidades, presentan gran variedad y elevada peligrosidad tanto desde el punto de vista fisicoquímico, como toxicológico y para el medio ambiente. Su no tratamiento y acumulación en el laboratorio, genera la presencia de productos químicos peligrosos innecesarios. Además, a menudo, no suelen estar adecuadamente envasados, identificados y almacenados.

#### Procedimientos sobre la gestión de residuos

Dichos procedimientos deben ser **de aplicación a**

todas las sustancias u objetos generados en el Laboratorio, o que estén en su poder, y de los cuales el laboratorio (como centro) se desprenda o tenga la intención u obligación de desprenderse, y se vean afectados por la normativa legal vigente en materia de residuos (con rango de Ley), desde el momento que se generan hasta que se depositan en sus zonas de almacenamiento, para entregar a un gestor autorizado para su retirada y posterior tratamiento.

#### Tipos genéricos de residuos

**Los tipos genéricos de residuos** a los que se refiere este procedimiento y que se producen en el Laboratorio, son los siguientes:

| TIPOS DE RESIDUOS                                    |        |
|--|--------|
| Residuos Peligrosos                                  | RRPP   |
| Residuos Urbanos o Municipales ( <i>Domésticos</i> ) | (RRUU) |
| Residuos Inertes                                     | (RRII) |
| Residuos de Construcción y Demolición                | (RCD)  |
| Residuos de Aparatos Eléctricos y Electrónicos       |        |
| Residuos de pilas, acumuladores y baterías           | (RAEE) |

Definición de

#### PRODUCTOR de Residuos

*(Cualquier persona física o jurídica cuya actividad, excluida la derivada del consumo doméstico, produzca residuos o que efectúe operaciones de tratamiento previo, de mezcla, o de otro tipo que ocasionen un cambio de naturaleza o de composición de esos residuos).*

Es decir,

**el mismo Laboratorio**, es lo que la Ley de Residuos denomina **Productor de Residuos**

Los laboratorios analíticos se consideran productores de residuos peligrosos, aunque por generar pequeñas cantidades

Existen dos tipos de productores en el caso usual de los laboratorios es

De **PEQUEÑO PRODUCTOR** (porque son superen diez toneladas anuales de residuos en función), en el caso

De **GRAN PRODUCTOR** (cuando supera la generación de 10 toneladas anuales), se tiene más controles.

#### REGISTRO COMO PRODUCTOR DE RESIDUOS EN LA AUTORIDAD AMBIENTAL.

**En la autoridad competente (por la Ley de Residuos)**

Lo primero que el laboratorio debe hacer para poder gestionar a través de un gestor autorizado es **registrarse el Laboratorio como PRODUCTOR DE RESIDUOS** en la Comunidad Autónoma.

**La Ley establece para los pequeños productores las siguientes obligaciones:**

- Separar correctamente los residuos peligrosos entre sí y de los no peligrosos; (Separar y segregar los residuos por tipologías y compatibilidades).
- No mezclar ni diluir los residuos peligrosos (RRPP) con otras categorías de RRPP ni con otros residuos, sustancias o materiales.

- Contar con una zona de almacenamiento acondicionada y señalizada para los residuos, en condiciones de seguridad;
- Envasar y etiquetar los residuos correctamente, en recipientes adecuados, en el lugar de producción antes de su recogida y transporte.
- Llevar un registro de los residuos producidos cada año;
- Entregar los residuos a un gestor autorizado o llevar a cabo su tratamiento en el plazo que marca la legislación (hasta 6 meses de almacenamiento (los llamados Depósitos Temporales de Residuos));
- Guardar la documentación relativa a la gestión durante al menos 5 años;
- Informar a las autoridades ambientales de cualquier desaparición, pérdida o fuga de residuos peligrosos.
- Priorizar la Reducción, Reutilización y Reciclaje de los residuos como buena práctica de laboratorio;
- Minimizar los residuos peligrosos:
  - Llevar un riguroso control de todo lo que se adquiere, ya que a la larga se convertirá en residuo;
  - Comprar según necesidades, evitando el deterioro o caducidad generada innecesariamente;
  - Emplear en los laboratorios las mínimas cantidades de reactivos necesarios, realizando pruebas con la menor cantidad posible si se desconoce la viabilidad de una reacción.

### **Programa de gestión de residuos en el laboratorio**

Su gestión debe basarse en los principios de minimización, reutilización, tratamiento y eliminación segura. Para ello se deberá establecer un **programa de gestión de residuos en el laboratorio** que contemple todos los residuos generados, sean banales (no especiales o no peligrosos) o peligrosos (especiales). El programa debe contemplar básicamente los siguientes aspectos:

- Inventario de todos los productos considerados como residuos.
- Definición de grupos en base a sus características fisicoquímicas, incompatibilidades, riesgos específicos y/o tratamiento y eliminación posterior.
- Contemplar las posibilidades de minimización considerando la posible reutilización, recuperación, neutralización y eliminación. Una adecuada gestión de compras, manteniendo el stock al mínimo, reduce el volumen de los residuos al disminuir la cantidad generada por reactivos caducados, sobrantes o de uso no previsible.
- Implantación de un sistema de recogida selectiva en función de los grupos establecidos con provisión de contenedores adecuados a las características de los residuos e identificación y etiquetado de los envases y contenedores.
- Información y formación del personal del laboratorio sobre la existencia y características del plan de gestión de residuos, siendo recomendable disponer de un contrato con una empresa externa autorizada para la recogida, tratamiento y eliminación de aquellos residuos que no puedan tratarse en el propio laboratorio.
- La gestión de residuos de laboratorio debe tener en cuenta las exigencias de la normativa existente, sea a nivel local, autonómico, estatal o comunitario y contemplar la gestión diferenciada de aquellos residuos que tienen una legislación específica: radiactivos, biológicos (sanitarios) y cancerígenos, por ejemplo.

## CODIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS

La codificación de los riesgos permite la identificación del residuo e informar del riesgo asociado al mismo, tanto al usuario como el gestor autorizado de residuos. Para este fin, a nivel legislativo europeo se ha establecido el código LER (Lista Europea de Residuos).

La determinación de si un residuo es peligroso o no es peligroso se llevará a cabo identificándolo dentro de la Lista Europea de Residuos (LER).

Los residuos marcados con un asterisco (\*) en la lista LER se considerarán residuos peligrosos con arreglo a la Directiva 2008/98/CE (modificada por la Directiva 2014/955/UE).

Código de 6 cifras y asterisco si es peligroso  
**000 000 (\*)**

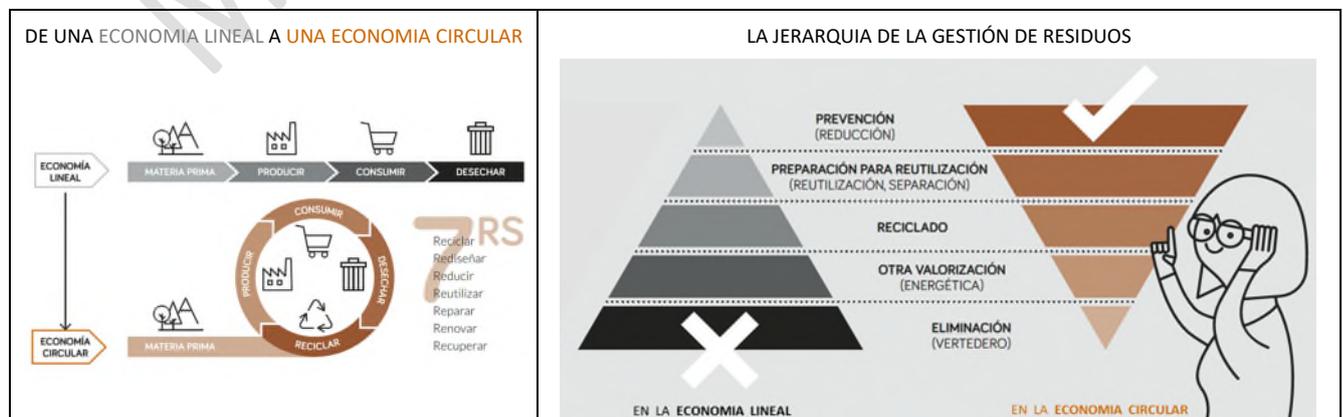
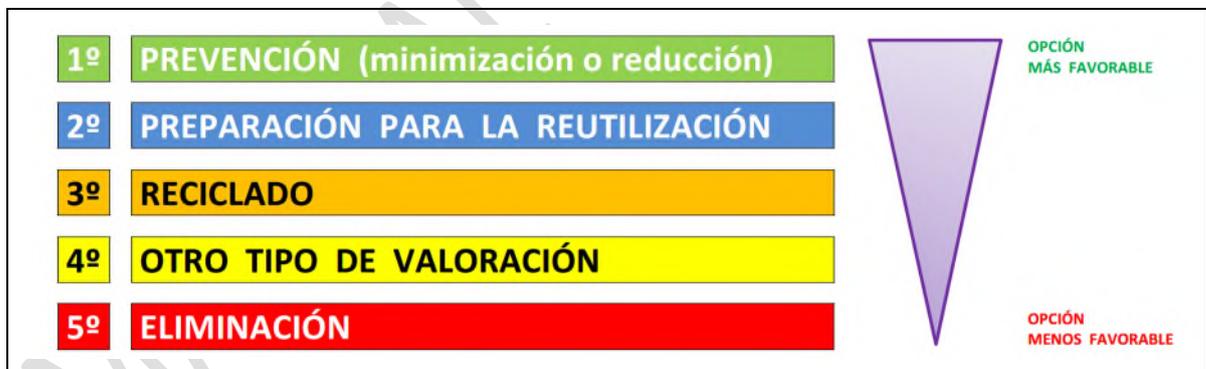
## Sistema de identificación de los RRPP

Consiste en la utilización de un conjunto de códigos estandarización para recoger información que permitir en todo momento la identificación de los residuos y facilite el control de los mismos desde que son producidos hasta su destino final.

Ejemplo: **DISOLVENTE HALOGENADO**  
LER : **140 602 \***

## JERARQUIZACIÓN de los residuos

De acuerdo con la Ley de Residuos, las administraciones competentes, en el desarrollo de las políticas y de la legislación en materia de prevención y gestión de residuos, **aplicarán** para conseguir el mejor resultado ambiental global, **la jerarquía de residuos**, por el siguiente orden de prioridad (de opción más favorable, a la opción menos favorable).



### PREVENCIÓN

Conjunto de medidas adoptadas en la fase de concepción y diseño, de producción, de distribución y de consumo de una sustancia, material o producto, para reducir:

- 1º. La cantidad de residuo, incluso mediante la reutilización de los productos o el alargamiento de la vida útil de los productos.
- 2º. Los impactos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana de los residuos generados, incluyendo el ahorro en el uso de materiales o energía.
- 3º. El contenido de sustancias peligrosas en materia y productos.

### REUTILIZACIÓN

Cualquier operación mediante la cual productos o componentes de productos que no sean residuos se utilizan de nuevo con la misma finalidad para la que fueron concebidos.

### RECICLADO o RECICLAJE

Toda operación de valoración mediante la cual los materiales de residuos son transformados de nuevo en productos, materiales o sustancias, tanto si es con la finalidad original como con cualquier otra finalidad.

Incluye la transformación del material orgánico, pero no la valoración energética ni la transformación con materiales que se vayan a usar como combustibles o para operaciones de relleno.

### VALORACIÓN

Cualquier operación cuyo resultado principal es que el residuo sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales, que de otro modo se habrían utilizado para cumplir una función particular o que el residuo sea preparado para cumplir esa función en la instalación o en la economía en general.

### ELIMINACIÓN

Cualquier operación que sea la valoración, incluso cuando la operación tenga como consecuencia secundaria el aprovechamiento de sustancias o materiales, siempre que estos no superen el 50 % en peso del residuo tratado, o el aprovechamiento de energía.

### REDUCCIÓN de los residuos

La opción más favorable (y por tanto la más deseada) es la Reducción (o prevención o minimización) de los residuos.

*“ El mejor residuo es el que no se genera  
o en su defecto, una vez generado,  
pueda recibir un tratamiento tal que permita incorporarse de nuevo al ciclo productivo.”*

### VALORIZACIÓN DE RESIDUOS

*.- es el resultado de un estudio que establece cómo un desecho pudiera sustituir a otros materiales dentro de un objeto que está diseñado para cumplir una función determinada.*

### VALORACIÓN DE UN RESIDUO

“operación cuyo resultado principal es que **el residuo sirva a una finalidad útil** al sustituir a otros materiales que, de otro modo, se habrían utilizado para cumplir una función particular”.

### ELIMINACIÓN de residuos

es el procedimiento dirigido al almacenamiento definitivo o la destrucción de **residuos** realizado sin poner en peligro la salud humana y sin utilizar métodos que puedan causar perjuicios al medioambiente.

Es importante **definir una serie de conceptos** (enfocado a un Laboratorio)

### **GESTIÓN DE RESIDUOS:**

la recogida, el almacenamiento, el transporte, la valorización y la eliminación de los residuos, incluida la vigilancia de estas actividades, así como la vigilancia de los lugares de depósito o vertido después de su cierre.

Es decir,

*el conjunto de actividades encaminadas a dar a los residuos el destino final más adecuado.*

### **GESTIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS (RRPP) EN EL LABORATORIO**

#### **→.Gestión INTERNA de residuos:**

operaciones de manipulación, clasificación, envasado, etiquetado, recogida, traslado y almacenamiento dentro del laboratorio (centro) de trabajo.

#### **→.Gestión EXTERNA de residuos:**

operaciones de recogida, transporte y eliminación de los residuos una vez que han sido retirados del centro generador de los mismos (el laboratorio).

### **GESTOR de residuos (RRPP):**

La persona o entidad, pública o privada, que realice cualquiera de las operaciones que componen la gestión de los residuos, sea o no el productor de los mismos.

#### **→.Gestor INTERNO de residuos:**

es el propio centro generador de los residuos, es decir, el laboratorio.

#### **→.Gestor EXTERNO de residuos:**

aquel gestor de residuos autorizado según la legislación vigente.

### **RECOGIDA de residuos (RRPP):**

Toda operación consistente en recoger, clasificar, agrupar o preparar residuos para su transporte.

#### **→.Recogida INTERNA de residuos:**

aquel que se realiza en el propio centro generador de los residuos, es decir, el laboratorio. Desde la sala de análisis a los Depósitos Temporales de los Residuos.

#### **→.Recogida EXTERNA de residuos:**

aquel que realiza el transportista/gestor de residuos autorizado según la legislación vigente. A partir de los Depósitos Temporales de los Residuos.

### **Recogida SELECTIVA de RRPP:**

Recogida de forma diferenciada de otros flujos de residuos, de manera que facilite su posterior clasificación, tratamiento y reciclaje.

Una gestión correcta de los residuos de cualquier tipo implica su separación previa y en su caso la agrupación según características similares.

Las distintas fracciones de residuos deben desecharse independientemente, en contenedores apropiados y señalización, ya que el tratamiento y coste son diferentes.

**Una incorrecta separación de los residuos** puede acarrear diversas situaciones no deseables:

- La gestión más adecuada para cada tipo de residuos se dificulta o se hace imposible;
- Mezclar residuos peligrosos no compatibles puede resultar en un accidente por reacciones inesperadas entre los distintos componentes y por tanto un mayor al medio ambiente y un riesgo para la salud;
- Mezclar residuos peligrosos con otros no peligrosos conlleva dificultar la gestión de los primeros y aumentar el coste, ya que la mezcla completa se transforma en un residuo peligroso.

La Ley de Residuos y Suelos Contaminados indica expresamente que los residuos no deben mezclarse si con ello va a dificultarse su gestión, en particular no mezclar los residuos y los

residuos no peligrosos. Igualmente no está permitido diluir los residuos peligrosos para que con esta operación se elimine su peligrosidad.

#### **ENVASE de RRPP:**

todo envase, recipiente, contenedor o material de envase del cual se desprenda su poseedor o tenga la obligación de desprenderse en virtud de las disposiciones en vigor.

Envasar según la clasificación que se haya determinado en recipientes homologados, preferentemente en garrafas de 10 litros (para reducir el riesgo en su manipulación).

Los envases y cierres serán sólidos y resistentes, y se mantendrán en buen estado, sin presentar fisuras ni fugas de ninguna clase.

#### **ETIQUETADO de RRPP:**

Se etiquetarán los envases de forma clara y legible, con etiquetas que contengan la información precisa para identificar el residuo, su procedencia y su gestión posterior.

El etiquetado de residuos peligrosos se regula en el artículo 14 del Real Decreto 833/88 sobre residuos peligrosos. No obstante los apartados 2, 3 y 4 de dicho artículo quedan modificados a partir del 1 de junio de 2015, al ser sustituidas las Directivas 67/548/CEE y la Directiva 1999/45/CE en las que se basaba el actual etiquetado de los residuos peligrosos por el Reglamento (CE) nº 1272/2008 sobre clasificación, envasado y etiquetado de sustancias y mezclas (CLP), y por tanto la naturaleza de los riesgos en el etiquetado deberá indicarse de acuerdo con el citado Reglamento CLP.

#### ***Artículo 14. Etiquetado de residuos tóxicos y peligrosos.***

1. *Los recipientes o envases que contengan residuos tóxicos y peligrosos deberán estar etiquetados de forma clara, legible e indeleble, al menos en la lengua española oficial del Estado.*
2. *En la etiqueta deberá figurar:*
  - a) *El código de identificación de los residuos que contiene, según el sistema de identificación en el Reglamento 1357/2014, de 18 de diciembre (características HP) y el código LER del residuo con su correspondiente descripción*
  - b) *Nombre, dirección y teléfono del titular Productor de los residuos*
  - c) *Fechas de envasado.*
  - d) *La naturaleza de los riesgos que presentan los residuos.*
3. *Para indicar la naturaleza de los riesgos deberán usarse en los envases los siguientes pictogramas dibujados en negro sobre fondo blanco*

#### **ALMACENAMIENTO TEMPORAL de RRPP:**

Desde que se genera el residuo hasta que se retira por la empresa gestora autorizada, el almacenamiento es responsabilidad del productor (en nuestro caso, el laboratorio) que debe hacerlo correctamente toda vez que la legislación actual en materia de residuos prohíbe almacenar residuos peligrosos por periodos superiores a 6 meses.

- ◆ Es necesario recordar que se deben tener las mismas precauciones que en el almacenamiento de reactivos en cuanto a incompatibilidades, inflamabilidad y características de las instalaciones y distribución de los productos en ellas. No dejan de ser los residuos unos productos químicos.
- ◆ En algunos casos, en función de las cantidades generadas y de la periodicidad de recogida, además de los almacenes generales de reactivos (como materia prima), puede ser recomendable disponer de unos locales específicos para el almacenamiento de los residuos peligrosos que también debe cumplir la normativa receptiva específica ya citada

#### **Se almacenarán los residuos en zonas adecuadas para tal fin:**

- Se hará siguiendo los procedimientos adecuados a fin de evitar generación de calor, exposiciones, igniciones, formación de sustancias tóxicas o cualquier causa que aumente su peligrosidad o haga más difícil su correcto tratamiento posterior;
- Se prestará especial atención a las posibles incompatibilidades entre diferentes envases y sustancias y por tipologías;

- Se almacenarán en estanterías, colocando los residuos de mayor peso y volumen en las zonas inferiores. (Esto se soluciona estandarizando todos los residuos en garrafas de 10 litros, lo que también proviene de accidentes en su manejo);
- Se dispondrán de cubetos de retención y recogida de posibles pérdida de los envases;
- No se expondrá a los residuos peligrosos a la luz solar;
- Los recipientes deben estar colocados en un sitio bien ventilado;
- Para evitar evaporaciones, los recipientes deben de estar cerrados correctamente;
- Seleccionar recipientes de un tamaño que impida conservar los residuos demasiado tiempo en el lugar de almacenamiento. De esta forma se reduce también al mismo tiempo el riesgo de fugas.

### 3.2. CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS

#### ESTUDIO PREVIO DE ACTIVIDADES DEL LABORATORIO (como centro productor de residuos)

Para el establecimiento de los grupos de clasificación de los residuos es necesario realizar un **estudio de las actividades realizadas** en el centro productor (laboratorio).

Se consideran todas las actividades del centro, desde las de investigación, docentes y servicios externos a empresas hasta operaciones de limpieza y mantenimiento. Este estudio de actividades se efectúa partiendo de las materias primas empleadas en cada actividad, siguiendo su transformación y mezcla con otros productos.

De este estudio, se extrae una relación de residuos generados en todas las actividades y una estimación de cantidades. Estos datos se comparan con el inventario de residuos acumulados en el centro productor, en caso de que existan.

A partir de estos datos y teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los residuos, las posibles reacciones de incompatibilidad en caso de mezcla y el tratamiento final de los mismos, se establecen unos grupos de clasificación.

#### CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LOS RRPP químicos

- ▶ Características físico-químicas
- ▶ Peligrosidad
- ▶ Compatibilidad química
- ▶ Cantidad de residuo generada
- ▶ Restricciones de almacenaje y/o transporte
- ▶ Tratamiento final

#### Peligrosidad

La peligrosidad de los residuos viene determinada por la presencia de determinadas características que representan un riesgo para la salud humana o el medio ambiente. Estas características de peligrosidad se pueden clasificar en tres grupos:

- Peligros físicos;
- Peligros para la salud;
- Peligros para el medio ambiente.

**El Reglamento (UE) nº 1357/2014** (donde se adaptó el reglamento CLP a los residuos) define 15 características de peligrosidad (identificadas por las letras “HP” = *Hazardous Properties*, sustituyendo la letra anterior “H”) que permiten calificar a los residuos como peligrosos. De este modo, un residuo se clasificará como peligroso si presenta una o varias de estas características de peligrosidad.

En España, la nueva **Ley de Residuos y Suelos Contaminados en Economía Circular (Ley 7/2022)** se ha incorporado tal como decía el reglamento europeo.

En la tabla siguiente se muestran las distintas características de peligrosidad definidas en el Reglamento referido agrupadas en función de la naturaleza del peligro y los pictogramas de peligro correspondiente de advertencia se usa de acuerdo al reglamento europeo CLP.

**Un pictograma de peligro** es una imagen adosada a una etiqueta que incluye un símbolo de advertencia y colores específicos con el fin de transmitir información sobre el daño que una determinada sustancia o mezcla puede provocar a la salud o al medio ambiente.

### Clasificación de residuos peligrosos

En el laboratorio está justificada la agrupación de residuos según peligrosidad, ya que es imposible la gestión diferenciada de los múltiples productos. Esta operación debe realizarla personal formado para que la segregación se lleve a cabo de forma adecuada y en condiciones de seguridad.

De entre los residuos generados en los laboratorios, se exponen los siguientes grupos de clasificación de residuos peligrosos.

- Grupo I:** Disolventes halogenados.
- Grupo II:** Disolventes no halogenados.
- Grupo III:** Disoluciones acuosas.
- Grupo IV:** Ácidos (inorgánicos).
- Grupo V:** Aceites (minerales).
- Grupo VI:** Sólidos.
- Grupo VII:** Especiales.

Como ya se ha comentado, esta clasificación está orientada a la posterior gestión de los residuos por un tratador autorizado, sobre la base de la experiencia de los autores. En función de la cantidad y composición de los RPPC generados, pueden modificarse los diferentes grupos.

#### Grupo I: Disolventes halogenados

Se entiende por tales, *los productos líquidos orgánicos que contienen más del 2% de algún halógeno*. Se trata de productos muy tóxicos e irritantes y, en algún caso, cancerígenos. Se incluyen en este grupo también las mezclas de disolventes halogenados y no halogenados, siempre que el contenido en halógenos de la mezcla sea superior al 2%.

Ejemplos:

*Hidrocarburos alifáticos: Cloroformo, Triclorometano, Tetracloruro de Carbono,*

*Hidrocarburos aromáticos: Clorobenceno, Hexafluorobenceno*

*Alcoholes halogenados: Tricloroetanol*

*Aminas halogenadas: Bromoanilina*

*Esteres halogenados: Cloroacetatos*

*Amidas halogenadas: Cloroacetamida*

#### Grupo II: Disolventes no halogenados

Se clasifican aquí los *líquidos orgánicos inflamables que contengan menos de un 2% en halógenos*. Son productos inflamables y tóxicos y, entre ellos, se pueden citar los *alcoholes, aldehídos, amidas, cetonas, ésteres, glicoles, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos y nitrilos*.

Es importante, dentro de este grupo, evitar mezclas de disolventes que sean inmiscibles ya que la aparición de fases diferentes dificulta el tratamiento posterior.

#### Grupo III: Disoluciones acuosas (cont.)

##### Soluciones acuosas inorgánicas:

- **Soluciones acuosas básicas:** *Hidróxido sódico, Hidróxido potásico.*
- **Soluciones acuosas de metales pesados:** *Níquel, Plata, Cadmio,*
- **Soluciones acuosas de cromo VI.**
- **Otras soluciones acuosas inorgánicas**

### **Soluciones acuosas orgánicas o de alta DQO**

- **Soluciones acuosas de colorantes.**
- **Soluciones de fijadores orgánicos:** *Formol, Fenol, Glutaraldehído.*
- **Mezclas agua/disolvente:** *Eluyentes de cromatografía, Metanol/agua.*

### **Grupo IV: Ácidos (inorgánicos y sus soluciones acuosas concentradas)**

Corresponden a este grupo los ácidos inorgánicos y sus soluciones acuosas concentradas (más del 10% en volumen). Debe tenerse en cuenta que su mezcla, en función de la composición y la concentración, puede producir alguna reacción química peligrosa con desprendimiento de gases tóxicos e incremento de temperatura. Para evitar este riesgo, antes de hacer mezclas de ácidos concentrados en un mismo envase, debe realizarse una prueba con pequeñas cantidades y, si no se observa reacción alguna, llevar a cabo la mezcla. En caso contrario, los ácidos se recogerán por separado.

### **Grupo V: Aceites (minerales)**

Este grupo corresponde a los aceites minerales derivados de operaciones de mantenimiento y, en su caso, de baños calefactores.

### **Grupo VI: Sólidos**

Se clasifican en este grupo los productos químicos en estado sólido de naturaleza orgánica e inorgánica y el material desechable contaminado con productos químicos. No pertenecen a este grupo los reactivos puros obsoletos en estado sólido (grupo VII). Se establecen los siguientes subgrupos de clasificación dentro del grupo de Sólidos:

**Sólidos orgánicos:** A este grupo pertenecen los productos químicos de naturaleza orgánica o contaminados con productos químicos orgánicos .

Por ejemplo, *carbón activo o gel de sílice impregnados con disolventes orgánicos*.

**Sólidos inorgánicos:** A este grupo pertenecen los productos químicos de naturaleza inorgánica. Por ejemplo, *sales de metales pesados*.

**Material desechable contaminado:** A este grupo pertenece el material contaminado con productos químicos. En este grupo se pueden establecer subgrupos de clasificación, por la naturaleza del material y la naturaleza del contaminante y teniendo en cuenta los requisitos marcados por el gestor autorizado.

### **Grupo VII: Especiales**

A este grupo pertenecen los productos químicos, sólidos o líquidos, que, por su elevada peligrosidad, no deben ser incluidos en ninguno de los otros grupos, así como los reactivos puros obsoletos o caducados.

**Estos productos no deben mezclarse entre sí ni con residuos de los otros grupos. Ejemplos:**

- + **Comburentes** (*Peróxidos*).
- + **Compuestos pirofóricos** (*Magnesio metálico en polvo*).
- + **Compuestos muy reactivos** [*Ácidos fumantes, Cloruros de ácido (cloruro de acetilo), Metales alcalinos (sodio, potasio), Hidruros (borohidruro sódico, hidruro de litio), Compuestos con halógenos activos (bromuro de benzilo), Compuestos polimerizables (isocianatos, epóxidos), Compuestos peroxidables (éteres)*, restos de reacción, productos no etiquetados].
- + **Compuestos muy tóxicos** (*Tetraóxido de osmio, Mezcla crómica, Cianuros, Sulfuros, etc.*).

### **Compuestos no identificados.**

Mención aparte merecen las sustancias clasificadas como cancerígenas que se recogen separadamente, ya que el trabajo con este tipo de sustancias y, en consecuencia, con sus residuos, está regulado por el R.D. 665/1997 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo. En el art. 5 l se indica que: "(se debe) ... disponer de medios que permitan... la recogida, almacenamiento y eliminación de

residuos, en particular mediante la utilización de recipientes herméticos etiquetados de manera clara, inequívoca y legible, y colocar señales de peligro claramente visibles, de conformidad todo ello con la normativa vigente en la materia”.

### 3.3. GESTIÓN INTERNA DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS

**Clasificación y recogida selectiva** de los residuos peligrosos (RRPP) y **traslado a** los depósitos temporales de residuos (DTR)

#### 1º. La recogida de residuos

Para la recogida de los RRPP el Laboratorio deberá disponer de recipientes o contenedores (adecuados al residuo a guardar), distribuidos por distintos puntos de sus instalaciones en función de los tipos y cantidades de residuos que se generan en cada zona de las salas de análisis. Asegurar (preventivamente) estas zonas de acopio previo en salas de análisis, como factor de riesgo.

El Laboratorio debe tener una persona encargada de los residuos, que puede ser el Responsable del SGA (Sistema de Gestión Ambiental) se encarga de resolver cualquier duda que surjan (y son muchas) entre el personal del Laboratorio, respecto al sistema de recogida y segregación de los residuos o sobre la gestión de estos en general. Y constante seguimiento del cumplimiento de la legislación vigente.

El laboratorio deberá de disponer de los almacenes DTR (Depósitos Temporales de Residuos de necesarios para custodiar los residuos de forma adecuada hasta que los recoja con la periodicidad adecuada el gestor autorizado. En el fondo un almacén de residuos se considera como Almacén de Productos Químicos (reglamentado por la legislación APQ) , así como en el laboratorio se tiene todo tipo de precauciones con los producto recién llegado para utilizarse como reactivos comercializados, en este caso se complica porque el residuo suelen ser productos con una cierta degradación (disolventes peroxidados, mezclas con sinergias de peligrosidad), e incompatibilidades (no vale solo almacenar los halogenados juntos, y separados de las disoluciones ácidas ( hay infinidad de halogenados incompatibles entre sí, y lo mismo ocurre entre ácidos).

#### 2º. Identificación y caracterización de los residuos peligrosos (RRPP) generados.

El Responsable del SGA o en su caso el responsable de los residuos, realiza un análisis previo para definir los grupos en base a sus características, contempla las posibilidades de mitigación, reutilización, recuperación, neutralización y eliminación. De esa evaluación identifica y asigna un código de identificación, de acuerdo a la legislación vigente, a cada uno de los residuos peligrosos que se generan en el Laboratorio. A la hora de asignar este código, se tendrá en cuenta la legislación vigente, si es preciso, puede solicitar la colaboración de los gestores autorizados de RRPP, que contrata el laboratorio o recurrir a los servicios de un laboratorio acreditado para las tareas de caracterización de RRPP.

Cualquier persona que detecta la existencia de un nuevo residuo, susceptible de ser clasificado como peligroso, lo comunica al Responsable del SGA o en su caso el responsable de residuos , quien realiza las gestiones precisas para determinar si efectivamente es un RP, y en ese caso identificarlo y codificarlo como tal.

El Responsable del SGA o en su caso el responsable de los residuos, deberá mantener identificados todos los residuos que se generan en el Laboratorio (Residuos Peligrosos, Residuos Urbanos, Residuos Inertes, Residuos de construcción y demolición, residuos de aparatos eléctricos y electrónicos, residuos de pilas, baterías y acumuladores, etc.). Para los residuos peligrosos (RRPP) retirados por gestor autorizado contratado por el Laboratorio, se mantiene actualizado un registro con los datos de estos residuos peligrosos, para ello se emplear un “Inventario de Residuos Peligrosos retirados por gestor autorizado a través del Laboratorio”.

Se implanta la sistemática de recogida selectiva en función de los grupos establecidos

### 3º. Acopio y envasado de los residuos peligrosos (RRPP) (relación no exhaustiva)

- + Productos químicos desechados;
- + Patrones de fitosanitarios caducados o deteriorados;
- + Vidrio contaminado;
- + Plásticos contaminados;
- + Papeles contaminados;
- + Viales contaminados;
- + Puntas de Pipetas contaminadas;
- + Columnas cromatográficas;
- + Filtros de osmosis inversas;
- + Lámparas IR;
- + Lámparas UV;
- + Equipos con
- + Envases vacíos de productos químicos (vidrios, plásticos, metálicos );
- + Trapos y papel contaminado;
- + Residuos de pilas, baterías, y acumuladores;
- + Residuos de tóner y/o cartuchos de impresoras;
- + Residuos de actividades de mantenimiento;
- + Filtros HEPA de cabinas de flujo laminar;
- + Filtros HEPA de las chimeneas de extracciones localizadas colmatados de contaminantes;
- + Filtros de carbono activo de extracciones localizadas colmatados de contaminantes;
- + Filtros de EPIs (Equipos de protección Individuales);
- + Lodos decantados en las neutralizadoras;
- + Material radiactivo (Patrones y equipos, como detectores radiactivos);
- + Material y elementos con mercurio;
- + Bronuro de etidio (en su caso);
- + Material contaminado con acrilamida;
- + Productos de especial peligrosidad.

Se dispondrá de zonas de acopio (inmediato de tránsito) de residuos dentro de la sala de análisis próxima a la generación del residuo, con los recipientes a usar. Estarán convenientemente señalizadas, de conocimiento del personal.

#### Residuos específicos por departamentos

El Responsable de los residuos analiza, en colaboración con cada uno de los departamentos de análisis, las particularidades de los residuos peligrosos que generan y establece a través de una ficha específica el nivel de segregación y acopio de dichos residuos.

#### Las FICHAS ESPECIFICAS contemplan como mínimo la siguiente información:

- ▶ **Criterio de segregación** de los reactivos usados dentro del departamento.
- ▶ **Envase para cada grupo** de reactivos usados que se segrega.
- ▶ **Identificación interna de cada grupo** de reactivos usados que se segrega.
- ▶ **Punto de acopio** de los reactivos usados dentro del departamento.
- ▶ **Fecha de entrada** en vigor, y número de la revisión.

El Responsable de los residuos se encargará de que la FICHA-CARTEL se encuentre en todos los departamentos, que generen Residuos Peligrosos, en un lugar visible.

## 4. BIBLIOGRAFIA

- ▶ **Ley de Prevención de Riesgos Laborales** y todo el inmenso desarrollo de la misma  
Consultar con la espléndida y didáctica página www del INSST (<https://www.insst.es>)
- ▶ **Ley de Residuos y Suelos contaminados para una economía circular**  
Para su desarrollo, consultar con legislación consolidada, porque existen reglamentos derogados de dos leyes anteriores pero todavía en vigor parcial sino contradice a la actual (vamos un desastre).

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 10**

**MATERIALES DE REFERENCIA. TIPOS DE MATERIAL DE CONTROL. USOS EN LABORATORIOS DE ANÁLISIS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN
2. MATERIALES DE REFERENCIA
3. TIPOS DE MATERIAL DE CONTROL
  - 3.1. CLASES DE MATERIALES DE REFERENCIA
  - 3.2. PROPIEDADES DE LOS MATERIALES DE REFERENCIA.
  - 3.3. Preparación de Materiales de Referencia
4. USOS EN LABORATORIOS DE ANÁLISIS.
  - 4.1. Validación del Método e Incertidumbre de la Medición
  - 4.2. Verificación del Uso Correcto de un Método
  - 4.3. Calibración de equipos
  - 4.4. Control de Calidad y Aseguramiento de Calidad (QC y QA)
  - 4.5. Otros usos
5. Bibliografía

## 1. INTRODUCCIÓN

La norma UNE EN ISO/IEC 17025 *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*, es una norma internacional desarrollada por un comité de expertos en la que se establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración para que su competencia técnica sea evaluada por parte de un organismo de acreditación, en el caso de España, por ENAC.

Esta norma especifica, en su punto 7.7 sobre *Aseguramiento de la validez de los resultados*, que el laboratorio debe disponer de procedimientos de control de calidad para hacer un seguimiento de la validez de los ensayos y calibraciones realizados. Los datos obtenidos deben registrarse de forma que puedan detectarse tendencias y, siempre que sea posible, deben aplicarse técnicas estadísticas para analizar los resultados. Este seguimiento debe ser planificado y revisado, y pueden incluir materiales de referencia o materiales de control de calidad, y el uso de patrones de verificación o patrones de trabajo con gráficos de control, entre otros.

**Se define Patrón de Medida** como la realización de la definición de una magnitud dada, con un valor determinado y una incertidumbre de medida asociada, utilizado como referencia (Centro Español de Metrología, 2012). Los patrones químicos son materiales que contienen una concentración precisa de una sustancia, y proporcionan una referencia que puede utilizarse para determinar concentraciones desconocidas o calibrar equipos analíticos.

Un **Patrón primario** es aquel patrón que es designado o ampliamente reconocido como poseedor de las más altas cualidades metroológicas y cuyo valor se acepta sin referirse a otros patrones de la misma magnitud.

Un **Patrón secundario** es aquel cuyo valor se establece por comparación con un patrón primario de la misma magnitud. La mayor parte de los materiales de referencia certificados se encuentran dentro de esta categoría puesto que la certificación de los valores de la propiedad está generalmente realizada por un procedimiento que es trazable a patrones primarios.

El **Patrón de referencia** es el patrón de la más alta calidad metroológica disponible en un lugar o en una organización determinada, del cual se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar.

Los patrones de más alto nivel son los que cumplen las recomendaciones de la Conferencia General de Pesas y Medidas (CGPM). Para las realizaciones técnicas y las comparaciones internacionales la Conferencia cuenta con la Oficina Internacional de Pesas y Medidas (BIPM). A estas comparaciones acuden los Laboratorios Nacionales dando lugar a la aparición de los Patrones Nacionales.

Podemos definir **Patrón Nacional** como aquel que ha sido declarado como último término de comparación dentro de un país por una autoridad que tenga capacidad legal para tomar

esa decisión. Los Patrones Nacionales pueden ser primarios o secundarios en caso de que sean patrones calibrados por otro instituto nacional de metrología.

## 2. MATERIALES DE REFERENCIA

Se define **Material de referencia (MR)** material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas (Centro Español de Metrología, 2012). Permite utilizarlos para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición, o la asignación de valores a los materiales.

Un **Material de referencia certificado (MRC)** se trata de un material de referencia, a acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos (Centro Español de Metrología, 2012).

Mientras que en el caso de las magnitudes físicas existen patrones de referencia que pueden ser utilizados, en el caso del laboratorio químico (en el que la magnitud a medir es la cantidad de sustancia) la materialización en un patrón se realiza en lo que se ha llamado **material de referencia**.

La definición dada de *Material de referencia* tiene correspondencias con la de *Patrón de medida* por lo que algunos materiales pueden ser caracterizados por ambos términos. En general se considera que un material de referencia es consumible mientras que un patrón material es inalterable en el proceso de medida.

Los MRs pueden presentarse bajo la forma de un gas, un líquido o un sólido, puro o compuesto. También tratarse de una pieza para ensayo o análisis o de un artículo manufacturado. En ocasiones necesitan de cierta preparación, como los materiales liofilizados o las disoluciones concentradas (Martí Veciana, 2001)

Se define **Trazabilidad metrológica** como la propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida (Centro Español de Metrología, 2012).

Los materiales de referencia son herramientas importantes para la transferencia de la exactitud de la medición entre laboratorios y sus valores de propiedad deben ser trazables al Sistema Internacional (SI). Sin embargo, la trazabilidad es un concepto relativamente nuevo en la medición química y como consecuencia muy pocos materiales de referencia químicos son explícitamente trazables al SI. Sin embargo se emplea una jerarquía de métodos para asignar valores de propiedad a materiales. A veces se emplea una combinación de procedimientos para asignar el valor, como un valor de consenso derivado de una comparación interlaboratorio (ensayo de certificación) dónde se emplean métodos primarios. (Inter American Accreditation Cooperation (IAAC), 2007)

La **Incertidumbre de medida** es un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza (Centro Español de Metrología, 2012)

La **Incertidumbre de un valor certificado** es la estimación ligada a un valor certificado de una magnitud (o propiedad) que caracteriza la zona de valor en el interior de la cual se puede encontrar el valor verdadero con un nivel de confianza indicado.

### 3. TIPOS DE MATERIAL DE CONTROL

Se usan MRs para apoyar las mediciones relacionadas con composición química, propiedades biológicas, clínicas, físicas y de ingeniería así como áreas mixtas tales como sabor y olor. Éstos pueden caracterizar la "identidad" (por ejemplo las especies microbiológicas) o los "valores de propiedad" (por ejemplo, cantidad de entidad química especificada, dureza, etc.).

Algunos tipos de materiales de referencia disponibles son los siguientes (Inter American Accreditation Cooperation (IAAC), 2007):

- **Sustancias puras** caracterizadas para pureza química y/o impurezas trazas.
- **Soluciones normalizadas** y mezclas de gas, a menudo preparadas gravimétricamente a partir de sustancias puras y usadas para propósitos de calibración.
- **Materiales de referencia en matrices**, caracterizados por la composición del constituyente químico especificado mayor, menor o traza. Estos materiales se pueden preparar de matrices que contienen los componentes de interés o preparando mezclas sintéticas.
- **Materiales de referencia físico-químicos** caracterizados para propiedades tales como punto de fusión, viscosidad y densidad óptica.
- **Objetos o artefactos de referencia** caracterizados para propiedades funcionales como sabor, olor, punto de inflamación y dureza. Este tipo también incluye especímenes de microscopía caracterizados para propiedades, como por ejemplo especímenes microbiológicos.

#### 3.1. CLASES DE MATERIALES DE REFERENCIA

Existen dos clases de materiales reconocidas por ISO (Inter American Accreditation Cooperation (IAAC), 2007):

- **Materiales de Referencia Certificados (MRCs)**
- **Materiales de referencia (MRs)**

Los MRCs deben, por definición, ser trazables a una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad. Cada valor de la propiedad debe estar acompañado por una incertidumbre a un nivel de confianza definido.

Los MRs son materiales cuyos valores de la propiedad son suficientemente homogéneos y bien establecidos para ser usados para la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medición o para asignar valores a los materiales.

Además de estos dos tipos, podemos encontrar:

- **Materiales de Referencia Primarios (MRP)**
- **Materiales de Referencia Internos.**

Los MRP son aquellos cuyas propiedades se establecen a partir de un programa de colaboración entre laboratorios de metrología química nacionales, utilizando pocos métodos absolutos y cuya incertidumbre ha sido evaluada rigurosamente, obteniendo trazabilidad vertical y comparabilidad horizontal.

Los Materiales de Referencia Internos son fabricados por el propio laboratorio a partir de un proceso de comparación con un material de referencia certificado, que se utilizan para las calibraciones y validaciones rutinarias.

Además, dependiendo del sistema de preparación pueden ser:

- Elementos individuales.
- Lotes de materia prima. Algunos MRs son certificados dentro de un lote, de forma que cualquier parte de él verifique los valores de la propiedad que se le adjudica a la totalidad del lote, dentro de unos límites de incertidumbre.

### **3.2. PROPIEDADES DE LOS MATERIALES DE REFERENCIA.**

Las propiedades que se deben exigir a un material para su empleo como material de referencia son:

1. **Estabilidad**, tanto del propio MR como de las propiedades que representa, durante un periodo de tiempo aceptable y conocido, en unas condiciones de almacenamiento, transporte y empleo razonables y definidas. Desde este punto de vista, los MR se pueden clasificar en:
  - **Inestables**: MR cuyo valor de la propiedad evoluciona con el tiempo rápidamente. Por ejemplo, materiales emisores de partículas $\alpha$ .
  - **Parcialmente estables**: el valor de la propiedad evoluciona muy lentamente en las condiciones de conservación y uso previstas. Debe establecerse un plazo de caducidad. Por ejemplo, diluciones de patrones.
  - **Estables**: el valor de la propiedad no evoluciona en todo el periodo de tiempo en el que va a ser usado el MR. Por ejemplo, el oro.
2. **Homogeneidad**: Debe ser suficiente para garantizar que los valores de las propiedades obtenidas sobre una porción puedan aplicarse a cualquier otra del lote, con una incertidumbre conocida.

3. **Incertidumbre** de medida acotada en el resultado: los métodos empleados en la obtención del valor de las propiedades que representa el MR deben tener una incertidumbre conocida y calculada. La incertidumbre asociada a un MR no debería ser mayor de un tercio de lo que corresponde a la muestra de medición.

Según ILAC (asociación mundial para la acreditación), cuando un Instituto Nacional de Metrología (NMI) difunde su CMC o *capacidad de medida y calibración* mediante el suministro de MRC, la declaración de incertidumbre que los acompañe deberá indicar la influencia del material (el efecto de la inestabilidad, la no homogeneidad y el tamaño de la muestra) sobre la incertidumbre de medida para cada valor certificado. Este debe ofrecer directrices sobre la aplicación prevista y las limitaciones de uso del material (ILAC, 2020) .

4. **Documentación:** la documentación que acompaña al MR debe contener suficiente información sobre los valores de las propiedades, las incertidumbres debidas a la estabilidad, homogeneidad y métodos de ensayo empleados en la certificación, precauciones de uso, etc., de modo que el laboratorio pueda utilizar correctamente el MR.

### 3.3. Preparación de Materiales de Referencia

La preparación de un Material de Referencia sigue una serie de etapas:

1. **Selección y Preparación:** La selección del material estará en función de su necesidad de ser utilizado
2. **Estudios de Homogeneidad y Estabilidad:** Para la preparación del material es necesario llevar a cabo un estudio exhaustivo de la homogeneidad y la estabilidad, empleando técnicas reproducibles.

En el caso de líquidos y gases, es fácil conseguir la homogeneidad, y difícil conseguir la estabilidad, la cual se puede conseguir con una buena elección de recipientes y almacenamiento.

En el caso de los sólidos conseguir la homogeneidad presenta dificultades, y se consigue mediante procesos de secado, molienda y tamizado

3. **Certificación del Material:** Consiste en estudiar y determinar estadísticamente en la siguiente etapa la exactitud y la precisión del analito o analitos con el propósito de certificar sus valores, mediante el uso de 2 o 3 métodos independientes que se caracterizan por su buena exactitud, precisión y trazabilidad. La certificación se puede llevar a cabo :
  - Mediante un único laboratorio
  - Con el consenso de varios laboratorios
  - Usando distintos métodos y diferentes laboratorios
4. **Evaluación Estadística:** Para obtener un valor certificado y su límite de confianza, los resultados obtenidos y proporcionados por los diferentes laboratorios se someten a una evaluación estadística. Cada laboratorio proporciona un conjunto de resultados al que se aplica un tratamiento estadístico.

La certificación de materiales de referencia supone utilizar un procedimiento técnicamente válido para obtener valores de una o más propiedades de un material, trazables y acompañadas de una estimación de una incertidumbre.

Dependiendo del uso que se vaya a dar al material de referencia, la certificación puede darse por un único método con uno o varios laboratorios, o por ensayo Interlaboratorio con varios métodos.

La necesidad de obtener un valor fiable y la dificultad de usar métodos absolutos para la medición de elementos o sustancias en matrices complejas, ha llevado a realizar ejercicios de intercomparación entre un conjunto de laboratorios con el objetivo de obtener valores asignables a los materiales de referencia, acompañados por su incertidumbre. Para ello se ha desarrollado la Guía ISO 35 *Materiales de referencia - Guía para la caracterización y evaluación de la homogeneidad y la estabilidad*, así como la Norma ISO 17034:2016 *Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia* (Gabinete de Servicios de la Calidad (GSC), 2016).

#### **4. USOS EN LABORATORIOS DE ANÁLISIS.**

Entre las principales finalidades de los MRC destacan (Inter American Accreditation Cooperation (IAAC), 2007):

##### **4.1. Validación del Método e Incertidumbre de la Medición**

La validación de un método de ensayo implica que se han evaluado sus características básicas (sesgo, precisión, linealidad, etc.) en diferentes condiciones. A partir de los resultados obtenidos en la validación se considera que el método puede ser adecuado al fin pretendido. La adecuación al fin pretendido implica que la calidad de la medida realizada es adecuada como para que se tomen decisiones correctas basadas en los resultados del ensayo (ENAC, 2008).

La estimación de la exactitud (la diferencia entre el valor medido y el valor verdadero) es uno de los elementos más difíciles de la validación del método, pero el uso de MRs apropiados puede proporcionar información valiosa relativa a los límites de la incertidumbre de los valores certificados de los MRs y la incertidumbre del método que está siendo validado.

##### **4.2. Verificación del Uso Correcto de un Método**

La aplicación con éxito de un método validado depende de su uso correcto, tanto con respecto a la habilidad del operador como a si el equipo, reactivos y patrones son apropiados. Los MRs pueden usarse para cualificación del personal, para verificar métodos usados con poca frecuencia o para resolver problemas que aparecen cuando se obtienen resultados inesperados.

##### **4.3. Calibración de equipos**

Según lo establecido en la Nota Técnica NT-74 sobre Trazabilidad metrológica de ENAC, los Organismos Evaluadores de la Conformidad (OEC) deben garantizar que mantienen la trazabilidad metrológica de sus medidas, y para ello deben asegurar que estas mediciones forman parte de una cadena ininterrumpida de comparaciones, teniendo como origen las

referencias adecuadas. Los elementos de los que disponen los OEC para asegurar la trazabilidad metrológica son varios, y entre ellos se incluye el desarrollo de la parte de la cadena de trazabilidad que se encuentre bajo su responsabilidad, mediante **calibraciones internas** entendiéndose estas como aquellas que se ejecutan dentro de la entidad legal acreditada (ENAC, 2021).

El punto 6.5 de la norma UNE UN ISO/IEC 17025:2017 indica que el laboratorio debe, entre otras acciones, asegurar que los resultados sean trazables al SI mediante valores certificados de MRC proporcionados por productores competentes.

#### **4.4. Control de Calidad y Aseguramiento de Calidad (QC y QA)**

El punto 7.7 de la norma UNE UN ISO/IEC 17025:2017, donde se indican los criterios de aseguramiento de la validez de los resultados, indica que el laboratorio debe contar con procedimientos para hacer un seguimiento de la validez de los resultados. Los datos deben registrarse para poder detectar tendencias y tendrían que aplicarse técnicas estadísticas para la revisión de los resultados. Este seguimiento ha de planificarse y revisarse y debe incluir, entre otros elementos, el uso de materiales de referencia o materiales de control de calidad.

#### **4.5. Otros usos**

Además de los citados, se pueden utilizar MRs para comprobar la equivalencia de métodos o asignar valores a un material o sistema (por ejemplo verificar la caducidad de otros patrones o materiales de referencia disponibles en el laboratorio)

Siempre que se utilicen MRC es recomendable hacer un seguimiento de los resultados obtenidos, por ejemplo, utilizando gráficos de control. Ello facilitará la detección de posibles errores del método, del equipo, o de los analistas, así como apreciar tendencias en los resultados (Martí Veciana, 2001).

El laboratorio debería establecer criterios de aceptación de los resultados, para determinar si la variabilidad que se obtiene es aceptable dentro de un método o del sistema de calidad implantado en el mismo.

## 5. Bibliografía

Centro Español de Metrología. (2012). Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales y términos asociados. *3ª Edición*.

ENAC. (Septiembre de 2008). Guía sobre la participación en programas de intercomparación. G-ENAC-14 Rev 1.

ENAC. (Julio de 2021). NT-74 Rev.4 Política de trazabilidad metrológica de ENAC.

Gabinete de Servicios de la Calidad (GSC). (2016). Curso de Ensayos de Intercomparación en Laboratorios. San Fernando de Henares.

ILAC. (2020). Política sobre Incertidumbre de medida en Calibración. ILAC-P14:09/2020.

Inter American Accreditation Cooperation (IAAC). (17 de Agosto de 2007). ILAC G9:2005 Guía para la selección y uso de Materiales de Referencia.

Martí Veciana, A. (2001). NTP 656: Materiales de Referencia. Utilización en laboratorios de higiene industrial.

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 11**

### **GRAVIMETRÍA Y VOLUMETRÍA. TIPOS. EXPRESIÓN DE RESULTADOS. APLICACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. GRAVIMETRÍA**

- 1.1. Tipos de análisis gravimétrico
  - 1.1.1. Métodos gravimétricos por volatilización o destilación
  - 1.1.2. Métodos gravimétricos por extracción
  - 1.1.3. Métodos gravimétricos por precipitación
- 1.2. Cálculos y expresión de los resultados
- 1.3. Aplicaciones del análisis gravimétrico

### **2. VOLUMETRÍA**

- 2.1. Tipos de volumetrías
  - 2.1.1. Clasificación en función del procedimiento de valoración
    - 2.1.1.1. Volumetrías directas
    - 2.1.1.2. Volumetrías indirectas
  - 2.1.2. Clasificación en función de la naturaleza de la reacción química
    - 2.1.2.1. Volumetrías ácido-base (o neutralización)
    - 2.1.2.2. Volumetrías de precipitación
    - 2.1.2.3. Volumetrías de oxidación-reducción (redox)
    - 2.1.2.4. Volumetrías de formación de complejos (complexometría)
- 2.2. Expresión de resultados
- 2.3. Aplicaciones del análisis volumétrico

## 1. GRAVIMETRÍA

Los métodos gravimétricos son métodos cuantitativos que se basan en la determinación del peso exacto de alguno de los constituyentes de la muestra (gravimetrías directas), o bien, el peso exacto de alguna sustancia derivada del constituyente por medio de una reacción química (gravimetrías indirectas).

En las gravimetrías indirectas se debe tener en cuenta el llamado factor gravimétrico, (f) que es la relación de pesos equivalentes entre el constituyente buscado y el compuesto pesado.

El análisis gravimétrico involucra dos etapas generales esenciales: la separación del componente que se desea cuantificar y la pesada exacta y precisa del componente separado.

Dependiendo del procedimiento empleado para separar el componente que se desea cuantificar, los métodos de análisis gravimétrico se pueden clasificar en:

- métodos gravimétricos por volatilización o destilación
- métodos gravimétricos por extracción
- métodos gravimétricos por precipitación

Un método gravimétrico puede involucrar varios procesos de separación, pero su clasificación se basa en la técnica de separación predominante.

### 1.1. Tipos de análisis gravimétrico

#### 1.1.1. Métodos gravimétricos por volatilización o destilación

Los métodos gravimétricos por volatilización o destilación tienen como fundamento la separación del analito del resto de los componentes de la muestra mediante un procedimiento que conlleva la volatilización, evaporación o destilación de determinadas sustancias con la ayuda del calor. Finalmente se pesa con precisión el residuo no volatilizado.

El analito puede ser el residuo que finalmente se pesa o puede ser el compuesto volatilizado. En el primer caso se habla de un método por volatilización directo y en el segundo estamos en presencia de un método por volatilización indirecto

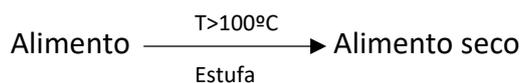
#### Método directo

Muestra  $\xrightarrow{\text{Calor}}$  Residuo (analito) + componente volatilizado

#### Método indirecto

Muestra  $\xrightarrow{\text{Calor}}$  Residuo + componente volatilizado (analito)

Un ejemplo de método directo por volatilización es la determinación de cenizas y un método indirecto es la determinación de humedad.



$$\% \text{Humedad} = \frac{m(\text{agua})}{m(\text{alimento})_{\text{inicial}}} \times 100 = \frac{m(\text{alimento})_{\text{inicial}} - m(\text{alimento})_{\text{seco}}}{m(\text{alimento})_{\text{inicial}}} \times 100$$



$$\% \text{Cenizas} = \frac{m(\text{cenizas})}{m(\text{alimento})_{\text{inicial}}} \times 100$$

### 1.1.2. Métodos gravimétricos por extracción

Los métodos gravimétricos por extracción se basan en la separación del analito del resto de los componentes de la muestra mediante un proceso de extracción (generalmente sólido-líquido); ya sea empleando disolventes orgánicos que solubilizan el compuesto objeto de estudio, o con solución ácida, básica, o neutra que separe los interferentes. El compuesto que se desea analizar se determina bien por pesada directa o bien por diferencia de pesada.

En el análisis de los alimentos, las técnicas más importantes que emplean métodos gravimétricos por extracción están dirigidas a la determinación de dos componentes de significativa importancia para la nutrición, las grasas y la fibra dietética.

### 1.1.3. Métodos gravimétricos por precipitación

El tipo de análisis gravimétrico más importante y habitual es el de precipitación. Se define como **forma precipitada** el compuesto insoluble formado en la reacción entre la sustancia de interés y el reactivo precipitante, y como **forma ponderable** el compuesto que se pesa para obtener el resultado del análisis. Estas dos formas pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, en la determinación de calcio con oxalato, la forma precipitada será el oxalato de calcio,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , y la forma ponderable es el óxido de calcio,  $\text{CaO}$ , que se puede obtener al calcinarlo. Sin embargo, en la precipitación de bario con sulfato, se precipita y se pesa como sulfato de bario,  $\text{BaSO}_4$ , sin experimentar cambios en su composición.

No todos los compuestos insolubles que puede formar un elemento pueden ser utilizados en análisis gravimétrico. Sólo es posible utilizar un compuesto insoluble, en la determinación gravimétrica de un elemento, si cumple una serie de condiciones:

1. Solubilidad: El precipitado debe ser lo suficientemente insoluble para que la parte soluble no afecte al resultado del análisis (0.0001 g/l).

2. Pureza: Las propiedades físicas del precipitado deben ser tales que los contaminantes se puedan liberar por tratamientos sencillos, como puede ser el lavado.
3. Filtrabilidad: Debe ser posible aislar cuantitativamente el precipitado sólido de la fase líquida por métodos de filtración sencillos y rápidos. Por eso son más convenientes los precipitados de cristales grandes que no obturan los poros del filtro y además adsorben menos sustancias de la disolución, son menos contaminables puesto que su superficie específica es menor.

Pocos precipitados o reactivos reúnen estos requisitos. Los reactivos tienden a dar productos poco solubles con más de un analito; muchos precipitados son difíciles de manipular y purificar.

La forma ponderable, a su vez, debe cumplir también una serie de condiciones:

1. Composición química conocida.
2. Estabilidad química (no higroscópico, ni absorba CO<sub>2</sub> atmosférico, que no se oxide fácilmente al aire, etc)
3. Peso fórmula elevado para minimizar errores de pesada, pérdidas debidas a la solubilidad del precipitado o a la transferencia incompleta del precipitado al filtro.

El **tamaño de partícula** determina la facilidad con que se filtra y purifica un precipitado.

La relación existente entre tamaño de partícula y facilidad de filtración es directa:

- los precipitados de tamaño grande se retienen sobre los medios porosos y, por tanto, son fácilmente filtrables.
- los precipitados de tamaño pequeño requieren filtros densos, que presentan baja velocidad de filtración.

El precipitado se debe aislar del resto de la disolución mediante un proceso de **filtración**  
Hay dos técnicas generales de filtración:

- Con papel de filtro de peso de cenizas conocido (cuando el precipitado se calcina)
- Con placa filtrante (cuando el precipitado se seca)

Después de filtrar el precipitado se lava con objeto de eliminar las impurezas adsorbidas en la superficie del precipitado y la disolución madre que lo impregna.

Por último el precipitado se seca o se deja secar en el filtro y se transfieren filtro y precipitado a un crisol, que se ha llevado previamente a pesada constante. Se calcinan empleando mechero y después, si es necesario, en un horno eléctrico o mufla. El calcinado se realiza para quemar el papel y en ocasiones para que el compuesto pase a la forma ponderable.

Si el precipitado se filtra sobre placa filtrante, se seca en la trompa de vacío y luego en la estufa a 110-120°C, para eliminar el agua adsorbida.

## 1.2. Cálculos y expresión de los resultados

El análisis gravimétrico se basa en dos medidas experimentales:

- el peso de la muestra tomada
- el peso del sólido obtenido a partir de esta muestra

Los resultados del análisis se expresan frecuentemente en porcentaje de analito.

$$\% \text{ analito} = \frac{\text{masa (analito)}(g)}{\text{masa (muestra inicial)}(g)} \cdot 100$$

Normalmente no se pesa la sustancia a determinar si no un compuesto suyo y por lo tanto es necesario calcular a qué cantidad de sustancia que se determina corresponde la cantidad encontrada de precipitado. La relación entre el peso fórmula (PF) de la sustancia buscada y el peso fórmula de la sustancia pesada es lo que se conoce como factor gravimétrico (FG).

$$FG = \frac{a}{b} \cdot \frac{PF(\text{analito})}{PF(\text{sustancia pesada})}$$

Donde:

**a** y **b** son números enteros que toman el valor necesario para establecer la equivalencia química entre las sustancias en el numerador y denominador. Esta condición se alcanza con frecuencia igualando el número de átomos de un elemento (que no sea oxígeno) que sea común en ambos términos.

Por ejemplo:

Analito  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y sustancia pesada  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ :

$$FG = \frac{2}{3} \cdot \frac{PF(\text{Fe}_3\text{O}_4)}{PF(\text{Fe}_2\text{O}_3)}$$

Analito  $\text{MgO}$  y sustancia pesada  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ :

$$FG = 2 \cdot \frac{PF(\text{MgO})}{PF(\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7)}$$

Y finalmente tendremos:

$$\% \text{ analito} = \frac{\text{masa (sustancia pesada)}}{\text{masa (muestra tomada)}} \cdot FG \cdot 100$$

## 1.3. Aplicaciones del análisis gravimétrico

### Determinación de humedad en leche en polvo

El agua, contenida en la leche en polvo, se elimina por calentamiento de la muestra en una estufa de desecación, a una temperatura de  $102^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ , hasta peso constante.

### Determinación de humedad en cereales

El contenido en agua de un alimento se define convencionalmente como la pérdida de masa que experimenta en condiciones determinadas. El producto se seca a 130°C a presión atmosférica normal, durante una hora y media.

Este método de desecación a 130°C se aplica a granos, harinas y otros productos derivados de los cereales, reducido a partículas de dimensiones inferiores o iguales a 1700 $\mu$ , de los cuales menos del 10% serán superiores a 1000 $\mu$  y más del 50% inferiores a 500 $\mu$ .

#### Determinación de cenizas en productos cárnicos

Adición de solución de acetato de magnesio, desecación en baño de agua o en baño de arena, incineración a 550°C y posterior determinación de la masa del residuo, teniendo en cuenta la cantidad de óxido de magnesio proveniente de la adición de la solución de acetato de magnesio utilizada en primer lugar.

#### Determinación del contenido de grasa total en productos cárnicos (Metodo Soxhlet)

Extracción de la grasa de la muestra previamente hidrolizada y desecada, por medio de hexano o éter de petróleo. Eliminación del disolvente por evaporación, desecación del residuo y posterior pesada después de enfriar.

#### Determinación de fibra dietética insoluble (FDI) en cereales

La muestra se extrae con una solución de detergente neutro en caliente. La determinación de las cenizas en el residuo filtrado permite conocer por diferencia, de peso, la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina de la muestra.

## **2. VOLUMETRÍA**

El análisis volumétrico consiste en la medida de volumen de reactivo necesario para reaccionar con el analito. Midiendo de forma exacta el volumen de reactivo (de concentración conocida) necesario para reaccionar completamente con el analito será posible calcular su concentración en la muestra.

Los métodos volumétricos son normalmente más rápidos y versátiles que los gravimétricos, ya que no suelen ser necesarios procesos de separación para preparar las disoluciones de valoración. También es más versátil porque se puede optimizar no sólo el peso de la muestra sino también la concentración del valorante para obtener la mejor precisión en cada rango de analito.

La precisión puede ser buena a altas concentraciones del analito, pero a veces cae por debajo del 5%, siendo entonces mejores los métodos gravimétricos. Los métodos volumétricos carecen de la "independencia" de los gravimétricos, ya que depende de materiales estándar para cuantificar los resultados.

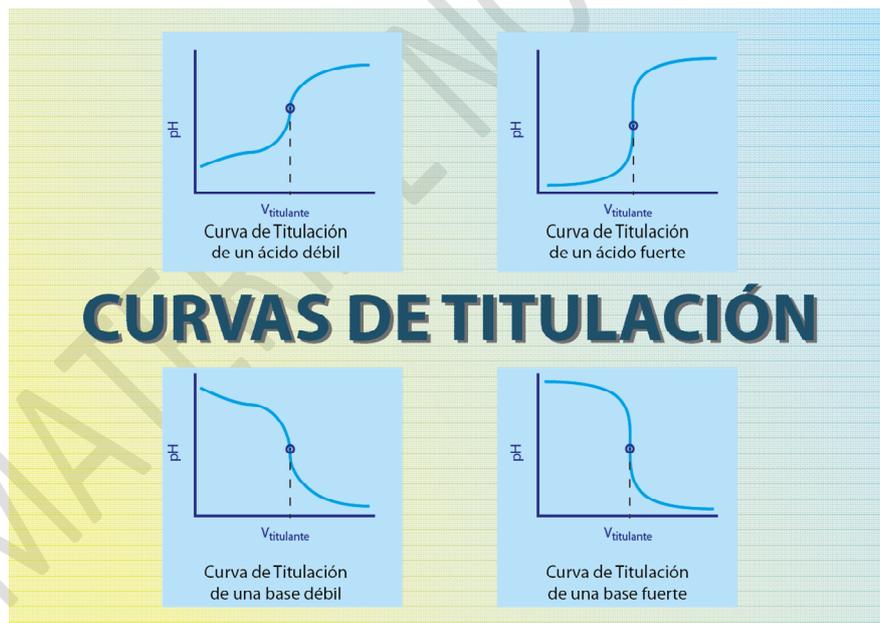
Las determinaciones volumétricas pueden tener varias fuentes de error, pero en general los requisitos de manipulación son menos importantes que en el caso de los métodos gravimétricos.

El objetivo de un análisis volumétrico o **valoración** es la adición de la disolución patrón en una cantidad que es químicamente equivalente a la sustancia con la que reacciona. Esto se produce en el **punto de equivalencia**. El punto de equivalencia sólo se puede apreciar mediante algún cambio físico asociado con la condición de equivalencia. Estos cambios ocurren en el **punto final** de la valoración. La diferencia entre el volumen del punto de equivalencia y el punto final es el **error en la valoración**:

$$E_{\text{valoración}} = V_{\text{punto final}} - V_{\text{punto equivalencia}}$$

Este error se puede minimizar escogiendo una propiedad física cuyo cambio sea fácilmente observable (como el cambio de color de un indicador, el pH, etc.), de manera que el punto final esté muy próximo al de equivalencia. La estimación del error de valoración es posible llevarla a cabo a través de la **valoración del blanco**, que consiste en realizar el mismo procedimiento, pero en ausencia del analito y restando el volumen del blanco al de la muestra.

En el análisis volumétrico es habitual el empleo de una representación gráfica de la variación de la concentración de uno de los reactivos de la valoración (analito o valorante) con respecto al volumen de valorante añadido al medio de valoración. Esta gráfica se llama **curva de valoración**. Habitualmente se representa en el eje de ordenadas la función **p** (-log) de la concentración, en lugar de la concentración. Estas curvas tienen forma sigmoideal con un punto de inflexión en el punto de equivalencia.



Los cambios físicos más habitualmente empleados para la detección del **punto final** son cambios visuales (cambio de color, turbidez, etc) y cambios eléctricos (cambio de potencial, corriente eléctrica o conductividad). El punto final de la reacción podrá determinarse de forma visual o de forma instrumental.

#### Punto final visual

La forma más común de observar el punto final de una volumetría es agregar un **indicador** químico a la disolución de analito para producir un cambio físico observable cerca del punto

de equivalencia. Entre los cambios típicos de los indicadores se incluyen la aparición, desaparición o cambio de color y la aparición o desaparición de turbidez.

Los **indicadores** pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de reacción química de valoración en la que se empleen (ácido-base, redox, de precipitación, etc), aunque un mismo tipo de indicador puede emplearse en distintos tipos de volumetrías.

#### Punto final instrumental

Es cada vez más frecuente el empleo de instrumentos que detectan un cambio físico en las inmediaciones del punto de equivalencia, como:

- voltímetros y amperímetros para detectar cambios bruscos de potencial eléctrico o de intensidad de corriente,
- colorímetros y espectrofotómetros para detectar cambios en la absorción de radiación electromagnética
- Turbidímetros, pHmetros, sensores de temperatura, refractómetros y medidores de conductividad eléctrica.

Un **patrón primario** es un compuesto de alta pureza que sirve de referencia en todos los métodos volumétricos. La exactitud del análisis volumétrico depende del patrón primario utilizado para establecer la concentración de la disolución patrón. Los patrones primarios han de cumplir los siguientes requisitos:

- Elevada pureza
- Estabilidad al aire y a las temperaturas normales de secado
- Ausencia de agua de hidratación
- Fácil adquisición
- Fácilmente soluble en el medio de valoración
- Un peso equivalente elevado para disminuir los errores asociados a la operación de pesada.

Existen pocas sustancias que cumplen los requisitos para ser consideradas patrones primarios y por ello se acude al empleo de sustancias **patrón tipo secundario**, cuya riqueza debe comprobarse previamente. Ejemplos de patrones secundarios son: sulfato amónico ferroso, permanganato potásico, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, etc.

Las disoluciones preparadas con patrones secundarios deben ser **estandarizadas** frente a un patrón primario.

La disolución patrón ideal para el análisis volumétrico debe cumplir los siguientes requisitos:

- 1.- Su concentración debe ser indefinidamente invariable
- 2.- Su reacción debe ser rápida
- 3.- La reacción con el analito debe ser completa
- 4.- Debe reaccionar sólo con el analito, y esta reacción debe ser descrita por una ecuación química igualada.

## 2.1 Tipos de Volumetrías

### 2.1.1. Clasificación en función del procedimiento de valoración

Dependiendo la forma en que se realiza la valoración, los métodos volumétricos pueden clasificarse en métodos **directos** y métodos **indirectos**.

#### 2.1.1.1. Métodos de valoración directos

Una valoración **directa** es aquella en la cual el analito (sustancia que se desea cuantificar) reacciona directamente con el patrón valorante. Los métodos de valoración directos se emplean siempre que la reacción entre el analito y el valorante cumpla satisfactoriamente con los **requisitos** de una reacción para ser empleada en análisis volumétrico:

- Sencilla: La reacción entre el analito y el valorante debe ser simple, ya que es la base de los cálculos para la obtención del resultado final.
- Rápida: Para llevar a cabo la volumetría en poco tiempo, de lo contrario sería necesario esperar cierto tiempo tras cada adición de valorante, resultando un método poco práctico.
- Estequiométrica: Debe existir una reacción definida.
- Completa: Debemos asegurarnos de que los reactivos se hayan consumido por completo.

Sin embargo, muchas reacciones no satisfacen algunos de estos requerimientos; o bien no son lo suficientemente rápidas, o bien no son estequiométricas, o a veces no se dispone de un indicador capaz de detectar el punto de equivalencia.

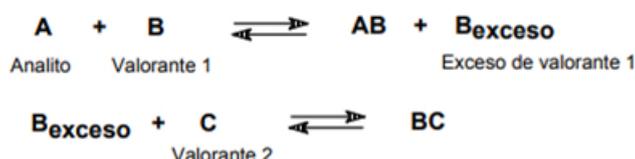
#### 2.1.1.2. Métodos de valoración indirectos

Una valoración indirecta es aquella en la que el analito no reacciona directamente con el patrón valorante, sino que se recurre a un procedimiento analítico para cuantificar la sustancia que se desea de forma indirecta.

Existen varias formas de realizar una valoración indirecta, pero los dos de mayor interés en el análisis químico de los alimentos son los métodos de valoración **por retroceso** y los métodos de valoración **por sustitución**.

##### Métodos de valoración por retroceso

En los métodos de valoración por retroceso a la solución que contiene al analito, se añade un volumen conocido de solución patrón de concentración exactamente conocida, de manera que una vez que reaccione completamente con el analito, quede un exceso de sustancia patrón sin reaccionar. Después se valora este exceso con un segundo patrón valorante (también de concentración exactamente conocida).



## Métodos de valoración por sustitución

Se basan en la sustitución de ion por otro que se pueda analizar. Un análisis que ilustra muy bien el procedimiento de valoración por sustitución es la estandarización de una solución de tiosulfato de sodio.

El estándar primario que se emplea en esta valoración es el dicromato de potasio. Sin embargo, la reacción entre el  $K_2Cr_2O_7$  y el  $Na_2S_2O_3$  tiene un carácter complejo, no estequiométrico y no puede ser expresada con una sola ecuación, por lo que resulta imposible valorar directamente el  $K_2Cr_2O_7$  con el  $Na_2S_2O_3$ . Por ello que se recurre a un método de valoración por sustitución, añadiendo yoduro potásico a la solución de  $K_2Cr_2O_7$  se añade en medio ácido.

### **2.1.2. Clasificación en función de la naturaleza de la reacción química**

Las volumetrías se pueden clasificar de acuerdo con la **naturaleza de la reacción química** de valoración en volumetrías **ácido-base**, de **oxidación-reducción**, de **complejación** y de **precipitación**. La detección más habitual del punto final de la reacción se realiza mediante el empleo de indicadores apropiados para cada tipo de reacción química. También es posible emplear métodos instrumentales, como por ejemplo, pHmetro en volumetrías ácido-base, medidas potenciométricas en volumetrías redox, medida de absorción de radiación en valoraciones complexométricas y turbidimetría o refractómetros en valoraciones de precipitación.

#### **2.1.2.1. Volumetrías ácido-base (o de neutralización)**

La volumetría de neutralización comprende un conjunto de reacciones que tienen lugar entre un ácido y una base con la correspondiente formación de sal y agua. Mediante estos métodos, utilizando una solución valorada de algún ácido se puede realizar la determinación cuantitativa de sustancias que se comportan como base o, empleando una solución valorada de algún álcali, se pueden determinar cuantitativamente sustancias que se comportan como ácidos.

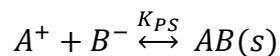
Las principales soluciones patrones que se emplean en los métodos volumétricos de neutralización son soluciones ácidas de HCl y  $H_2SO_4$  o soluciones básicas de NaOH y KOH. Ninguna de estas sustancias son patrones tipo primario, por lo que una vez preparadas a una concentración aproximada deben ser valoradas o estandarizadas para determinar exactamente su concentración.

Como indicadores se emplean ácidos orgánicos débiles o bases orgánicas débiles que muestran distintos colores en sus formas disociada y no disociada. Algunos de los más empleados son:

- fenoftaleina cambia de incolora a rosa; intervalo de pH 8.3 a 10.0.
- rojo metilo cambia de rojo a amarillo; intervalo de pH 4.2 a 6.2
- azul de bromotimol cambia de amarillo a azul; intervalo de pH 6.0 a 7.6

### 2.1.2.2. Volumetrías de precipitación

La volumetría de precipitación se basa en reacciones que van acompañadas de la formación de un producto difícilmente soluble según la reacción general:



Aunque se conocen muchas reacciones de formación de precipitados, solo algunas de ellas pueden emplearse en el análisis volumétrico, debido a que deben cumplir una serie de requisitos:

- El precipitado formado debe ser prácticamente insoluble.
- La precipitación debe ser rápida, para que no se produzcan soluciones sobresaturadas.
- Los resultados de la valoración no deben verse afectados por fenómenos de adsorción o coprecipitación.
- Debe existir la posibilidad de establecer el punto de equivalencia de la valoración.

Los métodos más importantes son los llamados “métodos argentométricos”, basados en reacciones de formación de sales de plata poco solubles (con aniones de Cl, I, Br y SCN entre otros).

Un concepto esencial directamente relacionado con los principios que rigen la volumetría de precipitación es el de constante del **producto de solubilidad** ( $K_{ps}$ ).

La precipitación de un sólido en el seno de una disolución es un equilibrio dinámico en el sentido de que la sal poco soluble  $AB(s)$  está sometida a un constante proceso de disolución así como de formación, pero las velocidades de estos dos procesos son iguales en el estado de equilibrio, por lo que el sistema no experimenta ningún cambio apreciable en su composición. Así pues, el equilibrio entre la sal  $AB(s)$  y sus iones en solución acuosa puede describirse mediante la siguiente expresión:

$$K_{eq} = \frac{c(A^+) \cdot c(B^-)}{c(AB_{(s)})}$$

En disoluciones saturadas la constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) se denomina constante del producto de solubilidad ( $K_{ps}$ ) y puede definirse como “el valor (máximo y constante) del producto de las concentraciones de los iones en solución en equilibrio con su precipitado”:

$$K_{eq} = K_{ps} = c(A^+) \cdot c(B^-)$$

Existen dos tipos de indicadores empleados en volumetrías de precipitación:

- Indicadores que forman precipitados o complejos coloreados en presencia de un exceso de valorante (p. e.: valoración de Mohr y Volhard)
- Indicadores que forman color cuando se adsorben en la superficie del precipitado del analito.

### 2.1.2.3. Volumetrías de oxidación-reducción (redox)

La volumetría de oxidación reducción o volumetría redox, se basa en reacciones con transferencia de electrones entre dos sustancias, en las que una de las sustancias se reduce (acepta electrones) y la otra se oxida (cede electrones). La sustancia que se reduce o acepta electrones se denomina **agente oxidante** y la que se oxida o cede electrones se denomina **agente reductor**.

Los métodos volumétricos basados en procesos de oxidación reducción son más numerosos y diversos que los basados en cualquier otro tipo de reacción. En su forma más sencilla, una reacción de oxidación reducción se puede escribir:



Los indicadores redox son sustancias que experimentan oxidación o reducción en el punto de equivalencia de la valoración. Otros indicadores empleados en volumetrías redox son sustancias que producen cambios visuales al interaccionar con uno de los reactivos o productos de la reacción redox; cómo es el caso del almidón en las yodometrías.

#### 2.1.2.4. Volumetrías de formación de complejos (complexometría)

La volumetría de formación de complejos (también conocida como complexometría) se basa en la formación de un complejo soluble mediante la reacción de la especie que se valora (generalmente un ion metálico) y la solución valorante que constituye el agente complejante.

Muchas reacciones dan iones complejos o moléculas neutras sin disociar; pero pocas pueden usarse en volumetría, pues la mayoría de los complejos son demasiado inestables para la valoración cuantitativa. Para que un agente complejante pueda usarse en complexometría debe:

- Formar solo un compuesto definido.
- Reaccionar cuantitativamente sin reacciones secundarias.
- El valorante y el complejo formado han de ser estables.
- La reacción debe ser rápida.
- Se ha de disponer un medio definitivamente visible para determinar el punto estequiométrico.

La forma más efectiva para determinar el punto final en valoraciones quelométricas o complexométricas es mediante el uso de un **indicador metalocrómico**, compuesto quelante que forma un complejo estable, soluble y coloreado con el analito y muestra un color diferente en ausencia del analito.

Son ejemplos de indicadores metalocrómicos más conocidos están el Negro de Eriocromo T y el Violeta de Pirocatecol.

## 2.2. Expresión de los resultados

Una vez concluida la determinación analítica es imprescindible expresar los resultados obtenidos en forma de concentración, es decir, referir la cantidad de analito cuantificado en

función de la cantidad de muestra (matriz) tomada para el análisis. Por otra parte, en cualquier método de análisis volumétrico es necesario también conocer la concentración de las soluciones con que se trabaja. Resulta imprescindible conocer las formas más usuales de expresar la concentración, tanto de las soluciones empleadas en el análisis como de los resultados de la cuantificación.

### Fracción másica

La fracción másica ( $\omega$ ) es una forma de expresar la concentración que expresa la masa de soluto ( $m_s$ ) contenida en una unidad de masa de muestra ( $m_m$ ):

$$\omega = \frac{m_s}{m_m}$$

Puede expresarse en g/g, mg/g, mg/Kg, etc

### Fracción volumétrica

La fracción volúmica ( $\varphi$ ) expresa el volumen de soluto ( $V_s$ ) contenida en un volumen de muestra ( $V_m$ ):

$$\varphi = \frac{V_s}{V_m}$$

Generalmente se expresa en ml/ml

### Porcentaje masa-masa

Expresa los gramos de soluto ( $m_s$ ) contenidos en 100g de muestra ( $m_m$ ):

$$\% \frac{m}{m} = \frac{m_s(g)}{m_m(g)} \cdot 100$$

### Porcentaje masa-volumen

Expresa los gramos de soluto ( $m_s$ ) contenidos en 100ml de muestra ( $V_m$ ):

$$\% \frac{m}{v} = \frac{m_s(g)}{V_m(ml)} \cdot 100$$

### Porcentaje volumen-volumen

Expresa los mililitros de soluto ( $V_s$ ) contenidos en un 100ml de muestra ( $V_m$ ):

$$\% \frac{v}{v} = \frac{V_s(ml)}{V_m(ml)} \cdot 100$$

### Molaridad (M)

Expresa el número de moles de soluto ( $n_s$ ) en un litro de disolución ( $V_d$ ):

$$M = \frac{n_s(\text{moles})}{V_d(L)}$$

A su vez el nº de moles de soluto se determinará teniendo en cuenta el peso fórmula de la sustancia ( $PM_s$ ):

$$n_s = \frac{m_s(g)}{PM_s(g/mol)} \cdot 100$$

### Normalidad (N)

Expresa el número de equivalentes (eq) de soluto que están contenidos en un litro de disolución o el número de miliequivalentes (meq) de soluto por mL de disolución:

$$N = \frac{eq_s}{V_d(L)} = M \cdot valencia$$

En una valoración, en el punto de equivalencia, el número de equivalentes (o miliequivalentes) del patrón es exactamente el mismo que el número de equivalentes (o miliequivalentes) del analito.

El número de equivalentes (nº eq) se obtiene dividiendo el peso de la sustancia en gramos por su peso equivalente:

$$n^\circ eq = \frac{\text{peso}}{\left( \frac{PM}{n^\circ \text{partículas intercambiadas}} \right)}$$

El **peso equivalente** de una sustancia que participa en una reacción de neutralización es el peso en gramos de la sustancia que puede aportar o reaccionar con un peso fórmula gramo de ion hidrógeno ( $H^+$ ) en una reacción determinada. El peso miliequivalente es igual al peso equivalente dividido por 1000.

El peso equivalente y el peso fórmula gramo (PM) de los ácidos y las bases, en una reacción determinada, presentan una relación directa con el contenido de iones hidrógeno o hidróxido reactivos.

Por ejemplo:  $\text{Peq Ba(OH)}_2 = \frac{1}{2} PM \text{ Ba(OH)}_2$

$\text{Peq SO}_4^{2-} = \frac{1}{2} PM \text{ H}_2\text{SO}_4$

### **2.3. Aplicaciones del análisis volumétrico**

#### Determinación del índice de yodo en aceites y grasas comestibles

La grasa, previamente disuelta, se mezcla con un volumen de solución de monobromuro de yodo. La cantidad de yodo que no se adiciona a los dobles enlaces de los ácidos grasos, se valora en forma de triyoduro con tiosulfato de sodio en presencia de almidón como indicador.

El índice de yodo se expresa convencionalmente como los gramos de yodo absorbidos por cien gramos de materia grasa.

### Determinación del índice de peróxidos en aceites y grasas comestibles

La muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con solución de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato sódico hasta el viraje del almidón

### Determinación de azúcares reductores

Eliminación previa de todas las materias reductoras distintas de los azúcares reductores por defecación y posterior valoración basada en la acción reductora de los azúcares sobre una solución crupo-alkalina.

### Determinación de calcio en leches

El calcio total se lleva a disolución por precipitación de las materias proteicas con ácido tricloroacético. El calcio contenido en el filtrado es precipitado bajo forma de oxalato de calcio, que se separa por centrifugación y se valora con permanganato de potasio.

### Determinación de calcio en vinos

Valoración del calcio por complexometría sobre la solución nítrica o clorhídrica de las cenizas en vino.

### Determinación de caseína en leche

Se determina la cantidad total de nitrógeno de la leche. A continuación, la caseína se precipita con un tampón acético-acetato y se filtra. Se determina luego la cantidad de nitrógeno del filtrado. La cantidad de caseína se calcula con estas dos determinaciones de nitrógeno, que se realizan por el método Kjeldahl.

### Determinación de proteínas totales por el método Kjeldahl

En este método una determinada cantidad pesada de leche se trata con ácido sulfúrico en presencia de óxido de mercurio II como catalizador con objeto de transformar el nitrógeno de los compuestos orgánicos en nitrógeno amoniacal. El amoníaco se libera por adición de hidróxido de sodio, se destila y se recoge en una solución de ácido bórico. A continuación se valora el borato formado con solución de ácido clorhídrico.

### Determinación del índice de acidez en aceites y grasas comestibles

El método se basa en la neutralización de los ácidos grasos libres presentes en el aceite o grasa con solución etanólica de hidróxido de potasio en presencia de fenolftaleína como indicador. El índice de acidez se expresa en mg de Hidróxido de Potasio necesarios para neutralizar un gramo de grasa. También puede expresarse en porcentaje de ácido oléico.

### Determinación del índice de saponificación en aceites y grasas comestibles

Constituye una medida del peso molecular promedio de los glicéridos que la constituyen y se fundamenta en la saponificación de la muestra de grasa por adición de KOH y valoración del exceso de álcali con solución estandarizada de HCl. Los resultados se expresan como los mg

de KOH necesarios para saponificar por completo 1 g de grasa. Este método es aplicable a aceites y grasas con un contenido de ceras inferior al 5%.

Determinación de cloruro de sodio en productos cárnicos por el método de Volhard

Se basa en la determinación de cloruros presentes en un extracto de la muestra que ha sido obtenido por tratamiento con agua caliente y precipitación de las proteínas. A una parte alícuota del extracto obtenido se añade un exceso de solución de nitrato de plata y se valora con solución de tiocianato de potasio en presencia de un indicador de sulfato férrico de amonio.

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 12**

**POTENCIOMETRÍA. FUNDAMENTO. ELECTRODOS. OTROS MÉTODOS  
ELECTROQUÍMICOS. APLICACIONES.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. FUNDAMENTO TEÓRICO**

### **2. ELECTRODOS**

2.1. Electrodo de referencia

2.2. Electrodo indicadores

2.2.1. Electrodo indicadores metálicos

2.2.2. Electrodo de membrana

### **3. OTROS MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS**

3.1. Métodos electrogravimétricos y coulombimétricos

3.2. Voltamperometría

3.3. Polarimetría

3.4. Conductimetría

### **4. APLICACIONES**

MATERIAL NO OFICIAL

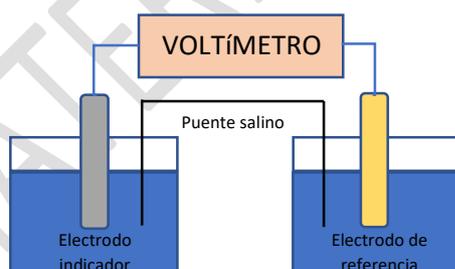
## 1. FUNDAMENTO.

Los **métodos potenciométricos** de análisis se basan en las medidas del potencial de celdas electroquímicas en ausencia de corrientes apreciables. Dicho de otra manera, los métodos potenciométricos son aquellos que miden la diferencia de potencial entre dos electrodos de una célula galvánica en condiciones de intensidad de corriente cero, siendo su objetivo determinar la concentración de los analitos a partir de los datos de potenciales de electrodo.

Al electrodo empleado en la determinación de la concentración del analito le llamamos **electrodo indicador**, el cual se utiliza junto con un **electrodo de referencia** cuyo potencial es independiente de la concentración del analito y de otros iones presentes en la disolución.

Existen dos métodos para hacer mediciones experimentales. El primero es hacer una medición del potencial de la celda; esto es suficiente para determinar la actividad del ion que nos interesa. En el segundo, el ion a determinar se valora y el potencial se mide en función del volumen de agente valorante. Al primer método se le llama **potenciometría directa** y se utiliza principalmente para medir el pH de disoluciones acuosas. Al segundo método se le llama **valoración potenciométrica** y se utiliza para detectar el punto de equivalencia en una valoración. Este segundo método es aplicable a todo tipo de volumetrías.

En la siguiente figura se representa un esquema de montaje de un análisis potenciométrico. En la zona donde se introduce el electrodo indicador se encuentra la especie cuya concentración se desea determinar y el electrodo de referencia está introducido en otra disolución con concentración conocida de sus componentes.



La lectura de voltaje registrada es debida, en principio, a la especie de interés que se aproxima al electrodo indicador.

El voltaje que se determina en los análisis potenciométricos potencial de celda ( $E_{\text{celda}}$ ) el cual es la diferencia entre los voltajes originados por los dos electrodos, el indicador y el de referencia. Los electrodos son sensibles a las actividades de las moléculas o iones que los rodean, siendo capaces de aceptar electrones de ellos, o por el contrario cedérselos.

Los dos compartimientos están conectados, por lo que fluyen electrones del electrodo donde ocurre la reducción (cátodo), hacia el electrodo donde tiene lugar la oxidación

(ánodo). Sin embargo, esta transferencia de electrones (o corriente) es casi nula, ya que de lo contrario las reacciones redox evolucionarían hasta modificar por completo las concentraciones e identidades de las especies involucradas. El voltímetro apenas permite el paso de los electrones, de forma que la lectura de voltaje es estable, y la celda puede alcanzar el equilibrio.

El potencial de la celda se relaciona con las actividades o concentraciones de las especies de interés mediante la **ecuación de Nernst**:

Dada una reacción  $aA + bB \rightarrow cC + dD$ , y la actividad de los reactivos y productos ( $a$ ), su cociente de reacción será:  $Q = \frac{(a_C)^c \cdot (a_D)^d}{(a_A)^a \cdot (a_B)^b}$

Y cuando alcanza el equilibrio  $Q = K_{eq} = \frac{(a_C)^c \cdot (a_D)^d}{(a_A)^a \cdot (a_B)^b}$

Aproximando la actividad a la concentración molar tendremos:

$$E_{celda} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}$$

Teniendo en cuenta los valores de las constantes universales R y F en la ecuación de Nernst, a la temperatura estándar de 25°C (298,15K) y el factor de conversión 2,302 para el cambio de logaritmo neperiano a logaritmo decimal la ecuación se reduce a:

$$E_{celda} = E^0 - \frac{0,059}{n} \log_{10} \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}$$

El potencial de una pila utilizada para medidas potenciométricas directas se puede expresar (por convenio) de la siguiente forma:

$$E_{celda} = E_{referencia} - E_{indicador} + E_j$$

Donde el potencial de unión líquida ( $E_j$ ) tiene dos componentes, el primero en la interfase entre el analito y un extremo del puente salino y el segundo entre la disolución del electrodo de referencia y el otro extremo del puente. Estos dos potenciales tienden a anularse uno al otro. Este potencial no puede determinarse pero hay que tratar de que su valor mínimo utilizando soluciones muy diluidas, o procurando que las composiciones en ambos compartimientos sean parecidas.

## 2. ELECTRODOS

Como se ha indicado anteriormente el electrodo empleado en la determinación de la concentración del analito le llamamos es electrodo indicador. Es necesario el empleo de un electrodo de referencia cuyo potencial es independiente de la concentración del analito y de otros iones presentes en la disolución.

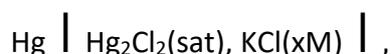
### 2.1. Electrodo de referencia

Es el electrodo cuyo potencial de semicelda es conocido, constante y completamente insensible a la composición de la disolución. Un electrodo de referencia ideal tiene las siguientes características:

- Es reversible y obedece a la ecuación de Nerst
- Presenta un potencial constante todo el tiempo
- Retorna a su potencial original después de haber estado sometido a pequeñas corrientes
- Presenta poca histéresis con ciclos de temperatura

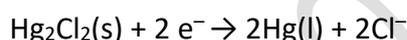
#### Electrodo de calomelanos

Se puede representar esquemáticamente de la siguiente forma:



donde x representa la concentración molar de cloruro de potasio en disolución.

La reacción del electrodo será:



El potencial de este electrodo solamente dependerá de la concentración del electrolito KCl. El más utilizado en análisis química es el ECS (Electrodo de Calomelanos Saturado) debido a su fácil preparación. Sin embargo presenta ciertos inconvenientes tales como que su coeficiente de temperatura es significativamente mayor en comparación con otros; y también que al cambiar la temperatura, el valor del nuevo potencial se alcanza lentamente debido al tiempo requerido para restablecer el equilibrio de solubilidad del cloruro de potasio y de calomelanos. El potencial del electrodo de calomelano saturado a 25°C es de 0,2444 V.

#### Electrodo de plata-cloruro de plata

Consiste básicamente en un electrodo de plata sumergido en una disolución de KCl saturada con AgCl.



La semirreacción es  $\text{AgCl}(\text{s}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}(\text{s}) + \text{Cl}^-$

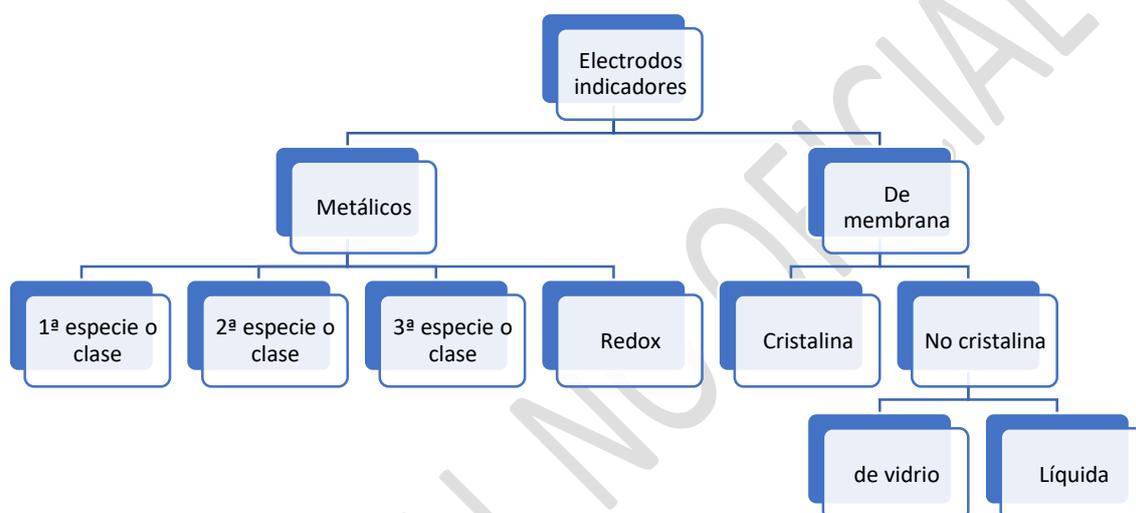
Los modelos comerciales de este electrodo son semejantes en apariencia externa a los electrodos de calomelanos, si bien en estos de plata / cloruro de plata, el tubo interno se reemplaza por un alambre de plata recubierto con una capa de cloruro de plata que se encuentra sumergido en una disolución de cloruro de potasio saturada con cloruro de plata.

Los electrodos de Ag/AgCl tienen la ventaja de que pueden utilizarse a temperaturas superiores a 60°C, mientras que los electrodos de calomelanos no. Por otra parte los iones

Hg reaccionan con menos componentes de la muestra que los iones plata. Tales reacciones pueden conducir a la obturación de la unión entre el electrodo y la disolución del analito.

## 2.2. Electrodo indicadores

La característica fundamental que debe reunir un electrodo indicador es que responda rápida y reproduciblemente a los cambios en la concentración de un analito (o grupo de iones). No existe aún ningún electrodo indicador totalmente específico en su respuesta aunque algunos presentan una notable selectividad. Los electrodos indicadores se pueden clasificar en:



### 2.2.1. Electrodo indicadores metálicos

#### Primera especie

Son aquellos que están en equilibrio directamente con el catión del metal que constituye el electrodo (Cobre, Hierro Níquel, etc..).

Estos electrodos no son muy utilizados en el análisis potenciométrico porque presentan una serie de inconvenientes tales como:

- No son muy selectivos ya que responden no sólo a sus propios cationes sino también a otros cationes más fácilmente reducibles.
- Algunos de estos electrodos metálicos tan sólo se pueden utilizar en disoluciones básicas o neutras ya que en disoluciones ácidas se disuelven.
- Algunos metales se oxidan tan fácilmente que su uso queda restringido a disoluciones previamente desoxigenadas.
- Ciertos metales, tales como hierro, cromo, cobalto y níquel no proporcionan potenciales reproducibles.

### Segunda especie

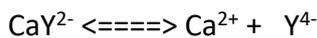
Son aquellos metales que no solo sirven como indicadores de sus propios cationes sino que también responden a la concentración de aniones que forman precipitados poco solubles o complejos de gran estabilidad con esos cationes. Por ejemplo el electrodo de Plata/Cloruro de Plata,

### Electrodos de tercera clase

Un electrodo de tercera clase implica dos equilibrios que afectan a la pareja redox  $Me^+/Me$ . Por ejemplo, un electrodo de tercera clase que responda al ión  $Ca^{2+}$  se puede obtener utilizando AEDT como ligando común para el  $Ca^{2+}$  y  $Hg^{2+}$ . La reacción de intercambio electrónico implica a la pareja redox  $Hg^{2+}/Hg$ .

Un electrodo metálico se convierte en un electrodo de tercera clase cuando se hace que responda a un catión diferente. Por ejemplo:

Sea el electrodo de mercurio utilizado para la determinación del pCa de disoluciones que contienen calcio. Se introduce en la disolución una pequeña concentración de AEDT con Hg (II). Si además introducimos una disolución del AEDT que contenga calcio, se establece un nuevo equilibrio:



Combinando ambos equilibrios (el del Hg (II) con el del calcio en la disolución de AEDT, se consigue que el electrodo de mercurio se transforme en un electrodo de tercera clase para el ión calcio.

### Redox

Estos electrodos son inertes y su potencial depende únicamente del potencial del sistema con el que están en contacto (Platino, Oro, Paladio, etc.)

#### **2.2.2. Electrodos de membrana**

El fundamento de los electrodos de membrana es diferente al de los electrodos de metal que acabamos de tratar. La membrana no da ni recibe electrones, sino que permite que pasen a través de ella ciertos iones sin dejar que pasen otros. El electrodo de vidrio, empleado para determinar el pH es el más conocido de los electrodos de membrana. Hace muchos años se observó que se genera un potencial en una delgada membrana de vidrio que separa dos disoluciones de diferente actividad del ion  $H^+$ . El estudio del electrodo de vidrio ha conllevado al desarrollo de vidrios que responden de forma selectiva a otros iones diferentes al hidrógeno.

Los electrodos de membrana a veces se denominan “p-Ion” ya que los datos que se obtienen de esos electrodos son generalmente funciones p, como pH, pCa, pCl o pF.

#### Electrodo de vidrio para pH:

El electrodo de vidrio comercial consiste en un bulbo de vidrio delgado que contiene un electrodo de referencia interno, casi siempre de Ag/AgCl, y una disolución de ion Hidrógeno



conocidos y no necesitan la calibración previa frente a patrones, ya que la relación funcional entre la cantidad medida y la concentración de analito se puede deducir teóricamente, a partir de la ley de Faraday:

$$m(\text{analito}) = \frac{Q \cdot PM}{F \cdot n}$$

Siendo  $Q$  la cantidad de electricidad que circula que es igual a la corriente por el tiempo que tarda el analito en reducirse.

$PM$  es el peso molecular del analito

$F$  es la constante de Faraday=96485,3 C/mol

$n$  es el número de electrones puestos en juego en la reacción de reducción

La coulombimetría tiene la ventaja frente a la electrogravimetría de que no se necesita obtener un producto pesable y se adapta mejor a la automatización.

### **Voltamperometría**

La voltamperometría es una técnica electroanalítica que proporciona información de una especie química o analito a partir de las corrientes eléctricas generadas por la variación de un potencial aplicado. El potencial aplicado, y el tiempo son las variables independientes; mientras que la corriente es la variable dependiente.

La mayor parte de los métodos voltamperimétricos emplean un sistema conformado por tres electrodos: uno de trabajo (1), auxiliar (2) y el de referencia (3).

El principal electrodo de referencia utilizado es el electrodo de calomelanos (ECS). Este, en conjunto con el electrodo de trabajo, permite establecer una diferencia de potencial  $\Delta E$ , ya que el potencial del electrodo de referencia permanece constante durante las mediciones.

Por otro lado, el electrodo auxiliar se encarga de controlar la carga que pasa al electrodo de trabajo, para así mantenerlo dentro de los valores de  $E$  aceptables. La variable independiente, la diferencia de potencial aplicado, es la obtenida por la sumatoria de los potenciales de los electrodos de trabajo y el de referencia

La especie química normalmente debe ser electroactiva. Esto significa que debe perder (oxidarse) o ganar (reducirse) electrones. Para que la reacción inicie, el electrodo de trabajo debe suministrar el potencial necesario determinado teóricamente por la ecuación de Nerst.

Según el tipo de barrido que se realice se distinguen varias técnicas. Las más usuales son las siguientes:

- Voltamperometría de barrido lineal
- Voltamperometría de impulsos
  - Diferencial
  - De onda cuadrada
- Voltamperometría de redisolución

- Voltamperometría cíclica

### **Polarografía**

La Polarografía es una subclase de voltamperometría donde el electrodo de trabajo es un **electrodo de gota de mercurio (DME)**, útil por su amplio rango catódica y su superficie renovable. Fue inventado por Jaroslav Heyrovský. La polarografía es una medida voltamperométrica cuya respuesta está determinada por el transporte combinado de masa difusión/convección. La polarografía es un tipo específico de medida que cae en la categoría general de voltamperometría de barrido lineal, donde el potencial de electrodo se encuentra alterado en forma lineal desde el potencial inicial hasta el potencial final. Como método de barrido lineal controlado por el transporte de masa por difusión/convección, la respuesta corriente frente a potencial de un experimento polarográfico tiene la típica forma sigmoideal. Lo que hace a la polarografía diferente de otras medidas de voltamperometría lineal de barrido es que polarografía hace uso del electrodo de gota de mercurio.

### **Conductimetría**

La conductimetría es un método que se utiliza para medir la conductividad de una disolución, producida por el transporte de carga eléctrica en forma de electrones o de iones entre dos puntos de diferente potencial.

Está basada en la ley de Ohm: “La unidad de potencial es el voltio, que es la fuerza electromotriz necesaria para que pase un amperio a través de una resistencia de un ohmio”.

$$I = V / R,$$

donde R (resistencia), V (potencial) e I (intensidad)

La conductividad eléctrica es un fenómeno de transporte en el cual la carga eléctrica (en forma de electrones o iones) se mueve a través de un sistema.

La carga fluye porque experimenta una fuerza electromotriz; lo que indica la presencia de un campo eléctrico E en un conductor que transporta corriente. La conductividad (conductividad específica) c de una sustancia está definida por:

$$K = J / E$$

Donde J es la densidad de corriente y E es el campo eléctrico. El inverso de la conductividad es la resistividad r:

$$r = 1 / K$$

Para muchas sustancias K es independiente de la magnitud del campo eléctrico E aplicado (por lo tanto lo es también, de la magnitud de la intensidad de corriente). Tales sustancias se dice que obedecen a la ley de Ohm, las disoluciones de electrolitos obedecen a la ley de Ohm, con la única condición de que E no sea extremadamente alto y se mantenga en condiciones de estado estacionario. En estas condiciones, se puede considerar a la

disolución como un conductor electrónico, que sigue la Ley de Ohm. Considerando un cierto volumen de una solución, la resistencia medida R correspondiente vendrá dada por:

$$R = r \times L / A$$

donde r es la resistividad (ohm  $\times$  cm) de la solución, A es el área (cm<sup>2</sup>) a través de la cual se produce el flujo eléctrico y L es la distancia (cm) entre dos planos considerados. Se define a la conductancia electrolítica (G) como la magnitud recíproca de la resistencia:

$$G = 1/ R$$

cuya unidad en el SI es el Siemens (S). Combinando las ecuaciones (1) y (2) se obtiene:

$$G = 1/r \times A/L = c \times A/L$$

donde c es la conductividad de la disolución (en S/cm), definida como la inversa de la resistividad, siempre que el campo eléctrico sea constante. De acuerdo con la ecuación, la conductividad de una disolución es la conductancia de la misma encerrada en un cubo de 1 cm<sup>3</sup> (l=1 cm, A=1 cm<sup>2</sup>).

### 3. APLICACIONES

#### 3.1. Potenciometría directa

Las medidas potenciométricas directas se utilizan para determinar la concentración de especies en las cuales se pueden emplear electrodos indicadores. La técnica es simple, basta con comparar el potencial del electrodo indicador en la disolución del analito con su potencial cuando se sumerge en una o más disoluciones de concentración conocida de analito. Siempre que la respuesta del electrodo sea específica para el analito e independiente de los efectos de la matriz, no se necesitarán etapas previas de separación.

El uso más frecuente de la potenciometría directa es la medida de **pH**, aunque actualmente gracias al desarrollo de electrodos de vidrio sensibles a otros cationes se pueden aplicar a la medida de cationes monovalentes (**Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**) y el desarrollo de electrodos de estado sólido selectivos para la determinación de aniones tipo **Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>**, etc.

#### 3.2. Valoraciones potenciométricas

Una valoración potenciométrica implica la medida del potencial en función del volumen de reactivo valorante. En comparación con las valoraciones que utilizan indicadores químicos (visuales), los puntos finales potenciométricos proporcionan datos más exactos, siendo particularmente útiles para valorar disoluciones coloreadas o turbias.

Para determinar el punto final de una valoración potenciométrica se pueden utilizar varios métodos. El más directo se basa en una representación del potencial en función del volumen del reactivo, el punto medio de la parte ascendente de la curva se determina visualmente y se toma como punto final.

#### Valoraciones de neutralización

Este tipo de valoraciones son especialmente útiles para el análisis de mezclas de ácidos o de ácidos polipróticos.

#### Valoraciones de formación de complejos

Los electrodos metálicos y de membrana se pueden utilizar para detectar puntos finales de valoraciones potenciométricas que implican la formación de complejos. El electrodo de mercurio es adecuado para valoraciones con EDTA de cationes que forman complejos menos estables que el  $\text{HgY}^{2-}$ . Con este electrodo se pueden determinar muchos cationes di, tri y tetravalentes con EDTA.

#### Valoraciones de precipitación

Un electrodo indicador para una volumetría de precipitación es a menudo el propio metal del que procede el catión que reacciona. El  $\text{AgNO}_3$  es el reactivo más versátil para las valoraciones de precipitación. En este caso un hilo de plata sirve como electrodo indicador.

#### Valoraciones de oxidación-reducción

Para detectar puntos finales en valoraciones redox se utilizan normalmente electrodos inertes de platino.

#### **Columbimetría**

La reacción de Karl Fischer utiliza una valoración coulombimétrica para determinar la cantidad de agua en una muestra. Se pueden determinar concentraciones de agua del orden de miligramos por litro. Se utiliza para encontrar la cantidad de agua en sustancias tales como mantequilla, azúcar, queso, papel, petróleo, etc

La reacción implica la conversión de yodo sólido en yoduro de hidrógeno en presencia de dióxido de azufre y agua. El Metanol es el disolvente utilizado más a menudo, pero el etilenglicol y el dietilenglicol también se emplean. La piridina se utiliza a menudo para evitar la acumulación de ácido sulfúrico, aunque el uso de imidazol y dietanolamina para este fin son cada vez más comunes. Todos los reactivos deben ser anhidros para que el análisis sea cuantitativo.

#### **Voltamperometría**

La voltamperometría de redisolución anódica se utiliza para determinar la concentración de metales disueltos en fluidos.

Permite estudiar la cinética de los procesos redox o de adsorción, en especial, cuando los electrodos están modificados para detectar un analito en específico.

Ha servido para la fabricación de biosensores sensibles a la presencia de moléculas biológicas, proteínas, grasas, azúcares, etc.

### **Polarografía**

Es empleada para el análisis de cationes metálicos siempre que el electrólito no reaccione a los elevados potenciales requeridos (se emplean haluros de tetraalquilamonio como electrólitos de soporte debido a sus elevados potenciales de reducción).

También se emplea para análisis de aniones inorgánicos como  $\text{BrO}_3^-$ ,  $\text{IO}_3^-$ , dicromato,  $\text{NO}_3^-$ , ...). Es necesario utilizar un tampón para obtener resultados reproducibles, ya que el  $\text{H}^+$  interviene en los procesos de óxido-reducción de estas especies.

### **Conductimetría**

La conductancia directa al no ser selectiva sólo se aplica para mezclas binarias y para medir la concentración total de electrolitos. Pero las titulaciones conductimétricas tienen muchas aplicaciones, siendo su principal ventaja es que se pueden titular disoluciones muy diluidas y sistemas en que la reacción es incompleta.

### **BIBLIOGRAFÍA**

-Skoog, Holler, Nieman (2001). Principios de análisis instrumental, Quinta edición. McGraw Hill

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 13**

### **ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA. ICP. TIPOS. APLICACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES**

### **3. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

#### **3.1. AAS DE LLAMA (FAAS)**

#### **3.2. AAS DE HORNO DE GRAFITO (GFAAS)**

#### **3.3. AUTOANALIZADORES DE MERCURIO CON AMALGAMA**

#### **3.4. AAS DE GENERACIÓN DE HIDRUROS (HG-AAS)**

### **4. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA. ICP. OTRAS TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES**

#### **4.1. EMISIÓN ATÓMICA DE LLAMA (FAES)**

#### **4.2. ICP-OES**

##### **4.2.1. COMPONENTES BÁSICOS DE LOS EQUIPOS**

#### **4.3. ICP-MS**

##### **4.3.1. COMPONENTES**

##### **4.3.2. INTERFERENCIAS**

##### **4.3.3. ESPECIACIÓN EN MUESTRAS ALIMENTARIAS**

## 1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados se encuentran presentes en la corteza terrestre, suelo, atmósfera y en consecuencia, en los alimentos. Los alimentos llegan como producto final de una larga cadena de producción y procesamiento durante la cual pueden ser contaminados por elementos metálicos.

La mayoría (Fe, Mn, Co, Cu, Zn, B, I, V, Se, Cr, Sn, Si y F) son esenciales y su deficiencia en la dieta puede provocar la alteración de una función biológica. Forman parte de enzimas, proteínas, hormonas y vitaminas. Otros, son esenciales en pequeñas concentraciones, pero tóxicos a partir de un nivel determinado (es importante estudiar en que rango empieza a ser tóxico). Hay un tercer grupo, los tóxicos (Pb, Cd, As, Hg..), que no tienen una función probada y su ingestión continua por largos periodos pueden originar la acumulación a un nivel suficiente para manifestar su toxicidad.

Los métodos de análisis para llevar a cabo la determinación de metales se basan en técnicas espectroscópicas.

## 2. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES

La espectrofotometría atómica, en términos generales, está basada en la medición de los espectros de absorción, emisión o fluorescencia de átomos o iones fundamentales.

En espectrometría atómica podemos medir la luz absorbida o emitida por un átomo al pasar de un estado fundamental al estado excitado o viceversa.

- Espectroscopía de Absorción Atómica: llama, atomización electrotérmica y autoanalizadores Hg
- Espectroscopía de Emisión Atómica: llama o con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES)
- Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo: ICP-MS

Los átomos de los distintos elementos químicos se diferencian en su configuración electrónica. La espectrometría de absorción atómica se basa en la diferente capacidad de absorción de radiación de los átomos de los distintos elementos en estado fundamental, pasando a un estado excitado al absorber dicha energía.

Un átomo excitado tiende a volver a su estado fundamental, pasando un electrón de un orbital de mayor E a otro de menor E, y emitiendo una radiación de una longitud de onda característica, similar a la previamente absorbida.

En la absorción atómica se mide la energía absorbida por un átomo en estado fundamental, pasando a un estado excitado al absorber dicha energía.

En la emisión atómica se mide la energía emitida por un átomo cuando vuelve de un estado excitado a uno fundamental, emitiendo la E previamente absorbida.

La intensidad de la radiación absorbida o emitida es proporcional a la concentración por la Ley de Lambert y Beer.

### 3. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectroscopía de absorción atómica (AAS), tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada. Esta radiación es absorbida selectivamente por átomos que tengan niveles energéticos cuya diferencia en energía corresponda en valor a la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos, está determinada por la ley de Lambert-Beer, que relaciona ésta pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda o recipiente que contiene los átomos absorbedores.

Como la cantidad de energía que se pone en la llama es conocida, y la cantidad restante en el otro lado (el detector) se puede medir, es posible, a partir de la ley de Lambert-Beer, calcular cuántas transiciones tienen lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide.

Existen diferentes técnicas de absorción atómica. La diferencia entre ellas radica en la forma en la que conseguimos el proceso de atomización de la muestra: Espectroscopía de absorción atómica de llama (F-AAS), Espectroscopía de atomización electrotérmica o cámara de grafito (G-AAS), Generación de Hidruros (HG-AAS) y Vapor frío (CV-AAS).

#### 3.1. AAS de LLAMA (FAAS)

La llama tiene como misión atomizar la muestra. Los átomos absorben la luz de una determinada  $\lambda$  procedente de una fuente (lámpara).

-Análisis cualitativo. Cada elemento tiene un espectro de absorción característico.

-Análisis cuantitativo. Ley de Lambert y Beer.

- **Limitaciones:**

- Técnica monoelemental

- No sirve para los elementos refractarios

Los componentes de esta técnica son los siguientes:

-Una fente de radiación que emita una línea específica correspondiente a la necesaria para efectuar una transición en los átomos del elemento analizado.

- \* Lámparas de cátodo hueco. En el interior de la lámpara hay un cátodo cilíndrico de metal que contiene el metal de excitación, y un ánodo. Se aplica la longitud de onda de excitación del metal en cuestión.

- \* Lámparas de descarga de electrones. Se construyen colocando una pequeña cantidad de una sal del elemento metálico en un recipiente de cuarzo. Cuando se enciende, causa la volatilización y la excitación de algunos átomos del elemento y así se forma el haz de radiación del elemento específico a determinar.

- \* Láseres de diodo. La técnica se denomina espectrometría de absorción por modulación de longitud de onda.

-Un nebulizador, que por aspiración de la muestra líquida, forme pequeñas gotas para una atomización más eficiente. La eficiencia y el grado en que la solución aspirada forma pequeñas gotas de rocío es sumamente importante ya que la reproductibilidad y la sensibilidad de esta técnica depende en gran parte de este paso en la operación del nebulizador.

-Un Quemador, en el cual por efecto de la temperatura alcanzada en la combustión y por la reacción de combustión misma, se favorezca la formación de átomos a partir de los componentes en solución.

El solvente es vaporizado y se forman los cristales de las sales metálicas. Una vez formadas las sales, estas son descompuestas por efecto de la temperatura. Y el elemento es reducido al estado metálico sólido. El metal pasa del estado líquido al estado gaseoso y finalmente se tiene en un vapor atómico que es capaz de absorber radiación de longitudes de onda bien definidas. Si la temperatura es lo suficientemente alta y/o el elemento metálico es de bajo potencial de ionización, parte de los átomos del elemento pierden uno o más de sus electrones y se ioniza parcialmente. Esto no es conveniente ya que la ionización es una interferencia.

-Un sistema óptico. Tienen como función seleccionar la línea de absorción, separandola de las otras líneas de emisión emitidas por el cátodo hueco. Los aparatos comerciales suelen venir equipados con monocromadores del tipo de red de difracción.

-Un detector o transductor, que sea capaz de transformar, en relación proporcional, las señales de intensidad de radiación electromagnética, en señales eléctricas o de intensidad de corriente.

-Un amplificador o sistema electrónico, que como su nombre lo indica amplifica la señal eléctrica producida, para que en el siguiente paso pueda ser procesada con circuitos y sistemas electrónicos comunes.

-Un sistema de lectura en el cual la señal de intensidad de corriente, sea convertida a una señal que el operario pueda interpretar (ejemplo: transmitancia o absorbancia).

La AAS de llama ha sido una técnica muy ampliamente usada, cada vez más competida por ICP-MS para determinar elementos metálicos y metaloides. Esta técnica es relativamente económica, pudiéndose aplicar a una gran variedad de muestras. En su desarrollo, podemos tener interferencias espectrales y no espectrales.

- Interferencias espectrales. Son originadas, por señales alteradas de la longitud de onda de radiación electromagnética seleccionada. Esta alteración tiene diferentes orígenes y son los siguientes:

-Solapamiento de líneas atómicas. Se basa en la posibilidad de que otra especie atómica que no es la que se está analizando absorba la radiación incidente.

-Interferencia por dispersión por partículas. Cuando la solución aspirada hacia el quemador tiene un gran número de sólidos disueltos, es probable que se tenga interferencia por dispersión por partículas.

-Interferencia por solapamiento de bandas moleculares. Ocurre cuando la matriz tiene en cantidades grandes, compuestos moleculares sumamente complejos; que producen compuestos y radicales que son potenciales absorbedores de radiación electromagnética en el rango de la línea de absorción del elemento en cuestión.

- Interferencias no espectrales. Son aquellas que causan errores y que pueden dar origen a lecturas mayores o menores a los valores normales. Las interferencias de este tipo son las que se detallan a continuación:

-Interferencia por ionización. Cuando la temperatura de la llama es muy alta y/o el elemento pierde fácilmente uno o más de sus electrones más exteriores ocurre la ionización. La ionización es indeseable debido al error que causa en las lecturas del analito.

-Interferencia por propiedades físicas de las soluciones. Para que dos soluciones de la misma concentración den iguales lecturas de absorbancia deben tener la misma velocidad de aspiración hacia la llama y la proporción de líquido aspirado que finalmente llega al quemador debe ser constante.

-Interferencias por volatilización de soluto. El solvente que acompaña al analito y demás sales, es evaporado en la cámara de nebulización o inmediatamente después de que ha alcanzado la llama, por lo que ocurre en la parte más baja del quemador la formación de partículas sólidas que posteriormente se descomponen hasta la formación de átomos y entidades más simples, que no permiten que el analito sea atomizado eficientemente.

Con la llama se pueden determinar prácticamente todos los metales menos el mercurio, sin embargo, con esta técnica no se pueden alcanzar concentraciones de ng/L, las cuales deben detectarse para los metales más tóxicos como son el Pb o Cd.

### 3.2. AAS DE HORNO DE GRAFITO (GFAAS)

La energía requerida para atomizar la muestra es producida por una diferencia de potencial eléctrico a través de un tubo de grafito. Esta técnica presenta una mayor sensibilidad, de 1000 veces mayor que la llama porque los átomos permanecen en el tubo de grafito por espacio de tiempos mayores (flujo de argón cero) que en la llama, que son arrastrados por el gas.

- **Limitaciones:**
  - Técnica monoelemental
  - Muchas interferencias de matriz
- **Ventajas:**
  - Gran sensibilidad

El aporte energético más utilizado es la llama, pero en ocasiones se necesita mayor sensibilidad. Una forma de controlar las etapas necesarias para llevar los átomos que constituyen una muestra hasta el estado fundamental es suministrar la energía de forma programada por medios electrotérmicos. Es decir, sustituimos la llama por la cámara de grafito. Las muestras se depositan en un tubo pequeño de grafito revestido del grafito, que entonces se puede calentar para evaporar y para atomizar el analito. Con ello aumenta la

proporción de átomos en estado fundamental y, por tanto, la sensibilidad aumenta unas 1000 veces la de la llama, pudiéndose llegar a detectar niveles de ng/L.

### **3.3. AUTOANALIZADOR DE MERCURIO CON AMALGAMA**

Se trata de un Analizador Directo de Mercurio, cuyo funcionamiento se basa en el secado de la muestra y su posterior descomposición térmica. Para la reducción se emplea un catalizador y el vapor de Hg es atrapado en una amalgama de oro, para posteriormente por desorción térmica, ser analizado por AAS. La principal ventaja es la posibilidad de analizar muestras líquidas o sólidas sin realizar tratamientos previos, disminuyendo así los tiempos de análisis y reduciendo la manipulación de la muestra. La mayor desventaja de este sistema es que no permite la diferenciación de especies de Hg por lo que para poder especificar hay que aplicar tratamientos previos de muestra.

### **3.4. AAS DE GENERACIÓN DE HIDRUROS (HG-AAS)**

Es una técnica que permite medir concentraciones muy bajas de elementos que tienen la propiedad de formar el hidruros metálicos volátiles (Hg, As, Bi, Sb, Sn, Se y Te), en presencia de un agente reductor (borohidruro de sodio) y calor (en el caso del Hg es en frío y se denomina vapor frío).

- Aumenta mucho la sensibilidad porque aísla el elemento del resto de componentes de la muestra.
- Disminuye las interferencias casi por completo.
- Se acopla a equipos de absorción o emisión atómica.

## **4. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA. ICP. OTRAS TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES**

### **4.1. EMISIÓN ATÓMICA DE LLAMA (FAES)**

La llama tiene como misión atomizar la muestra y excitar a los elementos químicos.

Los átomos absorben la luz de una determinada  $\lambda$  dependiendo de su estructura electrónica, que luego, al volver al estado fundamental, vuelven a emitir.

- **Limitaciones:**

Poco sensible y muchas interferencias. Hoy en día casi no se utiliza.

### **4.2. ICP-OES (Plasma Óptico de Acoplamiento Inductivo)**

La Espectrometría de Emisión de Plasma (ICP) es una de las técnicas más importantes en el análisis elemental instrumental. Puede ser usado para la determinación de alrededor de 70 elementos en cantidad de matrices distintas. Gracias a su versatilidad y su productividad puede ser utilizada en diferentes aplicaciones y actualmente es una técnica implantada en una gran cantidad de laboratorios de rutina.

La muestra se introduce en el plasma en estado líquido, debido a las altas temperaturas se rompen todos los enlaces químicos y los átomos y los iones se excitan. Una vez excitados

emiten una radiación electromagnética en el rango espectral del ultravioleta y el ultravioleta-visible, esta radiación emitida se separa en sus diferentes longitudes de onda, las cuales serán utilizadas para la identificación y cuantificación del elemento.

El corazón de un equipo de ICP es el plasma, un “gas” extremadamente caliente, alcanzando unas temperaturas que rondan los 10.000 °C. Las altas temperaturas alcanzadas en el plasma destruyen la muestra completamente, formando los átomos e iones que van a ser analizados.

En el plasma, los átomos y los iones se van a excitar y van a emitir una radiación electromagnética. Esta radiación se difracta espectralmente con una lente difractada, y la intensidad de la radiación es medida con un detector. En un equipo de ICP, las longitudes de onda son utilizadas para la identificación de los elementos, y la intensidad nos servirá para calcular sus concentraciones.

Las concentraciones de todos los elementos que se quieran determinar en una muestra, pueden ser obtenidas en una única secuencia, ya que todos los elementos son excitados y emiten radiación simultáneamente en el plasma, pueden ser determinados simultáneamente, o de manera muy rápida uno tras otro. Por tanto, los resultados analíticos para una muestra pueden ser obtenidos en un periodo de tiempo muy pequeño.

Las muestras que se van a analizar son principalmente líquidas, en alguna ocasión sólidas y en muy raras ocasiones gases.

El rango de trabajo de un ICP es muy amplio, generalmente estará entre 4 y 6 órdenes de magnitud, dependerá del elemento y de la longitud de onda.

Como norma, en espectrometría de emisión ICP hay una relación lineal entre la intensidad de la señal (radiación emitida) y la concentración. Pero esta relación depende de un gran número de factores, algunos de ellos desconocidos, como consecuencia deberemos calibrar antes de los análisis. Es importante realizar la función de calibrado antes del análisis para asegurar unos buenos resultados de recuperación.

#### 4.2.1. Componentes básicos de los equipos

- Sistema de introducción de muestra

La función del sistema de introducción de muestra, es introducir la muestra en el plasma sin variar la estabilidad del mismo y sin influenciar en el resultado de la señal. El líquido debe ser nebulizado formando gotitas muy pequeñas.

El nebulizador convierte la muestra líquida en un aerosol, el cual es transportado por un gas portador al plasma. Principalmente existen dos tipos diferentes de nebulizadores, el nebulizador neumático y el nebulizador ultrasónico.

En el nebulizador neumático, es el gas portador el que causa la nebulización (también es llamado gas nebulizador), formando una zona de presión negativa, la cual rompe la solución en pequeñas gotitas. Es el más empleado, distinguiéndose concéntrico, cross-flow o cone-spray.

En el nebulizador ultrasónico, la solución de la muestra es bombeada sobre un pequeño plato vibratorio con una frecuencia ultrasónica, lo cual convierte la solución en finas gotitas.

Tras la nebulización, la muestra pasa a la cámara de nebulización, cuya función es eliminar las gotas del aerosol que sean demasiado grandes y que pueden desestabilizar el plasma. El aerosol llega a la cámara transportado por el gas portador, si el flujo cambia de dirección, las gotitas pequeñas seguirán la dirección del gas, mientras que las que sean más grandes se depositarán en las paredes de la cámara. Estas gotitas grandes se irán acumulando en la parte inferior de la cámara y eliminadas por una bomba peristáltica.

- Plasma

Un plasma es un gas ionizado. A altas temperaturas la movilidad de las partículas aumenta y el orden disminuye, un plasma lo que genera es un gran “desorden” (entropía).

Un plasma acoplado inductivamente (ICP), se produce cuando hacemos pasar un gas (generalmente Argón) por un campo electromagnético alternativo, de manera que el movimiento de las partículas cargadas y su aceleración, hace que las partículas neutras se carguen por colisión y se aceleren.

La antorcha está formada por varios tubos de cuarzo concéntricos y puede estar colocada de dos maneras diferentes, radial o axial.

Radial, en perpendicular al detector, suele utilizarse en muestras con alto contenido de partículas disueltas.

Axial, en el mismo sentido que el detector, tiene mayor sensibilidad ya que más cantidad de muestra llega al detector.

El generador de radiofrecuencia es la parte del equipo encargada de dar la energía para generar el plasma.

- Óptica y detector

La radiación emitida por los iones y los átomos en el plasma es espectralmente separada por lentes y las respectivas longitudes de onda emitidas medidas en uno o varios detectores. Como todos los elementos emiten a la vez y además en varias longitudes de onda cada uno, es muy importante una correcta separación de las longitudes de onda (“Difracción de la luz”).

Por último, la señal llega al detector. La lectura de todas las longitudes de onda es simultánea, lo cual mejora notablemente los tiempos de análisis, ya que elimina la necesidad de lecturas secuenciales.

- **Limitaciones:**

-Espectros de emisión complejos.

-Sensible, pero no a nivel de ultratrazas.

- **Ventajas:**

Técnica multielemental- Rapidez.

Admite altas concentraciones de ácidos y sólidos disueltos.

### 4.3. ICP-MS

La Espectrometría de Masas con Plasma de acoplamiento Inductivo es una técnica de determinación multielemental en la que, mediante un plasma de alta intensidad, se produce la desolvatación, atomización e ionización de los elementos presentes en la muestra (como se ha indicado anteriormente). Posteriormente, estos iones se separan en el espectrómetro de masas según su relación masa/carga y se cuantifican mediante un detector (multiplicador de electrones).

- ✧ Técnica multielemental.
- ✧ Amplio intervalo lineal (6-8 órdenes de magnitud).
- ✧ Gran sensibilidad ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para la mayoría de los elementos.
- ✧ Posibilidad de analizar casi todos los elementos.
- ✧ Información isotópica (dilución isotópica).
- ✧ Análisis cuantitativo y semicuantitativo rápidos.

#### 4.3.1. Componentes

- Sistema de introducción de la muestra: nebulizador.
- Fuente de ionización : ICP (plasma generado por radiofrecuencia).
- Interfase de extracción: sistema de extracción iónica.
- La óptica iónica: lente magnética para focalizar los iones.
- El filtro de masas cuadrupolar (cuadrupolo).
- El detector de iones (Multiplicador de Electrones Secundarios).

La muestra es introducida mediante un nebulizador en el interior del plasma generado por inducción mediante una espiral de alta frecuencia. El plasma produce la desolvatación, atomización e ionización de los elementos (igual que en el caso anterior).

El haz de iones es enfocado mediante una lente magnética al interior del espectrómetro, donde son sometidos a un campo electromagnético que provoca su separación según su relación masa/carga. La intensidad del campo electromagnético se va variando a lo largo de la separación, de manera que los distintos iones con distinta relación masa/carga van llegando secuencialmente al detector. El detector es un multiplicador de electrones.

Mediante un sistema de integración la información que llega del detector en forma de intensidad eléctrica es transformada en datos cuantitativos.

Los iones que dejan el cuadrupolo chocan con el detector produciendo una cascada de electrones que puede ser medida electrónicamente.

#### 4.3.2. Interferencias

Pueden producirse interferencias debidas a la matriz de la muestra, como la presencia de sales, viscosidad de la muestra, etc... que pueden producir fenómenos de supresión de la ionización o efectos de carga espacial. Para evitar estas interferencias puede ser necesario diluir la muestra, añadir un estándar interno, realizar una dilución isotópica, etc...

Por otro lado, en el análisis por ICP-MS, se producen también interferencias espectrales. Pueden ser de dos tipos:

-Poliatómicas: se producen por reacciones inespecíficas entre componentes de la muestra y especies del plasma de argón (Ar, H, O, N y C). Pueden eliminarse mediante el uso de celdas de reacción o colisión que vienen integradas en algunos equipos y que usan gases como CH<sub>4</sub> o NH<sub>3</sub> para chocar contra estas moléculas interferentes y romperlas en sus componentes.

-Isobáricas: debido a la existencia de iones elementales o poliatómicos con la misma relación m/z que los analitos de interés. En este caso, será necesario elegir otro isótopo del elemento de interés, siempre y cuando, la concentración del mismo en la muestra lo permita.

#### 4.3.3. Especiación en muestras alimentarias

La especiación de elementos en muestras alimentarias y aguas es de gran importancia debido a que, tanto la toxicidad como la biodisponibilidad de los mismos depende en muchos casos de la especie química que esté presente.

- Especie química: forma específica de un elemento definida por su composición isotópica, electrónica, estado de oxidación y/o estructura molecular.
- Análisis de especiación: actividades analíticas encaminadas a identificar y/o medir las cantidades de una o más especies químicas individuales en una muestra.

#### **La toxicidad de los elementos puede depender de:**

##### **1. Su estado de oxidación:**

- Cr (III) esencial para el metabolismo de glucosa / Cr (VI) carcinogénico y genotóxico.
- As (III) toxicidad >>> As (V)

**2. Formación de complejos orgánicos e inorgánicos:** el que un elemento forme parte de compuestos inorgánicos, orgánicos u organometálicos, determina su solubilidad, lipofilia y estado de oxidación, características que a su vez determinan la toxicidad y biodisponibilidad del mismo.

Toxicidad Hg (II) < MeHg

**3. Formación de complejos macromoleculares:** El análisis de la toxicidad y biodisponibilidad de los elementos en base a los complejos macromoleculares de los que forma parte es investigado mediante técnicas de especiación.

#### **PROBLEMAS EN ESPECIACIÓN**

- Los elementos analizados en especiación suelen estar en bajas concentraciones en las muestras.

- Muchas veces se encuentran en matrices complejas; muestras biológicas y medioambientales.

- Las especies son lábiles: lo que provoca que durante el tratamiento y conservación de las muestras haya una interconversión de unas especies en otras y varíe la proporción de las mismas respecto a la muestra original.

Se requiere:

- Técnicas de extracción que preserven las especies en su forma original.
- Técnicas de análisis que combinen selectividad y sensibilidad.
- Técnicas de identificación de especies desconocidas.

Para la separación y cuantificación de las especies de un elemento presentes en una muestra es muy útil el acoplamiento de técnicas de separación selectivas con técnicas de cuantificación de gran sensibilidad.

- Separación: HPLC, GC.
- Cuantificación: **ICP-MS**, AFS (espectroscopia de fluorescencia atómica, AAS (absorción atómica), HGAAS (generación de hidruros).

#### HPLC-ICP-MS

Es la técnica más empleada en especiación. Esta técnica consiste en acoplar un equipo de HPLC, para realizar la separación de las distintas formas de As y Cr, a un ICP-MS que se utilizará como detector.

Es una técnica muy selectiva y sensible.

Mediante HPLC se separarán las distintas especies de As y Cr, que se introducen directamente en el ICP-MS, donde la muestra se nebuliza, y seguidamente se atomiza e ioniza en el plasma. Una vez ionizada pasa al espectrómetro de masas, donde los iones se separan según su relación masa/carga, y finalmente llegan al detector y son cuantificados mediante un multiplicador de electrones.

#### Extracción selectiva

Consiste en realizar una extracción selectiva de la especie que se quiere cuantificar y, posteriormente, analizar el elemento total en el extracto utilizando un equipo adecuado.

Ejemplos:

- Extracción de As inorgánico en pescado y cuantificación del As en el extracto mediante absorción atómica con generación de hidruros.
- Extracción de metil-Hg en pescado y análisis del Hg en el extracto mediante un autoanalizador directo de Hg.

## **BIBLIOGRAFÍA**

-Fundamentos de Química Analítica. Skoog.

-Análisis instrumental: Espectrometría de Absorción Atómica (EAA). Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Caminos Canales y Puertos Universitat Politècnica de València.

-Espectroscopía de emisión y absorción atómica. RUA.

-Fundamento de Espectroscopía atómica: Hardware. Agilent Technologies.

-Espectroscopía atómica ICP-OES. Agilent Technologies

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 14**

**ESPECTROFOTOMETRÍA DE ULTRAVIOLETA VISIBLE. FLUORESCENCIA.  
FUNDAMENTOS TEÓRICOS. APLICACIONES.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### 1. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ULTRAVIOLETA VISIBLE

- 1.1. Fundamento teórico
  - 1.1.1. Leyes de la espectrofotometría
  - 1.1.2. Desviaciones
- 1.2. Fundamentos de la técnica
- 1.3. Instrumentación
  - 1.3.1. Fuentes de radiación
  - 1.3.2. Selectores de longitud de onda
  - 1.3.3. Recipientes de muestra
  - 1.3.4. Detectores
- 1.4. Aplicaciones
  - 1.4.1. Aplicaciones cualitativas
  - 1.4.2. Aplicaciones cuantitativas

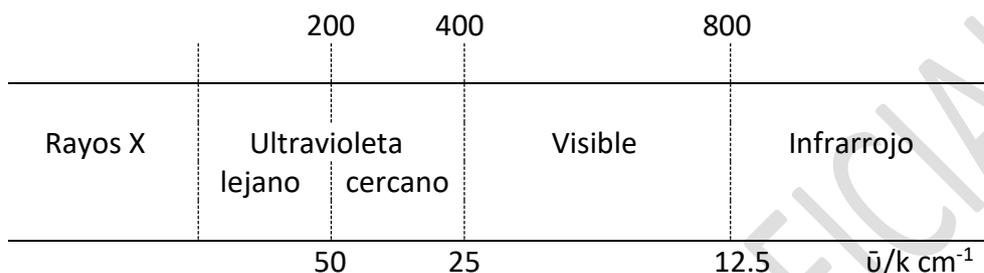
### 2. FLUORESCENCIA

- 2.1. Fundamento teórico
- 2.2. Variables que afectan al proceso de fluorescencia
- 2.3. Instrumentación
  - 2.3.1. Fuentes de radiación
  - 2.3.2. Monocromadores
  - 2.3.3. Cubetas
  - 2.3.4. Detectores
- 2.4. Aplicaciones
  - 2.4.1. Determinación fluorimétrica de especies inorgánicas
  - 2.4.2. Determinación fluorimétrica de especies orgánicas y bioquímicas

## 1. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ULTRAVIOLETA VISIBLE.

### 1.1. Fundamento teórico

La región del espectro electromagnético que corresponde a las transiciones que involucran a electrones de la capa de valencia se extiende por longitudes de onda de 100 a 1000nm (regiones ultravioleta-visible e infrarroja cercana).



La región por debajo de 200nm, conocida como Ultravioleta lejano, presenta características que hacen complicada su utilización:

1. -En esta zona absorben las moléculas componentes del aire, lo que hace imprescindible trabajar con equipos evacuados (de aquí el nombre alternativo de la región: Ultravioleta de vacío).
2. - Los materiales usuales para la construcción de componentes ópticos (celdas, lentes, elementos dispersivos), el cuarzo y el vidrio, absorben fuertemente en esta zona. Se requiere trabajar con otros materiales, menos versátiles y más costosos (LiF, CaF<sub>2</sub>, zafiro, utilizables hasta 115, 125 y 140 nm respectivamente).
3. -Los solventes absorben fuertemente en esta región. Los hidrocarburos saturados pueden usarse hasta 170 nm, los hidrocarburos perfluorados hasta 150nm.
4. - La sensibilidad de los detectores es generalmente baja.
5. - La absorción en esta zona es poco selectiva. Casi todos los compuestos presentan absorción en esta región.

La región entre 200 y 400nm, llamada **Ultravioleta cercana**, es de gran utilidad en la determinación estructural de insaturación conjugada, aromaticidad o de ciertos grupos insaturados con pares electrónicos libres (carbonilo, nitro, etc.), sin presentar los serios inconvenientes del Ultravioleta de vacío. Se requieren materiales ópticos de cuarzo si se quiere acceder a la zona de longitudes de onda inferiores a 350nm, mientras que el vidrio es utilizable en el resto de la región Ultravioleta cercana y toda la región visible.

La región **Visible**, de 400 hasta cerca de 800nm, es la única del espectro electromagnético detectable por el ojo humano. Las transiciones que se presentan en esta zona corresponden a transiciones electrónicas de muy baja energía. Todos los compuestos

coloreados absorben selectivamente en esta región. Los compuestos fuertemente conjugados y ciertos complejos de metales de transición absorben significativamente en la región. selectivamente en esta región. Los compuestos fuertemente conjugados y ciertos complejos de metales de transición absorben significativamente en la región.

### 1.1.1. Leyes de la espectrofotometría

Las leyes de la espectrofotometría fueron enunciadas basándose en una radiación monocromática, que atraviesa un sistema isotrópico (la velocidad de la luz, y por consiguiente el índice de refracción, es igual en todas las direcciones del material) y homogéneo, donde sólo se producen procesos de absorción y no existen modificaciones en la especie química absorbente.

**La ley de Bouguer y Lambert** tiene dos partes. Por una parte, establece que la energía transmitida ( $P$ ) en un medio homogéneo es proporcional a la energía radiante incidente ( $P_0$ ). Esta relación es una constante denominada **Transmitancia (T)**.

Por otra parte, establece que, en un medio transparente, cada capa sucesiva de igual espesor del medio absorbe una fracción igual de la luz incidente.

La **ley de Beer** relaciona la absorción de la radiación incidente y la concentración de material absorbente. Un fotón es absorbido por una molécula si colisiona con ella, y la probabilidad de colisión es directamente proporcional al número de moléculas y, por lo tanto, a la concentración.

La ley fundamental de la espectrofotometría se obtiene por combinación de ambas leyes y se conoce como **Ley de Lambert-Beer**:

$$A = a \cdot l \cdot C = -\log_{10} T$$

Cuando la concentración ( $C$ ) se expresa en moles por litro y el camino óptico ( $l$ ) en centímetros, la **absortividad (a)** se llama **absortividad molar** o **coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ )**.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

### 1.1.2. Desviaciones

En ocasiones, la representación gráfica absorbancia/concentración no produce una recta sino que para concentraciones cada vez más elevadas se produce una desviación hacia el eje de ordenadas (desviación positiva) o hacia abscisas (desviación negativa). Las desviaciones positivas pueden resultar útiles si estudiamos análisis de trazas, siempre que los resultados sean reproducibles. Por el contrario, las desviaciones negativas no son nunca deseables. Las limitaciones de la ley pueden ser de tres tipos: reales, químicas e instrumentales.

### Desviaciones reales

La ley de Beer describe bien la absorción de disoluciones diluidas. En general, estas desviaciones son insignificantes para concentraciones menores de 0,01 M. Cuando la concentración es elevada, las partículas de soluto están más juntas y provoca que la distribución de cargas y la capacidad para absorber radiaciones de una determinada longitud de onda, quedan alteradas.

Además, la ley fue enunciada para un material isotrópico y por lo tanto, está afectada por los cambios en el índice de refracción.

### Desviaciones químicas

Las desviaciones químicas de la ley se producen por desplazamientos en la posición de equilibrio, que afecta a las especies absorbentes. Esto puede ocurrir cuando:

- las especies absorbentes no representan la totalidad de la concentración, se asocian, disocian o interaccionan con el disolvente, dando lugar a un producto diferente.
- se produce la variación del pH, no regulado, en el seno de la disolución.
- los efectos producidos por un electrolito débil, por ejemplo, un ácido débil. Si la forma ácida y básica de la especie absorbente tiene distinta absorbancia.
- la variación de la temperatura y/o la presión.
- las reacciones competitivas entre iones metálicos.
- la presencia de agentes complejantes.
- los procesos de fotodescomposición y de fluorescencia.

### Desviaciones instrumentales

La ley de Beer está enunciada bajo el supuesto de una radiación monocromática y esto raramente se consigue experimentalmente, excepto si se utilizan fuentes de emisión de líneas. Normalmente, suelen utilizarse fuentes continuas de emisión, y las desviaciones instrumentales provienen, en la mayor parte de los casos, de los selectores de longitudes de onda (filtros o monocromadores) que originan una banda más o menos simétrica de longitudes de onda alrededor de la señal deseada. Sin embargo, cuanto más parecidas sean las absortividades molares del absorbente a diferentes longitudes de onda, menores serán las desviaciones.

Además, las absortividades cambian más lentamente en el pico de absorción que a los lados de la banda, por lo que para la mayor parte de las determinaciones cuantitativas se determina la longitud de onda del pico y las variables instrumentales no se cambian durante la medición y calibración, para minimizar las desviaciones debidas a radiación policromática.

Las desviaciones dependen en gran medida de la relación existente entre el ancho de rendija (banda instrumental) y el ancho de banda. Cuantas mayores sean las rendijas y menores las bandas de absorción, mayores serán las desviaciones.

## 1.2. Fundamentos de la técnica

Cuando un material transparente (ya sea un sólido, un líquido o un gas) es irradiado con una radiación electromagnética, parte de la energía es absorbida por los átomos y moléculas del material, que como consecuencia pasan del fundamental ( $y_0$ ) a un estado excitado ( $y_1$ ).

Para que se produzca esta absorción, la energía de los fotones excitantes debe ser igual a la diferencia de energía entre el estado fundamental y algún estado excitado del material transparente:

$$\Delta E = E(y_1) - E(y_0) = h\nu$$

La energía total de una molécula se puede considerar como la suma de cuatro componentes:

$$E_{total} = E_{rotacional} + E_{vibracional} + E_{electrónica} + E_{cinética}$$

En los espectros electrónicos, existen contribuciones de movimientos vibracionales y rotacionales y, por ello, el espectro de absorción UV-VIS da como resultado una banda ancha.

La banda de absorción tiene dos características principales:

- La posición del máximo de absorción, designado por  $\lambda_{max}$ , que corresponde a la longitud de onda responsable de la transición.
- La intensidad de la absorción, que depende de la diferencia de energía entre los dos estados electrónicos y de la probabilidad de la transición.

El espectro de absorción ultravioleta-visible de un compuesto se debe, por lo general, a tres tipos de transiciones:

- Transiciones producidas por electrones  $\sigma$ ,  $\pi$  y  $n$ .
- Transiciones producidas por electrones  $d$  y  $f$ .
- Transiciones producidas por transferencia de carga.

La mayor parte de las aplicaciones en estudios de química orgánica, comprenden tanto las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  como las  $\pi \rightarrow \pi^*$  en la región entre 200-700 nm. Estas transiciones requieren un grupo funcional insaturado para proporcionar los orbitales  $\pi$ , es decir, un **cromóforo** que son grupos coloreados que deben su color a uno o varios enlaces covalentemente insaturados y contienen electrones de valencia con energías de excitación relativamente bajas.

- Las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  se producen en moléculas que contienen dobles o triples enlaces o anillos aromáticos.

- Las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  requieren menos energía que las. Se producen en las moléculas en las que un heteroátomo con electrones no compartidos está unido por un enlace múltiple a otros átomos (por ejemplo, el enlace C=O).

El valor de la Absorbancia máxima varía de un cromóforo a otro y depende de la diferencia de electronegatividades de los elementos del doble enlace y de la facilidad de formación del mismo. La presencia de cromóforos conjugados produce el desplazamiento de la absorción a longitudes de onda mayores debido a que los electrones son desplazados por el efecto de conjugación cuyo efecto es reducir el nivel de energía de  $\pi^*$ .

Por otra parte, existen ciertos grupos funcionales que, aunque no producen color y no absorben en el UV pueden incrementar el poder colorante de un cromóforo (aumentar la intensidad de la banda) y producir desplazamientos hacia longitudes de onda más larga (menos energéticas). Estos grupos se denominan **auxócromos**, y suelen ser heteroátomos con pares electrónicos sin compartir: halógenos, oxígeno, nitrógeno y azufre.

La sustitución en los compuestos, los cambios estructurales, la polaridad, disolventes, radicales adyacentes, etc., pueden producir cambios en la intensidad y en la posición de los máximos de absorción.

- Los cambios hacia longitudes de onda mayores se denominan **desplazamientos batocrómicos** o hacia el rojo.
- Los desplazamientos a longitudes de onda menores se denominan **hipsocrómicos** o hacia el azul. El efecto hipsocrómico son más observables con disolventes polares próticos (agua o alcohol), en los cuales es frecuente la formación de enlaces de hidrógeno entre los protones del disolvente y el par de electrones no enlazantes.
- Si se produce un incremento de la señal, se denomina desplazamiento **hipercrómico**.
- Si lo que sucede es una disminución de la intensidad, se conoce como desplazamiento **hipocrómico**.

Por otro lado, Los espectros de los iones y complejos de la mayor parte de los metales de transición, así como de las series de los lantánidos y actínidos se caracterizan por una o varias bandas en las regiones del infrarrojo cercano, visible y ultravioleta del espectro. Los colores de estos compuestos están producidos precisamente por transiciones d-d, cuyos coeficientes de extinción molar suelen ser bajos y, por lo tanto, las bandas no son muy intensas, pero ya que en general están muy influidas por los factores químicos del entorno, con los ligandos apropiados se pueden conseguir valores más altos, lo que permite el estudio de trazas de iones en distintas sustancias.

#### Efecto de los solventes

Los disolventes utilizados en espectroscopía UV-VIS deben cumplir ciertos requisitos para asegurar unos resultados óptimos y fiables:

- Deben ser transparentes en la región en estudio.

- Deben disolver la muestra.
- No deben utilizarse cerca de su punto de corte en el UV.
- Deben ser compatibles con las celdas de trabajo.

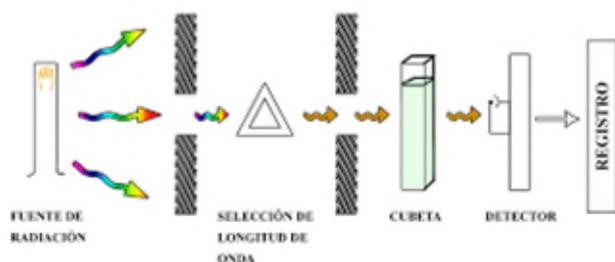
Los disolventes más comunes para estudios en UV VIS son el agua, alcoholes, dioxano, isooctano, cloroformo, benceno, ciclohexano, acetonitrilo..., cuyos límites de aplicación termina en torno a los 220-240 nm, es decir en el punto de corte o absorción final.

### 1.3. Instrumentación

La mayor parte de los equipos de espectrofotometría consta de los siguientes componentes, aunque difieran algo en su configuración:

- Fuente de radiación.
- Selector de longitud de onda.
- Recipiente de muestra.
- Detector.
- Dispositivo de procesamiento y lectura de las señales.

El esquema típico de los componentes en la absorción UV-visible es:



Para los fenómenos de emisión y fluorescencia el diseño varía fundamentalmente en la ausencia de fuente de emisión de radiación.

#### 1.3.1. Fuentes

Las lámparas más usadas en la región UV-VIS son:

##### Lámparas de filamento de wolframio (VIS)

Son las más frecuentes y constan de un filamento enrollado que se encuentra en un bulbo de vidrio a vacío o con gas inerte. La lámpara emite en la región comprendida entre los 330 y 2500nm quedando el límite inferior restringido al vidrio que aloja el filamento.

### Lámparas de wolframio-halógeno (VIS)

Es una variante de la lámpara anterior (también conocida como cuarzo-yodo). Contiene una pequeña cantidad de yodo dentro de la cubierta donde está el filamento. Durante su uso se forma por sublimación wolframio gaseoso que reacciona para dar  $Wl_2$  volátil, que al chocar con el filamento dan lugar a la deposición de wolframio. Alarga la vida media útil de la lámpara. El bulbo en esta ocasión es de cuarzo para tolerar altas temperaturas de operación.

### Lámparas de arco de deuterio e hidrógeno (UV)

Consiste en un bulbo de cuarzo que contiene deuterio a baja presión y en un ánodo y un cátodo entre los que se forma un arco al aplicar un alto voltaje entre ellos. Es la lámpara más adecuada (165-375nm), emitiendo un espectro continuo en la región UV. También emite una serie de líneas en la región visible que pueden ser útiles para calibrar longitudes de onda de los equipos.

### Lámparas de arco de xenón

Producen radiación intensa producida por el paso de corriente a través de una atmósfera de xenón. Produce un espectro continuo en el intervalo 200-1000 nm.

#### 1.3.2. Selectores de longitud de onda

- Filtros: de interferencia o de absorción, para seleccionar una longitud de onda, empleados en fotómetros y colorímetros
- Monocromadores: de prisma de o de red para tener un intervalo de longitudes de onda, empleados en espectrofotómetros.

#### 1.3.3. Recipientes de muestra (cubetas)

Deben construirse en un material que deje pasar la radiación, con ventanas perfectamente paralelas y paso óptico calibrado.

- Para trabajar en la región UV se requiere cuarzo o sílice fundida (<350nm). Estos materiales también son transparentes en la región visible e IR.
- Para la región visible (entre 350 y 2000nm) se pueden emplear vidrios silicatados y celdas de plástico.

#### 1.3.4. Detectores

Transforman la radiación recibida en una corriente eléctrica.

- Células fotovoltaicas
- Fototubos
- Tubos fotomultiplicadores
- Diodos en serie

## 1.4. Aplicaciones

La espectroscopía UV-VIS es una herramienta muy útil para el análisis cualitativo y la determinación estructural de especies, así como una técnica cada vez más extendida para el análisis cuantitativo.

### 1.4.1 Análisis cualitativo

La absorción UV-VIS proporciona datos para la identificación de sustancias disueltas, lo que se logra por la forma del espectro, longitudes de onda a las que se presentan los máximos y mínimos de absorción, por los valores de absorptividad molar, o por los cambios que experimenta el espectro al variar el pH, el disolvente, o la concentración. Sin embargo, dado que el número de máximos y mínimos no es muy elevado, la identificación inequívoca resulta bastante difícil.

#### Aplicación a grupos orgánicos. Elucidación estructural

La aplicación de la espectroscopía UV-VIS para la elucidación estructural de moléculas orgánicas es bastante amplia y son innumerables los compuestos determinados y tabulados. Son bien conocidos los efectos de los sustituyentes y la conjugación en los espectros, las diferencias entre isómeros, la presencia de uno o más cromóforos, etc., y se encuentran bien especificados en la literatura.

En moléculas de hidrocarburos saturados, la absorción se produce en la región de UV de vacío. Dado que no presentan en general absorción en la región UV son compuestos muy adecuados como disolventes. La presencia de anillos aromáticos, sustituciones alquílicas, diferencias de electronegatividades con el auxócromo..., producen cambios en las longitudes máximas de absorción.

La situación se complica con la existencia de varios cromóforos: si éstos están separados entre sí por enlaces sencillos, entonces podremos considerar el espectro como la suma de los de los cromóforos aislados, pero se puede producir un efecto hipercrómico según la posición de estos.

#### Análisis inorgánico

La espectrofotometría UV-VIS permite conocer si determinada especie en disolución se encuentra como ion libre o formando complejos, por comparación con el espectro de la sustancia pura.

En el caso de que dos bandas de iones inorgánicos estén interferidas, se puede adicionar alguna sustancia que reaccione selectivamente con uno de ellos y de este modo facilitar las medidas. Esto se hace, por ejemplo, con el sistema de Fe y Ni (II) cuyas bandas están interferidas y por medio de la adición de dimetilglioxina que

reacciona con el Ni (II) se forma una banda intensa, que nos permite separar ambas medidas.

#### 1.4.2 Análisis cuantitativo

Los métodos clásicos gravimétricos o volumétricos han sido ampliamente sustituidos por métodos espectrofotométricos, siempre que se cumpla la ley de Beer y se pueda construir la correspondiente curva de calibrado. Además, es posible determinar más de una especie, siempre que sus máximos de absorción no interfieran.

Las ventajas que la espectroscopía de absorción presenta en el análisis cuantitativo son:

- Gran aplicabilidad, tanto a especies absorbentes como no absorbentes (por formación de complejos) y tanto para compuestos orgánicos como inorgánicos.
- Selectividad bastante alta.
- Sensibilidades del orden de  $10^{-5}$  M llegando en ocasiones a  $10^{-7}$  M
- Sencillez en la adquisición de datos y buena precisión del método.

El primer paso en la determinación cuantitativa de concentraciones es seleccionar la longitud máxima de absorción a la que se van a efectuar las medidas, pero hay que tener en cuenta, que son muchos los factores que pueden afectar al valor máximo, como son el exceso de un reactivo, el pH, el efecto del tiempo y de la temperatura, estabilidad de los compuestos, las interferencias, el cumplimiento de la ley, etc. En general, para la determinación de concentraciones, las condiciones experimentales se deben encontrarse entre el 20-70% de T ( $A = 0,15-0,7$ ), para que el error relativo de concentración sea lo menor posible.

## 2. FLUORESCENCIA

### 2.1. Fundamento teórico

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones.

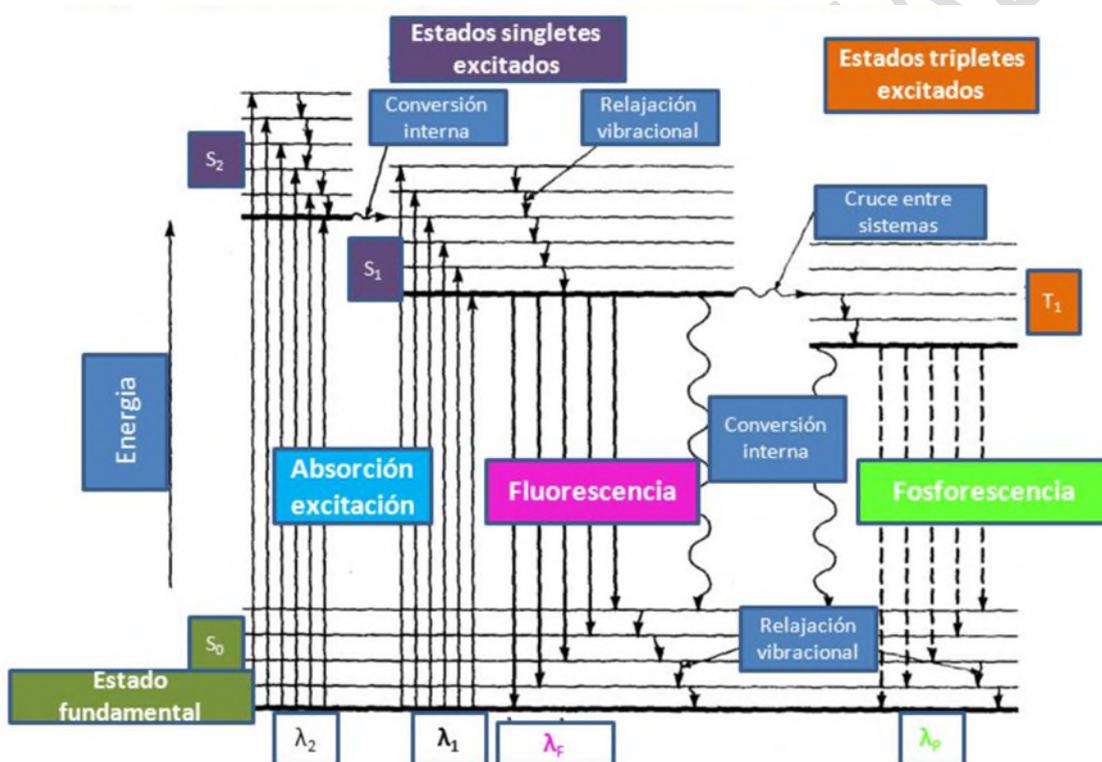
La velocidad a la cual se absorbe un fotón de radiación suele estar en torno a los  $10^{-15}$  a  $10^{-14}$  segundos, sin embargo la velocidad de emisión fluorescente es significativamente más lenta (entre  $10^{-4}$  y 10 segundos).

Una molécula excitada puede volver a su estado fundamental mediante una combinación de etapas. El camino más propicio hacia el estado fundamental es el que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por ello, la fluorescencia aparece cuando la desactivación por fluorescencia es más rápida que por procesos no radiantes.

Existen dos tipos de procesos de relajación no radiante:

- La **relajación vibracional**, tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. Durante estas colisiones el exceso de energía vibracional se transfiere a las moléculas del disolvente en una serie de etapas.
- La **conversión interna** se refiere al proceso de relajamiento no radiante entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico.

La fotoluminiscencia está limitada a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de los procesos de desactivación sin radiación se reduzca hasta el punto de que la reacción de emisión puede competir cinéticamente.



En la figura se puede observar que la fluorescencia aparece cuando las moléculas electrónicamente excitadas se pueden relajar a cualquier estado vibracional del estado electrónico fundamental. De igual forma que las bandas de absorción molecular, las bandas de fluorescencia molecular están formadas por una multitud de líneas espaciadas tan estrechamente que son muy difíciles de resolver.

Se observa que las bandas de fluorescencia molecular están formadas principalmente por bandas que tienen longitudes de onda más largas y, por tanto, energías menores que la banda de radiación responsable de su excitación. Este desplazamiento hacia longitudes de onda mayores se llama **desplazamiento de Stokes**, debido a los procesos de relajación vibracional previos a la emisión de fluorescencia.

En aquellos casos en los que la radiación absorbida sea emitida sin cambio en la longitud de onda (misma energía) se conoce como radiación de resonancia o resonancia fluorescente.

Debido a que las diferencias de energía entre los estados vibracionales es aproximadamente el mismo, tanto para el estado fundamental como para el excitado, la absorción, o espectro de excitación, y el espectro de emisión o fluorescencia de un compuesto frecuentemente son imágenes especulares uno de otro con una sobreposición que ocurre en la línea de resonancia.

## 2.2. Variables que afectan al proceso de fluorescencia

### Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico o eficacia cuántica de la fluorescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas.

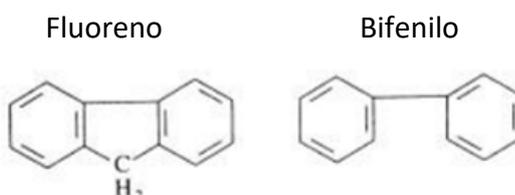
### Estructura

La fluorescencia más intensa la presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia.

La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación. La sustitución en un anillo aromático causa desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima y los cambios correspondientes en los picos de fluorescencia.

### Rigidez estructural

La fluorescencia está muy favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. Un ejemplo muy claro de la influencia de esta rigidez es la diferencia en la eficacia cuántica del fluoreno y el bifenilo (1'0 y 0'2, respectivamente) bajo condiciones similares de medida.



La influencia de la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos agentes quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico. Por ejemplo, la fluorescencia de la 8-hidroxiquinoleína es mucho menor que la de su complejo con zinc.

### Temperatura y disolvente

La eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que el aumento de la frecuencia de las colisiones a temperatura elevada hace aumentar la probabilidad de desactivación no radiante ( conversión externa ). Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de conversión externa y produce el mismo resultado.

### Efecto del pH

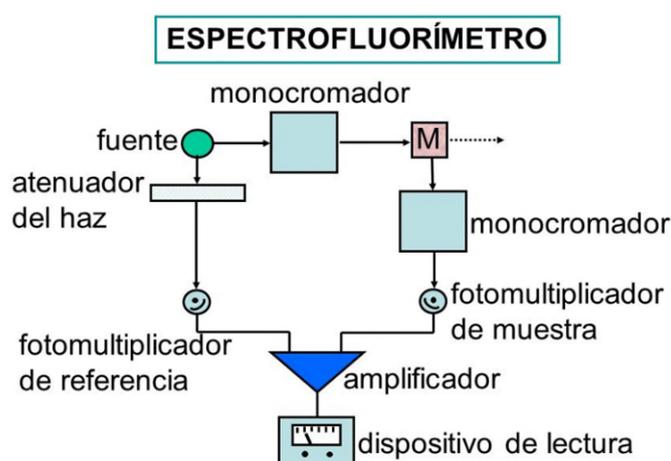
La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto. Por lo tanto será muy frecuente en los métodos fluorimétricos el control estricto del pH.

### Efecto de la concentración

La potencia de la radiación fluorescente (F) es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema.

donde  $P_0$  es la potencia del haz incidente sobre la disolución y P es su potencia después de atravesar la longitud b del medio. La constante  $K'$  depende de la eficacia cuántica del proceso de fluorescencia. Con objeto de relacionar F con la concentración (C) se puede escribir la ley de Beer:

### 2.3. Instrumentación



Un monocromador selecciona una longitud de onda de excitación, y la fluorescencia se examina con un segundo monocromador el cual se coloca de manera que forme un ángulo de 90° con la luz incidente. Manteniendo fija la  $\lambda_{exc}$  y haciendo un barrido

de la radiación emitida, se obtiene un espectro de emisión. Si la  $I_{em}$  se mantiene constante y se hace variar la  $I_{exc}$ , se obtiene el espectro de excitación.

### 2.3.1. Fuentes

En la mayoría de las aplicaciones se necesita una fuente más intensa que las lámparas de wolframio o de deuterio utilizadas para la medida de absorción. Esto se debe a que la magnitud de la señal de salida, y por tanto la sensibilidad, es directamente proporcional a la potencia de la fuente  $P_0$ . Normalmente se utiliza una lámpara de arco de xenón o de mercurio.

### 2.3.2. Filtros y monocromadores

En los **fluorímetros** se utilizan tanto los filtros de interferencia como los de absorción, mientras que los **espectrofluorímetros** están equipados con monocromadores de red.

### 2.3.3. Cubetas

Para medidas de fluorescencia se utilizan tanto cubetas cilíndricas como rectangulares fabricadas con vidrio o más normalmente con sílice.

### 2.3.4. Detectores

La señal de fluorescencia típica es de baja intensidad, por tanto, se necesitan factores de amplificación altos para estas medidas. Los tubos fotomultiplicadores son los más utilizados como detectores en instrumentos de fluorescencia sensibles.

## 2.4. Aplicaciones

En general, los métodos de fluorescencia son de uno a tres órdenes de magnitud más sensibles que los métodos basados en la absorción porque la sensibilidad de los primeros se puede reforzar aumentando la energía del haz de excitación o por amplificación de la señal del detector. Ninguna de estas opciones mejora la sensibilidad de los métodos basados en los procesos de absorción.

### 2.4.1 Determinación fluorimétrica de especies inorgánicas

Los métodos fluorimétricos de determinación de especies inorgánicas pueden ser de dos tipos. Los métodos directos que implican la formación de un quelato fluorescente y la medida de su emisión y los métodos indirectos basados en la disminución de la fluorescencia que resulta de la acción atenuadora de la sustancia que va a ser determinada. Esta última técnica ha sido más ampliamente utilizada en la determinación de aniones. Los reactivos fluorimétricos más empleados en el análisis de cationes son los que presentan estructuras aromáticas con dos o más grupos funcionales dadores que permitan la formación de quelatos con el ion metálico.

#### 2.4.2. Determinación fluorimétrica de especies orgánicas y bioquímicas

El número de aplicaciones del análisis fluorimétrico a especies orgánicas es muy elevado. Por ejemplo, existen métodos para la determinación de sustancias tales como enzimas, agentes medicinales, productos naturales, esteroides, vitaminas, etc. Las aplicaciones más importantes de la fluorimetría están en el campo del análisis de productos alimentarios, farmacéuticos, muestras clínicas y productos naturales. La sensibilidad y selectividad del método lo hace una herramienta particularmente valiosa en estos campos.

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 15**

**ELECTROFORESIS. FUNDAMENTO. TIPOS. EQUIPOS.  
APLICACIONES EN LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFORESIS**

- 1.1. Introducción
- 1.2. Principios básicos

### **2. TIPOS DE ELECTROFORESIS**

- 2.1. Electroforesis zonal
  - 2.1.1. Electroforesis en geles de agarosa (AGE)
  - 2.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)
  - 2.1.3. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes
    - 2.1.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)
  - 2.1.4. Electroforesis en gel con un gradiente desnaturalizante (DGGE)
- 2.2. Isoelectroenfoque (IEF)
- 2.3. Electroforesis bidimensional (2-DE)
- 2.4. Electroforesis en campo pulsante
- 2.5. Electroforesis capilar (CE)
- 2.6. Electroforesis microfluídica o electroforesis automática con microchips

### **3. APLICACIONES EN LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS**

- 3.1. Autenticación de carne y productos cárnicos
  - 3.1.1. Identificación de especies
  - 3.1.2. Identificación de componentes y aditivos animales no deseados
- 3.2. Autenticación de productos lácteos
- 3.3. Detección de organismos modificados genéticamente (OMG)

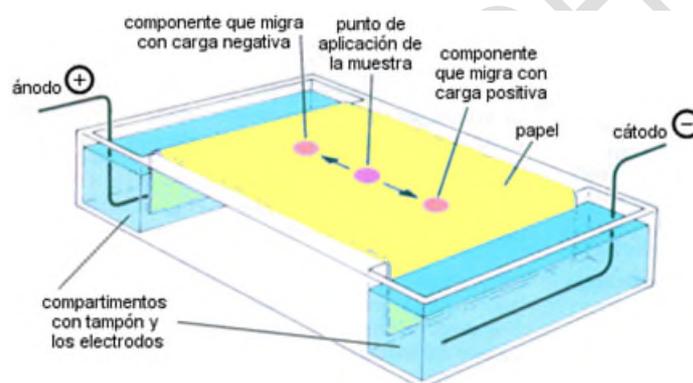
## 1. FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFORESIS

### 1.1. Introducción

La electroforesis es una técnica de separación de biomoléculas poliméricas (generalmente de proteínas y ácidos nucleicos) basada en la migración diferencial -en sentido y velocidad- de partículas cargadas en un campo eléctrico establecido al efecto (gradiente de potencial).

En principio podemos hablar de dos tipos de técnicas:

- Técnicas de electroforesis libre.  
Aplicación de un potencial eléctrico a una disolución en estado estacionario o no, en la que las macromoléculas se mueven libremente, sólo dependiente de las características de la disolución y de las macromoléculas.
- Técnicas de electroforesis de zona o en medio estabilizada.  
El movimiento se realiza a través de un medio sólido impregnado de disolución que dificulta el movimiento iónico libre.



#### 1. El proceso electroforético

### 1.2. Principios básicos

En función del fenómeno de transporte, se puede tener en cuenta:

#### a) Fenómenos de transporte de disolución:

Pueden originarse diversos fenómenos que se traducen en transporte de materia

- Difusión** → provocado por la existencia de gradientes de concentración.
- Migración** → movimiento producido por una fuerza externa, en este caso el campo eléctrico y su intensidad.
- Convección** → consiste en el transporte de todas las biomoléculas. No deseado.

#### b) Fenómenos de transporte en un medio estabilizante:

Empleo de un medio estabilizante situado entre los electrodos. Los medios más empleados son

- Soportes compactos** con una microestructura interna capilar como el polvo de celulosa, vidrio pulverizado o membranas de acetato de celulosa.
- Geles** de agar-agar o de poliacrilamida.

## 2. TIPOS DE ELECTROFORESIS

En función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación:

- 1) *Electroforesis libre o método electroforético de límite móvil*. Técnica sólo válida para la determinación de movilidades absolutas de proteínas solubles.
- 2) *Isotacoforesis*. Técnica de elevado poder de resolución, alta frecuencia de muestreo, precisión elevada y gran flexibilidad, pero solo puede separar especies iónicas cargadas con el mismo signo. Se emplean varios detectores en serie.
- 3) *Electroforesis zonal*. Existencia de un medio estabilizante. Se puede llevar a cabo en una superficie plana o en una columna.

### 2.1. Electroforesis zonal

- *Electroforesis zonal con soporte sólido.*
  - Soporte material plano:
    - Electroforesis sobre papel
    - Electroforesis sobre acetato de celulosa
    - Electro cromatografía
    - Inmuno electroforesis
  - Soporte en columna: el soporte (celulosa, almidón o Sephadex™) en forma de polvo se coloca en una columna al estilo cromatográfico.
- *Electroforesis zonal en gel.* Además del empleo como los anteriores soportes, admite dos variaciones:
  - **Electroforesis en gel con gradiente de porosidad.** La electromigración se ve impedida por fenómenos de filtración.
  - **Electroforesis en gel en presencia de detergente aniónico.** (SDS)

#### 2.1.1. Electroforesis en geles de agarosa (AGE)

Es el método más común para el análisis, purificación y obtención de fragmentos grandes de ADN (0,5-10 Mb). Utilizando agarosas de distintas concentraciones pueden separarse fragmentos de hasta 50 kb aplicando un campo eléctrico constante.

Hay que tener en cuenta:

- La agarosa estándar gelifica a 35°C y funde a 80-90°C.
- La fragilidad del gel. Su resistencia mecánica se expresa en g/cm<sup>2</sup>.
- Utilizar geles con un bajo flujo electroosmótico (EEO) para evitar problemas de resolución.

- La separación de fragmentos lineales de ADN de doble cadena se realiza a un pH cercano a la neutralidad, pero para el ADN monocatenario se utiliza NaOH (50 Mm).
- La muestra de ADN se carga en pocillos en una disolución a la que se le incrementa la densidad con sacarosa, glicerol o ficoll y se le añade uno o varios marcadores de color, como azul de bromofenol, xylene cianol FF o verde de bromocresol.
- Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN analizados, se incluyen en el gel patrones o fragmento de ADN de tamaños conocidos (ladder).

➤ *Movilidad electroforética del ADN*

- El voltaje que se aplica en los geles de agarosa depende de la resolución requerida y del tamaño de los fragmentos a separar. En general, la separación de fragmentos grandes de ADN es mejor a bajos voltajes.
- La electroforesis se hace a temperatura ambiente, ya que con los voltajes habituales los pequeños aumentos de temperatura no afectan al ADN ni al gel.
- Cuanto mayor es el fragmento de ADN, más se retarda a lo largo del recorrido por el gel.
- En ADN circulares, la movilidad electroforética aumenta con el grado de enrollamiento, es decir, cuanto más “retorcido” esté el ADN circular, más compacto es, atraviesa mejor el gel y tiene mayor movilidad, por lo que avanza más.

### 2.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo a través de geles de poliacrilamida, cuya porosidad se puede regular en función de la concentración de acrilamida. En condiciones nativas, las proteínas se separan en función de su relación carga/masa. A su vez, la carga viene determinada por la composición de los aminoácidos y del pH. Por tanto, sólo migrarán las proteínas con carga neta al pH de electroforesis.

Las muestras se disuelven en una solución tampón, que contiene **glicerol** para que la carga se sitúe al fondo y un colorante (normalmente **azul de bromofenol**) para indicar la migración del frente. El sistema se conecta a una fuente de alimentación y las proteínas migran hacia el polo positivo, avanzando más rápido las más pequeñas.

Posteriormente el gel se incuba en presencia de azul de Coomassie y tras esto, se destiñe con una disolución de etanol/acético, quedando el gel transparente y las bandas de proteínas teñidas de azul.

➤ Tipos de desarrollo

✓ Electroforesis continua de Weber y Osborn. Es la electroforesis más simple y se lleva a cabo en un gel de poliacrilamida de composición uniforme.

✓ Electroforesis discontinua o de Laemmli. Se utiliza un gel dividido en dos fases para que todas las moléculas se separen al mismo tiempo y desde el mismo lugar.

### 2.1.3. Electroforesis en condiciones desnaturizantes

#### ➤ Separación de proteínas

Los llamados agentes desnaturizantes producen el desplegamiento de la proteína, perdiendo su estructura nativa y de esta manera su funcionalidad biológica. En algunas proteínas hay puentes de disulfuro entre los residuos de cisteína, que se pueden romper mediante el tratamiento con agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) o el ditioneitol (DTT). Otros desnaturizantes son los detergentes, ya que las interacciones hidrofóbicas de las proteínas son sustituidas por interacciones detergente-proteína. Principalmente se usan 3 tipos de detergentes:

- 1) *Detergentes no iónicos*. No alteran las cargas de las proteínas a las que se unen. Se utilizan en geles con urea o isoelectroenfoque (Triton X100).
- 2) *Detergentes iónicos*. Los que muestran cargas positivas (catiónicos) sirven para separar proteínas muy ácidas o básicas (CTAB). Otros poseen carga negativa (aniónicos) y fuerte carácter desnaturizante.(SDS)
- 3) *Detergentes anfóteros*. Se utilizan como alternativa a los detergentes no iónicos.

#### 2.1.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

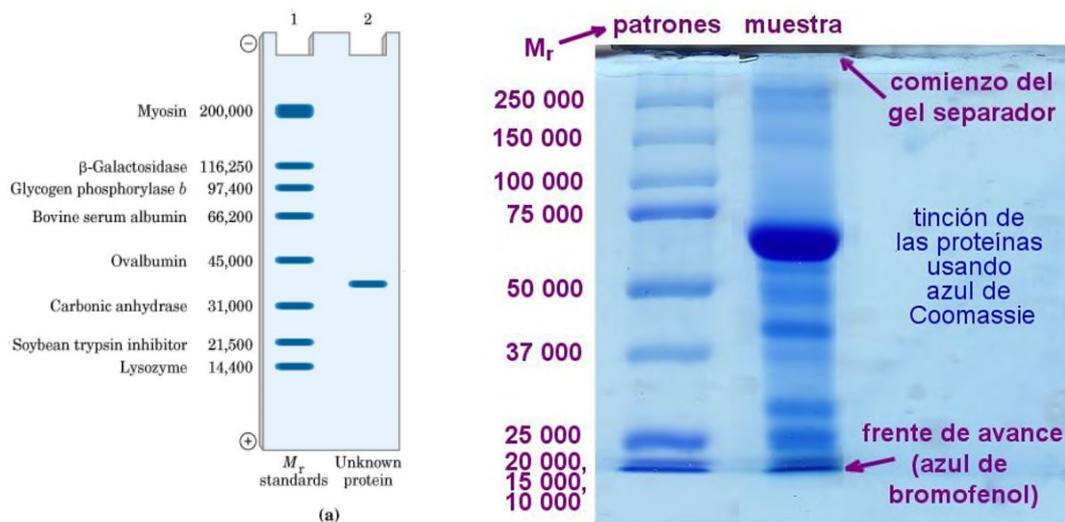
El SDS-PAGE es una técnica empleada para analizar el peso molecular de las proteínas en condiciones desnaturizantes, utilizando diferentes tinciones para visualizarlas. El SDS es un detergente aniónico que se une a todas las proteínas, formando una micela cargada negativamente. De este modo, se enmascara la carga intrínseca de las proteínas y se separan sólo en función de su masa.

#### ➤ Ventajas:

- La mayoría de las proteínas son solubles en SDS
- Permite calcular el peso molecular de cadenas polipeptídicas
- Su densidad de carga es muy alta, por lo que su velocidad de migración también lo es y las electroforesis son muy rápidas.
- La separación depende de un parámetro fisicoquímico, como es la masa molecular, la cual se puede calcular.

#### 2.1.4. Electroforesis en gel con un gradiente desnaturizante (DGGE)

Se basa en la distinta fuerza de enlace de las bases de ADN al migrar en un gel con gradiente desnaturizante. Los fragmentos más ricos en pares G-C son más estables mientras que los fragmentos ricos en A-T son menos estables y se produce su separación. El ADN queda retenido en posiciones diferentes en forma de bandas.



## 2. Bandas resultantes en el gel tras una electroforesis SDS-PAGE

### 2.2. Isoelectroenfoque (IEF)

En esta electroforesis, las proteínas se separan según su punto isoeléctrico (PI), es decir, en el pH en el que esa proteína tiene una carga neta de cero. Para ello, se forma un gradiente de pH en un medio estabilizante, donde al colocar la mezcla de anfóteros comienzan a moverse según su carga eléctrica y migran hasta el punto de pH igual a su PI. De este modo, su carga neta será igual a cero, se estabilizan y se detiene la migración.

\*Anfóteros: mezcla de compuestos de ácidos policarboxílicos y poliaminoácidos.

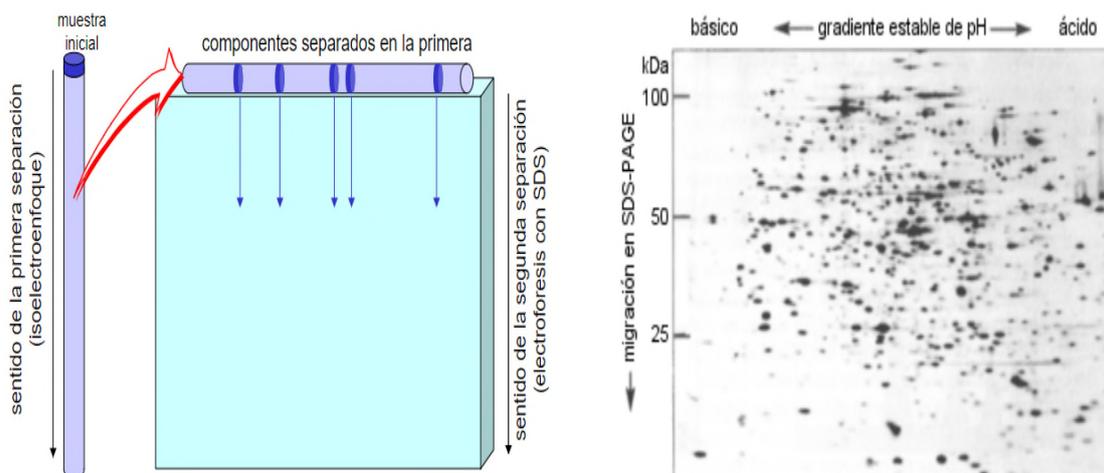
### 2.3. Electroforesis bidimensional (2-DE)

#### ➤ Separación de proteínas

Es una variante del isoelectroenfoque y PAGE. Su principal ventaja es la separación en base a los principales parámetros que diferencian unas proteínas de otras: el tamaño y la distribución de carga.

Las dos electroforesis se realizan secuencialmente, girando la segunda 90° con respecto a la primera. Por consiguiente, en la primera dimensión se separan las proteínas por sus PI, mientras que en la segunda lo hacen por su tamaño molecular, por medio de una electroforesis discontinua y en condiciones desnaturizantes.

El resultado es un mapa completo donde las proteínas quedan separadas casi completamente. Son muy útiles para caracterizar péptidos procedentes de mezclas complejas de los que se desconoce su identidad.



### 3. Principios de una electroforesis 2-D y visualización de las proteínas en el gel de poliacrilamida

#### ➤ Separación de ácidos nucleicos

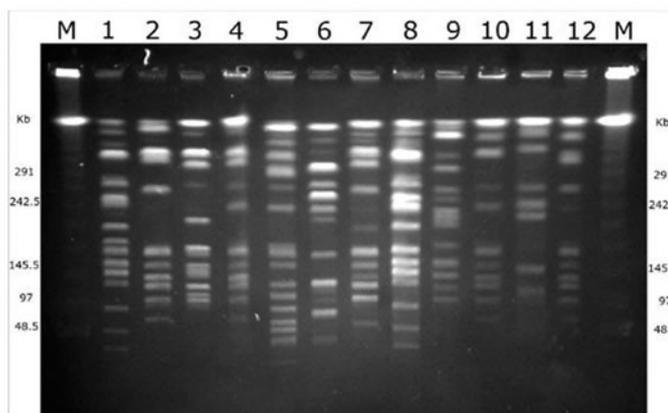
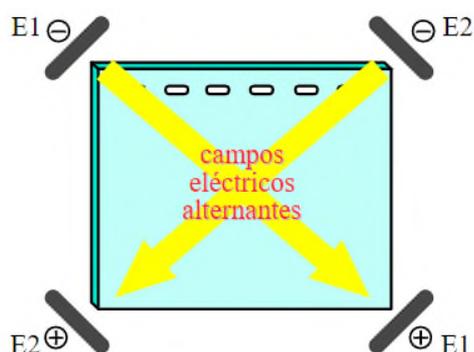
Técnica muy habitual para mapeos genéticos. En este caso se realiza en geles de agarosa. En la primera dimensión la muestra se digiere con una endonucleasa de restricción, separándose los fragmentos. A continuación, los fragmentos se tratan con una segunda endonucleasa de restricción sobre el propio gel o sobre una membrana de DEAE-celulosa y los segmentos resultante se separan en una segunda dimensión.

#### 2.4. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

La PFGE consigue la separación de grandes fragmentos de ADN induciendo su reorientación mediante cambios periódicos en el campo eléctrico, cuya duración determina el intervalo de tamaños que se pueden separar. Cuanto mayor sea el tamaño de los fragmentos a separar, mayor ha de ser la duración de los campos aplicados.

Los fragmentos se someten a dos campos eléctricos de distinta orientación. Al aplicarse el primero (E1) los fragmentos se estiran y se orientan. Si ahora se le aplica un segundo campo (E2), perpendicular al anterior, los fragmentos se relajan, elongan y se alinean de acuerdo con este segundo campo eléctrico. Realizando sucesivos cambios de campo eléctrico al final se consigue la separación en función de su tamaño. Por otro lado, las fracciones de ADN que no han podido reorientarse en la nueva dirección, se mueven en banda distintas y aparecen como una zona en la parte superior del gel, denominándola *zona de compresión*.

El ADN suele cargarse como una disolución concentrada junto con agarosa fundida. Para ello se emplean geles de agarosa al 0,5-1,0%.



#### 4. Fundamentos y bandas resultantes de una electroforesis en campo pulsante

### 2.5. Electroforesis capilar (CE)

Técnica de separación basada en la diferente movilidad electroforética de las sustancias a analizar bajo la acción de un campo eléctrico, en el interior de un tubo capilar. De esta manera, combina análisis de una electroforesis convencional y una cromatografía HPLC. Esto se traduce en

- Elevada rapidez de análisis
- Elevada eficacia.  $10^5$ - $10^6$  platos por metro
- Bajos volúmenes, del orden de nL
- Universalidad
- Facilidad de automatización

Las columnas capilares son tubos construidos en sílice fundida o teflón. Para técnicas especiales, se utilizan columnas capilares rellenas de:

- Electroforesis con micelas con el uso de SDS.
- Redes poliméricas con el uso del ADN, polisacáridos o complejos proteínas-SDS.
- Geles anclados, con el uso de poli(acrilamida) lineal o alcohol polivinílico.

#### 1.2.5.1. Electroforesis microfluídica o electroforesis automática con microchips

Mediante el sistema capilar y aprovechando la nanotecnología, algunas empresas biotecnológicas han desarrollado chips automatizados para aplicar la electroforesis capilar de una manera optimizada en la cuantificación de pesos moleculares, concentraciones y purzas.

Con estos chips se permite analizar de manera automática 96 muestras de una gran variedad de moléculas en menos de una hora y en un solo aparato. El inconveniente de los métodos que emplean microchips es el precio de estos.

### 3. APLICACIONES EN LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

#### 3.1. Autenticación de carne y productos cárnicos

##### 3.1.1. Identificación de especies

El uso de las técnicas electroforéticas para la identificación de carne de pescado, aviar y mamífero comenzó a principios de los 80. Para la carne cruda que no ha sido térmicamente procesada, la técnica de IEF ha dado buenos resultados; las condiciones de almacenaje como la congelación y la descongelación no afectan a las bandas de proteína en el gel.

Para productos procesados con proteínas desnaturalizadas, más difíciles de identificar, las proteínas se extraen a través de soluciones con detergentes como el SDS o con urea. Las técnicas de IEF y SDS-PAGE son exitosas para la distinción de carnes transformadas, a las que se les ha sometido a varias tecnologías de procesamiento como cocinado, ahumado o tratamientos a altas presiones.

➤ *Desventajas*

- Son sensibles a la temperatura, ya que las bandas se vuelven menos precisas, dificultando así su identificación
- Son métodos rápidos y relativamente baratos pero presentan problemas cuando se analizan productos compuestos de tejidos de diferentes especies. Para su evaluación, se requiere al menos un 5-10% de tejidos compartidos y que las especies no estén muy emparentadas entre sí. Esto ocurre al ser una técnica de baja resolución, pudiendo llegar a solaparse las bandas.

➤ *Metodología.* La identificación de las especies animales se realiza mediante la comparación entre las muestras analizadas (desconocidas) y de referencia, en un análisis en condiciones idénticas. Por ende, se hace una comparación visual de las bandas proteicas de las muestras analizadas y las de referencia.

En la última década, estos métodos se han ido sustituyendo por otros más precisos como la electroforesis capilar y la 2-DE. Con esta última, se extraen las proteínas en geles de poliacrilamida según su PI y su masa molecular. De esta forma, se consigue la separación simultánea de múltiples proteínas de acuerdo con sus características. Recientemente estas técnicas electroforéticas se han ido combinando con la espectrometría de masas. La manera más común es extraer proteínas individuales del gel tras la electroforesis, digerirlas con enzimas y luego analizar sus péptidos mediante la reciente técnica espectrométrica.

➤ *Desventaja.* La 2-DE es una técnica cara, que consume mucho tiempo y requiere un análisis de alta complejidad, por lo cual se utiliza más para especies de alto valor comercial (pescado y marisco) que para animales de mayor orden.

La CE es mucho más rápida y barata que la 2-DE y aunque normalmente no se emplea para la autenticación de carnes, sí permite distinguir entre carne bovina, cerdo y pavo.

### **3.1.2. Identificación de componentes y aditivos animales no declarados**

Los productos cárnicos suelen contener ingredientes molidos, así como sales y aditivos que dificultan su identificación. También es común adicionarles carne recuperada mecánicamente (CRM), generando un cambio en la composición proteica. Debido al mayor contenido de hemoglobinas en carne de pollo RM, con frecuencia se analiza fraccionando las proteínas según su PI, separando dichas fracciones mediante una SDS-PAGE y finalmente identificándolas en las bandas obtenidas usando cromatografía líquida-espectrometría de masas.

Por otro lado, la adulteración de productos cárnicos con aditivos de proteínas de origen animal o vegetal se puede distinguir usando la electroforesis en 2D. No obstante, debido a su alto coste y los largos tiempos de análisis se aplica más como método de referencia que como método de rutina.

### **3.2. Autenticación de productos lácteos**

En la actualidad, Europa es el líder de mercado en exportación de leche y queso, que por su valor, se pueden encontrar adulterados. La Unión Europea tiene establecida una metodología analítica de referencia (Reglamento nº 2018/150) para detectar proteínas bovinas en productos lácteos (leche de vaca en queso de leche de oveja, de leche de cabra o de leche de búfala). Dicho método se basa en el isoelectroenfoque con geles de poliacrilamida conteniendo urea para detectar caseínas. La normativa de la UE establece que el límite legal de sustitución de la leche es de 0,99% y estima fraude alimentario cuando el valor sea igual o mayor del 1%. No obstante, como desventaja, este método requiere de mucho tiempo y sólo proporciona resultados semicuantitativos.

Es por ello por lo que la CE y específicamente la electroforesis capilar de zona está más establecida para la autenticación en la industria láctea. La técnica es efectiva en el análisis de los pocos biomarcadores proteicos existentes y su rapidez y sencillez operativa lo convierte en un método adecuado para controles rutinarios.

### **3.3. Detección de organismos modificados genéticamente (OMG)**

Los ingredientes vegetales obtenidos a partir de organismos modificados genéticamente juegan un rol importante dentro de la industria de piensos compuestos. La legislación de la UE sobre alimentos y piensos es particularmente estricta a este respecto, por lo que se necesitan métodos analíticos que sean fiables, rápidos y de bajo coste para la identificación y estudio de OMGs.

Entre las distintas técnicas, destaca la CE en gel ya que permite el análisis de múltiples dianas (ADN, proteínas, péptidos y metabolitos de alta importancia) para el estudio fundamentalmente de cultivos transgénicos. Sobre todo es útil cuando se realiza PCR multiplex, muy empleadas para el análisis de OMGs, puesto que permite la separación y detección de los diferentes fragmentos de ADN amplificados. Asimismo, estos amplicones pueden clasificarse e identificarse según su tamaño y cantidad tiñéndolos con colorantes fluorescentes, ofreciendo así una buena sensibilidad con límites de detección bajos.

De igual manera, los chips microfluídicos se están convirtiendo en una adecuada alternativa por ser rápida y efectiva y en determinados casos, permitir análisis *in situ* de los cultivos transgénicos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Masci, M., Zoani, C., Navigato, T., Turrini, A., Jasionowska, R., Caproni, R., & Ratini, P. (2022). Authenticity assessment of dairy products by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 43(1-2): 340-354.  
<https://doi.org/10.1002/elps.202100154>
2. Camacho Garrido, S. (2015). Ensayos Biotecnológicos, Volumen IV. Madrid, 2015.
3. Sforza, S. (2013). Food Authentication using Bioorganic Molecules, Volumen X. Pennsylvania, 2013.
4. Domínguez Vega, E., & Marina, M. L. (2014). Characterization and study of transgenic cultivars by capillary and microchip electrophoresis. *International journal of molecular sciences*, 15(12): 23851–23877. <https://doi.org/10.3390/ijms151223851>
5. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-80559>
6. Yi, H., Liang, Z., Ge, J., Zhang, H., Liu, F., Ren, X., Ren, J., Wang, H., Ren, J., Ren, X., Zhang, Y., Jin, F., Jin, S., Zhao, Y., & Wang, F. (2022). A Multiplex PCR System for the Screening of Genetically Modified (GM) Maize and the Detection of 29 GM Maize Events Based on Capillary Electrophoresis. *Agriculture*, 12(3): 413.  
<https://doi.org/10.3390/agriculture12030413>
7. Papetti, A., & Colombo, R. (2019). High-performance capillary electrophoresis for food quality evaluation. En J. Zhong, X. Wang (Eds.), *Evaluation Technologies for Food Quality* (pp. 301-377). Woodhead Publishing, 2019.

## IMAGENES

Principios de bioquímica de Lehninger

<https://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>

<https://www.redaccionmedica.com/secciones/gestion/primer-acreditacion-para-electroforesis-de-campo-pulsado-en-hospitales-1412>

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 16**

### **TÉCNICAS MICROSCÓPICAS. FUNDAMENTO. TIPOS. APLICACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo. Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

**1. LENTES Y MICROSCOPIOS**

**1.1 INTRODUCCION**

**1.2 DESCRIPCION DEL MICROSCOPIO OPTICO**

**1.3 TIPOS DE MICROSCOPIO.**

**2. TECNICAS MICROSCOPICAS**

**2.1. INTRODUCCIÓN**

**2.2. TECNICAS" IN VIVO"**

**2.3. TECNICAS" IN VITRO"**

**3. APLICACIONES**

**4. BIBLIOGRAFIA**

**5. ANEXO**

MATERIAL NO OFICIAL

## **LENTE Y MICROSCOPIOS.TIPOS. TECNICAS MICROSCOPICAS.FUNDAMENTO APLICACIONES**

### **1. LENTES Y MICROSCOPIO**

#### **1.1 INTRODUCCIÓN**

La palabra microscopio deriva del griego “micros “que significa pequeño y de “scopeo “que significa observar .Instrumento que permite observar en un tamaño aumentado elementos que son imperceptibles a simple vista.

#### **1.2TIPOS DE MICROSCOPIO**

##### **2.2.1 MICROSCOPIO OPTICO**

###### **2.2.1.1-Microscopio simple**

- Lupas monoculares
- Lupas Binoculares

###### **2.2.1.2Microscopio Compuesto**

###### **2.21.2 A Luz visible:**

- Microscopio de campo claro
- Microscopio de campo oscuro
- Microscopio de contraste de fases
- Estereomicroscopio

###### **2.2.1.2 B. Luz no visible**

- Microscopio luz UV
- Microscopio de fluorescencia
- Microscopio de luz polarizada

###### **2.2.2Microscopio electrónico**

- De barrido
- Transmisión

#### **1.3DESCRIPCION DEL MICROSCOPIO OPTICO**

Atendiendo a las clasificaciones que tradicionalmente se han realizado, distinguimos las siguientes partes en un microscopio:

- ✓ Parte mecánica
- ✓ Parte óptica

**1.-Parte mecánica** Son aquellos que sirven de sostén, movimiento y sujeción de los sistemas ópticos y de iluminación así como de los objetos que se van a observar. Consta de los siguientes elementos

**Estativo o soporte** está formado por un pie pesado que sostiene un brazo inclinado, del cual salen tanto la platina como el tubo del microscopio.

**Platina** pieza en la que se colocan las diferentes preparaciones que deseamos observar. Puede ser fija o móvil

**Tubo** en la parte inferior lleva el revólver, y en la superior los oculares cambiables.

**Revolver o porta objetivos.** Es un componente que gira alrededor de un eje con la finalidad que los objetivos que sostiene coincidan de manera perpendicular con la perforación central de la platina.

**Los mandos de enfoque** (macro y micrómetro) El micrométrico produce desplazamientos evidentes y rápidos de la platina, en cambio el tornillo micrométrico produce movimientos imperceptibles de la platina y sirve para efectuar el enfoque fino y definitivo de la imagen.

## **2.-Parte óptica**

**Objetivos** son los elementos más importantes en la formación de la imagen microscópica, ya que estos sistemas de lentes establecen la calidad de la imagen en cuanto a nitidez y a la capacidad que tiene para captar los detalles de la misma (poder de resolución).

Están constituidos por un juego de lentes convergente y divergente, para eliminar en lo posible una serie de aberraciones que afectarían a la calidad de las imágenes formadas.

Los objetivos suelen llevar rotulado su poder de resolución y la apertura numérica.

La clasificación de los objetivos puede ser atendiendo a diferentes criterios:

Atendiendo al medio que existe entre el objeto y la lente frontal del objetivo:

- Seco cuando solo hay aire entre la preparación y la lente.
- Inmersión son los que requieren entre la preparación y la lente frontal una sustancia líquida que puede ser agua, glicerina o un aceite de inmersión como el aceite de cedro o aceites artificiales.

Atendiendo a las aberraciones corregidas

- Acromáticos corrigen los rayos luminosos azules y rojos haciéndolos coincidir en un solo plano focal. En tanto que los otros rayos coloreados se forman en otro plano generando una imagen cuyos bordes se observan levemente difusos (Espectro luminoso secundario)
- Semiapocromaticos se conocen también como objetivos de fluorita , corrigen el espectro secundario dando imágenes de bordes más nítidos .Por la alta capacidad que tienen para transmitir las radiaciones luminosas de onda corta, son los objetivos ideales para microscopia de fluorescencia.

- Apocromáticos hacen coincidir en un solo plano los rayos luminosos azules, rojos y verdes obteniéndose una imagen de bordes nítidos pero la corrección de esta aberración acentúa otra que es la curvatura de campo pues la superficie de la imagen es directamente curva, dando como resultado que al observar la imagen y tratar de enfocarla en la zona central del campo se desenfoca la zona periférica y viceversa
- Planocromáticos son los objetivos en los cuales se han corregido la mayor cantidad de aberraciones, como la cromática, curvatura de campo, de esfericidad y de astigmatismo. se obtienen imágenes nítidas y el campo de microscópico aparece totalmente plano, enfocado en toda su extensión.

La imagen que forman los objetivos es aumentada, de tamaño, invertida y real.

La capacidad que tienen los objetivos para formar imágenes en donde se distinguen más detalles del objeto depende de una serie de factores que son:

**1-Índice de refracción** –Se denomina a la relación existente entre la velocidad de la luz en el aire y su velocidad en el medio transparente utilizado.

$$I.R = \frac{\text{Velocidad de la luz en el vacío}}{\text{velocidad de la luz en el medio}}$$

**2-Angulo de apertura** \_ capacidad de un objetivo de captar los rayos luminosos refractados cuando estos atraviesan un medio transparente. Cuanto mayor sea este Angulo, la lente del objetivo aceptara una mayor cantidad de ellos.

Dependiendo del Índice de refracción del material transparente que forma la lente del condensador o la interface (aire o sustancia) que exista entre el objeto y la lente frontal del objetivo, el Angulo de apertura será mayor o menor.

**3-Apertura numérica** indica la capacidad del objetivo de poder captar los rayos refractados por las estructuras finas de los cuales está constituido el objeto que se observa.

Esta capacidad se traduce en el poder del microscopio de formar imágenes que muestren al observador una serie de detalles del objeto que se está examinando.

Cuanto mayor sea la apertura numérica este tendrá mayor capacidad de mostrar detalles finos de la imagen que forma de

La apertura numérica de un objetivo guarda relación directamente proporcional con el aumento del propio objetivo y la capacidad que tiene de mostrar el mayor número de detalles

$$A.N = n_x \text{sen} \alpha$$

n= índice de refracción de la interface que separa el cubreobjetos de la muestra examinada y la lente frontal del objetivo

A es la mitad del Angulo de apertura

**4-Aumento de un objetivo** es la capacidad que posee un objetivo de ampliar la imagen del objeto observado. Se define como la relación entre el tamaño de la imagen y el objeto, en valores lineales (largo y ancho)

**5-Poder de resolución** capacidad de un objetivo de poder distinguir la distancia mínima que debe existir entre 2 puntos del objeto para que se puedan visualizar como 2 puntos separados. La calidad de una imagen en la que se observe la claridad, la nitidez y la riqueza de detalles depende del poder de resolución del objetivo.

El poder de resolución de (PR) de un objeto depende de la longitud de onda del rayo luminoso utilizado y de la apertura numérica del sistema óptico del objetivo

**Ocular** es el encargado de formar una segunda imagen a partir de la imagen primaria que forma el objetivo.

La imagen es de mayor tamaño, virtual y derecha. Esta imagen únicamente amplía un número determinado de veces (5x, 8x, 10x, 12x) a la imagen formada por el objetivo. No añade por más aumentos propios que posea ningún detalle a los generados por el objetivo.

Los oculares normalmente están contruidos por 2 lentes convergentes (plano convexas):

- ❖ Lente campo o frontal que está situada en la parte anterior del ocular y es la encargada de recoger y ampliar la imagen generada por el sistema de lentes del objetivo
- ❖ Lente ocular, lente posterior en contacto estrecho con el ojo del observador y es la responsable de aumentar nuevamente la imagen y orientarla hacia el ojo del observador.

Los oculares se clasifican dependiendo de la disposición de las lentes y del diafragma dentro de la camiseta metálica que los contiene:

- Oculares negativos de Huygens las lentes plano convexas están dispuestas con las superficies convexas hacia abajo, entre ambas se sitúa un diafragma anular, localizado en el plano focal de la lentes
- Oculares positivos o de Ramsden las lentes plano convexas están dispuestas con las superficies curvas dirigidas hacia dentro. El diafragma está situado por debajo de la lente de campo o frontal, en el plano que se forma la imagen formada por el objetivo.

La imagen total formada por ambas lentes (objetivo y ocular) es aumentada de tamaño, invertida y virtual con relación al objeto.

**Condensador** componente óptico que tiene como función principal concentrar y regular los rayos luminosos que provienen de la fuente luminosa. Están formados por 1 o 2 lentes convergentes que reúnen los rayos luminosos y los orientan hacia la abertura central de la platina. Mediante un mecanismo de cremallera se acercan y se aleja de la platina., todo ello con la finalidad de concentrar la mayor cantidad de rayos

luminosos en el plano donde está situado el objeto a observar. Existen distintos tipos dependiendo de las necesidades y requerimientos de nuestra observación: abbe,

**Diafragma** está situado debajo de la platina y del condensador, siendo el encargado de regular la entrada de luz al condensador

**Fuente de luz** la podemos obtener a través de un espejo situado debajo de la platina que recoge tanto la luz natural como la luz eléctrica o través de lámparas incorporadas al pie del microscopio

Dentro de la microscopia óptica según el número y posición de las lentes tenemos;

- ✚ **Microscopio simple** provisto de una lente o sistema de lentes convergentes dispuestas de manera que proporcionan una imagen virtual, derecha y mayor que el objeto que a su vez está situado entre la lente y el foco. La ampliación del microscopio simple es bastante limitada y se utiliza para la disección de animales pequeños o para la disociación de piezas histológicas. Este tipo se denomina también lupa pudiendo ser monoculares o binoculares.
- ✚ **Microscopio Compuesto** se combinan 2 lentes o sistemas de lentes convergentes de amplificación de imagen colocadas en los extremos del tubo y son el objetivo más cerca del objeto y el ocular cerca del observador. Pueden ser monoculares o binoculares.

A continuación vamos a describir brevemente los distintos tipos de microscopio compuesto

### Microscopios de luz visible

**Microscopio de Campo** claro emplea luz natural o luz artificial como energía luminosa para formar las imágenes del objeto que se observa. La imagen muestra puntos o áreas iluminadas (generalmente coloreadas) sobre un fondo claro o transparente. Para que la imagen sea visible con nitidez es necesario que el objeto este coloreado o teñido, es decir, que los componentes celulares y tisulares de la estructura se contraten mediante colorantes específicos que absorben y transmiten determinadas longitudes de onda del espectro visible.

El campo microscópico aparece claro o transparente porque los rayos luminosos directos que provienen del condensador no encuentran en su camino ninguna estructura coloreada y entran como rayos de luz blanca hacia el objetivo...

Si se examinan objetos sin colorear la imagen ofrecerá detalles poco contrastados, casi transparentes.

**Microscopio de .Campo oscuro** consiste en un fondo oscuro sobre el que se ven los objetos intensamente iluminados. El poder ver un objeto depende del contraste existente entre el mismo y el medio que le rodea. El condensador es sustituido por uno de campo oscuro, a través del cual solamente pasa un cilindro hueco de luz. Hay objetos y estructuras de células que resultan invisibles pero que se hacen visibles

cuando se recurre a esta técnica de iluminación .El objeto aparece como una mancha brillante sobre un fondo oscuro.

Se utilizan para observar microorganismos sin teñir suspendidos en un líquido (preparaciones húmedas y de gota pendiente)

**Microscopio de contraste de fases**, también corresponde a una técnica de observación por contraste, valga la redundancia. Eso quiere decir que el resultado de la imagen será el fruto del paso de la luz a través de la muestra, normalmente viva, y los diferentes índices de refracción que resulten de esto.

La luz desde una lámpara/bombilla de halógeno-tungsteno es dirigida a través de un lente colectora y enfocada hacia anillos especializados del condensador. Los frentes de onda pasando a través del anillo iluminan al espécimen y pasan directamente (o difractados) a través de la muestra y son retardados por los gradientes de fase de la muestra. La luz sin desviar, difractada y colectada por el objetivo es separada por un plato de fases y enfocada en el plano intermedio de la imagen para formar la imagen final.

Esta técnica se usa en observación de células vivas o en estudio de materiales con láminas muy finas.

**Estereomicroscopios** son microscopios dobles llamados erróneamente lupas binoculares, con dos objetivos y dos oculares, poseen un doble prisma el cual permite enderezar las imágenes y conservar el relieve. La iluminación del objeto se hace por transparencia o por incidencia siendo esta última la más frecuente.

#### **Microscopios de luz no visible**

**Microscopio luz polarizada** consiste en colocar un polarizador entre la fuente de luz y el condensador y un analizador entre el objeto y el ocular.

Se utilizan para la observación de sustancias birrefringentes, al hacer rotar el objeto birrefringente con relación a los filtros cruzados este se verá brillante sobre un campo oscuro.

**Microscopio luz UV** Utiliza la longitud de onda más corta corresponde el espectro uv (180-400nm).teniendo en cuenta que el poder de resolución del microscopio esta razón es inversa a la longitud de onda utilizada esta será mayor en el uv que en el visible,

Esta técnica posee la ventaja de que muchas sustancias estudiadas en biología tienen bandas de absorción UV con lo que la observación microscópica no requiere el uso de una tinción.

Este tipo de microscopio necesita unas lentes de cuarzo y la imagen UV solo es visible a través de fotografías, fluorescencia o fotoemisión.

**Microscopio de fluorescencia.** La fluorescencia es la propiedad que poseen determinadas sustancias, las denominadas fluorescentes de emitir bajo la acción de

radiaciones de onda corta y otras radiaciones de longitud de onda más largas denominadas de fluorescencia.

Las radiaciones UV excitan los materiales fluorescentes radiaciones visibles, por eso estos materiales expuestos a este tipo de luz se perciben como brillantes sobre un fondo oscuro.

Los componentes de este tipo de microscopio son:

Fuente de luz emite banda de longitud de onda desde uv hasta infrarrojo.

Filtro que delimita la banda de excitación que es la uv.

Una muestra fluorescente después de la cual, encontramos un segundo filtro (filtro de barrer) que corta los restos de luz de excitación y deja pasar solo la fluorescencia.

Este tipo de microscopía puede ser:

- ❖ Primaria la propia muestra posee fluorescencia
- ❖ Secundaria la muestra se marca con un colorante fluorescente.
- ❖ Inmunofluorescencia la fijación del colorante se realiza a un AC marcado.

### Microscopio electrónico

El **principio de funcionamiento** de un microscopio electrónico se basa en utilizar **electrones** en lugar de luz visible. La **longitud de onda** con la que se mueve un electrón es inversamente proporcional a su **velocidad**. Esto significa que si los electrones son acelerados a altas velocidades pueden obtenerse longitudes de onda muy cortas.

Un microscopio electrónico utiliza esta idea para observar las **muestras**. A un nivel muy básico consiste en una fuente de electrones que son acelerados a gran velocidad. Estos **electrones impactan** con la muestra de modo equivalente a como la luz podría iluminarla. Algunos de estos electrones son **reflejados** por la muestra y otros la atraviesan. Mediante la **detección** estos electrones es posible reconstruir una imagen de la muestra.

### **Partes del microscopio electrónico**

Las **partes principales** de un microscopio electrónico incluyen aquellos elementos utilizados para generar electrones y dirigirlos hacia la muestra. Esto incluye:

#### **Fuente de electrones**

Es equivalente a la fuente de luz en un microscopio óptico. En este caso es necesario disponer de un emisor de electrones. En general se utiliza un filamento de tungsteno. Este filamento es calentado de modo que la energía de sus átomos y electrones aumenta. A partir de un cierto nivel energético los electrones poseen suficiente energía para escapar de sus átomos. Estos electrones libres son a continuación dirigidos hacia la muestra.

### **Lentes electromagnéticas**

Los microscopios ópticos utilizan lentes convergentes y divergentes para desviar los rayos de luz y aumentar así la imagen de la muestra. Este mismo procedimiento no puede ser aplicado para desviar la trayectoria de los electrones. En lugar de utilizar lentes de vidrio, los microscopios electrónicos utilizan lentes electromagnéticas. Estas lentes generan campos eléctricos y magnéticos de modo que su interacción con los electrones hace que sus trayectorias diverjan o converjan en un punto.

### **Cámara de vacío**

El procedimiento expuesto anteriormente debe llevarse a cabo dentro de una cámara de vacío. De lo contrario, los electrones interactuarían con las moléculas del aire y no sería posible determinar sus trayectorias adecuadamente. La muestra que se observa debe colocarse también dentro de la cámara de vacío. Este es uno de los motivos por el cual no es posible observar muestras vivas con un microscopio electrónico.

### **Detector (Pantalla fluorescente)**

Una vez los electrones han impactado contra la muestra es necesario medir algún tipo de información para poder reconstruir la imagen de la muestra. Una opción consiste en utilizar una pantalla fluorescente. Esta pantalla reacciona de modo distinto según cual sea el número de electrones que impactan en ella. De este modo es posible detectar las zonas donde impactan más o menos electrones y deducir así la imagen de la muestra. Existen alternativas a las pantallas fluorescentes, por ejemplo, sensores CCD.

A continuación, la información capturada por la pantalla fluorescente es transmitida a un ordenador que puede asignar colores artificiales a la imagen obtenida. En los microscopios ópticos estos componentes no son necesarios porque la luz proveniente de la muestra es directamente observada con el ojo humano. Dado que nuestros ojos no están preparados para detectar electrones debemos incorporar este elemento detector en un microscopio electrónico.

### **Tipos de microscopios electrónicos**

Existen dos tipos principales de microscopios electrónicos. Los microscopios electrónicos de transmisión y los microscopios electrónicos de barrido. A continuación presentamos sus detalles:

#### **Microscopio electrónico de transmisión (MET)**

La principal característica del microscopio electrónico de transmisión es que se utilizan los electrones que atraviesan la muestra.

En primer lugar los electrones son conducidos hacia la muestra mediante las lentes electromagnéticas. Cuando los electrones impactan contra la muestra, algunos de ellos consiguen atravesarla y otros son dispersados. Los electrones que pueden pasar al otro lado de la muestra son capturados por un detector dando lugar así a una imagen.

La cantidad de electrones que atraviesa la muestra sin desviarse varía en función de las características internas de la muestra. Dicho de otro modo, hay partes de la muestra que presentan más transparencia a los electrones que otras. Esto da lugar a zonas más oscuras (menos electrones atraviesan la muestra y llegan al detector) y zonas más claras (más electrones atraviesan la muestra y llegan al detector).

Para utilizar esta técnica es necesario preparar la muestra para que sea muy delgada (espesor inferior a 2000 ángstroms). De lo contrario, demasiado espesor impide que los electrones puedan atravesarla.

Esta técnica de microscopía es muy útil para visualizar los detalles internos de una muestra, por ejemplo, estructuras cristalinas. A nivel conceptual esta técnica es similar a realizar una radiografía de la muestra.

La principal limitación que tiene esta técnica es que no permite extraer información de la superficie de la muestra. Es decir, no permite observar detalles como la forma o rugosidad de la muestra que se observa. Para observar este tipo de características es necesario utilizar la microscopía electrónica de barrido.

### **Microscopio electrónico de barrido (MEB)**

En el microscopio electrónico de barrido también es necesario que los electrones impacten contra la muestra. En este caso, los electrones no iluminan toda la muestra simultáneamente sino que se hace un escaneado recorriendo los distintos puntos de la muestra.

Cuando los electrones impactan con la muestra estos pierden parte de su energía debido a distintas interacciones. Parte de su energía inicial se transforma en calor o en emisiones de rayos X. Además, se produce también la emisión de electrones que se desprenden de la superficie de la muestra. Estos electrones se conocen como electrones secundarios

El principio de funcionamiento de los microscopios electrónicos de barrido se basa en medir alguna de estas propiedades para extraer información de la muestra observada. Generalmente, esto consiste en medir la cantidad de electrones secundarios que emite la superficie cuando es bombardeada con electrones.

Esta técnica de microscopía es muy útil para observar los detalles de la superficie de microorganismos. Es habitual realizar una preparación de la muestra depositando primero una capa de metal sobre la muestra. De esta forma, existen más electrones secundarios que pueden desprenderse cuando se aplica el haz principal de electrones. Este proceso de preparación es en general más sencillo que el que se debe realizar para la microscopía electrónica de transmisión.

El aumento que alcanza este tipo de microscopios es menor que el que se puede obtener con un microscopio electrónico de transmisión. Sin embargo, la información tridimensional que proporciona esta técnica lo convierte en un instrumento muy útil para determinados tipos de muestras.

## **2. TECNICAS MICROSCOPICAS**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

Las técnicas microscópicas son el conjunto de procedimientos de investigación que utilizan un microscopio para obtener imágenes de determinadas estructuras, las cuales por ser demasiado pequeñas, resultan inapreciables a simple vista por el ojo humano.

Para poder observar y estudiar una muestra hay que realizar una preparación de la misma. La preparación del objeto de estudio puede resultar un proceso simple o, por el contrario, ser bastante complejo, dependiendo de la naturaleza y características de aquello que queramos observar.

La preparación de una muestra para estudiarla al microscopio óptico es diferente según la naturaleza del material que ha de ser observado, orgánico o inorgánico y si es orgánico, según queramos observar propiedades que solo se manifiestan en estado vivo o si queremos observar morfología y estructuras, que no se modifican cuando sobreviene la muerte celular

Así distinguimos dos tipos:

2.2. Técnicas de estudio "in vivo"

2.3 Técnicas de estudio "in vitro"

#### **2.2-Técnicas de estudio "in vivo"**

El estudio "in vivo" se desarrolló cuando todavía no se habían inventado la fijación y la tinción. Actualmente se siguen utilizando, sobre todo gracias al desarrollo de las técnicas de contraste de fases y contraste interferencial.

Un estudio "in vivo" es aquel que no precisa un tratamiento en el que se maten las células como ocurre con la fijación o la inclusión. No presenta dificultades añadidas a las de cualquier técnica microscópica, pero si requiere la máxima limpieza.

La observación vital se utiliza principalmente para la investigación de los caracteres de la movilidad bacteriana y morfología (en bacterias que al secarse se alteran>), agrupación y estructuras de resistencia (quistes) de parásitos.

Las técnicas para la observación vital son las siguientes:

2. A -**Examen en fresco** distinguimos:

- ✓ Preparaciones húmedas para observar organismos acuáticos microscópicos (algas, larvas etc.): se pone una gota del líquido que los contiene sobre el portaobjetos y se pone el cubreobjetos con cuidado para que no aparezcan burbujas de aire.
- ✓ Gota pendiente: se utilizan portaobjetos excavados sobre los que se pone el cubreobjetos que lleva adherido la gota del líquido que ha de ser observado:

Así podemos observar el movimiento de los microorganismos en el medio líquido sin que estén sometidos a la presión entre portaobjetos y cubreobjetos

- ✓ .Examen en fresco con nigrosina: esta técnica consiste en añadir nigrosina, (se prefiere a la tinta china), al objeto de estudio. Con este método podemos distinguir bacterias incoloras sobre fondo negro Se utiliza sobre todo para el estudio de detalles estructurales como capsulas y flagelos. El objetivo de inmersión.es el utilizado en este tipo de técnica.

En el examen en fresco se pueden utilizar dos tipos de medios:

- Líquidos fisiológicos son los que conservan las condiciones más parecidas a aquellas en las que se desenvuelven el microorganismo vivo.
- Líquidos de adición se utilizan para aclarar los objetos de estudio poco transparentes (insectos, pelos, fragmentos vegetales) y así hacerlos visibles. Como líquidos de adición se utiliza el lacto fenol o el clorofenol

## 2. B- Coloración vital

Permite poner en relieve detalles estructurales sin matar al organismo. En general no tiñen, sino que se acumulan en determinadas zonas de la célula .Como colorantes vitales se utilizan el azul de metileno, el rojo neutro, el rojo Congo, el verde Jannus

La coloración en vivo se puede hacer de dos maneras:

- ✓ Por difusión: en el espacio entre portaobjetos y cubreobjetos de una preparación en fresco se pone una gota de colorante que penetra en la muestra por capilaridad.
- ✓ Mezclando una gota de colorante con el material que ha de ser examinado en el portaobjetos y colocando luego el cubreobjetos

Tanto en un examen en fresco como en una coloración vital pueden realizarse procedimientos de microimpresión, disociación e incluso fragmentación.

### 2.3. Técnicas de estudio "in vitro"

Consiste en la observación de células y tejidos muertos. Para ello se realizan una serie de pasos como son la fijación, la inclusión, el corte (microtomía), la tinción y el montaje

2.3.1 Fijación mecanismo que consiste en matar a la célula lo más rápidamente posible, para permitir que se mantengan las propiedades fisiológicas y morfológicas del organismo vivo. Los fijadores solidifican el coloide protoplasmático mediante coagulación o precipitación, convirtiéndolo en un gel insoluble .La fijación evita que el tejido se pudra y se desintegre, produciendo puentes entre proteínas y diferentes materiales de los tejidos. 24 horas después se procederá a la inclusión

Hay diferentes tipos de fijador:

- a) Físicos: calor (húmedo o seco), frío (congelación rápida)
- b) Químicos según la base fijadora: alcohol metílico, dicromato de potasio, formol 10% tamponado

La muestra que va a ser fijada no debe tener más de 3mm de espesor, porque de lo contrario el fijador que penetra por difusión, no actuaría por igual en todas las células de la muestra

Además de mantener las propiedades del objeto de estudio, los fijadores, dependiendo de los casos pueden servir para endurecerlo, o ablandarlo, o aumentar su afinidad tintorial.

2.3.2l inclusión este proceso se utiliza para dar una cierta consistencia a la pieza y así poder cortarla. La muestra la incluimos en un material que llegue a todas las estructuras celulares .Esta debe ser una sustancia con plasticidad como la parafina, el colodión o la gelatina .La inclusión nos permite conservar la muestra durante largo tiempo.

2.3.3 Corte la obtención de cortes se obtiene por los micrótomos .existen diferentes tipos en función de la textura del material que se quiere estudiar, para las células vegetales de un órgano duro se utiliza el micrótomos de mano o de Ranvier. Para el resto de órganos vegetales y animales se utiliza el micrótomos de rotación o de Minot o el de deslizamiento,

Los cortes obtenidos se planchan en la superficie de un baño maría a 45º con un 5% de gelatina y se pescan con un portaobjetos.

También se pueden realizar cortes a partir de material no incluido en parafina mediante congelación.

Los cortes una vez recogidos y puestos en agua, se tiñen para evitar que se sequen.

Tinción para teñir los cortes no deben tener parafina porque si no, no penetraría el colorante. Por ello, si antes han sido incluidos en parafina, se elimina sumergiendo los cortes 15 minutos en xilol. También se elimina el xilol haciéndolos pasar por alcohol absoluto, alcohol 90º, alcohol 70ºy agua destilada.

Una vez eliminada la parafina, o bien utilizando los cortes que no habían sido incluidos en ella se procede a la tinción. Hay muchos tipos de tinción, muchas de ellas específicas para poder observar determinadas estructuras

A-Según el origen:

- Naturales proceden de animales o vegetales: eosina, azafrán...
- Artificiales proceden del carbón mineral son los más utilizados

B-Según su naturaleza:

- Ácidos tiñen las bases por ej. eosina
- Básicos tiñen los ácidos por ej. azul de metileno

Supra vitales se aplican cuando el material ya ha muerto a causa de la fijación.

Una vez teñidos los cortes se deshidratan para quitarles el agua y que esta no produzca cambios en la refringencia. Para ello se pasan los cortes por alcohol en gradación creciente para acabar en alcohol puro, después se aclaran en dos baños de xilol

Montaje:

- Gota pendiente ya explicado anteriormente
- Extensión o frotis se extiende la gota sobre el portaobjetos con la ayuda de otro rápidamente para que no coagule .El líquido extendido
- Aplastamiento consiste en poner el cubreobjetos encima de la preparación dando unos pequeños golpecitos para que se asiente.

### **3- APLICACIONES**

Mohos en conservas de tomate

PAT, s en piensos

Estructura de los almidones.

Análisis palinológico

### **4. BIBLIOGRAFÍA**

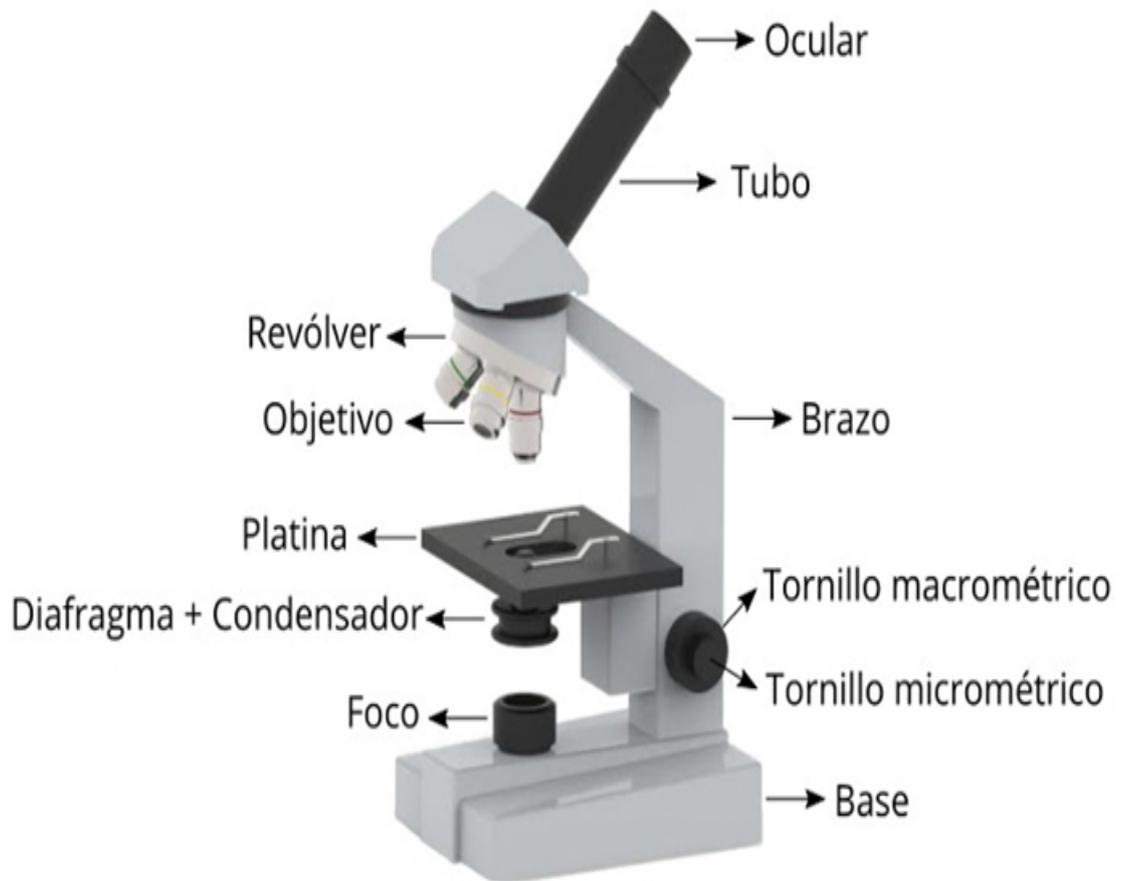
Microscopia de los alimentos .Olga Flint Ed. Acribia I.S.B.N 84-200-0816-8

Prácticas de Microbiología Ed Everest

La célula tópicos acerca de su estudio

## 5-ANEXO

### PARTES DEL MICROSCOPIO



MA

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 17**

### **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): CONCEPTO Y TIPOS. APLICACIONES AL CAMPO AGROALIMENTARIO**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

#### **1.1. CONCEPTOS**

1.1.1. Termociclador

1.1.2. Reactivos

1.1.3. Ciclo de amplificación

#### **1.2. TIPOS**

1.2.1. RT-PCR

1.2.2. PCR-RFLP

1.2.3. PCR a tiempo real (Rti-PCR)

1.2.4 PCR digital (dPCR)

### **2. APLICACIONES AL CAMPO AGROALIMENTARIO**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

### 1.1. CONCEPTOS

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tecnología desarrollada por Kary Mullis en 1996, es la técnica molecular basada en ADN más desarrollada hasta el momento. Constituye una herramienta simple, rápida, específica y de alta sensibilidad para la identificación molecular y trazabilidad de productos agrícolas.

Esta técnica de amplificación se basa en la hibridación de oligonucleótidos específicos de un fragmento de ADN diana y la síntesis, *in vitro*, de millones de copias de ADN (amplicones) iniciadas por sus *primers* o cebadores. Para llevarla a cabo se necesita un termociclador, reactivos y programar los ciclos de amplificación.

#### 1.1.1. Termociclador

El termociclador es el equipo que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación del ADN específico. El modelo más común consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye, a través de una placa, una temperatura homogénea (rango de 4°C a 96°C) durante tiempos programables.

#### 1.1.2. Reactivos

- a) **ADN molde** que contiene la región de ADN que se va a amplificar (diana) y que es el sustrato para polimerizar nuevo ADN.
- b) **Dos cebadores**, oligonucleótidos complementarios de las dos hebras de ADN que delimitan la zona de ADN a amplificar. Son secuencias cortas (normalmente 18-26 nucleótidos), reconocidos por la polimerasa para iniciar la reacción.
- c) **ADN polimerasa**, es la enzima que se encarga de formar la nueva hebra de acuerdo a la secuencia de bases de la hebra molde. Es característico de esta enzima su termorresistencia con temperatura óptima de funcionamiento alrededor de 70°C. La más común es la Taq polimerasa.
- d) **Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)**, son las moléculas que la polimerasa irá tomando del medio e uniendo para formar la nueva hebra. Hay 4 tipos básicos comunes para formar la molécula de ADN: dATP, dTTP, dCTP y dGTP. De manera abreviada; A, T, C y G
- e) **Iones monovalentes**, como el potasio.
- f) **Iones divalentes** como el magnesio ( $Mg^{2+}$ ), normalmente agregado en forma de  $MgCl_2$  o el manganeso ( $Mn^{2+}$ ). Actúan como cofactores de la polimerasa.
- g) **Solución tampón** que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.

### 1.1.3. Ciclo de amplificación

El proceso de PCR consta de una serie de 30 a 40 cambios de temperatura llamados ciclos y cada ciclo consiste generalmente en 2-3 pasos de temperaturas. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo depende de varios parámetros:

- Enzima usada para la síntesis de ADN
- [ ] de iones divalentes en la reacción
- [ ] de dNTPs en la reacción
- Tamaño y composición en bases de los cebadores

- I. **Inicialización.** Consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de **94-96°C** durante **1-10 minutos**. Es necesario para las ADN polimerasas que requieran activación por calor (método hot start).
- II. **Desnaturalización.** Es la separación de las dos hebras del ADN doble. Hay diferentes maneras de desnaturalizar el ADN, siendo el calentamiento (**94-95°C**) la más común. La temperatura de desnaturalización va a depender de factores como la proporción de G+G que tenga la hebra o su longitud.
- III. **Alineamiento/anillamiento/unión del cebador.** Se produce la hibridación de cada cebador, uniéndose a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello, se baja la temperatura a **50-65°C** durante **20-40 segundos**, permitiendo su alineamiento. A continuación, las moléculas de polimerasa se unen a los cebadores alineados, en el extremo del sentido de elongación de la hebra nueva respecto de la hebra molde y comienza a **sintetizar ADN**.
- IV. **Extensión/elongación de la cadena.** La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTPs complementarios en dirección 5'-3'. La temperatura comúnmente es de **72°C** ya que está dentro de la temperatura de máxima actividad de la Taq polimerasa. En cambio, el tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa utilizada como de la longitud del fragmento de ADN que se amplifique. Hay un regla básica: en su temperatura óptima, la polimerasa de ADN polimerizará mil bases en un minuto.
- V. **Elongación final.** A una temperatura de **70-74°C** y un total de 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR, asegurando que se completen los amplicones no terminados.
- VI. **Conservación.** **4-15°C** en un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo.

Los ciclos que se repiten de 30 a 40 veces son los pasos que van desde II. hasta IV. en los cuales va aumentando el número de copias del fragmento deseado de manera exponencial, al duplicarse en cada ciclo de la forma  $2^n$ .

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de ADN previsto, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de ADN generados del resto del ADN en base a su tamaño.

## 1.2. TIPOS DE PCRs

### 1.2.1. RT-PCR

PCR donde el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, como Tth, para realizar la etapa inicial de conversión del ARN al ADN complementario.

Una vez formado el ADN complementario (que sería el ADN diana), se procede como una PCR normal.

### **1.2.2. PCR-RFLP**

Técnica en la que hay una etapa que es una reacción de PCR en la que se obtiene un fragmento de ADN amplificado del ADN diana y a continuación en la siguiente etapa, este fragmento se somete a digestión con una o más enzimas de restricción.

Dependiendo de la secuencia específica del fragmento amplificado, se obtendrán uno o varios fragmentos mas pequeños, siendo importante que sean de diferente tamaño para que se puedan identificar. Estos fragmentos se visualizarán por cualquiera de las técnicas de electroforesis aplicables al ADN de doble hebra (en gel, capilar, ...).

### **1.2.3. PCR a tiempo real (Rti-PCR o también RTPCR)**

Reacción de PCR sensible y específica que permite detectar pequeñas cantidades de ADN (o ARN en la RT-PCR) de la muestra original. Esto se consigue gracias a la detección por fluorescencia. En una reacción de RTPCR correctamente desarrollada la intensidad de fluorescencia formada es proporcional a la cantidad de ADN sintetizado, y si se conoce la cinética de la reacción el ADN formado será también proporcional al ADN diana inicial en la muestra. Para ello, se emplean termocicladores a los que se les ha incorporado un lector de fluorescencia.

Hay dos sistemas básicos de detección por fluorescencia:

- Agentes intercalantes: fluorocromos que aumentan sensiblemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice → SYBR Green es el más usado.
- Sondas de hibridación específicas: En su forma elemental son oligonucleótidos marcados con dos fluorocromos, uno que actúa como donador o emisor de fluorescencia y otro que actúa como aceptor o secuestrados de fluorescencia. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente por resonancia (FRET) → Sondas de hidrólisis o sondas Taqman (las más utilizada). Otros tipos son las molecular beacons y las sondas scorpion.

Principales ventajas:

- ✓ Más rápida al eliminarse la etapa de electroforesis
- ✓ Más específica que la PCR a tiempo final (con electroforesis)
- ✓ Disminución del riesgo de contaminación al ser un sistema cerrado
- ✓ Determinación precisa de mutaciones puntuales

#### 1.2.4. PCR digital (dPCR)

La PCR digital permite la cuantificación absoluta de los ácidos nucleicos diana en una muestra, incluso cuando se encuentre en un bajo número de copias.

La técnica funciona repartiendo los fragmentos de ADN de una muestra en múltiples reacciones de PCR individuales en tiempo real; algunas de estas reacciones individuales contendrán la molécula diana (PCR positivas) mientras que otras no (PCR negativas). Tras el análisis de PCR, se examina la relación de reacciones de PCR positivas a negativas y mediante el empleo de funciones estadísticas se puede contabilizar el número exacto de moléculas diana, sin necesidad de patrones o controles endógenos.

Principales ventajas:

- ✓ Cuantificación absoluta de la expresión génica
- ✓ Capaz de analizar mezclas complejas
- ✓ No es necesario el uso de referencias o patrones
- ✓ Mucha menor influencia de los inhibidores de la polimerasa en la cinética de la enzima

## 2. APLICACIONES AL CAMPO AGROALIMENTARIO

- Peligros microbiológicos

En seguridad alimentaria, la identificación de contaminación microbiana es un problema primario. Para su detección, se usa el ADN y ARN como diana, principalmente el ARN ribosomal, abundante en el citosol. Actualmente se han desarrollado métodos de PCR para secuencias específicas de ADN de los principales patógenos (*Clostridium*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*).

De igual modo, la identificación de contaminación viral, como norovirus, en los alimentos es posible realizando una RT-PCR.

- Detección de alérgenos

Una gran fuente actual de inquietud actual son los alérgenos escondidos, es decir, alérgenos presentes por error en alimentos que podrían desencadenar reacciones severas en el consumidor. Para evitar esto, se busca detectar el ADN del mismo mediante RT-PCR. Recientemente se ha publicado la norma UNE-EN 15634-1 (Julio, 2020) en la que se indican las pautas para aplicar los métodos.

- Identificación y cuantificación de organismos modificados genéticamente (OMG)

Los análisis de ADN son esenciales para confirmar presencia de vegetales OMG, ya que la principal diferencia entre cultivos clásicos (*wild type*) y de OMG está en que su contenido genético está modificado para expresar nuevas características de utilidad, principalmente agronómicas. La Unión Europea tiene una estricta regulación: el etiquetado de alimentos o

piensos que son, llevan o están elaborados a partir de vegetales OMG debe indicar dicha presencia. Se admite una presencia accidental o técnicamente inevitable no mayor del 0,9 % respecto del vegetal correspondiente, en cuyo caso no es necesario indicar el contenido en OMGs. El método de elección para verificar el cumplimiento con la normativa es la RTPCR.

Las últimas autorizaciones de uso de OMGs corresponden mayoritariamente a vegetales GM que contienen más de un evento de transformación en el genoma de sus células. Son los denominados eventos apilados o "*stacked events*" OGM, es decir, plantas con más de un gen modificado. Es por ello por lo que cada vez es más necesario la combinación de dianas para identificar dos o mas genes. Asimismo, la confirmación de la identidad de los productos de PCR es particularmente importante si la presencia de OGM tiene consecuencias inmediatas a nivel industrial y legal.

- Evaluación de la autenticidad de la especie

La evaluación del ADN de productos de origen típico es necesaria para justificar la relación calidad-precio del producto, así como para evitar los problemas a nivel ético y religioso.

- a) Identificación de carnes y alimentos de origen cárnico
- b) Autenticación de aceites vegetales de consumo
- c) Identificación de variedades *gluten-free*
- d) Autenticación y trazabilidad de pescados y mariscos

## BIBLIOGRAFÍA

1. Camacho Garrido, S. (2015). Ensayos Biotecnológicos, Volumen IV. Madrid, 2015.
2. Fanelli, V., Mascio, I., Miazzi, M. M., Savoia, M. A., De Giovanni, C., & Montemurro, C. 2021. Molecular Approaches to Agri-Food Traceability and Authentication: An Updated Review. *Foods*, 10(7): 1644.
3. Grothaus, G. D., Bandla, M., Currier, T., Giroux, R., Jenkins, G. R., Lipp, M., Shan, G., Stave, J. W., & Pantella, V. 2006. Immunoassay as an analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, 89(4): 913-928.
4. Habza-kowalska, E., Grela, M., Gryzinska, M., & Listos, P. 2020. Molecular techniques for detecting food adulteration. *Medycyna Weterynaryjna*, 75: 6260-2020.
5. Illumina (2022). Next-generation sequencing. *Illumina*. Recuperado de <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners.html#how-it-works>
6. Kafarski, P. 2012. Rainbow code of biotechnology. *Chemik*, 66: 814-816.
7. Martins-Lopes, P., Gomes & Pereira, L., Guedes-Pinto, H. 2013. Molecular markers for food traceability. *Food Technology and Biotechnology*, 51: 198-207.
8. Sforza, S. (2013). Food Authentication using Bioorganic Molecules, Volumen X. Pennsylvania, 2013.
9. Thermo Fisher Scientific (2022). ¿Usaría PCR digital o Pcr en tiempo real? *Fisher Scientific*. Recuperado de [https://www.fishersci.es/es/es/scientific-products/publications/lab-reporter/2021/issue-1/should-you-use-digital-or-real-time-PCR.html#:~:text=La%20PCR%20digital%20cuenta%20las,que%20otras%20no%20\(negativo\).](https://www.fishersci.es/es/es/scientific-products/publications/lab-reporter/2021/issue-1/should-you-use-digital-or-real-time-PCR.html#:~:text=La%20PCR%20digital%20cuenta%20las,que%20otras%20no%20(negativo).)

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 18**

**CROMATOGRFÍA DE GASES. FUNDAMENTO TEÓRICO.  
INSTRUMENTACIÓN. ACOPLAMIENTOS. APLICACIONES.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CROMATOGRAFÍA DE GASES. FUNDAMENTO TEÓRICO**

### **2. INSTRUMENTACIÓN**

#### **2.1. GAS PORTADOR**

#### **2.2. SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRAS**

#### **2.3. COLUMNA Y HORNO**

#### **2.4. DETECTORES**

### **3. ACOPLAMIENTOS**

#### **3.1. DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA**

#### **3.2. DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA**

#### **3.3. DETECTOR DE QUIMIOLUMINISCENCIA DEL AZUFRE**

#### **3.4. DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES**

#### **3.5. DETECTOR DE EMISIÓN ATÓMICA**

#### **3.6. DETECTOR FOTOMÉTRICO DE LLAMA**

#### **3.7. DETECTOR NITRÓGENO-FÓSFORO**

#### **3.8. DETECTOR DE FOTOIONIZACIÓN**

#### **3.9. DETECTOR DE MASAS**

### **4. MODOS DE CUANTIFICACIÓN**

### **5. APLICACIONES**

## **1. CROMATOGRAFÍA DE GASES. FUNDAMENTO TEÓRICO.**

La cromatografía es una de las herramientas más potentes de separación e identificación/cuantificación (a través de los distintos detectores acoplados) disponible en los laboratorios. Se trata de un método físico que va a permitir separar los componentes de una mezcla mediante la distribución entre dos fases, una de ellas estacionaria (fija, bien de carácter sólido o bien de carácter líquido) y otra móvil (un líquido, un gas o un fluido supercrítico).

Sus orígenes se remontan a principio del siglo 20, cuando un botánico ruso Mijaíl Tsvet consiguió separar los pigmentos de plantas (clorofilas) en una columna de carbonato cálcico. Su nombre procede del griego chroma (color) y grapho (registrar, escribir).

La clasificación más simple de la cromatografía es la basada simplemente en qué tipo de fluido constituye la fase móvil. De esta forma, podemos distinguir cromatografía de gases, cuando la fase móvil es un gas, cromatografía de líquidos, cuando es un líquido o de fluidos supercríticos.

En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases en función del estado de la fase estacionaria: la Cromatografía gas-sólido y la Cromatografía gas-líquido.

En la cromatografía gas-sólido, se produce la retención de los analitos en una fase estacionaria sólida como consecuencia de la adsorción física. Su aplicación es limitada por la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y por la obtención de picos de elución con colas muy significativas.

La cromatografía gas-líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. Esta es la que se conoce generalmente como Cromatografía de Gases debido a que es la más ampliamente usada.

El gas portador fluye generalmente desde una botella de gas comprimido a través del sistema de inyección, la columna y el detector. La muestra se inyecta mediante jeringa, manual o automáticamente, en la cámara de inyección calentada, donde es vaporizada y arrastrada hacia la columna. En la columna se produce la separación de los componentes en función de su temperatura de volatilización. El detector, dispuesto a la salida de la columna, detecta la concentración o cantidad de cada componente y genera una señal eléctrica que pasa al sistema de tratamiento de datos.

## **2. INSTRUMENTACIÓN**

Los componentes básicos de un instrumento para la cromatografía de gases son: el sistema de alimentación de la fase móvil (gas portador), el sistema de inyección de muestras, el horno, la columna analítica, el detector y el sistema de adquisición y tratamiento de datos.

## **2.1. GAS PORTADOR**

El primer componente principal de un sistema de CG es el carrier. El suministro de este gas está siempre presente y normalmente se trata de Helio, Nitrógeno, Hidrógeno o mezclas Argón-Metano. La elección de dicho gas está con frecuencia determinada por el tipo de detector utilizado y de la aplicación, sin embargo, el Helio suele ser el más común. Siempre debe de tratarse de un gas inerte que no interaccione con los analitos en cuestión.

Otros carriers como hidrógeno y aire están muy relacionados con el detector empleado ya que por ejemplo, el detector de ionización necesita un combustible.

## **2.2. SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRAS**

Los sistemas de inyección de muestra para cromatografía de gases tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige a la columna. La vaporización e introducción de las muestras en el sistema, debe realizarse cumpliendo una serie de requisitos:

- La vaporización de la muestra debe ser lo más rápida posible
- La vaporización debe realizarse sin discriminar ningún componente de la mezcla
- La muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible.

La eficacia de la columna requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y que sea introducida como un “tapón de vapor”. Así la inyección lenta de muestras demasiado grandes provoca el ensanchamiento de las bandas y una pobre resolución.

El método más común de inyección de muestras implica el uso de una microjeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma (o septum) de un material elastomérico en una cámara de vaporización instantánea (que está a unos 50 ° por encima del punto de ebullición del compuesto menos volátil de la muestra). Este elastómero sella la entrada del sistema cuando la aguja es retirada, y juega un papel muy importante, ya que suelen desprender pequeños fragmentos cuando son atravesados por la jeringa, y además presentan el fenómeno de “sangrado” (migración de componentes del material), que ocasiona pérdidas de señal.

Las columnas capilares admiten una cantidad de muestra pequeña y se debe introducir la muestra con poco disolvente para que no afecte a la columna. Dado que no existen jeringas capaces de medir con precisión volúmenes inferiores a 0,1 µl, los inyectores utilizados para trabajar con este tipo de columnas, además vaporizar la muestra y mezclarla con el gas portador, deberán ser capaces de introducir en la columna sólo una alícuota de la muestra total inyectada.

El tipo de inyección más conocida es el modo “Split” (división de flujo), que consta con un sistema de división de flujo a la salida de la cámara de mezcla. Por medio de este tipo de inyector, el flujo de gas portador que pasa a través del inyector, se divide en dos; una parte es introducida en la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la proporción de gas que es introducido en la columna.

Existe también la técnica “Splitless” en donde la casi totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna.

Destacar también la técnica de inyección de espacio de cabeza, cuyo fundamento consiste en analizar una alícuota de la atmósfera que se encuentra en contacto con la muestra con el fin de determinar en ella la fracción vaporizada de los componentes que se encuentra en equilibrio con la muestra sólida o líquida.

Destacar también la desorción térmica, que consiste en que los analitos de la muestra son adsorbidos sobre la superficie de una fibra, para posteriormente ser desorbidos y pasar a la columna cromatográfica, consiguiéndose así una limpieza previa de la muestra.

### **2. 3. COLUMNA Y HORNO**

En CG se emplean dos tipos de columnas, las rellenas o empaquetadas y las abiertas o capilares. Si bien, en sus inicios la CG se desarrolló sobre columnas rellenas, en la actualidad, prácticamente la totalidad de los sistemas cromatográficos de gases emplean columnas capilares que son más eficaces, rápidas y reproducibles. No obstante, existen todavía algunos métodos oficiales que obligan al uso de columnas empaquetadas.

La longitud de estas columnas varía entre 2 y 50 metros. Van a ser el componente responsable de la separación de los componentes de la muestra. Las columnas se describen por su longitud, su diámetro, el grosor del film de la fase estacionaria y el tipo de fase estacionaria. Están construidas de acero inoxidable, vidrio, sílice o PTFE. A fin de colocarse en un horno termostaticado, se configuran de forma helicoidal.

La disponibilidad de fases estacionarias es más limitada que en el caso de cromatografía líquida, comercialmente se dispone de una gama de polaridad suficiente para afrontar los análisis de rutina.

La temperatura de la columna es un parámetro importante, por ello se introduce en un horno con regulación. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido. Generalmente con temperaturas mayores o similares al punto de ebullición promedio de la muestra, se obtienen tiempos de elución razonables. Para muestras con un amplio rango de temperaturas de ebullición, se emplean temperaturas controladas.

### **2.4. DETECTORES**

Es la parte que “siente” la presencia de compuestos distintos del carrier y convierte la información en una señal eléctrica proporcional. Existe un alto número de detectores distintos

que van a distinguirse por su sensibilidad y selectividad, pero no todos los detectores van a responder a todos los componentes de una mezcla.

La sensibilidad es el nivel de concentración detectable y se define como el cambio de la respuesta con el cambio en la cantidad detectada.

### **3. ACOPLAMIENTOS**

La cromatografía de gases es únicamente una técnica de separación, y por sí sola no es capaz de detectar la cantidad de analito que está presente en la muestra y por ello, precisa de ser acoplada con un detector. La cromatografía de gases puede ser acoplada con multitud de detectores como los que se indican a continuación.

#### **3.1. DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID)**

Quizá se trate del detector más empleado hasta la generalización de los detectores de espectrometría de masas. Su funcionamiento es muy sencillo, el efluente de la columna se mezcla con H<sub>2</sub> y aire, para luego encenderlo con una chispa eléctrica.

La mayoría de los compuestos cuando son pirolizados a la temperatura de una llama H<sub>2</sub>/aire produce iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la llama, de forma que se genera una corriente desde el electrodo generador al electrodo colector. Esta señal, una vez amplificada, será proporcional al número de átomos de carbono por unidad de tiempo.

Grupos funcionales como carbonilo, alcohol, halógenos y aminas generan pocos o ningún ión, por lo que no es un detector apropiado en estos casos, además el detector es insensible a gases no combustibles como CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, H<sub>2</sub>O.

Se trata de un detector destructivo

#### **3.2. DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA (TCD)**

Uno de los primeros detectores utilizados para el trabajo de rutina en cromatografía de gases, ha sido el detector de conductividad térmica o detector de hilo caliente. A veces, también llamado catarómetro.

Se basa en los cambios de conductividad térmica de la corriente de gas ocasionados por la presencia de un analito. El detector mide la conductividad del carrier de forma aislada y la del carrier + analitos, minimizando los efectos de la conductividad térmica del Carrier o las posibles variaciones de flujo.

#### **3.3 DETECTOR DE QUIMIOLUMINISCENCIA DE AZUFRE (SCD)**

El detector de Quimioluminiscencia de azufre es el detector cromatográfico más sensible y selectivo disponible para el análisis de compuestos azufrados. El SCD utiliza un quemador dual de Plasma para realizar la combustión a altas temperaturas de los compuestos de azufre y formar el monóxido de azufre (SO). Un tubo fotomultiplicador detecta la luz producida por la

reacción quimioluminiscente del monóxido de azufre con el ozono. Esta reacción produce una respuesta lineal y equimolar de los compuestos de azufre, eliminando la interferencia del resto de compuestos que contiene la matriz.

### **3.4. DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES (ECD)**

El detector de captura electrónica es ampliamente utilizado para el análisis de muestras medioambientales, debido a su selectividad para compuestos que tienen halógenos (pesticidas, bifenilos, etc.).

Es el detector “menos selectivo” de los detectores selectivos, pero tiene una alta sensibilidad. Contiene una fuente radiactiva (normalmente  $^{63}\text{Ni}$ ), que emite partículas  $\beta$  de alta energía capaces de ionizar el carrier para producir electrones térmicos secundarios. Estos electrones son monitorizados. Cuando una molécula electrofílica capaz de capturar electrones es eluida y colisiona con uno de estos electrones; éstos, que son de movimiento rápido, son sustituidos por analitos iónicos de movimiento lento, que tardan más en llegar al ánodo, y por tanto, tienen más probabilidad de recombinarse con iones del carrier para formar moléculas neutras. Así, el sistema pierde electrones y la corriente estática disminuye.

### **3.5. DETECTORES DE EMISIÓN ATÓMICA (AED)**

En este detector, el efluente se introduce en un plasma de helio obtenido con microondas, que se acopla a un espectrómetro óptico de emisión de diodos en serie. El plasma es suficientemente energético como para atomizar todos los elementos de una muestra, excitarlos, y así obtener sus espectros de emisión atómica característicos.

### **3.6. DETECTOR FOTOMÉTRICO DE LLAMA (FPD)**

El principio operativo de un detector FPD es la detección de una emisión luminiscente específica procedente de varios estados excitados en una llama. Su uso más común es la detección de compuestos que contienen azufre y/o fósforo. Bajo las condiciones correctas de combustión de compuestos que contienen estos elementos, se producen dos especies,  $\text{HPO}^*$  y  $\text{S}_2^*$ , las cuales emiten a 526 y 394 nm.

En este tipo de detector, el gas portador procedente de la columna es mezclado con aire y quemado en una atmósfera de hidrógeno; la emisión de los átomos de azufre o fósforo se da fundamentalmente en la zona superior, rica en hidrógeno de la llama, por lo que en ocasiones se utiliza un diseño de doble quemador con una segunda llama para producir la excitación; este diseño, ayuda a además a evitar el fenómeno de apagado de llama, que se da en este tipo de detectores, cuando eluye de la columna un compuesto en gran cantidad (básicamente el disolvente).

### **3.7. DETECTOR NITRÓGENO-FÓSFORO**

El detector de nitrógeno-fósforo (también conocido como detector termoiónico o detector de llama alcalina), está basado en el hecho de que la adición de una sal de metales alcalinos a la

llama de un detector de ionización aumente la respuesta de éste hacia determinados elementos (fósforo, nitrógeno, azufre, etc.).

En un detector de este tipo, una perla de un silicato de metal alcalino, calentada eléctricamente, se coloca entre el "jet" del detector y el electrodo colector, manteniéndose la perla a un potencial negativo para reducir las pérdidas de metal alcalino. En la región de la perla, se genera un plasma por medio de una mezcla aire/hidrógeno, utilizándose un flujo de hidrógeno muy bajo, insuficiente para mantener una llama pero suficiente para mantener un plasma en el que puedan darse los fenómenos de ionización.

El detector NPD es muy utilizado en el campo de medio ambiente, fundamentalmente para la determinación de residuos de plaguicidas, debido a su sensibilidad y a su especificidad, lo que permite minimizar la limpieza de las muestras. Su principal problema que presenta este detector es la inestabilidad de su respuesta, debida fundamentalmente a contaminación o pérdida de actividad de la perla alcalina, por lo que es necesario realizar calibraciones con relativa frecuencia.

### **3.8. DETECTOR DE FOTOIONIZACIÓN**

Los detectores de fotoionización están basados en la utilización de los fotones generados en una lámpara de descarga para ionizar los compuestos orgánicos que emergen, junto con el gas portador, de una columna cromatográfica.

Este tipo de detectores, utilizan para generar la radiación un tubo de descarga que contiene una mezcla de gases a baja presión; éstos son excitados por medio de una diferencia de potencial elevada que se mantiene entre dos electrodos.

En este detector, el gas portador pasa a través de una cámara de ionización, separada físicamente del tubo de descarga por medio de una ventana transparente a la radiación (generalmente de  $MgF_2$ ). Los compuestos que eluyen de la columna son ionizados por los fotones de alta energía procedentes de la lámpara y los iones generados son recogidos por medio de un electrodo polarizado adecuadamente.

Prácticamente la totalidad de los compuestos orgánicos dan algún tipo de respuesta con estos detectores. La sensibilidad del detector de fotoionización es dependiente del potencial de ionización del compuesto de que se trate; la respuesta del detector frente a los compuestos orgánicos sigue el orden general: Compuestos aromáticos > alquenos > alcanos > alcoholes > ésteres > aldehídos > cetonas.

### **3.9. DETECTOR DE MASAS**

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc. Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.

- Cuantitativa: permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt.
- Universal y específica.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.
- Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente, en el acoplamiento con cromatografía de gases, es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía.

El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria del ordenador para compararse con los espectros de una colección de espectros (o librería) y proceder a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen, etc.

Actualmente, el acoplamiento directo GC-MS resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual. En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o "TIC" (total ion current).

En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado. En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIR (“selected ion recording”). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total de los iones (TIC). De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias.

#### 4. MODOS DE CUANTIFICACIÓN

Se muestran distintos procedimientos de cálculo para determinar la concentración de cada componente presente en una mezcla.

Los procedimientos de cálculo de estándar externo o ESTD (External Standard), de normalización y el cálculo de estándar interno o ISTD (Internal Standard) requieren factores de respuesta y, por lo tanto, una tabla de calibración. En la tabla de calibración se especifica la conversión de respuestas en las unidades seleccionadas mediante el procedimiento seleccionado.

El procedimiento ESTD o calibración externa es el procedimiento de cuantificación básico en el que se analizan tanto las muestras de calibración como las desconocidas en las mismas condiciones. A continuación, se comparan los resultados de la muestra desconocida con los de la muestra de calibración para calcular la cantidad en la desconocida. En el procedimiento ESTD, a diferencia del procedimiento ISTD, se utilizan factores de respuesta absolutos. Los factores de respuesta se obtienen a partir de una calibración y luego se almacenan. En los análisis de muestras siguientes, se calculan las cantidades de los componentes aplicando estos factores de respuesta a las cantidades de muestra medidas. Asegúrese de que el tamaño de la inyección de muestra se puede reproducir entre análisis, puesto que no hay ningún estándar en la muestra para corregir las variaciones del tamaño de la inyección o la preparación de la muestra.

En el método de normalización, se aplican los factores de respuesta a las áreas de picos (o alturas) para compensar los cambios que se producen en la sensibilidad del detector para los distintos componentes de las muestras. El % Norm se calcula del mismo modo que un ESTD, con la diferencia de que hay un paso adicional para calcular las cantidades relativas de los compuestos en lugar de las absolutas. El % Norm tiene el mismo inconveniente que los % de área y % de altura, cualquier cambio que afecte al área de pico total afectará al cálculo de concentración de cada pico individual. La normalización sólo debe utilizarse si todos los componentes de interés son eluidos e integrados. Si se excluyen determinados picos, cambiarán los resultados del informe de la muestra.

El procedimiento ISTD o de patrón interno elimina los inconvenientes del método ESTD añadiendo una cantidad conocida de un componente, que sirve como factor de normalización. Este componente, el estándar interno, se añade tanto a las muestras de calibración como a las desconocidas. El software recupera los factores de respuesta apropiados obtenidos de una calibración anterior almacenada en el método. El software calcula las concentraciones de componentes mediante la concentración y las áreas de pico o alturas del estándar interno del análisis. El compuesto utilizado como estándar interno debe ser similar al compuesto calibrado, tanto químicamente como en su tiempo de retención/migración, pero debe ser cromatográficamente distinguible.

#### 4. APLICACIONES

La cromatografía de gases con los diferentes acoplamientos explicados anteriormente tiene una elevada aplicabilidad en muestras alimentarias y de alimentación animal.

En el campo de los aceites y grasas vegetales, la mayoría de las determinaciones se llevan a cabo mediante GC-FID, destacando la determinación por normalización de áreas de la composición en ácidos grasos de una muestra, o la determinación de los isómeros trans, la composición esterólica, el eritrodilol y uvaol o las ceras o el cálculo de los ECN.

En los vinos y bebidas espirituosas podemos destacar la determinación de MeOH (compuesto tóxico) mediante GC-FID o la determinación de compuestos volátiles en este tipo de muestras. Además de la determinación de ftalatos en estas matrices mediante la técnica de GC-MS.

En una gran variedad de matrices de frutas, hortalizas y cereales, destaca la técnica de CG-MS/MS para la determinación de residuos de plaguicidas, alcanzando la determinación de más de 100 analitos distintos por esta técnica junto con la extracción por QueChErS.

La determinación de PAHs en muestras de alimentos también se lleva a cabo por GC-MS/MS, llevando a cabo la determinación de Benzo(a)pireno y la suma de 4 PAHs para ver la concentración de estos contaminantes de proceso en las muestras.

Por último, mencionar la determinación del THC, ya sea mediante GC-FID o GC-MS en muestras de cáñamo con el objetivo de comprobar que su valor es inferior al límite legal establecido.

Además, existe una gran cantidad de compuestos químicos que no pueden ser analizados directamente por cromatografía de gases, bien porque no sean suficientemente volátiles o por otros motivos. En muchos casos, puede llevarse a cabo la determinación indirecta aplicando la derivatización de la muestra.

Puede estimarse que entre el 80 y 90 % de los compuestos orgánicos no son adecuados para su determinación directa por CG debido a su baja volatilidad.

La silinación es la técnica de derivatización más empleada, y consiste en la sustitución de algún átomo de hidrógeno activo del analito por un grupo trialkilsilil, tal como  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ .

**BIBLIOGRAFÍA -**

-<https://www.ingenieria-analitica.com/ncd-scd.html>

-Selección de detectores en cromatografía de gases masas. Seminario de Salamanca. 2011.  
Agilent Technologies

-Cromatografía de gases. Avelló Linde, S.A.

Cromatografía de gases. [https://www.mcn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](https://www.mcn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf)

-Cromatografía de gases. <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8247/4/T3gascromat.pdf>

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 19**

**CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS. FUNDAMENTO TEÓRICO.  
INSTRUMENTACIÓN. ACOPLAMIENTOS. APLICACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS. FUNDAMENTO TEÓRICO.**

### **2. INSTRUMENTACIÓN**

#### **2.1. SISTEMA DE SUMINISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LA FASE MÓVIL**

#### **2.2. SISTEMA DE BOMBEO**

#### **2.3. SISTEMA DE INYECCIÓN**

#### **2.4. COLUMNA**

#### **2.5. HORNO**

#### **2.6. SISTEMA DE INYECCIÓN**

#### **2.7. SISTEMA DE REGISTRO Y TRATAMIENTO DE DATOS**

### **3. ACOPLAMIENTOS**

#### **3.1. DETECTOR UV-VIS**

#### **3.2. DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN**

#### **3.3. DETECTOR DE FLUORESCENCIA**

#### **3.4. DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD**

#### **3.5. DETECTOR ELECTROQUÍMICO**

#### **3.6. DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

### **4. APLICACIONES**

## **1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS. FUNDAMENTO TEÓRICO.**

La cromatografía es una de las herramientas más potentes de separación e identificación/cuantificación (a través de los distintos detectores acoplados) disponible en los laboratorios. Se trata de un método físico que va a permitir separar los componentes de una mezcla mediante la distribución entre dos fases, una de ellas estacionaria (fija, bien de carácter sólido o bien de carácter líquido) y otra móvil (un líquido, un gas o un fluido supercrítico).

En la clasificación más simple de la cromatografía, podemos distinguir, en función del fluido que constituya la fase móvil, cromatografía líquida, cromatografía gaseosa y cromatografía de fluidos supercríticos.

Se denomina Cromatografía de Líquidos a la técnica de separación en la cual la fase móvil, que transcurre a través de una fase estacionaria, es un líquido. En una primera etapa la CL se llevaba a cabo en columnas de vidrio de grandes dimensiones y los tiempos de separación eran largos, a menudo de varias horas. Sin embargo, los intentos de acelerar el procedimiento clásico mediante la aplicación de vacío o por bombeo no resultaron efectivos, puesto que la eficacia disminuía considerablemente.

Los científicos se dieron cuenta de que se podían conseguir grandes aumentos en la eficacia de la columna disminuyendo el tamaño de las partículas de los rellenos, lo que requiere una instrumentación sofisticada para poder trabajar a altas presiones. Para distinguir estos procedimientos más nuevos de los métodos básicos, se emplea la denominación de cromatografía de líquidos de alta eficacia o presión (HPLC).

La cromatografía de líquidos de alta eficacia es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.

La naturaleza de la fase móvil es el factor clave en HPLC para la discriminación de componentes, el factor equivalente a la temperatura en cromatografía de gases. El eluyente ideal ha de ser compatible con los materiales empleados, de elevada pureza, de baja toxicidad e inflamabilidad, de baja viscosidad y, en el caso de utilizar detectores UV, de la mayor transparencia posible. Los más utilizados en fase reversa son metanol, acetonitrilo y agua, y en fase normal, n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y cloroformo.

### Clasificación

Dentro de la cromatografía de líquidos, en función de la polaridad columna-eluyente, podemos distinguir, fase normal y fase reversa.

Los sistemas que cuentan con una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar reciben el nombre de sistemas en fase normal. Con esta combinación de fases, la retención del soluto

generalmente aumenta con la polaridad del soluto. Contrariamente, si la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, el sistema se describe como de fase reversa y las moléculas polares tendrán una afinidad menor por la fase estacionaria y eluirán más rápido.

Los sistemas en fase reversa son mucho más comunes, hasta el punto en el que en los laboratorios de rutina, son muy pocos los que emplea la fase normal.

En función del mecanismo de separación, existen diversos tipos de cromatografía. Aquí se destacan los más comunes:

- a) Adsorción. En ella las moléculas de soluto y de fase móvil compiten por los sitios activos de la superficie sólida de la fase estacionaria (adsorbente).
- b) Partición. Consiste en el reparto de un soluto entre dos líquidos inmiscibles, como una extracción con solventes, con la diferencia de que uno de los líquidos está anclado a un soporte sólido como sílica gel, celulosa, PTFE, etc.
- c) Intercambio iónico. Proporciona un intercambio reversible y estequiométrico entre los iones de la muestra en la fase móvil y los iones asociados a la superficie.
- d) Exclusión de tamaños. También recibe el nombre de cromatografía de permeación en gel (GPC). Se basa en un proceso de filtrado físico.
- f) Afinidad. Existen interacciones analito-matriz muy específicas. La fase estacionaria consiste en un ligando bioactivo unido a un soporte sólido. Estos ligandos pueden ser específicos para una sustancia o grupo de sustancias, y en todo caso estas interacciones deben ser reversibles.

## **2. INSTRUMENTACIÓN**

Un cromatógrafo de líquidos consta habitualmente de los elementos siguientes: sistema de suministro y almacenamiento de la fase móvil, sistema de bombeo, sistema de inyección, columna y horno, detector y sistema de registro y tratamiento de datos

### **2.1. SISTEMA DE SUMINISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LA FASE MÓVIL**

Garantiza la disponibilidad de fase móvil al sistema en condiciones apropiadas, de modo que se evite la contaminación y la degradación de la misma.

La fase móvil en HPLC está formada por un disolvente o por una mezcla de ellos, cada uno de los cuales está contenido en un recipiente, generalmente de vidrio, aunque en ocasiones se emplean otros materiales, como el politetrafluoroetileno. Los recipientes deben disponer de tapones que impidan la contaminación por gases o partículas en suspensión presentes en el aire del laboratorio.

Para evitar flujos inestables, la formación de burbujas o la interferencia de partículas extrañas, los disolventes deben estar filtrados y desgasificados. Esto puede realizarse mediante un tratamiento previo que elimine los gases y la materia en suspensión (filtros milipore) o bien integrando sistemas de filtrado y desgasificación en el equipo de HPLC.

La elución se puede realizar de dos maneras:

Elución isocrática: cuando se emplea un único disolvente o una mezcla de disolventes de composición constante.

Elución en gradiente: cuando se emplea una mezcla de disolventes cuya concentración se hace variar a largo del proceso, con el fin de modificar la polaridad de la fase móvil y disminuir el tiempo de separación (es un efecto semejante al que se produce cuando modificamos la temperatura en cromatografía de gases).

Los instrumentos modernos están equipados con válvulas de alimentación que permiten controlar de manera programada la velocidad de flujo de cada disolvente en cada instante.

## **2.2. SISTEMA DE BOMBEO**

Los requisitos de bombeo en HPLC son rigurosos e incluyen:

- la generación de presiones por encima de 6000 psi,
- un flujo libre de pulsaciones,
- un intervalo de caudales de 0.1 a 10 ml/min constantes y reproducibles,
- permitir cambios de disolvente de modo simple y rápido,
- ser químicamente inertes y resistentes a la corrosión.

Las más empleadas son las bombas recíprocas, que consisten en una pequeña cámara en la que el disolvente es impulsado por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor. La entrada y salida del disolvente se regula mediante dos válvulas antiretorno que se abren y cierran alternativamente, permitiendo el paso de fluido en un solo sentido.

Entre las ventajas que presentan se encuentran: pequeño volumen interno, altas presiones de salida, caudales constantes y compatibilidad con la elución en gradiente. Sin embargo, generan un flujo pulsado, que se ha de amortiguar para evitar la generación de ruido.

## **2.3. SISTEMA DE INYECCIÓN**

Un sistema de inyección para HPLC debe satisfacer los siguientes requisitos:

- introducir volúmenes muy pequeños ( $\mu\text{l}$ ) y de forma reproducible.
- originar la menor dispersión de la muestra.
- no alterar el flujo de la fase móvil.

En la actualidad, se han desarrollado los inyectores de volumen variable que, por medio de un sistema de jeringa controlado por un microprocesador, permite inyectar décimas de microlitro de manera muy reproducible. El sistema de inyección cuenta con un loop de volumen variable,

el cual permite la inyección de su totalidad, de forma parcial o la inyección de la muestra embebida en la propia fase móvil (modo sándwich).

#### **2.4. COLUMNA**

Es la parte fundamental del sistema cromatográfico ya que en ella tiene lugar la separación de componentes de acuerdo con los diferentes mecanismos (adsorción, reparto, iónico, exclusión, etc.).

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen con tubo de acero inoxidable, son generalmente de 10 a 30 cm de longitud y de 2 a 5 mm de diámetro interno y los tamaños de partícula de los rellenos de 1,8 a 8  $\mu\text{m}$ . Las fases estacionarias están constituidas generalmente por partículas de materiales rígidos o semirígidos, y en la gran mayoría de los rellenos se suele utilizar sílice con este fin, aunque también es posible encontrar rellenos basados en polímeros sintéticos. La sílice puede actuar como superficie adsorbente, como soporte de la fase móvil o como sustrato microporoso.

En el relleno de la columna reside la eficacia de la separación para cada tipo de analito. Existe una gran variedad de rellenos, desde lo más simple, columnas de C18, hasta rellenos modificados para conseguir separaciones más complejas, estando en muchos casos patentados.

En muchas ocasiones para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina no sólo la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes sino también componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria. La composición del relleno de la precolumna es semejante al de la columna analítica. Cuando la precolumna se contamina se sustituye por una nueva. Así se sacrifica la precolumna para proteger a la columna analítica que es más cara.

#### **2.5. HORNO**

En muchas aplicaciones no se necesita un control estricto de la temperatura, y las columnas trabajan a  $t^{\circ}$  ambiente. Sin embargo, muchas veces si se controla la  $t^{\circ}$  de la columna en unas pocas décimas de grado centígrado, se obtienen mejores cromatogramas. Ésta influye en la solubilidad, en la capacidad de difusión de los mismos, y en la viscosidad del eluyente. El tiempo de retención es el más afectado por un cambio de temperatura, disminuyendo notablemente al aumentarla. Por ello, es conveniente un control preciso de la temperatura en la columna cromatográfica.

#### **2.6. SISTEMA DE DETECCIÓN**

Es el módulo que, situado a la salida de la columna, proporciona de forma continua información relativa a la composición de la fase móvil que la atraviesa.

Las características esenciales que debe cumplir un detector ideal para HPLC son:

- Alta sensibilidad, y, en consecuencia, un bajo nivel de ruido de fondo.

- Respuesta universal.
- Amplio intervalo lineal.
- Pequeño volumen de célula de medida para evitar la dispersión de los solutos.
- Insensibilidad a cambios de temperatura, presión y caudal.
- Insensibilidad a cambios de composición de la fase móvil.
- Volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de banda.

## **2.7. SISTEMA DE REGISTRO Y TRATAMIENTO DE DATOS**

Hoy día todos los equipos vienen provistos de una estación de datos con un software de manejo del equipo

## **3. ACOPLAMIENTOS**

Existen diferentes tipos de detector que serán empleados dependiendo de nuestros propósitos. Dentro de ellos podemos hacer una división primera entre detectores destructivos y no destructivos. Dentro de los primeros englobamos aquellos que alteran la composición de la muestra para detectarla. Por supuesto, éstos no serán nunca utilizados para propósitos preparativos o semipreparativos. Estos detectores son los electroquímicos, los detectores de luz difusa o light-scattering y los espectrógrafos de masas. El segundo grupo, que es el más utilizado es el formado por los detectores ultravioleta-visible, de índice de refracción, de fluorescencia y de conductividad.

### **3.1. DETECTOR UV-VIS**

De todos los detectores el más utilizado es el ultravioleta-visible. Esto se debe a que casi todos los compuestos susceptibles de analizarse por HPLC pueden presentar absorción de luz en cualquiera de las bandas del espectro. Dentro de estos detectores podemos diferenciar dos grandes categorías: los detectores de longitud de onda variable y los detectores de diodo-array. La estructura de los primeros es simplemente un rayo de luz monocromática que incide en una célula de flujo y es detectado por un fotodiodo. En el segundo grupo tenemos aquellos que hacen incidir sobre la célula de flujo un rayo de luz policromática detectado por una que es separado por un monocromador detrás de la célula de flujo y es serie de fotodiodos. Con este tipo de detector obtenemos, a parte de un cromatograma, un espectro de cada uno de los picos, lo que supone una ventaja a la hora de su identificación.

Los detectores fotométricos son los más frecuentes y se basan en la absorción molecular de la radiación ultravioleta-visible de ahí su denominación detectores ultravioleta. Se les puede considerar detectores universales si consideramos el intervalo de trabajo de 190-800 nm. El mayor problema que plantean es que muchos disolventes absorben en la región donde absorben la mayor parte de los solutos (190-220 nm).

Los detectores espectrofotométricos de ultravioleta más potentes son los instrumentos de diodos en serie, conocidos como detectores DAD (detectores diodo Array), que han supuesto un avance importante en la detección.

Entre sus ventajas hay que destacar:

- Obtención del espectro UV del analito.
- Creación de librerías de espectros.
- Posibilidad de realizar identificaciones negativas con fines cualitativos, a base de comparación del espectro de un componente desconocido con el de un patrón.
- Detección simultánea de dos compuestos que absorben a distintas longitudes de onda sin necesidad de realizar varias inyecciones
- Desarrollo de métodos cuantitativos (dilución o concentración de muestras) tomando lecturas de absorbancia de patrones a distintas longitudes de onda.
- Comprobación de la pureza espectral de un pico comparando los espectros de absorción en distintos puntos del mismo.

### **3.2. DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN**

El detector de índice de refracción, es el detector de uso corriente de respuesta más universal. El índice de refracción es una característica física definida de todos los compuestos. La detección se basa en equilibrar el detector, a caudal constante, con fase móvil pura y medir el cambio de índice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil.

El detector de índice de refracción compara la diferencia del mismo entre una célula llena de fase móvil y otra célula de flujo por donde pasan los diferentes analitos.

Resulta obvio que cuanto mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y de la fase móvil, mayor será el desequilibrio, por tanto, la máxima sensibilidad se obtendrá cuando exista una diferencia máxima entre los respectivos índices de refracción.

### **3.3. DETECTOR DE FLUORESCENCIA**

El fenómeno de fluorescencia tiene lugar cuando compuestos que poseen determinados grupos funcionales específicos, se excitan con la energía de ciertas longitudes de onda y emiten radiación de mayor longitud de onda que la absorbida. En fluorescencia, la radiación emitida se mide normalmente, con objeto de evitar interferencias, en dirección perpendicular a la de incidencia del haz de excitación.

Los detectores de fluorescencia representan el tercer tipo de detectores más comúnmente utilizados en la moderna CL. Para los compuestos que presentan fluorescencia natural, así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por medio de una derivatización simple, es el tipo de detección más sensible que se puede aplicar de rutina a la CL.

El detector de fluorescencia mide la emisión de los componentes de la muestra. Para evitar la contaminación con la luz de excitación el diodo detector se coloca en ángulo recto con el ángulo de incidencia. Este detector, por su característica de detectar una emisión, es mucho más sensible y más específico que el ultravioleta-visible.

### **3.4. DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD**

En los detectores de conductividad electrolítica se mide de manera continua la conductividad de la fase móvil que eluye de la columna, indicándose la presencia de un analito por medio de un cambio en la conductividad.

El detector de conductividad basa su actuación conductividad en la fase móvil mediante unos electrodos en medir diferencias de conductividad en la fase móvil mediante unos electrodos.

### **3.5. DETECTOR ELECTROQUÍMICO**

Este tipo de detectores, están basados en la oxidación del analito eluido mediante un electrodo adecuado, registrándose la intensidad de la corriente, mantenida mediante la electrolisis de los analitos, a lo largo del cromatograma. La detección en este caso está basada en el conocido polarógrafo de gota de mercurio; este instrumento consta de un par de electrodos a los que se aplica un potencial de oxidación (potencial de semionda) suficiente para crear una corriente de difusión. Puesto que la cantidad de corriente es una medida directa de la concentración de analito en un momento dado, el proceso es cuantitativo.

Dentro de los detectores destructivos, en el detector electroquímico se aplica una diferencia de potencial entre dos placas. Si el compuesto es susceptible de oxidarse o reducirse producirá un cambio en la diferencia de potencial de las placas, dependiendo del potencial redox, que será detectado por el mismo.

### **3.6. DETECTORES DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc. Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Cuantitativa: permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt.
- Universal y específica.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.

- Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente en cromatografía de líquidos es el ELECTROSPRAY. La muestra en solución se hace pasar a través de un capilar al que se aplica un alto potencial eléctrico; y a la salida del capilar, la solución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas, las cuales se evaporan rápidamente bien por un proceso de desorción del campo eléctrico ó de evaporación del solvente, liberando moléculas protonadas a la fase gaseosa.

Todos los avances en mejoras de sistemas de detección para HPLC van encaminados al tándem HPLC/MS.

El problema fundamental del acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas es el enorme contraste que existe entre los volúmenes relativamente grandes de disolvente de la primera y los requerimientos de vacío de la última. Para resolver este problema se han desarrollado diversas interfases. Como se ha comentado, destaca la fuente de ionización de Electrospray, en la que la nebulización térmica y la desolvatación ocurren simultáneamente y producen una mezcla de partículas del soluto en suspensión y moléculas gaseosas de la fase móvil.

Con los detectores de espectrometría de masas se emplea el control y el almacenamiento de datos por ordenador. Se pueden obtener tanto los cromatogramas en tiempo real como los reconstruidos por ordenador, y también los espectros de los picos eluidos.

#### **4. APLICACIONES**

Existen multitud de aplicaciones de la cromatografía de líquidos en el campo de la alimentación y alimentación animal.

En la siguiente tabla se pueden ver la multitud de aplicaciones existentes para la cromatografía de líquidos:

Mediante la técnica de HPLC-UV/VIS se puede llevar a cabo la determinación de cafeína, conservadores (sorbico o benzoico) o colorantes en bebidas mediante cromatografía en fase inversa.

En bebidas, también destaca la determinación de azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) mediante la detección por índice de refracción; la determinación de edulcorantes (aspartamo, acesulfamo K, ciclamato, sacarina, sacarosa, etc) ya sea mediante UV/VIS o espectrometría de masas.

La determinación de Vitamina C en zumos o vinos también se puede llevar a cabo mediante HPLC-UV/VIS, o la determinación en conjunto de vitaminas hidrosolubles mediante la misma técnica.

En aceites, destacar la determina de ECN-42 mediante HPLC acoplado con el índice de refracción, o la determinación de tocoferoles mediante cromatografía en fase normal con detector ultravioleta (de los pocos métodos que realizan este tipo de cromatografía).

Por cromatografía iónica, destacan la determinación de nitratos y nitritos en productos cárnicos o piensos, o la determinación de ácidos orgánicos (succínico, málico, tartárico, láctico,...).

La determinación de histamina y otras aminos biógenas también puede llevarse a cabo mediante HPLC-Fluorescencia en productos de la pesca o vinos.

La determinación de Aflatoxina B1 y la suma de aflatoxinas, Ocratoxina A y otras toxinas del Fusarium, se puede llevar a cabo por diferentes técnicas. Destaca la técnica de la Fluorescencia para la determinación de las Aflas y la OTA, alcanzando límites muy bajos debido a la sensibilidad de la técnica, y la determinación multianalito por espectrometría de masas de toxinas de Fusarium.

Destacar también por la técnica de HPLC-MS/MS la determinación de Patulina (toxina que se presenta en productos derivados de la manzana), la natamicina (antibiótico añadido de manera ilegal a vinos), la melanina (producto orgánico que se presenta en alimentos como resultado de su uso en materiales en contacto con los alimentos o que se haya añadido ilegalmente para adulterar el valor proteico), plaguicidas (extracción con QuEChERS y determinación multirresiduo) o la determinación de acrilamida (compuesto tóxico que aparece en los alimentos ricos en almidón debido a un tueste excesivo), entre otros.

## **BIBLIOGRAFÍA**

-Fundamentos de Química Analítica. Skoog.

-Tema 6. Técnicas Cromatográficas. Universidad de Jaén.

-Cromatografía de líquidos de alta resolución. <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>

[https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_liquida\\_de\\_alta\\_eficacia.pdf](https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf)

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 20**

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.  
INSTRUMENTACIÓN. APLICACIONES TÉCNICAS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

#### 1.2 INSTRUMENTACIÓN

#### 1.3 APLICACIONES TÉCNICAS

1.3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS O GC-MS/MS)

1.3.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS O LC-MS/MS)

1.3.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP-MS)

1.3.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS (IRMS)

### **2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

#### 2.2 INSTRUMENTACIÓN

#### 2.3 APLICACIONES TÉCNICAS

2.3.1 <sup>1</sup>H-RMN

2.3.2 RMN DE DEUTERIO: SITE-SPECIFIC NUCLEAR ISOTOPIC FRACTIONATION-NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (SNIF-NMR)

## 1. ESPECTROMETRÍA DE MASA

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica comúnmente utilizada para el análisis químico cualitativo y cuantitativo. De todas las herramientas analíticas, la espectrometría de masas es, posiblemente, una de las de mayor aplicación al ser una técnica que proporciona información sobre:

- la composición elemental de las muestras de materia
- la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas
- la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas
- la estructura y composición de superficies sólidas
- las relaciones isotópicas de átomos en las muestras

La espectrometría de masas ofrece numerosas ventajas frente a otras técnicas de análisis como las técnicas espectroscópicas. Entre dichas ventajas están: los menores límites de detección (para muchos elementos, son tres órdenes de magnitud mejores que en los métodos ópticos), los espectros notablemente sencillos (casi siempre son únicos y a menudo se interpretan con facilidad) y la capacidad para medir relaciones isotópicas atómicas. Entre las desventajas se encuentran el coste de la instrumentación, la deriva del instrumento y las interferencias.

Esta técnica está basada en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa, su separación de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ), y finalmente su detección por medio de un dispositivo adecuado.

Un análisis por espectrometría de masas consta, por tanto, de las siguientes etapas:

- atomización
- conversión de una fracción significativa de los átomos formados en la atomización en un flujo de iones (casi siempre positivos de una sola carga)
- separación de los iones formados en función de su relación  $m/z$
- conteo del número de iones de cada tipo o medición de la corriente iónica producida cuando los iones formados a partir de la muestra inciden en el transductor adecuado, obteniéndose un espectro de masas, en el que se representa la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación  $m/z$

### 1.2. INSTRUMENTACIÓN

Los elementos básicos de un espectrómetro de masas son: sistema de introducción de muestra, fuente de ionización, analizador y detector.

## **SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA**

El objetivo del sistema de entrada es introducir una cantidad muy pequeña de muestra en la fuente de iones. Los espectrómetros de masas más modernos están equipados con diversos tipos de entradas capaces de adaptarse a las distintas muestras, entre los que destacan: los sistemas indirectos de entrada, entradas por sonda directa, entradas cromatográficas y entrada de electroforesis capilar.

## **FUENTE DE IONIZACIÓN**

La fuente de ionización transforma los componentes de la muestra en iones gaseosos gracias al bombardeo con electrones, fotones, iones o moléculas. Otra manera de lograr la ionización es aplicar energía térmica o eléctrica. De esta forma, se genera un flujo de iones positivos, que es lo más común, o iones negativos gaseosos, que son acelerados en el analizador de masas. En muchos casos la fuente de ionización y el sistema de entrada están combinados en un único componente.

Las fuentes de iones se clasifican en fuentes duras y fuentes blandas. Las primeras confieren energía suficiente a las moléculas del analito para situarlas en un estado energético altamente excitado. La relajación posterior involucra la rotura de enlaces, lo que genera iones fragmentados con una relación  $m/z$  menor que la del ion molecular (radical con la misma masa molecular que la molécula). La fuente dura más importante es la fuente de impacto de electrones o ionización electrónica (IE). Sin embargo, las fuentes blandas, tales como las fuentes de ionización química (IQ), electrospray (ESI) y la de desorción, producen relativamente poca excitación de los iones, de modo que, tiene lugar poca fragmentación, y los espectros son sencillos (pico del ion molecular y sólo alguno/ningún otro pico). Por todo ello, ambos tipos de espectros son útiles en química analítica. Por un lado, los picos de un espectro procedente de una fuente dura proporcionan información útil acerca de la naturaleza de los grupos funcionales, y, por tanto, de la estructura de los analitos. Por otro, los espectros de una fuente blanda son útiles porque suministran información exacta relacionada con la masa molecular de la molécula o moléculas del analito.

La apariencia de los espectros de masas para distintas especies moleculares depende en gran medida del método que se utilice para formar los iones. Estos métodos pueden clasificarse en tres categorías principales: fuentes de fase gaseosa (IE, IQ e ionización de campo (FI)), fuentes de desorción (desorción de campo (FD), ionización por electrospray (ESI), desorción/ionización láser asistida por una matriz (MALDI), desorción por plasma (PD), bombardeo con átomos rápidos (FAB), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) e ionización por termonebulización (TS)) y fuentes de desorción ambiental (ionización por electronebulización por desorción (DESI) y análisis directo en tiempo real (DART)).

Con una fuente de fase gaseosa, primero se vaporiza la muestra y luego es ionizada. En el caso de las fuentes de desorción, la muestra, en estado sólido o líquido, se transforma directamente en iones gaseosos. Una ventaja de las fuentes de desorción es que son aplicables a muestras no volátiles y térmicamente inestables. Por otro lado, las fuentes ambientales

permiten la ionización por desorción con un pretratamiento mínimo de la muestra y sin los requisitos de las fuentes típicas de ionización. En la actualidad, los espectrómetros de masas comerciales están equipados con accesorios que permiten usar varias de estas fuentes de manera intercambiable.

A continuación se describen brevemente las más ampliamente utilizadas:

- **IONIZACIÓN POR IMPACTO DE ELECTRONES**

Es un proceso en el que la muestra, previamente vaporizada, se somete a un bombardeo mediante electrones acelerados que chocan con las moléculas provocando su ionización. Al entrar en colisión, se origina la pérdida de un electrón del analito y la formación del ion molecular. En general, el choque entre los electrones energéticos y las moléculas de analito proporcionan a éstas suficiente energía para que las moléculas adquieran estados vibracionales y rotacionales altamente excitados. A menudo se produce la relajación por la fragmentación de parte de los iones moleculares para dar lugar a iones de masas más bajas (en ocasiones pueden ser mayores a causa de los choques). Estos iones de masas más bajas se llaman productos o iones fragmentados.

- **IONIZACIÓN QUÍMICA**

En la ionización química, los átomos gaseosos de la muestra se ionizan al chocar con los iones producidos al bombardear con electrones un exceso de gas reactivo. Por lo general, se utilizan iones positivos, aunque la ionización química de iones negativos se utiliza a veces en aquellos analitos que contienen átomos muy electronegativos. Es clave el gas elegido para provocar la ionización del analito y hay que considerar la diferente afinidad hacia los protones, tanto del gas elegido como del analito.

La ionización química permite obtener información sobre la masa molecular de compuestos con un límite de masas de 1.000 Dalton pero, como sucede con la ionización por impacto de electrones, los compuestos no volátiles no se pueden analizar con este método, ni tampoco muchos compuestos con grupos funcionales polares. Otra limitación, es la falta de información estructural de los espectros de masas obtenidos por ionización química.

- **ELECTROSPRAY**

En este caso, la muestra en solución se hace pasar a través de un capilar al que se aplica un alto potencial eléctrico. A la salida del capilar la solución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas, las cuales se evaporan rápidamente bien por un proceso de desorción del campo eléctrico o de evaporación del solvente, liberando moléculas protonadas a la fase gaseosa.

## **ANALIZADOR**

El analizador separa los fragmentos iónicos generados en función de su relación  $m/z$ . Solo analiza iones gaseosos (no moléculas neutras) y requiere alto vacío.

Los distintos equipos de masas se clasifican según el analizador que dispongan. Para la separación de iones con diferente relación  $m/z$  se dispone de varios dispositivos, entre los que destacan:

- ANALIZADOR DE SECTOR MAGNÉTICO

Los analizadores de sector magnético se basan en la dispersión provocada por campos magnéticos sobre los flujos de iones. El campo magnético desvía la trayectoria de los iones en función de su masa y velocidad. Variando la intensidad del campo magnético es posible enfocar sucesivamente iones con diferente relación  $m/z$  hacia una rendija de salida tras la cual se coloca el detector.

Este tipo de analizadores presenta un gran inconveniente cuando se precisa realizar barridos muy rápidos o frecuentes, por ejemplo cuando se combina con un cromatógrafo, puesto que la variación del campo magnético no sigue exactamente las variaciones de corriente del electroimán, debido a la histéresis magnética del núcleo de este.

- ANALIZADOR CUADRUPOLO

Está formado por cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par está unido al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par se une al terminal negativo. Además, se aplican a cada par de barras, potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia. Para obtener un espectro de masas con este dispositivo, los iones se aceleran en el espacio entre las barras mediante un potencial. Entre tanto, las tensiones de corriente continua y alterna se incrementan simultáneamente, mientras se mantiene constante su relación. En cualquier momento, todos los iones, excepto aquellos que tengan un determinado valor de  $m/z$ , inciden en las barras y se convierten en moléculas neutras. Por tanto, sólo los iones cuyo valor de  $m/z$  esté dentro de un determinado intervalo alcanzan al detector.

- ANALIZADOR DE TRAMPAS DE IONES

Este analizador está basado en la utilización de una zona de confinamiento electromagnética generada por medio de dos señales de radiofrecuencia. La trampa de iones consta de un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Al electrodo anular se le aplica un potencial de radiofrecuencia variable, mientras que los dos electrodos colectores están conectados a tierra. Los iones con un valor de  $m/z$  adecuado circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. Cuando se incrementa el potencial de radiofrecuencia, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabilizan, produciéndose su colisión con la pared del electrodo anular.

Los analizadores anteriores tienen una limitación funcional, puesto que permiten la búsqueda de compuestos conocidos a priori. Sin embargo, en los últimos años han empezado a incorporarse a los laboratorios de rutina equipos de alta resolución (o masa exacta). Estos sistemas, a diferencia de los anteriores, capturan información de todas las moléculas que aparecen en una muestra, permitiendo la realización de ensayos no dirigidos (non-target analysis).

- ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO (TOF)

Estos equipos se basan en el mantenimiento de la energía. Es decir, a un grupo de iones que se les comunica una determinada energía cinética a un tiempo 0, se les mide el tiempo que tardan en recorrer una determinada distancia. La velocidad adquirida por cada ion será inversamente proporcional a su relación  $m/z$ , es decir, a mayor masa, más tiempo tardará la molécula en llegar al detector.

Como ventajas destaca su tiempo de análisis extraordinariamente corto y lo que es más importante, es que no existen limitaciones en la masa de los iones que pueden ser separados. Son ampliamente utilizados en análisis de sustancias de muy elevado peso molecular).

- ORBITRAP

El último desarrollo en analizadores de trampa de iones es el analizador Orbitrap. Consiste en un electrodo interno que es ancho en el medio y cónico en ambos extremos (en forma de huso) y un electrodo dividido coaxial externo. Se aplica un potencial constante entre estos dos electrodos. Como las superficies opuestas del electrodo externo no son paralelas entre sí, el campo eléctrico varía con la posición y alcanza un mínimo en el centro de la trampa. Los iones van a oscilar a diferentes frecuencias, lo que permite separarlos. Por último se mide la frecuencia de oscilación inducida por estos iones en los electrodos exteriores, permitiendo la adquisición del espectro de masas.

## DETECTOR

Es el encargado de recoger y caracterizar los fragmentos iónicos procedentes del analizador. El detector es el elemento final del espectrómetro y registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie.

El número total de iones que dejan el analizador en un instante determinado es realmente pequeño y por ello se requiere una amplificación significativa para conseguir una señal mínimamente procesable. Destacan los fotomultiplicadores o la copa de Faraday.

## ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

La espectrometría de masas en tándem, a veces llamada espectrometría de masas-espectrometría de masas (MS/MS, por sus siglas en inglés), es otra técnica que facilita la obtención de un espectro de masas de iones preseleccionados y fragmentados. En un sentido general, la espectrometría de masas en tándem se refiere a aquellos métodos híbridos que involucran más de un tipo de espectrómetro de masas para aumentar la especificidad y/o la capacidad de resolución de masas. Estos sistemas a menudo incluyen una tecnología cromatográfica de separación adicional. En estos casos, una fuente de ionización, que a menudo es una fuente de ionización blanda, produce iones y algunos fragmentos. Éstos entran luego al primer analizador de masas, el cual selecciona un ion en particular, denominado ion precursor, y lo envía a la celda de interacción donde se descompone de manera espontánea,

reacciona con un gas de choque o puede interactuar con un rayo láser intenso para generar los fragmentos, que se llaman iones producto. Posteriormente, se analiza la masa de estos iones en el segundo analizador de masas y se les detecta mediante el detector de iones.

El empleo de analizadores como: triplecuadrupolo (QqQ), cuadrupolo-TOF (Q-TOF), trampa de iones-TOF (IT-TOF), cuadrupolo de trampa lineal (LTQ)-Orbitrap o Q-Orbitrap, proporcionan tándem (MS/MS) o espectros MS de alta resolución, además de mediciones precisas de masas monoisotópicas, de gran aplicabilidad tanto para la confirmación de compuestos objetivo como para la identificación de compuestos desconocidos.

### **1.3. APLICACIONES TÉCNICAS**

#### **1.3.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS O GC-MS/MS)**

La cromatografía de gases (GC) es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. Ambas técnicas trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son compatibles. El único obstáculo físico a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual.

Para el análisis de compuestos de baja-media polaridad, esta, o el tándem GC-MS/MS son las técnicas más apropiadas. De hecho, en la última década, han sido las técnicas más ampliamente usadas para la detección de la mayoría de los contaminantes orgánicos.

A continuación se indican algunos ejemplos de aplicaciones de esta técnica en el campo agroalimentario: ftalatos en vinos y bebidas espirituosas (dibutil ftalato, becilburil ftalato, di(2etilhexil)ftalato, diisononil ftalato y diisododecil ftalato), divinilbenceno, estireno y glicerina en vinos, etil carbamato en vinos y destilados espirituosos, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), residuos de plaguicidas en: alimentos de origen vegetal (vino, zumos, productos vegetales transformados, frutas, hortalizas..), grasas animales y vegetales, miel, abejas y panales, fertilizantes, harinas de pescado, etc.

#### **1.3.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS O LC-MS/MS)**

Sin embargo para la determinación de compuestos más polares o termosensibles, la cromatografía de gases no es una técnica adecuada, a no ser que se recurra a un proceso de derivatización lo que incrementa el tiempo total de análisis, así como su complejidad. En estos

casos, la cromatografía de líquidos (LC) acoplada también a un detector de masas (LC-MS) o a un sistema tándem (LC-MS/MS) ofrece un amplio espectro de posibilidades analíticas. Además, la mayoría de los nuevos plaguicidas desarrollados así como los antibióticos son cada vez más polares, por lo que poco a poco, la LC-MS está reemplazando en algunos casos a la GC-MS.

Así, a modo de ejemplo se indican a continuación una serie de compuestos que pueden determinarse analíticamente mediante LC-MS o LC-MS/MS, alcanzando niveles de ppm/ppb en muestras complejas, lo que permite establecer si se cumplen los límites legales vigentes para este tipo de compuestos: melanina (piensos y otras materias primas), micotoxinas (deoxinivalenol, aflatoxina B1, fumonisina B1, B2, ocratoxina A, patulina,...en piensos y materias primas, zumo de manzana, sidras...), acrilamida (alimentos), edulcorantes (bebidas), natamicina (vinos), cloranfenicol (miel), plaguicidas polares (miel, abejas, panales, fertilizantes, harinas de pescado, frutas y hortalizas, productos vegetales transformados, vinos, zumos,..) y residuos veterinarios.

### **1.3.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP-MS)**

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo es una técnica de determinación multielemental en la que, mediante un plasma de alta intensidad, se produce la desolvatación, atomización e ionización de los elementos presentes en la muestra. Posteriormente, estos iones se separan en el espectrómetro de masas según su relación  $m/z$  y se cuantifican mediante un detector (multiplicador de electrones).

Se emplea en el análisis de metales, y se trata de una técnica multielemental con un amplio intervalo lineal. Los métodos basados en ICP-MS permiten la detección simultánea de diferentes compuestos metálicos en muestras de alimentos que en algunas ocasiones deben ser previamente digeridas, alcanzando niveles muy bajos que permiten cumplir con los límites legales establecidos. Además, el acoplamiento con técnicas cromatográficas permite a su vez poder llevar a cabo estudios de especiación.

### **1.3.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS (IRMS)**

Los espectrómetros de masas de relaciones isotópicas son en su mayoría, salvo excepciones, de sector magnético. Las principales peculiaridades de estos espectrómetros con respecto a otros espectrómetros de masas, consisten básicamente en que no se emplean para análisis cualitativo, no requieren prácticamente resolución de masas, requieren ultra-alto vacío, el electroimán no debe fluctuar durante los análisis y el sistema de detección es de tipo multicolector (una copa de Faraday para cada haz de iones). Los IRMS se caracterizan, en definitiva, por su gran estabilidad de medida, más que por su resolución de masas o rapidez.

Es fundamental que la muestra se procese antes de introducirse en el espectrómetro de masas para que sólo entre una única especie química en un momento dado. Generalmente, las muestras se queman o pirolizan y el gas deseado (generalmente hidrógeno ( $H_2$ ), nitrógeno

(N<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) o dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) se purifica mediante trampas, filtros, catalizadores y/o sistemas cromatográficos. Por ello, estos sistemas, en general, acoplan un sistema de preparación y separación de gases, como por ejemplo análisis elemental (EA), cromatografía de gases (GC-TC), análisis elemental termoquímico (TC/EA), etc., en flujo continuo a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas. En estos sistemas, el gas a analizar llega inmerso en un flujo de He que actúa como gas portador y que mantiene una presión constante en la fuente de ionización.

La espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS), permite determinar con precisión las relaciones de isótopos estables (<sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N, <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O y <sup>34</sup>S/<sup>32</sup>S) dentro de un producto, y se encuentra dentro del grupo de las herramientas favoritas para evaluar la autenticidad de los alimentos y bebidas. En este sentido, desde hace algunos años se han desarrollado métodos basados en la determinación de la composición natural en isótopos estables de diferentes productos, ya que se ha demostrado que existe una relación clara entre la distribución isotópica de una determinada molécula y su origen botánico y/o geográfico.

El espectrómetro de masas de relación de isótopos permite medir las variaciones isotópicas que surgen del fraccionamiento isotópico, dependiente de la masa, en los sistemas naturales. Los isótopos más analizados en el análisis de alimentos son el carbono-13 ( $\delta^{13}\text{C}$ ), el azufre-34 ( $\delta^{34}\text{S}$ ) y el nitrógeno-15 ( $\delta^{15}\text{N}$ ), así como el deuterio ( $\delta^2\text{H}$ ) y el oxígeno-18 ( $\delta^{18}\text{O}$ ), que son precisamente los mayoritarios en la naturaleza. Estos elementos se caracterizan por presentar las mayores variaciones naturales en sus relaciones isotópicas como consecuencia de ser los que sufren los mayores fraccionamientos isotópicos en una amplia gama de procesos físico-químicos. En muchas ocasiones el análisis de estas relaciones isotópicas abre la posibilidad de diferenciar materiales o compuestos que no son distinguibles desde el punto de vista químico, verificar las auténticas procedencias de algunos productos agrícolas y la adulteración con productos naturales o sintéticos de menor coste.

La huella isotópica de los alimentos y bebidas es específica de la región o del proceso (Tabla 1), lo que significa que los productos pueden diferenciarse en función de la región geográfica (vino, productos lácteos,...), procesos botánicos (aceite, azúcar,...), suelo y procesos de fertilización (frutas y verduras) y prácticas fraudulentas (adición de azúcar a la miel, zumos, vinos y licores,...). Estos procesos pueden rastrearse utilizando los isótopos mencionados con anterioridad, y sus variaciones indican el origen y la historia de productos alimenticios y bebidas.

El análisis isotópico es, por lo tanto, un método analítico utilizado para el control oficial y la lucha contra el fraude en diferentes sectores como: el sector vitivinícola, el sector de los zumos y el sector apícola, cuyo objetivo principal es la protección de los derechos del consumidor.

Tabla 1. Huellas dactilares de isótopos en alimentos y bebidas.

| Isótopo          | Interpretación bio/geoquímica   | Ejemplo de aplicación  | Productos que pueden verse afectados  |
|------------------|---|--|---|
| <b>Carbono</b>   | Origen botánico (fotosíntesis planta C3, C4 y CAM)                                      | Detección de adulteración (ej. adición de azúcar, glicerol, CO <sub>2</sub> , ácidos orgánicos, origen endógeno/exógeno/natural/sintético, etc...) | Miel, vino, licor, vinagre, zumo, aceite de oliva, productos lácteos, aromas, anhídrido carbónico, etc. |
| <b>Nitrógeno</b> | Procesos del suelo y procesos de fertilización de la planta                             | Etiquetado erróneo (ej. diferenciación entre orgánico y no orgánico)   | Frutas y vegetales, carne, etc.   |
| <b>Azufre</b>    | Condiciones del suelo y proximidad a la costa   | Origen del producto  | Frutas y vegetales, carne, miel, etc.   |
| <b>Oxígeno</b>   | Principalmente relacionado con la pluviosidad local, y por tanto con la zona geográfica | Detección de adulteración (ej. aguado de bebidas, origen endógeno/exógeno/natural/sintético, origen geográfico del producto)                       | Vino, zumo, leche y productos lácteos, vinagre, cafeína, licor, carne, aromas, etc.                     |
| <b>Hidrógeno</b> | Relacionado con la pluviosidad local, y por lo tanto con la zona geográfica             | Detección de adulteración (ej. aguado de bebidas, origen geográfico del producto)  | Café, vino, licor, agua, azúcar, carne, aromas, etc.  |

## 2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

### 2.1 INTRODUCCIÓN

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica analítica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. Dentro del campo de la Química, la RMN se ha utilizado sistemáticamente como una potente herramienta estructural para la caracterización de nuevos compuestos. La primera aplicación de la RMN en la ciencia de los alimentos se remonta a 1957, cuando se midió la humedad de los alimentos con un equipo de RMN de baja resolución. Sin embargo, no es hasta la década de 1980 cuando comienza la aplicación consistente y generalizada de la RMN en el campo alimentario, debido principalmente a las deficiencias en la instrumentación y a la complejidad de las matrices. Cabe mencionar que algunos métodos de RMN fueron aprobados como métodos oficiales por la Unión Europea (por ejemplo, la detección de fraudes en el vino) hace más de 20 años. Desde entonces, el número de artículos científicos sobre las aplicaciones de la RMN en la campo del análisis alimentario es cada vez mayor, y en los últimos años se está posicionando como una técnica analítica importante en el campo de la autenticación de alimentos.

Hay varias razones para esta evolución: la creciente sofisticación y la mejora experimentada en la instrumentación de RMN y en el tratamiento de los espectros, la creciente necesidad de la industria alimentaria de comprender e innovar sus productos y procesos, y la necesidad de desarrollar nuevas técnicas analíticas cada vez más eficaces para el control de la calidad y la autenticación de los alimentos de acorde a la legislación vigente.

Se fundamenta en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos, en base a la interacción del momento magnético nuclear con un campo magnético externo, que conduce a la generación de diferentes niveles energéticos. La respuesta a la transición entre estos niveles por la absorción de energía de radiofrecuencia por parte de los núcleos atómicos, puede ser detectada, amplificada y registrada en lo que sería una línea espectral o señal de

resonancia. De esta forma se generan los espectros de RMN para compuestos con núcleos de momento magnético distinto de cero, entre los que se encuentran el protón ( $^1\text{H}$ ), y otros como  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , etc. Para un mismo tipo de núcleo, las frecuencias de resonancia pueden ser distintas ya que los entornos químicos son diferentes, de aquí se define el desplazamiento químico ( $\delta$ ). La información molecular se obtiene de una variedad de espectros obtenidos de diferentes tipos de experimentos de RMN.

En la espectroscopía de RMN de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), el área de una señal de resonancia es proporcional al número de núcleos que producen esa señal, lo que permite su integración. Además, no todas las líneas espectrales son simples (singletes), sino que como resultado de acoplamientos entre espines nucleares de núcleos vecinos se producen desdoblamientos de señales, separados por una frecuencia característica o constante de acoplamiento ( $J$ ).

## 2.2 INSTRUMENTACIÓN

A continuación, se muestra de forma esquemática los principales componentes de un equipo para medidas de resonancia magnética nuclear.

Un espectrómetro de RMN consta de las siguientes partes fundamentales:

- Un imán que genera un campo magnético estable, el cual puede ser de una intensidad variable, definiendo la frecuencia de resonancia de cada núcleo. Generalmente se identifica cada espectrómetro por la frecuencia de resonancia del protón, así en un imán de 7.046 Tesla, los núcleos de  $^1\text{H}$  resuenan a 300 MHz, y por tanto sería un espectrómetro de 300 MHz.
- Una sonda, que se sitúa dentro del imán, en la que se introduce la muestra y que consta de las bobinas responsables de emitir y recibir las radiofrecuencias (RF). El número de bobinas y su disposición determinan el tipo y las aplicaciones de cada sonda.
- Una consola en la que se generan los pulsos de RF y se controla el resto de la parte electrónica del espectrómetro.
- Un ordenador que sirve de interfaz con el espectrómetro y con el que se analiza toda la información obtenida.

El campo magnético se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación excita a todos los núcleos simultáneamente. Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias, los protones absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín) individualmente. A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial, emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial.

Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN).

## **2.3 APLICACIONES TÉCNICAS**

### **2.3.1 1H-RMN**

En la actualidad existe un creciente interés en la trazabilidad de los alimentos y en este sentido la RMN de protón ha demostrado ser una potente técnica para el análisis cuantitativo de muestras de alimentos.

Además de la composición de los alimentos que es la fuente fundamental de información para resolver problemas relacionados con la calidad y autenticidad, la combinación de dicha técnica con la quimiometría, usando métodos de análisis multivariante, permite ampliar el campo de aplicación de esta técnica.

La aparición de nuevas señales y/o cambios observados en las intensidades de las señales en los espectros de RMN de ciertos componentes alimentarios son indicativos de la aparición de alteraciones fisicoquímicas en la composición de los alimentos inducidas por factores endógenos o exógenos, por ejemplo, las condiciones climáticas, las prácticas agronómicas, el proceso de maduración, las condiciones y tiempo de almacenamiento, y el origen botánico y geográfico. Debido a la complejidad de la composición de los alimentos, como indica la multitud de señales que se obtienen en los espectros de RMN, el análisis estadístico univariante, seleccionando una o dos señales correspondientes a ciertos componentes químicos que forman parte de los alimentos puede suponer una simplificación excesiva de la información disponible. Esto se debe a que se pierde una enorme información repartida por todo el espectro de RMN.

La selección de señales asociadas a variables cruciales requiere el conocimiento a priori de las propiedades de la muestra, que no siempre está disponible. Por último, las interferencias en el espectro debidas a la superposición de señales pueden impedir la integración precisa de la/s variables seleccionadas. El análisis estadístico multivariante, más conocido como análisis quimiométrico, se ocupa de estos casos, incluidos los patrones espectrales complejos en los que la señal de una sola variable no puede identificarse fácilmente en el espectro.

Existen dos enfoques diferentes a la hora de abordar el análisis por RMN: enfoque dirigido y enfoque no dirigido o de perfiles. En el primer enfoque, el objetivo es identificar y cuantificar los compuestos químicos en la medida de lo posible y, a continuación, pueden llevarse a cabo análisis estadísticos multivariante, ya sea con fines de clasificación o para identificar relevantes biomarcadores útiles para la caracterización del producto, y detectar así posibles adulteraciones. En el segundo enfoque, los metabolitos no se identifican ni se cuantifican, sino que los espectros de RMN de las muestras de alimentos se analizan estadísticamente para identificar características o patrones espectrales relevantes que puedan diferenciar las muestras. Este modo de quimiometría se aplica preferentemente a espectros muy complejos, en los que es imposible una integración precisa de la señal.

El objetivo de la quimiometría al analizar los espectros de RMN es triple: (a) clasificar y/o discriminar entre grupos de muestras de alimentos, por ejemplo como función del origen geográfico o botánico (por ejemplo, aceite de oliva, miel, vino) o en función del modo de elaboración; b) estudiar la relación entre la composición y las propiedades fisicoquímicas, y (c)

construir modelos de calibración-predicción para la identificación de muestras desconocidas y/o controlar los procesos alimentarios.

### **2.3.2 RMN DE DEUTERIO: SITE-SPECIFIC NUCLEAR ISOTOPIC FRACTIONATION-NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (SNIF-NMR)**

El contenido y la distribución isotópica en las moléculas de plantas y animales están influidos tanto por factores ambientales como por las rutas de síntesis, por lo que pueden utilizarse para diferenciar el origen de un determinado compuesto que contiene una molécula químicamente idéntica pero, procedente de otra fuente. Los métodos para detectar el origen "sintético" o "natural" de una especie química se basan en el análisis isotópico.

La espectrometría de masas de relaciones isotópicas proporciona el contenido isotópico molecular global, pero no puede medir directamente las relaciones isotópicas en posiciones específicas de una molécula determinada.

Una de las contribuciones más notables de la RMN a la autenticación de alimentos es su uso para poder medir el contenido isotópico, a nivel de la abundancia natural, en determinadas posiciones de una molécula. La técnica, conocida como Site-Specific Nuclear Isotopic Fractionation-NMR (SNIF-NMR) fue desarrollada a principios de los años 80 y supuso una mejora en el análisis isotópico, ayudando a proporcionar una prueba genuina del origen "natural" o "sintético" de una molécula.

La primera aplicación del SNIF-NMR fue la detección del enriquecimiento de los vinos con azúcar o también denominado "chaptalización". La práctica prohibida, o limitada y controlada (en función del país europeo origen de producción), de aumentar el grado alcohólico del vino de forma artificial, incrementando el contenido de azúcar antes o durante la fermentación del mosto y, por tanto, aumentado así su valor de mercado, puede ser detectada mediante esta técnica en combinación con otros métodos isotópicos. Por este motivo, el método SNIF-NMR fue adoptado oficialmente en 1987 por la Oficina Internacional del Vino y por la Comunidad Europea (Reglamento CE 2676/90, 1990).

En este caso, además de un equipo de RMN es necesario contar con un sistema especial de destilación (ADCS) que garantice la ausencia de fraccionamiento isotópico.

En la actualidad, el ámbito de aplicación es más amplio: autenticación, identificación y detección de adulteraciones entre otros en vinos, bebidas espirituosas, zumos de frutas, vinagres, miel, azúcares y compuestos aromáticos como vainillina, benzoaldehído o anetol.

El SNIF-NMR se ha convertido en una técnica analítica eficaz para la detección de adulteraciones en alimentos y bebidas, gracias a que el contenido y la distribución isotópica en las moléculas de plantas y animales están influenciados por el clima, la distribución isotópica en los nutrientes absorbidos y por vías metabólicas en las que intervienen las moléculas. Por ello, el análisis de una molécula por esta técnica puede proporcionar una visión del origen botánico y/o geográfico, lo que convierte a la técnica en una poderosa herramienta.

Es importante además destacar que además que la técnica SNIF-NMR no sólo se ha aplicado al núcleo de deuterio, sino que también se ha aplicado al  $^{13}\text{C}$ .

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Carter J. F y Chesson Lesley A. (2017) Food forensics. Stable Isotopes as a Guide to Authenticity and Origin. CRC Press.

Danezisa G.P. et al. (2016) Food authentication Techniques, trends & emerging approaches. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 85, 123–132.

Da-Wen Sun (2018) Modern Techniques for Food Authentication. Academic Press.

[https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria\\_de\\_masas.pdf](https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf)

<https://www.oiv.int>

Romero-González R., Garrido Frenich A. (2017) Applications in high resolution mass spectrometry. Food safety and pesticide residue analysis. Elsevier.

Sevastyanov V.S. (2015) Isotope Ratio Mass Spectrometry of Light Gas-Forming Elements. CRC Press.

Skoog D.A., Holler F.A., Crouch S.R. (2018) Principios de análisis instrumental. Séptima edición. CENGAGE

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 21**

**TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS. FUNDAMENTO. TIPOS.  
APLICACIONES.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### 1. TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS

#### 1.1. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

1.1.1. Antígenos y anticuerpos

1.1.2. Anticuerpos monoclonales y policlonales

1.1.3. Clasificación de los inmunoensayos con reactivos marcados

### 2. FUNDAMENTO.

### 3. TIPOS

3.1. *Dot blot* o *slot blot*

3.2. *Western blot* o *immunoblot*

3.2.1. Ensayo *Zestern*

3.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

3.3.1 Dispositivos

3.3.2 Fases de un ensayo ELISA

3.3.3 Ventajas y desventajas

3.3.4 Tipos de ensayo ELISA

3.4. Inmunohistoquímica

### 4. APLICACIONES

4.1. Autenticación de alimentos

4.1.1. Carnes y pescados

4.1.2. Leche y productos lácteos

4.2. Alérgenos

## 1. TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS

### 1.1. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

Los ensayos inmunológicos son análisis en los que se aplican técnicas que se basan en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. La propiedad que tienen las inmunoglobulinas de unirse a un antígeno, la especificidad de esta unión y el hecho de que pueda hacerse visible por fenómenos indirectos (marcaje con enzimas), hace que se utilicen ampliamente.

#### 1.1.1. Antígenos y anticuerpos

**Antígeno (Ag):** Molécula reconocida por cualquiera de los componentes del sistema inmunitario (SI). De manera más restrictiva, se entiende como Ag cualquier molécula capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos.

**Anticuerpo (Ac)**

**o inmunoglobulina:** Grupo de moléculas séricas que producen los linfocitos B.

- Todos los anticuerpos tienen una estructura básica en común, a excepción del sitio de unión con el Ag, el cual es específico de cada uno, denominada *región Fab (Fragment antigen binding)*.
- La región donde el Ac interactúa con otros elementos del SI se denomina *región Fc*. Algunas células del SI también presentan receptores de Fc en su superficie, por lo que si un Ac se une a un patógeno, esas células también pueden unirse a él.
- La zona de la molécula de Ag a la que se une el Ac se denomina *epítipo*, mientras que el del Ac se denomina *parátipo*. Una molécula Ag puede tener varios de ellos, por esta razón los Ac son sólo específicos de un epítipo y no de toda la molécula de Ag.
- Los linfocitos B están programados para codificar un receptor de superficie específico de un determinado Ag, tras lo cual se multiplican y se diferencian en células plasmáticas que producen los Ac.
- El proceso por el que los linfocitos son capaces de reconocer a un determinado antígeno se denomina *selección clonal*. Una de las características más importantes e indispensable en la lucha contra las infecciones por parte de los organismos superiores es que una vez producido el contacto inicial con un antígeno, en los sucesivos contactos con el mismo antígeno va a obtenerse una respuesta mucho más rápida y enérgica.

#### 1.1.2. Anticuerpos monoclonales y policlonales

Los ensayos pueden hacerse con dos tipos de anticuerpos: anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales.

❖ Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales son los anticuerpos que se derivan de muchas y diversas células, similares a la mezcla de anticuerpos encontrados en sueros. Podemos afirmar que los anticuerpos policlonales corresponden a múltiples epítomos y tienden a contener varias inmunoglobulinas.

❖ Anticuerpos monoclonales

Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocito B descendiente de una única célula madre y una célula plasmática tumoral; por tanto, todos los anticuerpos son idénticos. Es posible producir anticuerpos monoclonales que se unan específicamente con cualquier molécula con carácter antigénico.

**1.1.3. Clasificación de los inmunoensayos con reactivos marcados**

- Según el tipo de marcador
  - ✓ Radioinmunoensayos
  - ✓ Enzimoimmunoensayos
  - ✓ Fluoroimmunoensayos
- Según el formato de ensayo que implique
  - ✓ Inmunoensayos heterogéneos: en ellos, es preciso separar los inmunocomplejos formados de las moléculas que queden libres. Para ello, los reactivos van en fase sólida y la separación de las moléculas libres se consigue mediante lavados. Son técnicas adecuadas para determinar sustancias de alto peso molecular.
  - ✓ Inmunoensayos homogéneos: valoración directa del complejo formado. Son, en general, procedimientos más sencillos que suelen utilizarse en la determinación de sustancias de bajo peso molecular y de concentración considerable.

**2. FUNDAMENTO.**

El enzimoimmunoanálisis (EIA) es una metodología que permite detectar y también cuantificar anticuerpos o antígenos en muy baja concentración en la mayoría de los líquidos biológicos y sobrenadantes de cultivos celulares. Se utiliza ampliamente para analizar autoanticuerpos y diversas proteínas e inmunoglobulinas.

La técnica se basa en el uso de un anticuerpo marcado con un sistema enzimático. El anticuerpo se une a una enzima, con lo que es posible la cuantificación del complejo Ag-Ac a través de la acción que dicha enzima ejerce sobre un sustrato cuyos cambios son fácilmente medibles. Por lo tanto, se basa en dos fenómenos biológicos:

1. La alta especificidad del antígeno por su anticuerpo
  2. La amplificación de la unión antígeno-anticuerpo por reacciones químicas llevadas a cabo por determinadas enzimas.
- EIA en fase líquida sin etapas de separación se conoce como sistema homogéneo. Un ejemplo es el EMIT (*enzyme-multiplied immunoassay technique*).
  - EIA en fase sólida requiere etapas de separación y recibe el nombre de sistema heterogéneo. El EIA más representativo es el ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).
  - EIA que permiten la detección de proteínas en tejidos (inmunohistoquímica) o en células (inmunocitoquímica).

### 3. TIPOS DE TÉCNICAS INMUNOENZIMATICAS

#### 3.1. *Dot blot* o *slot blot*

El *dot blot* es una técnica molecular utilizada para la detección de ADN, ARN y proteínas. La mezcla que contiene las biomoléculas se aplica directamente sobre una membrana de transferencia (nylon o nitrocelulosa) para ser identificada por anticuerpos en forma de mancha, punto o línea.

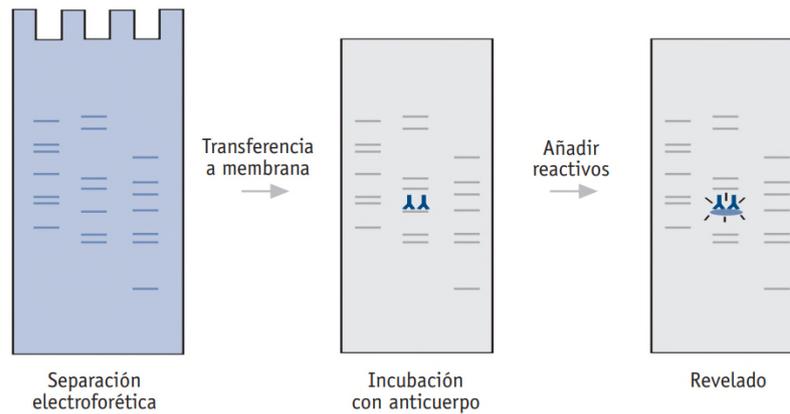
- ✓ Gracias a ello, no se precisa de una cromatografía o electroforesis en gel, por lo que se ahorra tiempo de manera significativa.
- ✗ No proporciona información acerca del tamaño de la biomolécula diana.
- ✗ Si dos moléculas de diferente tamaño son detectadas, aparecen como un único punto.
- ✗ Sólo puede confirmar la presencia o ausencia de la biomolécula.

#### 3.2. *Western blot* o *immunoblot*

El *Western blot* es un método utilizado para la detección de proteínas en una muestra de un tejido homogeneizado o extracto. En total se dan tres etapas:

- 1) Electroforesis. Se realiza la técnica SDS-PAGE para separar proteínas desnaturalizadas en función de su masa.
- 2) Transferencia (*blotting*). Para hacer accesibles las proteínas para su detección, son transferidas desde el gel hacia membranas sintéticas, originalmente de nitrocelulosa.
- 3) Inmunoensayo enzimático. Se examinan utilizando anticuerpos específicos con las proteínas, detectadas gracias a la enzima unida a ellos.

Con esta técnica, los investigadores pueden examinar la cantidad de proteínas en una muestra y comparar los niveles de presencia entre varios grupos.



### 1. Proceso del método *Western blot*

#### 3.2.1. Ensayo por *western blot*

Este ensayo proporciona un método para eliminar la electroforesis nativa en gel y los pasos de transferencia mediante la inclusión de una etapa de elución tras los procesos de fijado, incubación y lavado y antes de comenzar la detección. Este paso adicional permite que la membrana con los inmunocomplejos antígenos-anticuerpos unidos, al exponerse a una solución con una cantidad excesiva de antígenos, provoque la liberación del anticuerpo marcado, permitiendo así una determinación directa de la cantidad de proteína liberada.

Este análisis de inmunodetección se puede realizar en solución y en su formato de placa de pocillos múltiples, debido a lo cual se reducen esfuerzos y costes así como proporciona una buena base para la automatización del análisis de proteínas.

#### 3.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

ELISA se caracteriza por su elevada sensibilidad, especificidad, rapidez y economía. Presenta considerables posibilidades de aplicación, sobre todo en sanidad animal y vegetal, pudiendo estudiar grandes poblaciones en un corto plazo de tiempo y de manera sencilla, rutinaria y sin instalaciones costosas. Por estas razones, la técnica ELISA se aplica en la mayoría de los laboratorios, constituyendo uno de los métodos de diagnóstico utilizados más extensivamente.

La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida, mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción y cuyo producto, por ejemplo, un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

##### 3.3.1. Dispositivos

En la actualidad se utiliza con más frecuencias microplacas de 96 pocillos que son analizadas mediante lectores ELISA, espectrómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. Éstos disponen de sistemas de filtros que solo permiten la lectura de las longitudes de onda necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados.

### 3.3.2 Fases de un ensayo ELISA

- 1) **Conjugación del anticuerpo o del antígeno.** Con una enzima (ej. Peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.).
- 2) **Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos.** Se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.
- 3) **Saturación del resto de la superficie (con seroalbúmina bovina).** Se realiza después del lavado, pues se trabaja con antígenos y anticuerpos, y ambas son proteínas.
- 4) **Formación de una o más capas de inmunocomplejos.** Se realiza después del lavado. En caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (sería un ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario antiprimario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incuba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado.
- 5) **Revelado de la acción enzimática.** Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar, se para la reacción y se lee la densidad óptica (D.O) mediante espectrofotometría visible.

### 3.3.3 Ventajas y desventajas

#### a) Ventajas

- ✓ Utiliza muestras de fácil recolección (suero, sangre, leche)
- ✓ Rapidez
- ✓ Alta sensibilidad y especificidad
- ✓ Permite cuantificar
- ✓ Versatilidad en técnicas

#### b) Desventajas

- ✗ Espectrofotómetro especial
- ✗ Infraestructura necesaria
- ✗ Personal técnico preparado
- ✗ Tratamientos físico-químicos a los productos que pueden alterar los anticuerpos, inutilizando la reacción Ag-Ab.

### 3.3.4 Tipos de ensayo ELISA

Los más comunes son:

- **ELISA directo**

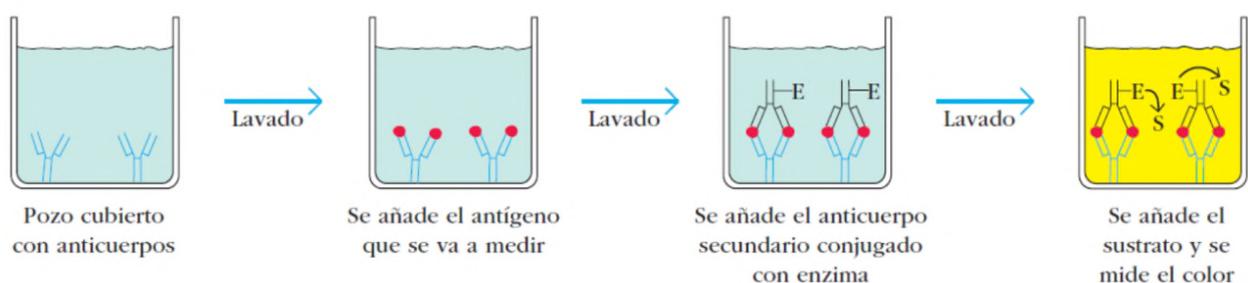
- Se recubren los pocillos de la placa ELISA con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno.
- Se incuban con anticuerpos marcados que indiquen la presencia del antígeno en la solución.
- Se incluyen controles negativos (muestras del mismo tipo de las analizadas que no presentan el antígeno buscado) así como controles positivos- (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado).

- **ELISA indirecto**

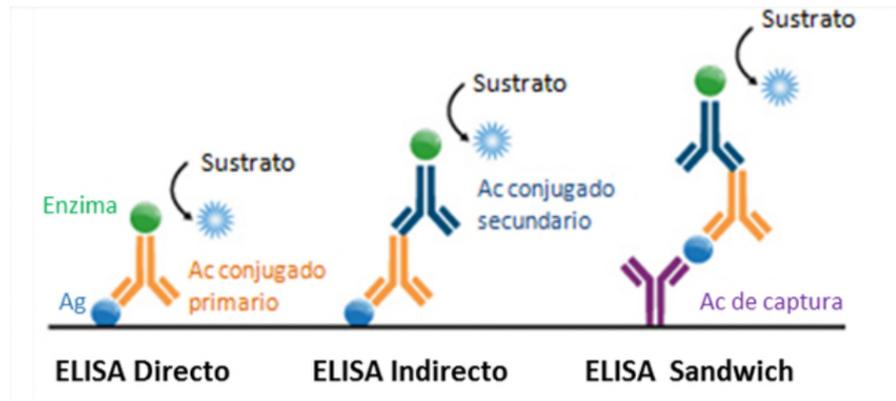
- La preparación del ELISA indirecto es idéntica al del ELISA directo.
- La diferencia es que el sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. Gracias a esto, la detección tiene mayor sensibilidad pues presenta una amplificación de señal al unirse dos o más anticuerpos secundarios por cada primario.
- Es el ensayo más popular.

- **ELISA sándwich**

- Ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos.
- El pocillo se recubre con un primer anticuerpo anti-antígeno.
- Tras lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema con el antígeno, que será reconocido por el primer anticuerpo.
- Tras un segundo lavado para eliminar el material no retenido, se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado.
- De esta manera, cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene, y un segundo anticuerpo que lo marca.
- Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad, debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.



## 2. Paso a paso de un ELISA tipo sándwich



### 3. Comparación entre un ELISA directo, ELISA indirecto y ELISA tipo sándwich

Existe otra manera de definir los ensayos ELISA:

- **ELISA directo.** Determinación de anticuerpos.

El anticuerpo específico comercial está generado contra algún epítipo localizado en el antígeno. Generalmente se usan anticuerpos de alta afinidad. Los anticuerpos reconocen la misma molécula (antígeno).

- **ELISA indirecto.** Determinación de anticuerpos.

El antígeno debe estar purificado. El primer anticuerpo reconoce un epítipo del antígeno. El anticuerpo secundario reconoce al anticuerpo primario (actuando como antígeno suyo).

- **ELISA de competición.** Determinación de antígenos.

Se necesitan tres anticuerpos específicos. Se produce la reacción antígeno-anticuerpo en fase líquida que luego se inmoviliza. El primer y segundo anticuerpo reconoce un epítipo del antígeno. El anticuerpo terciario marcado reconoce al anticuerpo secundario (actuando como antígeno suyo).

### 3.4. Inmunohistoquímica

Similar al ELISA, pero este método se aplica directamente en los tejidos mediante cortes histológicos.

#### a) Ventajas

- ✓ Poner en evidencia el Ag en el propio tejido
- ✓ La relación estructural entre las células es más sencilla de evaluar
- ✓ La visualización se hace en microscopía óptica

#### b) Desventajas

- ✗ No es fácil el procesado de la muestra
- ✗ Se precisa infraestructura adecuada
- ✗ Personal técnico capacitado

## 4. APLICACIONES

### 4.1. Autenticación de alimentos

En la actualidad, el ELISA se considera una de las técnicas de cribado (*screening*) para la determinación de la autenticidad de un gran número de muestras al ser fácil de usar, rápido, específico, sensible y barato. Para ello, se emplean tanto anticuerpos policlonales como monoclonales.

Los primeros ofrecen una mayor tolerancia a pequeños cambios sobre la naturaleza del antígeno como su polimerización o una desnaturalización parcial, por lo que son la opción más popular para detectar proteínas desnaturalizadas. Sin embargo, son de producción limitada y necesitan procesos de purificación extensos para eliminar la reactividad cruzada para identificar una especie concreta.

En cambio, los segundos son una población homogénea que tiene una actividad biológica definida, una especificidad consistente y su producción no está limitada.

Para la autenticación de alimentos, donde las proteínas son el compuesto diana en muchos casos, la técnica ELISA convencional, tanto en formato competitivo o indirecto para identificar moléculas pequeñas, como en formato sándwich para dianas macromoleculares, es la más empleada para un gran número de matrices. Esto se debe a que la obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales contra una proteína específica es hoy en día muy asequible.

Hasta la fecha, casi la totalidad de las aplicaciones de ELISA se han dirigido a la identificación y cuantificación de componentes que no deberían estar presentes en la muestra, es decir, la detección de adulteraciones, al ser factible detectar una sustancia determinada entre todos los componentes de una muestra muy compleja, como sucede en cualquier comida.

Como cualquier alimento o pienso tiene su origen en organismos vivos, la autenticación del mismo generalmente consiste en obtener resultados negativos al buscar componentes de procedencia no autorizada que serían la fuente de la adulteración, como es el análisis de carne de cerdo en embutidos de vacuno. En este caso se cometería fraude de valor económico y además engaño al consumidor. También es fraude cuando se altera la composición de alimentos con calidad diferenciada establecida o cuando se añaden compuestos que sólo sirven para potenciar artificialmente una propiedad del alimento.

En otros casos, el análisis de los alimentos busca certificar de que son seguros sanitariamente y tienen la calidad higiénica adecuada para ser consumidos por la ausencia de contaminantes (alérgenos, tóxicos, fármacos o microorganismos). Para estos análisis hay muchos anticuerpos disponibles comercialmente.

#### 4.1.1. Carnes y pescados

Para identificar con precisión las especies de carne o pescado en los alimentos mediante inmunoensayo, el objetivo debe ser una proteína específica, por lo que se utilizan

anticuerpos contra proteínas animales musculares y séricas de preferencia termoestables. En la última década, diversas compañías han desarrollado una gran variedad de kits ELISA comerciales para detectar e identificar especies en carnes cocinadas, crudas o térmicamente procesadas, en los productos cárnicos y en los piensos. Sin embargo, hay límites para la localización de especies en carnes procesadas, dependiendo de varios parámetros como el contenido en grasas, la gravedad del tratamiento térmico, el origen de los músculos y el estado de maduración de la carne.

De igual manera, se emplea el método ELISA en casos donde se sustituyen proteínas de animal caras por otras más baratas como por ejemplo sustituir músculo por restos o colágeno. Este último contiene un 8% más de hidroxiprolina que otras proteínas, un parámetro utilizado para detectar la baja calidad de la carne.

Con respecto al control de residuos farmacológicos en los productos cárnicos, mediante ELISA competitivo indirecto se han determinado antibióticos como clindamicina o lincomicina en músculo bovino, porcino de pollo y de pescado.

Por otro lado, los ELISA dirigidos a la identificación de microorganismos patógenos en carnes y productos relacionados, se suelen realizar en matrices alimentarias con un tratamiento mínimo. Con esta tecnología se pueden identificar patógenos como *Salmonella* sp., *Listeria* sp. o *Escherichia coli*. Asimismo, también es posible distinguir toxinas producidas por organismos como el caso de la *E.coli* productora de la toxina Shiga, cuyos subtipos son detectados por un ELISA universal sándwich. De igual manera, los organismos marinos también acumulan toxinas naturales que el ELISA puede determinar, como por ejemplo el ácido okadaico, que causa problemas intestinales en humanos, o la tetrodotoxina que se encuentra en los peces globos.

#### **4.1.2. Leche y productos lácteos**

Debido a su valor comercial, este tipo de productos es propenso a la adulteración. Además, su falsificación es muy sencilla porque la fuente primaria de todos los productos es la leche, un sustrato líquido susceptible de ser mezclado con soluciones acuosas, leche, suero o proteínas de otras especies animales o incluso sustancias extrañas.

Cuando se considera la adulteración de leche o queso utilizando leche de otras especies, la leche más barata se añade a la más cara, siendo habitual utilizar leche de vaca para ello. La detección de este fraude puede realizarse mediante el control de proteínas lácteas específicas, como la caseína o las lactoglobulinas. Para ello, deben emplearse ELISA altamente selectivos, pues la leche y el queso presentan perfiles proteicos y peptídicos muy complejos.

Otros compuestos no deseados presentes en la leche son los antibióticos, los cuales provienen de los tratamientos administrados a los animales en las granjas. Un ejemplo son las estreptomycinas, tetraciclina y la penicilina G, detectadas con ELISA indirectos. De igual manera, se pueden encontrar toxinas, contaminantes u hormonas, provenientes del mal manejo de la leche o sus productos. Un buen ejemplo de ello son las prácticas fraudulentas

con la familia de los esteroides, en su mayoría con el estradiol, para los que se han ido desarrollando diferentes ELISA. La determinación de toxinas potentes en la leche como la ricina, se realiza empleando tanto ELISA indirectos como de tipo sándwich.

| Matrix                          | Analyte                                      | Type of Immunoassay  | Highlights  |
|---------------------------------|--|--|---|
| Ewe milk and cheese             | Cow and goat milk                            | Two commercial direct ELISA kits   | LOD 0.2% in milk, inaccurate in cheese  |
| Bovine milk                     | Glycomacropeptide (present in cheese whey)   | Western Blot   | Can detect 0.5% v/v cheese whey in milk   |
| Water buffalo mozzarella cheese | Bovine milk ( $\beta$ -CN-(106–110) peptide) | Immunoblot analysis using specific antipeptide antibodies                        | Can detect bovine milk in mozzarella cheese at 0.25% (v/v)                        |
| 14 different foods              | $\beta$ -lactoglobulin                       | ELISA Kit using PABs   | LOD 0.07 mg/kg, LOQ 0.22 mg/kg  |
| Cheese                          | Three peptides from $\alpha_{s1}$ -casein    | Direct binding of scFvs to analyte, detected by fluorescence microscopy          | Direct monitoring proteolysis of casein   |
| River buffalo milk and curd     | Nonhydrolyzed $\beta$ -casein                | Indirect ELISA   | Monitoring of proteolysis to assess freshness                                     |
| Milk and dairy beverages        | Glycomacropeptide form whey                  | Commercial immunochromatographic strips  | The test can detect 15–30 $\mu$ g/mL of sweet whey added to milk (1%–2%) in 5 min |
| Sheep and goat cheeses          | Bovine IgG (cow milk adulteration)           | Immunochromatographic test kit and confirmation by noncompetitive ELISA test kit | Strip kit able to detect 1.0% cow's milk in cheese                                |

## 4.2. Alérgenos

La técnica de ELISA es la más extendida para la detección de alérgenos por parte de las industrias alimentarias y las agencias reguladoras. Mediante una curva estándar generada a partir de las muestras con los alérgenos de referencia de concentraciones conocidas, se consigue la semicuantificación de los mismos en los alimentos.

Generalmente, para ello se emplean dos tipos de sistemas ELISA: de tipo sándwich y el competitivo. El primero suele ser el más escogido mientras que el segundo es el formato preferido para detectar proteínas más pequeñas. La principal diferencia es que en este último se utilizan antígenos inmovilizados en contraste con el uso de anticuerpos inmovilizados en el ELISA tipo sándwich.

Las proteínas diana también pueden diferir entre los kits ELISA que presentan el mismo propósito. Un ejemplo sería los kit ELISA específicos para la leche, ya que pueden detectar caseínas,  $\beta$ -lactoglobulinas, etc. Por tanto, se precisa conocer la composición proteica de la fuente de alérgenos para garantizar la elección correcta del kit.

No obstante, se ha demostrado que ciertos componentes de la matriz pueden inhibir la extracción de las proteínas o interferir en la detección de los analitos. Para optimizar la extracción de los alérgenos es recomendable el uso de aditivos de extracción, tales como la gelatina de pescado, la leche desnatada en polvo o albúmina sérica bovina. Otra alternativa es la realización de la técnica ELISA seguida por *Western blot* como método de confirmación.

De esta manera, se consigue la separación de las proteínas en función de su peso molecular y posteriormente la detección del alérgeno, evitando los problemas de reactividad cruzada.

En algunas ocasiones se utiliza el *dot blot*, ya que permite un cribado más sencillo y menos costoso. Este método omite la separación de proteínas en la muestra, y ésta se fija directamente en una membrana. La intensidad del punto resultante va a ser proporcional a la cantidad de alérgeno (el antígeno), lo que permite una detección semicuantitativa de la/s proteína/s diana. Dado que no se produce una separación de proteínas, puede darse una reactividad cruzada entre los anticuerpos y los componentes de la matriz alimentaria, lo que podría conducir a falsos positivos.

#### ➤ Gluten

Gracias a su simplicidad y su relación costo-efectividad, la técnica ELISA es uno de los métodos de elección para la detección de contaminaciones por trazas de gluten y así certificar alimentos sin gluten.

Existen varios kits ELISA comerciales basados en anticuerpos monoclonales y policlonales para la detección del gluten, con un límite de cuantificación que oscila entre 0,3 y 5 ppm. Estos kits varían en su tipo de anticuerpo y en el epítipo diana, en el tampón de extracción, el tiempo y la temperatura de incubación o los estándares de calibración. Por estas razones, las estimaciones de gluten pueden variar significativamente entre los kits ELISA.

Por otro lado, los ELISA sólo son aplicables a la detección de gluten en alimentos crudos o poco procesados, pero no a los que se han sometido a tratamientos térmicos, a la extrusión o a la fermentación. Debido a estos tratamientos térmicos y enzimáticos, el gluten se encuentra fragmentado, originando pequeños péptidos que no pueden ser reconocidos por los anticuerpos. Por ello, hasta el día de hoy los alimentos altamente procesados siguen suponiendo un reto.

La técnica de *Western blot* es otro método utilizado, el cual presenta algunas ventajas frente a los sistemas ELISA:

- Método altamente específico que proporciona más información cualitativa y cuantitativa, ya que las proteínas extraídas se someten a una separación mediante electroforesis antes de la hibridación con anticuerpos específicos en la membrana. La separación electroforética nos aporta información sobre el peso molecular de las proteínas extraídas.
- Mayor eficacia en la detección de proteínas insolubles. La separación de las proteínas se realiza en condiciones desnaturalizantes, lo que puede favorecer la solubilidad de dichas proteínas.

Como limitaciones al método, hay que considerar que es mucho más difícil de llevar a cabo y requiere mayor formación y especialización.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AESAN. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la enfermedad celíaca y los problemas que plantean las técnicas analíticas para el control del contenido de gluten en los alimentos. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 12: 63-78. Recuperado de [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/TECNICAS\\_ANALITICAS\\_GLUTEN.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/TECNICAS_ANALITICAS_GLUTEN.pdf)
2. Asensio, L., Gonzalez Alonso, I., Garcia, T., & Martín, R. (2008). Determination of Food Authenticity by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Food Control*, 19: 1-8. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.02.010.
3. Camacho Garrido, S. (2015). Ensayos Biotecnológicos, Volumen IV. Madrid, Síntesis, 2015.
4. Crevel, R.W.R. (2014). Food Safety Assurance Systems: Management of Allergens in Food Industry. En Y. Motarjemi (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety* (pp. 254-261). Academic Press, 2014.
5. De la Cruz Ares, S. (2017). *Desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos recombinantes y de técnicas de PCR en tiempo real para la detección de almendra y nuez de Brasil de alimentos* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/42866/1/T38828.pdf>
6. González-Martínez, M.A., Puchades, R. & Maquieira, A. (2018). Chapter 15 - Immunoanalytical Technique: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). En S. Da-Wen (Ed.), *Modern Techniques for Food Authentication* (pp. 617-657). Elsevier, 2018.
7. Montes Barqueros, N. (2018). *Técnicas de inmunodiagnóstico*. España, Síntesis, 2018.
8. Nestic, K., Stojanovic, D., & Baltic, M. (2017). Authentication of meat and meat products vs. detection of animal species in feed – what is the difference? *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 85(1): 012043.
9. Santini-Araujo, E., K. Kalil, R., Bertoni, f., & Park, Y., (2015). *Tumors and Tumor-Like Lesions of Bone*. Nueva York (Estados Unidos), Springer, 2015.
10. Sforza, S. (2013). *Food Authentication using Bioorganic Molecules*, Volumen X. Pennsylvania, DEStech Publications, 2013.
11. Van Hengel, A., Anklam, E., Taylor, S., & Hefle, S. (2007). Chapter 7 - Analysis of Food Allergens - Practical Applications. En Y. Pico (Ed.), *Food Toxicants Analysis - Techniques, Strategies and Developments* (pp.189-229). Amsterdam (The Netherlands), Elsevier B.V. JRC37399.
12. Wieser, H., Segura, V., Ruiz-Carnicer, A., Sousa, C., & Comino, I. (2021). Food Safety and Cross-Contamination of Gluten-Free Products: A Narrative Review. *Nutrients*, 13(7):2244. <https://doi.org/10.3390/nu13072244>.
13. <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM001738.pdf>
14. [file:///C:/Users/Pola-/Downloads/Attachment\\_0.pdf](file:///C:/Users/Pola-/Downloads/Attachment_0.pdf)
15. <https://inmunojmvucv.files.wordpress.com/2019/09/clase-prc3a1ctica-elisa-y-western-blot-2019.pdf>
16. <https://filadd.com/doc/resumen-tecnicas-bioquimica-docx-bioquimica-humana-1>

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 22**

**COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS. SUSTANCIAS NITROGENADAS. PROPIEDADES GENERALES. ASPECTOS ESTRUCTURALES. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. SUSTANCIAS NITROGENADAS**

#### **2.1 AMINOÁCIDOS**

#### **2.2 PEPTIDOS**

#### **2.3 PROTEINAS**

##### **2.3.1 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS**

##### **2.3.2.-PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS**

##### **2.3.3-FUNCIONES DE LAS PROTEINAS**

### **3-MÉTODOS DE ANÁLISIS**

### **4-OTRAS SUSTANCIAS NITROGENADAS**

### **5-BIBLIOGRAFIA**

MATERIAL NO OFICIAL

**COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS. SUSTANCIAS NITROGENADAS. PROPIEDADES GENERALES. ASPECTOS ESTRUCTURALES. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

## **1.-INTRODUCCION**

Los alimentos proporcionan la energía y los nutrientes necesarios para llevar a cabo las funciones corporales, mantener una buena salud y realizar las actividades cotidianas

El Codex Alimentarius define “**alimento**” como toda sustancia, elaborada, semielaborada o bruta, que se destina al consumo humano, incluyendo las bebidas, el chicle y cualesquiera otras sustancias que se utilicen en la fabricación, preparación o tratamiento de los alimentos

Los alimentos se pueden clasificar según distintos criterios: origen, composición y componente predominante, principal función nutritiva que desempeñan:

### **Origen**

- Animal
- Vegetal

### **Composición química**

- Glúcidos
- Prótidos
- Lípidos

### **Función nutritiva que desempeñan:**

- Energéticos destacan los hidratos de carbono y las grasas.
- Plásticos o constructores proteínas
- Reguladores minerales y las vitaminas

Todos los alimentos están constituidos por los siguientes elementos en distintas proporciones: agua, hidratos de carbono, proteínas, lípidos (grasas), vitaminas, minerales, pigmentos, saborizantes y compuestos bioactivos. Estos componentes están dispuestos de formas distintas en los alimentos, para darles su estructura, textura, sabor (flavor), color (pigmentos) y valor nutritivo. La composición general de los alimentos y la forma en que sus componentes se organizan, le otorgan sus características particulares:

El agua es el principal componente de la mayoría de los alimentos y forma parte de la composición de prácticamente la totalidad de los mismos. Los principales componentes sólidos son: hidratos de carbono, proteínas, lípidos y sus correspondientes derivados.

## **2.-SUSTANCIAS NITROGENADAS**

**.2.1-AMINOÁCIDOS** son compuestos orgánicos que se caracterizan por poseer un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH<sub>2</sub>)

**2.1.1-Propiedades de los aminoácidos.** Los aminoácidos son compuestos sólidos, cristalinos, de elevado punto de fusión, solubles en agua, con actividad óptica y comportamiento químico anfótero.

**1\_Actividad óptica:** todos los aminoácidos salvo la glicina poseen un carbono asimétrico, enlazado a cuatro radicales diferentes. Debido a esta característica, los aminoácidos presentan actividad óptica, es decir son capaces de desviar el plano de la luz polarizada.

Si la desvían hacia la derecha son dextrógiros o + y hacia la izquierda son levógiros o –

Un aminoácido tendrá una configuración D si el grupo  $\text{-NH}_2$  se halla situado a la derecha, mientras que si se encuentra a la izquierda posee una configuración L. La disposición D o L es independiente de la actividad óptica así por ej. Un L-aminoácido puede ser levógiro o dextrógiro. En la naturaleza la forma L es la más abundante.

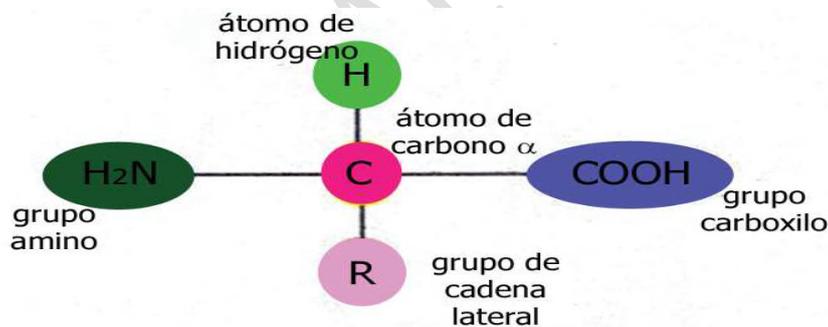
**2-Comportamiento químico:** los aminoácidos en disolución acuosa muestran un comportamiento anfótero, es decir, pueden ionizarse dependiendo del  $\text{P}^{\text{H}}$  como un ácido, como una base o como un ácido y una base a la vez. En el último caso, los aminoácidos se ionizan doblemente, apareciendo una forma dipolar iónica denominada zwitterion

El pH en el cual un aminoácido puede adoptar una forma dipolar neutra se denomina punto isoeléctrico

### 2.1.2- Clasificación de los aminoácidos

Según el radical R que se enlace al carbono  $\alpha$ , los aminoácidos se clasifican en:

- Aminoácidos alifáticos
- Aminoácidos aromáticos mediante enlaces peptídicos.
- Aminoácidos heterocíclicos



### 2.2-PÉPTIDOS

Están formados por la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos. El enlace peptídico es un enlace covalente que se establece entre un grupo amino de un aminoácido y un grupo carboxilo de otro, dando lugar a una molécula de agua. La disposición en el espacio de un enlace peptídico es tal que los átomos del grupo carboxilo y del grupo amino se sitúan en un mismo plano, con distancias y ángulos fijos... Dependiendo del número de aminoácidos que forman la molécula del péptido distinguimos:

- Oligopéptido cuando el número de aminoácidos que forman el péptido no es mayor de 10
- Polipéptido cuando es mayor de 10
- Proteína cuando está constituido de más de 50 aminoácidos

### 2.3-PROTEÍNAS

Las proteínas constituyen el principal componente de las sustancias nitrogenadas ocupando una posición de primera importancia en las producciones agroalimentarias porque condicionan las propiedades funcionales de numerosos productos; además desempeñan un papel específico en el campo nutricional.

Las proteínas están compuestas básicamente por carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno, aunque pueden contener azufre y, en menor proporción, fósforo, hierro, cobre, magnesio, yodo, etc.

Según su composición las proteínas las clasificamos en:

- ✓ Holoproteínas están formadas únicamente por aminoácidos
- ✓ Heteroproteinas formadas por aminoácidos y otras moléculas.

| CLASIFICACION DE PROTEÍNAS |                 |                        |
|----------------------------|-----------------|------------------------|
| PROTEÍNAS                  | HOLOPROTEINAS   | Proteínas globulares   |
|                            |                 | Proteínas filamentosas |
|                            | HETEROPROTEINAS | Cromoproteínas         |
|                            |                 | Glucoproteínas         |
|                            |                 | Lipoproteínas          |
|                            |                 | Nucleoproteínas        |
|                            |                 | Fosfoproteínas         |
|                            |                 |                        |

#### 2.3.1-ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

La composición y la forma de una proteína vienen definidas por cuatro estructuras:

**2.3.1.1 Estructura Primaria** Está constituida por la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica. Las proteínas se diferencian por: o el número de aminoácidos o el tipo de aminoácidos o el orden en que se encuentran los aminoácidos dispuestos.

**2.3.1.2 Estructura secundaria** es la disposición de la secuencia de aminoácidos o estructura primaria en el espacio.

Se conocen dos tipos de estructura secundaria:

- $\alpha$  hélice se forma al enrollarse sobre sí misma la estructura primaria. Para ello, cada plano que contiene un enlace peptídico realiza un desplazamiento con respecto a la anterior
- Disposición  $\beta$  en esta disposición, los aminoácidos forman un hélice extendida, que recuerdan un zig-zag, debido a que no existen puentes de hidrogeno entre ellos.

La estabilidad de esta disposición se mantiene gracias a la asociación de varias moléculas o varios segmentos de la misma cadena polipeptídica con disposición  $\beta$ . Entre estas moléculas o segmentos se establecen puentes de hidrogeno. Se forma así una lámina en zig-zag, denominada disposición en lámina plegada. Los grupos R de los aminoácidos se disponen por encima o por debajo del plano de lámina. Las proteínas con esta estructura son ricas en aminoácidos que tienen grupos R pequeños.

**2.3.1.3-Estructura terciaria** informa sobre la disposición de la estructura secundaria en el espacio, y por tanto, del tipo de conformación que posee.

Hay dos tipos principales de estructura terciaria:

- Conformación filamentosa. Las proteínas con conformación filamentosa mantienen su estructura secundaria alargada y esta se retuerce ligeramente. Las proteínas filamentosas son insolubles en agua y disoluciones salinas.
- Conformación globular en esta conformación, la estructura secundaria se pliega adoptando formas que en ocasiones parecen esféricas. Las proteínas con esta conformación son solubles en agua y en disoluciones salinas. Además, se difunden con facilidad en estos medios, lo que les permite realizar funciones de transporte, enzimáticas, hormonales, etc.

**2.3.1.4-Estructura cuaternaria** informa de la unión de varias cadenas polipeptídicas, idénticas o no, para formar un complejo proteico. Cada una de estas cadenas polipeptídicas recibe el nombre de protomero,

Según el número de protomeros que se asocian tenemos

Dímeros como la hexoquinasa

Tetrámeros como la hemoglobina

Polímeros cuando intervienen un gran número de protomeros.

## **2.3.2.-PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS**

**Solubilidad.** Las proteínas globulares poseen un elevado tamaño molecular, por lo, que al disolverse, dan lugar a dispersiones coloidales. La solubilidad de estas moléculas se debe a los radicales R, que, al ionizarse establecen puentes de hidrogeno con las moléculas de agua. Así la proteína queda recubierta de una capa de moléculas de agua que impide que se puedan unir a otras proteínas, lo que provocaría su precipitación.

**Desnaturalización.** Si una disolución de proteínas es sometida a cambios de pH, a alteraciones en la concentración, a agitación molecular o a variaciones de temperatura, la solubilidad de las proteínas desaparece produciéndose una precipitación de estas moléculas. Ello se debe a que los enlaces que mantienen la conformación globular se rompen y la proteína adopta la conformación filamentosa.

Entonces, la capa de moléculas de agua no recubre totalmente las moléculas proteicas, que tienden a unirse entre sí dando lugar a grandes partículas que precipitan.

La desnaturalización no afecta a los enlaces peptídicos: al volverse a las condiciones normales la proteína en algunas ocasiones, recupera la conformación primitiva, lo que se denomina renaturalización

**Especificidad** en su secuencia de aminoácidos, las proteínas presentan sectores estables y sectores variables

**Capacidad amortiguadora:** Las proteínas, al estar constituidas por aminoácidos, tienen un comportamiento anfótero. Tienden a neutralizar las variaciones de  $p^H$  del medio, ya que pueden comportarse como un ácido o como una base y, por tanto liberar o retirar protones del medio.

### **2.3.3.-FUNCIONES DE LAS PROTEINAS**

**Función estructural** las proteínas forman tejidos de sostén y relleno que confieren elasticidad y resistencia a órganos y tejidos. EJ queratina de la epidermis

**Función de transporte** tenemos por ej. La hemoglobina y al mioglobina que son proteínas transportadoras de oxígeno en la sangre y en los músculos respectivamente

**Función enzimática** llevan a cabo esta función aquellas proteínas que tienen una acción biocatalizadora

**Función hormonal** son biocatalizadores que a diferencia de las enzimas actúan por todo el organismo por ejemplo insulina y glucagón

**Función de defensa** las principales proteínas que ejercen una defensa del organismo son las inmunoglobulinas

**Función contráctil** llevan a cabo esta función la actina y la miosina

**Función de reserva** si fuera necesario las proteínas cumplen una función energética para el organismo pudiendo aportar hasta 4 Kcal de energía por gramo por ejemplo la gliadina del trigo.

### **3.-METODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.1-Cuantificación del nitrógeno total y estimación del contenido en proteína bruta.**

**A-Método Kjeldhal:** las proteínas y otros compuestos orgánicos alimentarios contenidos en la muestra son digeridos con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. El contenido total de nitrógeno orgánico es transformado en sulfato de amonio. El digerido se neutraliza con álcali, se destila sobre una disolución de ácido bórico. Los aniones boratos formados se valoran frente a ácido valorado, el cual, a su vez, se convierte al nitrógeno en la muestra. El resultado del análisis representa el contenido bruto de proteínas en el alimento, puesto que el nitrógeno proviene también de componentes distintos de las proteínas

**B--Método de Dumas** el nitrógeno se determina por combustión; Consiste en la calcinación a una temperatura de 850 a 1400° en presencia de oxígeno...Los productos de la combustión (dióxido de carbono, óxidos de azufre y agua) son adsorbidos selectivamente en columnas, mientras que los óxidos de nitrógeno se reducen catalíticamente en presencia de cobre a gas nitrógeno que será cuantificado en un detector de conductividad térmica,

El contenido de nitrógeno se convierte en proteína considerando que la totalidad del nitrógeno esta en forma proteica. La conversión del nitrógeno (Kjeldhal o Dumas) en proteína se realiza multiplicando por un coeficiente basado en el porcentaje de nitrógeno en la proteína.

El factor por defecto es 6.25, en el caso del trigo es 5.75 y la leche es 6.35. De esta forma se obtiene una cantidad de proteína llamada bruta o total para distinguirla de una medida real y directa de las fracciones proteicas que contiene la muestra.

### **3.2-Cuantificación directa de proteína**

Existen diferentes técnicas que permiten determinar el contenido de proteínas cuando se encuentra dispersa en una fase acuosa.

**1-Método biuret** cuando los iones cuprosos se acomplejan con los enlaces peptídicos de sustancias que contengan al menos 2 enlaces peptídicos, es decir, el biuret, (los péptidos grandes y las proteínas) se produce una coloración violeta purpurea bajo condiciones alcalinas. Se lee a 540 nm. Este método se recomienda para la cuantificación de proteínas, pero no para los hidrolizados a menos que se conozcan los tamaños moleculares y se adapte la proteína estándar de la curva.

El método Biuret ha sido utilizado para determinar las proteínas contenidas en cereales, carne, en extractos de proteínas y como método cualitativo para el pienso

**2-Método de Lowry** combina la reacción del biuret con la reducción del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-fosfowolfrámico) por parte de los residuos tirosina y triptófano de las proteínas. Se desarrolla un color azulado que se mide a 750nm

**3-Método de Bradford** cuando el azul brillante de Coomassie se une a las proteínas, el tinte cambia de color desde rojizo a azulado el máximo de absorción se desplaza de 465 nm hasta 595 nm.

El cambio de absorbancia es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra. Al igual que otros métodos de tinción, el de Bradford se fundamenta en la naturaleza anfótera de las proteínas

**4-Método bicinconinico (BCA)** las proteínas reducen los iones cúpricos a cuprosos bajo condiciones alcalinas: El ion cuproso con el reactivo BCA da color purpura. La intensidad del color es proporcional a la concentración de las proteínas

**5-Reacción xantoproteica** es otra forma de cuantificar las proteínas. El ácido nítrico diluido produce una reacción de nitración de los aminoácidos aromáticos (tirosina y fenilalanina). En caliente, la reacción da lugar a una coloración amarillo limón y al enfriar, en medio ligeramente alcalino, la coloración adquiere un tinte rojo oscuro.

**6-Absorción a 280nm (UV)** las proteínas presentan una fuerte absorción en UV a 280nm debido a los residuos de triptófano y lisina.

### **6.3-Separación de proteínas por electroforesis.**

Se define la electroforesis como la migración de las moléculas cargadas en el seno de una disolución, causada por un campo eléctrico.

La proteína se desplaza hacia el cátodo o el ánodo dependiendo del balance global de grupos positivos y negativos a un  $p_H$  determinado, La velocidad de migración está dada en función de la carga neta y está influenciada por la forma de la proteína, sus dimensiones moleculares, la intensidad de la corriente aplicada y el material utilizado que es el gel de poliacrilamida (PAGE).

Este es el método que se utiliza para la separación de proteínas y análisis de proteomas

La electroforesis con PAGE se puede realizar en 1 o 2 dimensiones y se le denomina 1D-2D PAGE

Esta electroforesis se puede realizar en dos formas:

A-Condiciones nativas en las que las proteínas migran conservando su diversidad y propiedades físicas especialmente su punto isoeléctrico y su peso molecular. Una vez realizada las separaciones generalmente se continúa con una degradación proteolítica y la separación de fragmentos por electroelución o por análisis de espectrometría de masas

B.-Condiciones desnaturalizantes si se utilizan tiol-reductores fuertes como el mercaptoetanol y ditioneitol y un detergente desnaturalizante fuerte (SDS).

El tratamiento con ambas sustancias las despliega y las carga negativas conferidas por los grupos sulfato del SDS permite la migración de las moléculas hacia el ánodo, de acuerdo con su peso molecular exclusivamente

Las técnicas 2D permiten una segunda separación para discriminar proteínas que se solapan el 1D por ej. Cuando son especies moleculares múltiples, aun cuando se trate de proteínas purificadas

Para el primer paso en una 2D-SDS\_PAGE se aplica una separación por carga eléctrica (Isoelectroenfoque) y en una segunda separación por el peso molecular. Esta técnica se utiliza en proteómica y es el mejor método para la resolución de una mezcla compleja de proteínas

### **3.4- Caracterización de proteínas**

El análisis de los aminoácidos se utiliza para determinar cuantitativamente la composición de aminoácidos en una proteína, En primer lugar se hidroliza la muestra para liberar los aminoácidos de una proteína a continuación los aminoácidos son separados utilizando técnicas de cromatografía y se cuantifican,

Las técnicas utilizadas son;

- Cromatografía de intercambio iónica con dos resinas una catiónica y otra anionica con capacidad de separar las moléculas del aminoácido
- HPLC líquida de fase inversa

**3.5-Determinación de amino y carboxilos terminales** existen diversos métodos que requieren que ninguno de estos grupos este bloqueado. La determinación del grupo amino terminal involucra el marcaje Químico de todos los grupos amino de la proteína incluyendo los de lisina para posteriormente someter a hidrólisis acida a la proteína, a una separación por electroforesis o cromatografía en papel, para identificar los aminoácidos que tienen marcado el grupo  $\alpha$  amino. Los dos reactivos usados son fluoro-2,4 dinitrobenceno (DNF) o reactivo de Sager y el cloruro de dansilo. El  $\alpha$  amino derivado con DNF se colorea de amarillo y el derivado de cloruro de dansilo se obtiene en condiciones fuertemente alcalinas, con la ventaja de ser altamente fluorescente.

La determinación de la composición proporciona una información limitada sobre una proteína por lo que es más importante identificar la secuencia de los aminoácidos por lo que cuenta con dos métodos

- Método directo secuenciación de las proteínas, lo que se hace es hidrolizar enzimáticamente con proteasas específicas para posteriormente secuenciar e identificar más fácilmente porciones de 10 a 20 aminoácidos los péptidos generados.
- Espectrometría de masas Maldi –Tof permite el análisis de los péptidos generados y sus peso moleculares respectivamente

### 3.6-Detección y cuantificación de aminoácidos, péptidos y proteínas

**1-Reacción de la ninhidrina** se utiliza para cuantificar aminoácidos libres, péptidos y proteínas. El aminoácido reacciona con un exceso de ninhidrina que le causa la desaminación oxidativa y la producción  $\text{NH}_3$ , el aldehído correspondiente, que tiene un átomo de carbono menos que el aminoácido original,  $\text{CO}_2$  e hidranteína que proviene de la reducción simultánea de la ninhidrina. El  $\text{NH}_3$  liberado reacciona con una molécula de hidranteína formando un producto de color púrpura que tiene una absorción a 570nm

**2-Reacción del orto-ftalaldehído** la reacción de los aminoácidos con el orto-ftalaldehído en la presencia de 2-mercaptoetanol produce un derivado fluorescente que tiene una emisión de fluorescencia máxima a 450nm

La ninhidrina y el O-ftalaldehído no son específicos para proteínas porque estos reaccionan con otros grupos amino.

### 4-COMPUESTOS NITROGENADOS

Algunos análisis de compuestos nitrogenados se realizan en determinadas condiciones para precisar la calidad proteica e higiénica de un alimento

Hidroxiprolina nos da idea del valor nutricional de los productos cárnicos. Este aminoácido, ausente en la fibra muscular que constituye la carne propiamente dicha, es muy abundante en el colágeno, se encuentra en la elastina y es característico de los tejidos conjuntivos, cutáneos y vasculares.

El valor proteico de un producto cárnico es inversamente proporcional a su contenido en hidroxiprolina. Se realiza una hidrólisis ácida de las proteínas y después de neutralizar, la hidroxiprolina se oxida para dar un derivado del pirrol. Este último reacciona con el reactivo de Erlich para generar un cromóforo que absorbe a 557 nm

Aminas biógenas las fermentaciones favorecen por descarboxilación enzimática de diversos aminoácidos libres y su transformación en aminas biógenas. Aparecen en animales en estado postmortem (pescado) así como en los productos fermentados (queso, vino)

Se realiza una extracción, una purificación, una cromatografía seguida o precedida de una derivación y finalmente detección UV

Nitrosaminas a partir de las funciones amina y en presencia de los nitros/nitritos presentes en los alimentos y en los organismos vivos se forman las nitrosaminas.

Determinación del nitrógeno no proteínico se encuentra presente en prácticamente todos los alimentos, Para determinarlo las muestras se extraen, habitualmente en condiciones alcalinas y se precipitan, a continuación con ácido tricloroacético o con ácido sulfosalicílico, de esta manera se separan las proteínas de las sustancias no proteicas como pueden ser urea, ácidos nucleicos etc. y se determinan posteriormente por Kjeldhal

**5-BIBLIOGRAFIA**

Biología de COU Ed Anaya

Análisis nutricional de los alimentos Ed Acribia

Análisis de los alimentos Suzanne Nielsen.Ed Acribia

Química de los alimentos Salvador Badui Ed.Pearson

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 23**

**COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS.SUSTANCIAS LIPÍDICAS.PROPIEDADES  
GENERALES. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

1. Introducción
2. Lípidos
3. Clasificación
4. Funciones de los lípidos
5. Métodos de análisis

MATERIAL NO OFICIAL

## 1-INTRODUCCION

Los alimentos proporcionan la energía y los nutrientes necesarios para llevar a cabo las funciones corporales, mantener una buena salud y realizar las actividades cotidianas.

El Codex Alimentarius define “**alimento**” como toda sustancia, elaborada, semielaborada o bruta, que se destina al consumo humano, incluyendo las bebidas, el chicle y cualesquiera otras sustancias que se utilicen en la fabricación, preparación o tratamiento de los alimentos.

Los alimentos se pueden clasificar según distintos criterios: origen, composición y componente predominante, principal función nutritiva que desempeñan

### Origen

- Animal
- Vegetal

### Composición química

- Glúcidos
- Prótidos
- Lípidos

### Función nutritiva que desempeñan:

- Energéticos destacan los hidratos de carbono y las grasas.
- Plásticos o constructores proteínas
- Reguladores minerales y las vitaminas

Todos los alimentos están constituidos por los siguientes elementos en distintas proporciones: agua, hidratos de carbono, proteínas, lípidos (grasas), vitaminas, minerales, pigmentos, saborizantes y compuestos bioactivos<sup>7</sup>. Estos componentes están dispuestos de formas distintas en los alimentos, para darles su estructura, textura, sabor (flavor), color (pigmentos) y valor nutritivo. La composición general de los alimentos y la forma en que sus componentes se organizan, le otorgan sus características particulares<sup>5</sup>.

El agua es el principal componente de la mayoría de los alimentos y forma parte de la composición de prácticamente la totalidad de los mismos<sup>4</sup>. Los principales componentes sólidos son: hidratos de carbono, proteínas, lípidos y sus correspondientes derivados<sup>5</sup>.

## 2-LIPIDOS

Son biomoléculas formadas básicamente por C, H y O pudiendo contener además N, P y S. Son un grupo muy heterogéneo de moléculas aunque tienen en común las siguientes propiedades: son insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos, es decir, no polares como el éter, cloroformo, benceno....

## 3-CLASIFICACIÓN

**3.1 ÁCIDOS GRASOS** generalmente no se encuentran libres si no que se obtienen por la hidrólisis de otros lípidos. Están formados por una larga cadena hidrocarbonada y un grupo carboxilo. Tienen un número par de átomos de carbono, generalmente entre 12 y 24.

Pueden ser saturados u insaturados y adoptan forma de zigzag

- ✓ Saturados si todos los enlaces son simples. ej ácido esteárico.

- ✓ Insaturados si tienen algún doble o triple enlace. Ej. Ácido oleico

### 3.1.1-Propiedades de los ácidos grasos

#### 3.1.1A-Propiedades físicas

- Son bipolares o anfipáticas la larga cadena hidrocarbonada es hidrófoba y el grupo carboxilo es hidrófilo. Debido a esta propiedad, cuando se encuentran en medio acuoso, los grupos hidrófilos se orientan hacia las moléculas de agua mientras que los hidrófobos se alejan de esta, Así se explica la formación de películas superficiales de ácidos grasos formando bicapas, monocapas y micelas. Las cadenas se unen mediante fuerzas de van der Waals
- Punto de fusión de los ácidos grasos insaturados es menor que el de los saturados y asciende cuando aumenta el número de carbonos que posee la molécula
- Isomería cis-trans solo la poseen los ácidos grasos insaturados debido a la configuración espacial que adoptan respecto al doble enlace.

#### 3.1.1B-Propiedades químicas Dependientes del grupo carboxilo

- Esterificación consiste en la unión de un ácido graso con un alcohol para obtener un Ester, con liberación de una molécula de agua.
- Saponificación consiste en la unión de un ácido graso con una base fuerte normalmente KOH o NaOH para obtener una sal de ácido graso.

### 3.2-LÍPIDOS SAPONIFICABLES son aquellos que por hidrólisis dan ácidos grasos

#### 3.2.1-Lípidos simples u hololípidos son ésteres de ácidos grasos y un alcohol

- ✓ Acilglicéridos se llaman también glicéridos y son ésteres de la glicerina con uno, dos o tres ácidos grasos Así tendremos monoglicérido, diglicérido o triglicérido

Las grasas constituyen la principal reserva energética de los seres vivos: Son insolubles en agua y pueden ser de dos tipos

Aceites están formados por ácidos grasos insaturados por lo que a temperatura ambiente son líquidos. Son propios de los vegetales.

Grasas o sebos están formados mayoritariamente por ácidos grasos saturados por lo que a temperatura ambiente son sólidos. Son propios de los animales.

Por hidrogenación los ácidos grasos insaturados pierden los dobles enlaces y se saturan, pasando al estado sólido

- ✓ Ceras son ésteres de un ácido graso con un alcohol monovalente lineal de cadena larga ej. La cera de abeja.

Tienen función protectora y de revestimiento. Son insolubles en agua y forman láminas impermeables protectoras (piel, plumas, hojas...)

3.2.2-Lípidos complejos o heterolípidos son moléculas compuestas por componentes lipídicos y no lipídicos. Se encuentran formando la bicapa lipídica de las membranas celulares por lo que también se les llama lípidos de membrana

- ✓ Fosfolípidos, glicerofosfolípidos o fosfogliceridos están formados por glicerina+ 2 ácidos grasos + 1 ácido fosfórico, que constituye el ácido fosfatídico, que es la unidad estructural de los fosfolípidos del cual derivan los distintos tipos al unirse a un alcohol aminado.

Los principales alcoholes aminados son: etanolamina, colina y serina. Los ácidos grasos constituyen la parte hidrófoba y el resto hidrófila, por tanto, son bipolares, de ahí que se sitúen en la membrana en bicapa.

- ✓ Fosfolípidos: esfingolípidos o fosoesfingolípidos están formados por la esfingosina (alcohol)+1 ácido graso+1 alcohol aminado. La esfingosina y el ácido graso constituyen la ceramida que es la unidad estructural de los esfingolípidos y que es la parte hidrófoba
- ✓ Glucolípidos están formados por una ceramida unida a un glúcido. Pueden ser
  - Gangliósidos el glúcido es un oligosacárido complejo
  - Glucolípidos están formados por glicerina+2 ácidos grasos + 1 monosacárido. Forman parte de las membranas bacteriana.

**3.3-LÍPIDOS INSAPONIFICABLES** son aquellos que por hidrólisis no dan ácidos grasos y por tanto no realizan la reacción de saponificación

- ✓ Terpenos o isoprenoides están formados por la polimerización del isopreno. Son lípidos vegetales.

Según el número de moléculas de isopreno se denominan:

- Monoterpenos dos unidades de isopreno. Componen los aceites esenciales de muchas plantas que les dan olor y sabor (mentol, geraniol....)
- Diterpenos cuatro unidades de isopreno ej. fitol de la clorofila.
- Triterpenos seis de unidades de isopreno ej. precursores del colesterol.
- Tetraterpenos ocho unidades de isopreno ej. Pigmentos como la xantofila y los carotenos
- ✓ Esteroides son derivados del ciclopentanohidrofenantreno o esterano. Son moléculas muy activas que intervienen en el metabolismo celular
- ✓ Prostaglandinas son una clase especial de ácidos grasos insaturados. Son hormonas locales sintetizadas en el mismo lugar donde ejercen su acción a partir de los lípidos de membrana

#### 4.-FUNCIONES DE LOS LÍPIDOS.

- ❖ Función energética son la principal reserva energética del organismo
- ❖ Función estructural forman parte de los sistemas de membranas de las células animales y vegetales. Algunos lípidos actúan como aislantes térmicos o como amortiguadores de vísceras.
- ❖ Función dinámica y biocatalizadora; vitaminas lipídicas, ácidos biliares y hormonas esteroideas. Los ácidos grasos transportan las grasas y facilitan la absorción intestinal
- ❖ Función de transporte las lipoproteínas transportan aquellos lípidos que son poco solubles. Los ácidos biliares transportan las grasas y facilitan su degradación y posterior absorción.

#### 5.- MÉTODOS DE ANÁLISIS

Distinguiremos

**A Métodos que determinan el contenido total de lípidos**

## **B.-Métodos para la determinación de la calidad de las grasas**

### **C-Métodos para las fracciones lipídicas**

**A-Métodos del contenido total de lípidos-** Se determinan por medio de extracción con disolventes orgánicos.

A.1-Método de Soxhlet se trata de una extracción semicontinua con disolventes .El contenido de la grasa se determina gravimétricamente

Existen alimentos como por ej. productos animales en la que los lípidos se encuentran enlazados a las proteínas y a los hidratos de carbono y su extracción directa con disolventes es ineficiente, por lo tanto hay que realizar previamente una hidrólisis ácida para romper las uniones de los lípidos enlazados tanto covalente como iónicamente, dando formas fácilmente extraíbles.

A.2-Método Gerber se utiliza para las grasas de la leche. Se recurre a la solubilización ácida de la del conjunto de los componentes de la leche a excepción de la fase lipídica .consiste en colocar una alícuota de leche en un tubo graduado (butirometro) y adicionar ácido sulfúrico concentrado y unas gotas de alcohol amílico, para facilitar la separación de la capa grasa sobrenadante de la fase acuosa que contiene los componentes solubilizados .El contenido de materia grasa se lee directamente sobre la escala del butirometro.

### **B-Métodos de análisis para la determinación de la calidad de las grasas**

Junto a la información cuantitativa, los lípidos obtenidos por gravimetría pueden someterse a un examen más detallado para definir características de las grasas como pueden ser

B.1-Índice de acidez se trata de una medida de la cantidad de ácidos grasos libres presentes en una grasa alimentaria. Se expresa por el número de mg de hidróxido potásico necesarios para neutralizar la acidez presente en 1 g de grasa.

B.2-Índice de saponificación consiste transformar en jabones solubles (sódicos o potásicos) la totalidad de los ácidos grasos presentes en estado esterificado y regenerar el glicerol en caso de los triglicéridos.

El índice de saponificación es la cantidad de potasa, expresada en mg, necesaria para saponificar 1 g de grasa. Proporciona información sobre la longitud media de las cadenas de ácidos grasos, ya que su valor es tanto más elevado cuanto menor es el peso molecular de los ácidos grasos.

B.3-Índice de peróxidos se define como los miliequivalentes de peróxido por cada kilogramo de muestra Es una determinación volumétrica

El índice de peróxidos mide un producto transitorio de la oxidación(es decir, después de formarse, los peróxidos se degradan para formar otros productos. Un valor bajo puede representar o bien el comienzo de la oxidación, o bien la oxidación avanzada, entre los cuales se puede distinguir midiendo el índice de peróxidos a lo largo del tiempo.

B4-Dienos y trienos conjugados. Como consecuencia de la oxidación, los enlaces dobles de los lípidos se transforman de

B.5-Medida de la fracción insaponificable –La fracción insaponificable está constituido por el conjunto de compuestos lipídicos extraíbles con solventes (hexano, éter etílico) del medio resultante de la materia grasa con potasa alcohólica (saponificación)

El contenido del insaponificable es generalmente bajo de 0.3 a 1.5% en las materias grasas naturales. Incluye, según la naturaleza de la muestra, colesterol, fitoesteroles, ergosterol, pigmentos, vitaminas liposolubles...

### C- **Métodos para las fracciones lipídicas**

Para ello se estudian las fracciones lipídicas. La cromatografía de gases es ideal para el análisis de lípidos combinada con la espectrometría de masas es una potente herramienta para la identificación de los compuestos, El estudio de las fracciones lipídicas nos sirven para medir la pureza de una grasa

.C 1--Composición de los ácidos grasos o perfil de los ácidos grasos se determina cuantificando el tipo y la cantidad de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases. Para ello se saponifica la muestra y se hacen más volátiles por esterificación de sus grupos carboxílico con metanol.

C 2- Determinación de los ácidos trans la mayor parte de las grasas y los aceites naturales de origen vegetal contienen únicamente dobles enlaces cis, no conjugados

Los ácidos y grasas de origen animal pueden contener pequeñas cantidades de dobles enlaces en trans. En la medida en que el isómero trans es termodinámicamente más estable, se pueden formar cantidades adicionales de dobles enlaces en trans, en las grasas y los aceites que experimenten la oxidación, o bien en el transcurso de los tratamientos de procesado tales como la extracción, el calentamiento o la hidrogenación.

La determinación de los isómeros trans de los ácidos grasos se lleva a cabo mediante cromatografía de gases aunque también se puede determinar por espectroscopia de infrarrojo

C 3--Identificación y cuantificación de esteroides una vez realizada la saponificación de saponificable, además de las vitaminas liposolubles, tenemos los esteroides que se encuentran libres puesto que las formas esterificadas han sido liberadas durante la saponificación

.C4.-Índice de refracción de un aceite se define como la relación entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en el aceite.

El índice de refracción está relacionado con el grado de saturación. El índice de refracción se utiliza como una medida de la pureza y como un medio de identificación, puesto que cada sustancia presenta un índice de refracción característico.

### **Bibliografía.**

Biología de COU Ed Anaya

Análisis nutricional de los alimentos Ed Acribia

Análisis de los alimentos Suzanne Nielsen. Ed Acribia

Química de los alimentos Salvador Badui Ed. Pearson

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 24**

**COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS. CARBOHIDRATOS.  
MICRONUTRIENTES. PROPIEDADES GENERALES. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCION**

### **2. HIDRATOS DE CARBONO**

#### **2.1 DEFINICION**

#### **2.2 CLASIFICACION**

##### **2.2.1. MONOSACARIDOS**

##### **2.2.2. OLIGOSACARIDOS**

##### **2.2.3. POLISACARIDOS**

#### **2.3. METODOS DE ANALISIS**

##### **2.3.1. GLUCIDOS DIGESTIBLES**

###### **2.3.1.1. METODOS CUALITATIVOS**

###### **2.3.1.2. METODOS CUANTITATIVOS**

###### **2.3.1.3 METODOS DE DETERMINACION DEL ALMIDON**

##### **2.3.2. GLUCIDOS NO DIGESTIBLES**

###### **2.3.2.1. FIBRA CRUDA**

###### **2.3.2.2. FIBRA DETERGENTE NEUTRO Y ÁCIDO DETERGENTE**

###### **2.3.2.3. FIBRA DIETETICA**

### **3. MINERALES**

#### **3.1 PROPIEDADES GENERALES**

#### **3.2 DESCRIPCIÓN**

#### **3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS**

### **4. BIBLIOGRAFIA**

## 1.-INTRODUCCION

Los alimentos proporcionan la energía y los nutrientes necesarios para llevar a cabo las funciones corporales, mantener una buena salud y realizar las actividades cotidianas.

El Codex Alimentarius define “**alimento**” como toda sustancia, elaborada, semielaborada o bruta, que se destina al consumo humano, incluyendo las bebidas, el chicle y cualesquiera otras sustancias que se utilicen en la fabricación, preparación o tratamiento de los alimentos.

Los alimentos se pueden clasificar según distintos criterios: origen, composición y componente predominante, principal función nutritiva que desempeñan

### Origen

- Animal
- Vegetal

### Composición química

- Glúcidos
- Prótidos
- Lípidos

### Función nutritiva que desempeñan:

- Energéticos destacan los hidratos de carbono y las grasas.
- Plásticos o constructores proteínas
- Reguladores minerales y las vitaminas

Todos los alimentos están constituidos por los siguientes elementos en distintas proporciones: agua, hidratos de carbono, proteínas, lípidos (grasas), vitaminas, minerales, pigmentos, saborizantes y compuestos bioactivos. Estos componentes están dispuestos de formas distintas en los alimentos, para darles su estructura, textura, sabor (flavor), color (pigmentos) y valor nutritivo. La composición general de los alimentos y la forma en que sus componentes se organizan, le otorgan sus características particulares.

El agua es el principal componente de la mayoría de los alimentos y forma parte de la composición de prácticamente la totalidad de los mismos. Los principales componentes sólidos son: hidratos de carbono, proteínas, lípidos y sus correspondientes derivados.

## 2.-HIDRATOS DE CARBONO

### 2.1.-Definición

Son biomoléculas formadas básicamente por C, H y O en una proporción semejante a  $C_nH_{2n}O_n$  es decir,  $(CH_2O)_n$  por eso se les llama hidratos de carbono o carbohidratos, tienen estructura de polihidroxialdehído o de polihidroxiacetona;

Los hidratos de carbono son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza, y también los más consumidos por los seres humanos (en muchos países constituyen entre 50 y 80% de la dieta poblacional). Los hidratos de carbono que provienen del reino vegetal son más variados y abundantes que los del reino animal, se originan como producto de la fotosíntesis y son los principales compuestos químicos que almacenan la energía radiante

del sol. De hecho, la glucosa que se sintetiza en las plantas representa la materia prima fundamental para la fabricación de casi todos los hidratos de carbono.

## 2.2.-Clasificación:

Se clasifican según el número de átomos de carbono que contengan:

- ❖ **Monosacáridos** glúcidos de 3 a 8 átomos de carbono
- ❖ **Oligosacáridos** están formados por la unión de 2 a 10 monosacáridos, Los únicos de interés son los disacáridos y los trisacáridos.
- ❖ **Polisacáridos** son los glúcidos formado por la unión de más de 10 monosacáridos se distinguen:
  - ◆ **Homopolisacáridos** se repite un tipo de monosacáridos
  - ◆ **Heteropolisacáridos** si se repiten 2 o más tipos de monosacáridos.

### 2.2.1.-MONOSACÁRIDOS

Los monosacáridos se clasifican según la naturaleza química del grupo carbonilo y del número de átomos de carbono que poseen.

Son sólidos cristalinos, blancos, hidrosolubles y de sabor dulce. Su solubilidad en agua se debe a los radicales hidroxilo como a los radicales de hidrógeno (H) presentan elevada polaridad eléctrica y establecen por ello fuerzas de unión electrostática con las moléculas de agua que también son polares dispersándose así las moléculas del glúcido.

Atendiendo a la naturaleza química del grupo funcional carbonílico, si este es aldehído el monosacárido recibe el nombre de aldosa y si es cetónico se denomina cetosa.

Dentro de ellos tenemos: triosas (3 átomos de carbono), tetrasas (4 átomos de carbono), pentosas (5 átomos de carbono), hexosas (6 átomos de carbono).

#### Estructura química

El gliceraldehído es la aldosa más simple. Está formada por tres átomos de carbono, el primero contiene el grupo aldehído, el segundo tiene unido un hidrógeno y un grupo hidroxilo mientras que el tercero posee dos hidrógenos y un hidroxilo. De los tres carbonos que posee, el segundo tiene cuatro sustituyentes distintos y de ahí que se denomine carbono asimétrico o quiral., con lo cual en el gliceraldehído existen dos estructuras espaciales que son D y L en función de si el grupo OH del carbono 2 se sitúa a la derecha o a la izquierda de dicho carbono se diferencian por la actividad óptica.

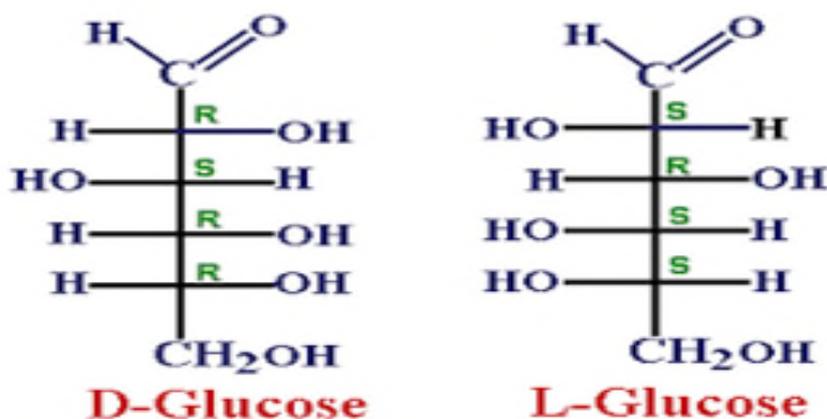
Las moléculas que teniendo la misma composición química tienen diferentes propiedades se denominan **isómeros**, que se diferencian por la disposición espacial de los grupos sustituyentes de un centro **quiral** se denominan isómeros ópticos o **estereoisómeros**, estos isómeros ópticos tienen la capacidad de desviar el plano de un haz de luz polarizada. Si lo hacen en el sentido de las agujas del reloj se designa (+) y en sentido contrario (-). Así el enantiomero del D-gliceraldehído es (+) y el L (-). Esto no quiere decir que todos los monosacáridos de la serie D tengan que ser (+): Por un lado está la posición del grupo OH respecto a su carbono quiral que es

un aspecto puramente estructural y por otro el efecto de la estructura de la molécula sobre el haz de luz polarizada que es producido por la interacción de los rayos de luz polarizada con la red cristalina de la molécula en disolución

Cuando los isómeros ópticos son imágenes especulares no superponibles se denominan **enantiómeros**

Aquellos isómeros ópticos que se diferencian solo en la configuración de uno de sus carbonos quirales se denominan **epímeros**. El resto de los isómeros ópticos que no son enantiómeros ni epímeros se denominan **diastereómeros**.

Los monosacáridos se clasifican en la serie D o en la serie L de acuerdo con la configuración del carbono quiral más alejado del grupo carbonilo



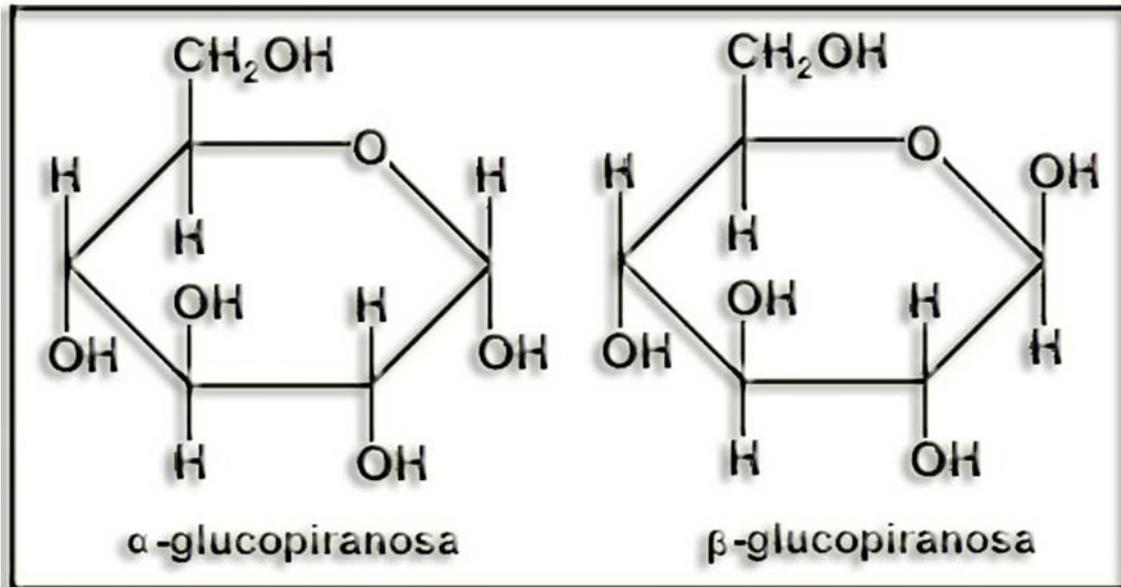
**Reacciones de ciclación de los monosacáridos** La presencia de 5 o 6 carbonos en la cadena proporciona a estos compuestos la posibilidad de formar estructuras de anillo muy estables mediante la formación de un enlace hemiacetal interno, en el caso de las aldosas, o un hemicetal interno si son cetosas. La formación de la estructura cíclica se produce de la misma manera que los alcoholes reaccionan con los grupos carbonilo de aldehídos o las cetonas.

El grupo hidroxilo de un monosacárido puede reaccionar con su correspondiente grupo carbonilo (aldo- o ceto-) para dar lugar a hemiacetales o hemicetales cíclicos. Este tipo de procesos se puede representar mediante las fórmulas de proyección de Haworth. Las proyecciones derivadas de las aldosas de seis carbonos dan lugar a anillos derivados del pirano y las derivadas de cetosas de 6 carbonos originan anillos derivados de furano.

Un aspecto importante del proceso es que al formarse el correspondiente hemiacetal, el C-1 de la glucosa (que inicialmente no era quiral) se transforma en un carbono quiral. Este nuevo carbono quiral se denomina anomérico y da lugar a dos estructuras denominadas anomeros, uno

con el grupo hidroxilo del C-1 por debajo del anillo anomero  $\alpha$  y el otro con el grupo hidroxilo por encima del anillo, anomero  $\beta$ .

En general, las hexosas y las pentosas pueden adoptar la forma de pirano o furano dependiendo de la naturaleza del azúcar. Es importante indicar que en disolución acuosa existe un equilibrio entre la forma abierta y los anillos ciclados. De tal manera que la D-glucosa se presentaría en equilibrio entre sus anomeros  $\alpha$  y  $\beta$



Los monosacáridos más importantes son las hexosas:

- ✓ Glucosa en la naturaleza se encuentra como D (+) glucosa
- ✓ Galactosa junto con la glucosa forma la lactosa.
- ✓ Manosa es una aldohexosa
- ✓ Fructosa es una cetohehexosa, es fuertemente levógira por lo que también se llama levulosa

### Propiedades químicas

Los glúcidos se oxidan frente a sustancias menos oxidantes que ellos pasando de CHO o CO a COOH.

Frente a sustancias más oxidantes se reducen pasando el grupo aldehído a grupo alcohólico. Otra propiedad es su capacidad para asociarse con el grupo amino  $\text{NH}_2$ . Tiene gran importancia en la formación de nucleosidos, entre ellos, la adenosina que forma parte del ATP y de los ácidos ribonucleicos.

### 2.2.2.-OLIGOSACÁRIDOS

Son glúcidos que provienen de la unión de 2 a 10 monosacáridos mediante enlace O-glucosídico.

El enlace O-glucosídico se produce entre dos grupos hidroxilo entre dos monosacáridos. El enlace O-glucosídico es  $\alpha$  glucosídico si el primer monosacárido es  $\alpha$  y  $\beta$  glucosídico si es  $\beta$ . Son dulces, solubles, cristalizables y por hidrólisis dan monosacáridos.

En el área de los alimentos los más importantes son los disacáridos.

Los disacáridos están formados por la unión de 2 monosacáridos, esta unión se puede realizar de dos formas:

- Mediante enlace monocarbonílico entre el carbono anomérico de primer monosacárido y un carbono cualquiera no anomérico del segundo. Al quedar un carbono anomérico con el hemiacetal libre sigue teniendo la capacidad de reducir el licor de Fehling por ej. La maltosa
- Enlace dicarbonílico si se establece entre 2 carbonos anoméricos de los 2 monosacáridos con lo que se pierde la capacidad de reducir el licor de Fehling por ej. la sacarosa

#### Principales disacáridos

- ✓ Maltosa
- ✓ Isomaltosa
- ✓ Lactosa
- ✓ Sacarosa es dextrógira pero si se hidroliza la mezcla de D-glucosa y D-fructosa que queda es levógira, se denomina azúcar invertido

#### 2.2.3. POLISACÁRIDOS

Están formados por la unión de muchos monosacáridos de 11 a varios miles mediante enlaces O-glucosídicos con la consiguiente pérdida de una molécula de agua por cada enlace, tienen pesos moleculares muy elevados, no poseen carácter reductor. Desempeñan funciones estructurales o de reserva energética. Los que realizan función estructural presentan enlaces  $\beta$  glucosídicos y los que llevan a cabo función de reserva enlace  $\alpha$  glucosídico.

Entre los polisacáridos tenemos:

- ✓ Homopolisacáridos: celulosa, almidón, glucógeno
- ✓ Heteropolisacáridos: pectina, agar-agar, goma arábiga
- ✓

**Almidón** es la principal reserva de hidratos de carbono que sintetizan las plantas y es también la principal fuente de glucosa para la alimentación de los animales. Está formado por una mezcla de dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de D-glucosa con uniones  $\alpha$  (1-4) glucosídicas que le permite adoptar una disposición tridimensional de tipo helicoidal y la amilopectina constituida por restos de D-glucosa unidos por enlace  $\alpha$  (1-4) pero presenta también ramificaciones cada 24-30 unidades de glucosa, mediante enlaces  $\alpha$  (1-6). El almidón es el único polisacárido que digiere el hombre. **Glucógeno** es el polisacárido de reserva de glucosa en animales y constituye el equivalente de almidón en las células vegetales. Se halla presente en todas las células, aunque preferentemente se acumula en los músculos esqueléticos y especialmente en el hígado, en cuyas células el glucógeno aparece en forma de grandes gránulos.

**Celulosa** es el componente estructural primario de las paredes de las células vegetales, es un polímero lineal de glucosa unido por enlaces  $\beta$  (1-4) glucosídicos: Los vertebrados no poseen enzimas capaces de hidrolizar el enlace  $\beta$  (1-4) glucosídicos.

## Funciones de los glúcidos

**Energética:** Constituyen un material energético de uso inmediato para los seres vivos y son los primeros productos que se obtienen durante la fotosíntesis por ello, constituyen una fuente de carbono para los demás compuestos. La glucosa es el azúcar más utilizado como fuente de energía por las células

**Estructural:** la celulosa, la pectina y la hemicelulosa que forman parte de las paredes vegetales, y la quitina del exoesqueleto en los artrópodos.

**Material de reserva:** actúan como reserva nutritiva, almacenándose en forma de glucógeno, polisacáridos etc. Estas reservas son movilizadas por las células en el momento apropiado.

## 2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Distinguimos entre los glúcidos digestibles y los no digestibles

### 2.3.1. Glúcidos digestibles

#### 2.3.1.1 Métodos cualitativos

- **Método de Molisch** se deshidrata el glúcido en forma de furfural que al reaccionar con la  $\alpha$ -naftol produce un color morado.
- **Prueba del lugol** es la interacción del IK con el almidón dando una coloración azul oscura.
- **Prueba de Barfoed** se utiliza para detectar monosacáridos reductores en disolución: Los monosacáridos reductores son oxidados por el ion cobre formándose un ácido carboxílico y una precipitación rojiza de ion cobre.
- **Prueba de Fehling** reduce el  $\text{Cu}^{++}$  por oxidación con todos los azúcares reductores siempre que esté en medio alcalino con una presencia de tartrato de sodio y potasa. La reacción positiva forma una coloración rojo ladrillo.

#### 2.3.1.2. Métodos cuantitativos

- **Determinación del contenido total de hidratos de carbono**. Preferentemente se utilizan las propiedades químicas específicas de los monosacáridos.: una vía muy general es la deshidratación, en caliente y en medio ácido, de los grupos hidroxilos, que conduce a la formación de compuestos intermedios como el furfural para las pentosas y el -hidroxi metil furfural para las hexosas. Estos compuestos se pueden cuantificar directamente o por formación de derivados fenólicos con la antrona que da una coloración azul verdosa que se lee a 580nm
- **Métodos de determinación de azúcares reductores:** se trata de métodos espectrofotométricos basados en las propiedades reductoras de los azúcares. Se pueden clasificar según el oxidante utilizado. Estas técnicas se basan en la reducción.

- De un grupo nitro-aromático: el dinitroftalato
- De un compuesto orgánico: el azul de tetrazoilo
- De iones cúpricos: Bertrand, Nelson.

El método de Nelson es el más empleado. se basa en la reducción de los iones Cu (II) a iones Cu (I) por los azúcares reductores. A continuación, los iones Cu (I) reducen un complejo de arsenomolibdato. La reducción del complejo arsenomolibdato produce un color azul, que se mide espectrofotométricamente.

La técnica de referencia europea para la determinación de azúcares reductores o de los azúcares totales después de la inversión, es el método de Luff-Schorl. Es un método volumétrico. Los azúcares se disuelven en alcohol diluido y la solución resultante se defeca con los reactivos de Carrez. Después de la eliminación del etanol, se toma una alícuota que se hace reaccionar antes y después de la inversión, con el reactivo de Luff-Schorl (sulfato de cobre en disolución de carbonato sódico a pH 9.4), finalizada la reacción se adiciona una solución de yoduro potásico y el yodo generado se valora con una solución de tiosulfato sódico.

- **Cuantificación polarimetría** de los azúcares se mide el poder rotatorio de una solución pero conteniendo un solo tipo de azúcar. Este método no se aplica a la mezcla de azúcares

- **Cuantificación individual de azúcares**

#### Métodos cromatógrafos

- HPLC es el método de elección para el análisis de los monosacáridos y los oligosacáridos y se puede utilizar para el análisis de polisacáridos después de una hidrólisis. La cromatografía HPLC proporciona tanto análisis cualitativo (identificación del hidrato de carbono) como análisis cuantitativo. La cromatografía HPLC no requiere una derivatización previa de los hidratos de carbono. Se pueden analizar mezclas complejas de monosacáridos y disacáridos. El detector utilizado es el de índice de refracción.
- Cromatografía de gases ha sido en su mayor parte reemplazada por la cromatografía HPLC. Para la GC, los azúcares deben ser convertidos en derivados volátiles. Los derivados más comúnmente utilizados son los peracetatos de los alditoles. El detector utilizado es el de ionización de llama

Métodos enzimáticos son muy sensibles y muy específicos, presentan el inconveniente de aplicarse a un solo azúcar determinado y por lo tanto no sirven para la resolución de mezclas.

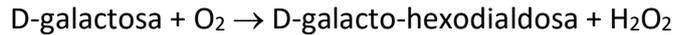
Cuantificación enzimática de monosacáridos distinguimos;

- ✓ Métodos colorimétricos:

A- La glucosa se determina por el sistema glucosa oxidasa - peroxidasa .de la misma forma la galactosa se cuantifica por el sistema galactosa oxidasa - peroxidasa  
La glucosa, en medio acuoso y en presencia de oxígeno disuelto, es oxidada por la glucosa oxidasa a glucolactona que se hidroliza espontáneamente a ácido gluónico



B- Para la galactosa:



El agua oxigenada es inmediatamente reducida por la peroxidasa en luciocoloreado que absorbe entre 500 y 560 nm y cuya concentración es proporcional a la de la glucosa o de la galactosa inicialmente presentes.

#### ✓ Métodos UV

Se aprovecha la propiedad del NADPH, H<sup>+</sup> de absorber en la región del UV próximo. Este método es aplicable a la glucosa y la fructosa

Consta de dos etapas

Primera es la conversión de los azúcares reductores en esteres fosfato, en presencia de ATP y hexoquinasa

Segunda corresponde a la oxidación de la glucosa 6 fosfato por la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa con la reducción simultanea del NADP

La cantidad de NADP reducido a NADPH.H<sup>+</sup> es proporcional a la cantidad de glucosa.

#### 2.3.1.3. Métodos de determinación del almidón

- Método polarimétrico: se basa en la degradación del almidón en glucosa mediante una hidrólisis ácida y posterior medida del poder rotatorio
- Método enzimático: se basa en la transformación completa del almidón en D-glucosa por medio de enzimas purificados específicos para el almidón y la determinación de la D-glucosa liberada mediante un enzima específico para ello,

#### 2.3.2. Glúcidos no digestibles

##### 2.3.2.1 Fibra cruda

Método de Weende o Fibra bruta son todas aquellas sustancias orgánicas no nitrogenadas que no se disuelven tras hidrólisis sucesivas; una en medio ácido y otra en medio alcalino. El principal componente es la celulosa, hemicelulosas y lignina se utiliza en alimentación animal.

Es un ataque con sulfúrico y con kohl ruido final menos el peso de las cenizas obtenido por incineración a 500 °C es la celulosa bruta; en realidad, el residuo está constituido por lignina y una fracción de celulosa de la muestra ; su valor es muy inferior a la masa indigestible.

Las pérdidas de glúcidos indigestibles se deben principalmente al tratamiento alcalino que solubiliza sobre todo las hemicelulosas

### **2.3.2.2 Fibra detergente neutro y ácido detergente**

La fibra detergente neutro hace uso de un detergente neutro, compuesto de EDTA y laurilsulfato y su resultado conduce a la suma de celulosa, lignina y hemicelulosa. Ambos métodos se utilizan para las raciones de rumiantes. Si se trata con un detergente ácido (ácido sulfúrico conteniendo bromuro de cetiltrimetil amonio) el residuo final estará formado por celulosa, lignina y materia mineral asociada.

### **2.3.2.3 Fibra dietética**

La fibra dietética: es la que contiene polisacáridos de los vegetales y lignina resistente a la hidrólisis resistente a la hidrólisis por las enzimas digestivos. Se trata de un método enzimático - gravimétrico, para ello se utiliza con enzimas amilolíticos y proteolíticos para solubilizar el almidón y las proteínas.

La fibra dietética puede ser:

- Fibra insoluble los componentes son la celulosa, la celulosa microcristalina, añadida como ingrediente alimentario, la lignina, las hemicelulosas y el almidón resistente. Presentan escasa capacidad para retener agua y crear así soluciones viscosas tanto en el estómago como en el intestino delgado. Este tipo de fibra actúa principalmente en el intestino grueso aumentando el peso y el volumen de las heces. Este hecho provoca una aceleración del tránsito intestinal y, por consiguiente, un efecto laxante
- Fibra soluble incluye gomas, mucilagos, sustancias pecticas, alginas hemicelulosas, almidón resistente, la inulina, fructoligosacaridos y los galactoligosacaridos. La fibra soluble, una vez que abandona el estómago y llega al colon, es un sustrato altamente fermentable por la microbiota colónica desencadenando efectos beneficiosos con el control de la colesterolemia y de la glucemia entre otros.

La acidez que produce dificulta el crecimiento de microorganismos patógenos en el intestino y presenta un efecto antiinflamatorio, con una acción protectora frente a diferentes patologías del colon como el cáncer. Son compuestos que forman soluciones muy viscosas en agua tanto en el estómago como en el intestino delgado

## **3-MINERALES**

Los minerales son elementos inorgánicos esenciales para el organismo como componentes estructurales y reguladores de los procesos corporales. No pueden ser sintetizados y deben formar parte de la alimentación diaria. Se han descrito aproximadamente 20 minerales esenciales para el hombre. Según las cantidades en que sean necesarios y se encuentren en los tejidos corporales se distinguen tres grupos:

Macroelementos son el calcio, fósforo, sodio, potasio, magnesio, cloro y el azufre, se denominan así por su abundancia,

Microelementos o elementos traza u oligoelementos que se encuentran en cantidades muy pequeñas: hierro, zinc, yodo, selenio, flúor, manganeso, selenio, cromo, cobre o molibdeno

Elementos ultra traza en muchos casos se desconocen sus funciones y necesidades son Boro, silicio, litio, arsénico, níquel, aluminio, cadmio, plomo, cobalto bromo...

Algunos elementos (níquel, cromo, mercurio, cadmio, plomo, cobre, selenio, flúor) se consideran que son tóxicos u oligoelementos en función de su concentración.

### **3.1 -PROPIEDADES GENERALES**

Los minerales se encuentran en el organismo y en el alimento, principalmente, en estado iónico, como cationes por ej.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o como aniones  $\text{F}^-$ , sulfato...

Los minerales también se presentan como componentes de compuestos orgánicos, como fosfoproteínas, fosfolípidos, metaloenzimas y otras metaloproteínas como la hemoglobina.

A diferencia de las vitaminas que pueden ser fácilmente destruidas, los minerales son elementos inorgánicos que siempre mantienen su estructura química. Los minerales no son destruidos o alterados por el calor, el oxígeno o los ácidos, únicamente solo pueden perderse por la lixiviación

Los minerales, como las vitaminas, no suministran energía al organismo pero tienen funciones reguladoras además de su función plástica al formar parte de la estructura de muchos tejidos. Son constituyentes de huesos y dientes (calcio, fósforo y magnesio), controlan la composición de los líquidos extracelulares (sodio, cloro) e intracelulares (potasio, magnesio, y fósforo) y forman parte de enzimas y otras proteínas que intervienen en el metabolismo con las necesarias para la producción y utilización de la energía (hierro, Zinc, fósforo)

### **3.2-DESCRIPCION**

- Potasio actúa como regulador en el balance de agua en el organismo y participa en la contracción del músculo cardíaco
- Calcio forma parte de los huesos, del tejido conjuntivo y de los músculos; Junto con el potasio y el magnesio, es esencial para una buena circulación de la sangre
- Fósforo es también un elemento constituyente de la estructura de los huesos y, en asociación con ciertos lípidos, da lugar a los fosfolípidos, que son componentes esenciales de las membranas celulares y del tejido nervioso: La concentración en sangre de fósforo afecta los impulsos nerviosos y aumenta la secreción de bilis
- Cloro favorece el equilibrio ácido-base en el organismo y ayuda al hígado en su función de eliminación de tóxicos
- Azufre entra en composición de diversas hormonas (insulina) y vitaminas. Neutraliza los tóxicos y ayuda al hígado en la secreción de la bilis
- Hierro es necesario para la producción de hemoglobina. También es imprescindible en la correcta utilización de las vitaminas del grupo B, S
- Su déficit provoca la anemia ferropénica
- Flúor previene la caries dental y fortifica los huesos
- Yodo indispensable para el buen funcionamiento de la glándula tiroides. La carencia del yodo da lugar al bocio
- Manganeso activa las enzimas que intervienen en la síntesis de las grasas y participa en el aprovechamiento de las vitaminas C, B y biotina

- Cobalto contribuye en la formación de los glóbulos rojos ya que forma parte de la vitamina B12 que se puede sintetizar en la flora intestinal
- Cobre es necesario para convertir el hierro almacenado en el organismo en hemoglobina y para asimilar correctamente el de los alimentos
- Zinc interviene en los procesos metabólicos como la producción de linfocitos, la síntesis de proteínas y la formación de insulina,
- Silicio indispensable para la asimilación del calcio, la formación de nuevas células y a la nutrición de los tejidos; Forma parte de la síntesis del colágeno, tendones y tejido conectivo.
- Níquel es necesario para el funcionamiento del páncreas.
- Cromo participa en el transporte de proteínas
- Molibdeno ayuda a prevenir la anemia y la caries
- Selenio potente antioxidante

### 3.3-METODOS DE ANALISIS

- **Determinación de cenizas**, cuando hablamos de cenizas nos referimos al residuo inorgánico que permanece bien sea después de la calcinación o bien tras la oxidación completa de la materia orgánica...

La importancia de las cenizas radica en que representa el contenido total de los elementos inorgánicos de un alimento., esto es importante porque es una parte del análisis inmediato para la evaluación nutricional.

Otras medidas de las cenizas son:

- Cenizas insolubles en ácidos es una medida de la contaminación superficial de las frutas y verduras así como materias primas de piensos como es la alfalfa, generalmente los contaminantes son silicatos que permanecen insolubles en los ácidos excepto en el HBr
- Alcalinidad de las cenizas, las cenizas de frutas y verduras son alcalinas
- Cenizas sulfatadas aplicadas a los azúcares, los jarabes y los aditivos colorantes

#### -Métodos de análisis elemental

En la mayoría de estos métodos se requiere una preparación de la muestra, esto es una destrucción de la materia orgánica

Esto puede ser de dos formas:

Calcinación por vía seca se refiere a la utilización de un horno mufla capaz de mantener la temperatura 500-600°

Calcinación por vía húmeda se oxidan las sustancias orgánicas mediante el uso de ácidos y agentes oxidantes o bien sus combinaciones. Se solubilizan los elementos inorgánicos sin ocasionar su volatilización. Esta se prefiere a la calcinación por vía seca para la preparación del análisis elemental.

Distinguimos

Tratamiento de la muestra con un ácido fuerte y oxidante a ebullición

Por microondas hay que utilizar mezclas de ácidos ya que un solo ácido no produce la oxidación completa y rápida de la materia orgánica.

Las combinaciones de disoluciones ácidas utilizadas son ácido nítrico, ácido sulfúrico/peróxido de hidrógeno y ácido perclórico.

Interferencias: factores tales como el pH, la matriz de la muestra, la temperatura y otras condiciones analíticas así como los reactivos pueden interferir con la capacidad de un método analítico para cuantificar un elemento inorgánico

### **Métodos:**

1.-Volumetría de precipitación cuando al menos uno de los productos de una reacción de valoración es un precipitado insoluble es lo que se conoce como volumetría de precipitación.

Como ejemplo de este tipo de métodos tenemos el método Volhard que es un método de valoración inversa o por retroceso en el cual se añade un exceso de una disolución patrón de nitrato de plata a una solución de la muestra que contiene cloruro.

A continuación de retrovalora el exceso de Ag utilizando una solución valorada de tiocianato de potasio o de amonio en presencia de iones férricos como indicador.

La cantidad de plata que es precipitada por el cloruro presente se calcula sustituyendo el exceso de plata del contenido de plata original

2.-Métodos espectrofotométricos utilizado por ej. Para la determinación del fósforo mediante la reacción de este con el molibdovanadato dando un compuesto coloreado el fosfomolibadtovanadato.

3-Electrodos selectivos de iones miden la reactividad de los iones libres en solución el contacto con un electrodo de la misma naturaleza que la del elemento a determinar. Se utiliza para en análisis,

Ventaja rapidez y facilidad de empleo

Inconveniente ausencia de especificidad debido a las interacciones entre los diferentes iones y su reproducibilidad puede reducirse por pasivación de los electrodos con los elementos orgánicos

4.-Métodos de espectroscopia de absorción y emisión atómicas prácticamente todos los elementos de la tabla periódica pueden ser determinados por estas técnicas.

La espectroscopia de absorción atómica (AAS) cuantifica la absorción de la radiación electromagnética por parte de los átomos neutros aislados, en estado gaseoso mientras que la espectroscopia de emisión atómica (AES) mide la emisión de la radiación procedente de átomos excitados térmicamente o por otros medios.

AAS requiere una fuente de radiación (lámpara de cátodo hueco) específica del elemento para analizar, una fuente de átomos, un dispositivo óptico selección de radiación y un fotomultiplicador asociado a un amplificador.

Distinguimos

AAS que utiliza como fuente de átomos una llama producida por la combustión de una mezcla aire/acetileno o de protóxido de nitrógeno/acetileno

AAS electrotermia (AAS de cámara de grafito) es igual que la de llama a excepción del proceso de atomización. La atomización electrotermica supone el calentamiento de la muestra hasta una temperatura (2000-3000º) que provoca la volatilización y la atomización. Las ventajas de la AAS electrotermica frente a la de llama es que puede aceptar muestras más pequeñas y que los límites de detección son más bajos.

AAS generador de hidruros es una técnica que permite medir concentraciones más bajas de elementos que tienen la propiedad de formar hidruros metálicos volátiles en presencia de un agente reductor con el BNa .Poe ej. El  $\text{Se}^{4+}$  se convierte en  $\text{SeH}_2$ , en presencia de  $\text{NaBH}_4$ .

Espectroscopia de emisión atómica (EAA) el uso del plasma acoplado inductivamente permite alcanzar temperaturas superiores a los 10.000ºC, energía suficiente para analizar los principales oligoelementos y los metales pesados

EL ICP-AES equipado con un generador de hidruros y un espectrómetro de masas, ofrece muy buenos resultados. El espectrómetro de masas separa los iones producidos por la antorcha del plasma en función de su masa antes de producir su distribución en forma de espectro

Estas técnicas permiten el análisis multielemental

#### **4. BIBLIOGRAFIA**

Biología de COU Ed Anaya

Análisis nutricional de los alimentos Ed Acribia I.S.B.N 84-200-0919-9

Análisis de los alimentos Suzanne Nielsen Ed Acribia

Química de los alimentos Salvador Badui Ed.Pearson

Química de los alimentos Grosch 2ª edición.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 25**

**VITAMINAS. CLASIFICACIÓN. FUNCIÓN. MÉTODOS DE ANÁLISIS  
APLICADOS A SU DETERMINACIÓN.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. VITAMINAS**

### **2. CLASIFICACIÓN. FUNCIONES. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **2.1. VITAMINAS LIPOSOLUBLES**

2.1.1. VITAMINA A

2.1.2. VITAMINA D

2.1.3. VITAMINA E

2.1.4. VITAMINA K

#### **2.2. VITAMINAS HIDROSOLUBLES**

2.2.1. VITAMINA B1 O TIAMINA

2.2.2. VITAMINA B2 O RIBOFLAVINA

2.2.3. NIACINA O VITAMINA B3

2.2.4. ÁCIDO PANTOTÉNICA O VITAMINA B5

2.2.5. VITAMINA B6 O PIRODOXINA

2.2.6. BIOTINA O VITAMINA B8

2.2.7. FOLATOS O VITAMINA B9

2.2.8. VITAMINA B12

2.2.9. ÁCIDO ASCÓRBICO O VITAMINA C

## 1. VITAMINAS

Las vitaminas son micronutrientes orgánicos, sin valor energético, necesarias en muy pequeñas cantidades y esenciales para el funcionamiento normal del cuerpo y para mantener la salud. Se encuentran en pequeñas cantidades en todos los alimentos, excepto en los que están muy refinados. Las vitaminas, como sugiere su etimología (del latín *vita*, vida) son importantes para la vida del organismo y para la función metabólica. Estas sustancias fueron estudiadas por primera vez en 1911, por el bioquímico Casimir Funk.

Debido a que el organismo no es capaz de producir vitaminas, éstas tienen que ser aportadas con los alimentos en cantidades bajas, es por ello la importancia de una alimentación o dieta equilibrada, y sobretodo variada para obtenerlas todas, ya que no existe un alimento que contenga todas las vitaminas.

El Reglamento nº 1925/2006 regula la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos

La carencia de vitaminas o un desequilibrio vitamínico, produce la denominación avitaminosis, que pueden llegar a ocasionar patologías o trastornos tan graves como raquitismo, el escorbuto, la esterilidad o la pérdida de la capacidad de coagulación de la sangre. Sin embargo, si algunas de las vitaminas son administradas en exceso, pueden producir también alteraciones llamadas hipervitaminosis.

Las vitaminas son 13 compuestos con estructuras químicas orgánicas diversas que aunque no producen energía si actúan en el control de diversas reacciones propias del anabolismo y del catabolismo. Esta actividad biológica no es exclusiva de un solo compuesto debido a que varias sustancias llamadas vitámeros cumplen la misma función aunque con diferente poder vitamínico.

En muchos alimentos las vitaminas se encuentran en una forma química inactiva que requieren activarla o hacerlas biodisponibles, y en otros casos existen provitaminas o precursores que son susceptibles de ser parcialmente convertidas en vitaminas por el organismo durante el metabolismo, como los carotenoides que se convierten en vitamina A.

El contenido vitamínico de los alimentos es muy variable, por lo que en muchas ocasiones se adicionan vitaminas sintetizadas químicamente o se intenta mejorar la calidad nutritiva buscando alternativas en este procesado. Además también influyen algunas reacciones químicas en el deterioro causadas por el pH, altas temperaturas, por compuestos propios del alimento o por los aditivos añadidos. De todos estos factores la lixiviación (extracción del sólido por un líquido) y las altas temperaturas son los máximos responsables de la pérdida de las vitaminas en los alimentos.

Los ensayos de vitaminas se pueden clasificar:

- Bioensayos involucrando a animales y seres humanos
- Ensayos microbiológicos

- Ensayos fisicoquímicos los cuales incluyen los métodos espectrofotométricos, los fluorimétricos, los cromatográficos, los enzimáticos, los inmunológicos y los radiométricos

Los ensayos de vitaminas implican la extracción de una vitamina de su matriz biológica, lo cual incluye uno o varios de los siguientes tratamientos: el calor, el ácido, el álcalis, los disolventes y los enzimas.

En general, los procedimientos de extracción son específicos para cada vitamina y están diseñados para estabilizar la vitamina.

## **2. CLASIFICACIÓN. FUNCIONES.MÉTODOS DE ANALISIS.**

Debido a que las vitaminas no pertenecen a un grupo específico de compuestos y tienen estructuras químicas muy diferentes entre sí, se han clasificado en función de su solubilidad, en liposolubles e hidrosolubles.

### **2.1. VITAMINAS LIPOSOLUBLES: A, D, E Y K.**

Las vitaminas de este grupo son solubles en disolventes orgánicos y en aceites. Comercialmente existen preparaciones microencapsuladas en gomas y en otros polímeros hidrófilos que las hacen estables en disoluciones acuosas. Se almacenan con facilidad en el tejido adiposo.

La función general es promover la asimilación de otros nutrientes en el organismo. En concreto, las liposolubles, tienen un papel fundamental en el crecimiento y la protección de los tejidos del cuerpo.

#### **2.1.1. VITAMINA A:**

También llama retino, se encuentra sólo en el reino animal, principalmente en el hígado, la leche, huevos y pescado.

Puede presentarse en la forma retinoides de alcohol o retinol, o de aldehído o retinal y de ac.retinoico. (Vitamina A ya preformada).

En los vegetales no existe como tal pero si como sus provitaminas o precursores carotenoides de los cuales el  $\beta$ -caroteno es el más importante. Se trata de provitamina A que se convierte a retinol en el organismo. Se encuentra en vegetales (zanahorias, espinacas, grelos,...)

#### **Funciones de la vitamina A:**

Esencial para prevenir la ceguera, para la visión, para un adecuado crecimiento y funcionamiento del sistema inmunitario y para mantener la piel y las mucosas sanas pues participa en la síntesis proteica y diferenciación celular.

Su deficiencia provoca la xeroftalmia (principal causa de ceguera en los niños). Su falta disminuye la resistencia a las infecciones y produce alteraciones digestivas, nerviosas y musculares.

#### **Determinación analítica de la vitamina A:**

Su determinación cuantitativa tradicional no discrimina entre los isómeros y mide la cantidad total, motivo por el cual se acude a la cromatografía líquida de alta resolución HPLC fase normal o fase inversa, con detección por fluorescencia o ultravioleta, a 325 nm como longitud de excitación y 489 nm como longitud de emisión.

Es importante saber que la adición de la vitamina se hace mediante esteres por lo que para su determinación por HPLC se lleva a cabo una saponificación previa con metanol o etanol, agua, hidróxido potásico y un antioxidante como el ácido ascórbico debido a su inestabilidad.

Durante la hidrólisis alcalina, se llevan a cabo diferentes reacciones químicas que comprenden la liberación de las vitaminas esterificadas. Las grasas se transforman en jabones que se separan fácilmente de las vitaminas al utilizar solventes orgánicos en los cuales son insolubles y un gran número de compuestos, entre ellos los pigmentos, que pueden interferir en la determinación analítica, son transformados a compuestos de menor peso molecular que se solubilizan en agua.

### 2.1.2. VITAMINA D:

La vitamina D de efecto antirraquítico se encuentra en diversas formas; las dos más importantes son la vitamina D<sub>2</sub>, ergocalciferol, previamente conocida como calciferol y la vitamina D<sub>3</sub>, colecalciferol. A su vez estos dos vitámeros tienen sus precursores en el organismo humano, el ergosterol y el 7-dehidrocolesterol respectivamente, sin actividad biológica pero que se transforman en la respectiva vitamina cuando se irradian con la luz ultravioleta del sol.

#### Funciones de la Vitamina D

Interviene en la mineralización de los huesos pues favorece la absorción intestinal de Ca y P y aumenta su reabsorción renal.

Se obtiene de pescados, yema de huevo, lácteos, mantequilla y principalmente de la síntesis cutánea por la radiación UV a partir de un precursor que se encuentra en la piel.

Su deficiencia da lugar al raquitismo en los niños y la osteomalacia en los adultos

Sus distintas formas comerciales se han utilizado para enriquecer la leche y resisten bien los tratamientos térmicos pero se oxidan en contacto con el oxígeno y la luz.

#### Determinación analítica de la vitamina D:

El bajo nivel hace difícil determinar los niveles naturales de la vitamina D en los alimentos.

La HPLC ofrece actualmente el método de análisis más adecuado para la determinación de vitamina D en un amplio rango de alimentos incluso a bajos niveles de concentraciones naturales. Se realiza como en el caso anterior un proceso de saponificación y si se está trabajando con muestras de alimento es necesario purificar los extractos utilizando cromatografía semipreparativa para concentrar el extracto. La purificación se lleva a cabo por cromatografía en fase reversa, utilizando metanol-agua como fase móvil, o en fase normal.

Si ha de determinarse la vitamina D3, se agrega D2 como estándar interno. Si ha de determinarse la vitamina D2, se agrega D3 como estándar interno.

### 2.1.3. VITAMINA E:

Con este nombre se conocen 8 compuestos de la familia de los tocoferoles y de los tocotrienoles. El  $\alpha$ -tocoferol es el más abundante en los alimentos y por ser el más activo biológicamente se toma como referencia para medir la potencia del resto de los isómeros.

El producto comercial sintético de acetato es en realidad una mezcla de todos los isómeros y tiene una actividad biológica del 80% del  $\alpha$ -tocoferol.

Entre las fuentes más ricas de vitamina E están los cereales, germen de cereales y la mayoría de las semillas oleaginosas, nueces y aceites. La vitamina E también se encuentra en los vegetales con hojas (lechuga, espinaca, repollo, puerro), en la grasa animal y también en la leche, mantequilla y queso.

Puede destruirse fácilmente por acción del calor y del oxígeno del aire.

#### Funciones de la vitamina E:

Es beneficiosa para el sistema circulatorio, tiene propiedades antioxidantes, es beneficiosa para la vista y ayuda en la prevención de la enfermedad de Parkinson. Su función es prevenir el deterioro celular y se caracteriza por su valor antioxidante para retrasar el crecimiento celular.

#### Determinación analítica de la vitamina E:

Como en los casos anteriores se realiza una etapa de saponificación previa.

Posteriormente se utiliza HPLC para su determinación analítica. Principalmente, pueden utilizarse dos modos de cromatografía (fase normal y fase reversa) para la cuantificación de los tocoferoles. El sistema de fase normal tiene claras ventajas dado que todos los vitámeros son separados mientras que los sistemas de fase reversa no separan  $\beta$ -tocoferol de  $\gamma$ -tocoferol.

La detección se realiza preferentemente mediante fluorescencia.

### 2.1.4. VITAMINA K:

La fitoquinona (K1) y menaquinona (K2) se encuentran en el hígado, el huevo, la espinaca, brócoli, col. Es estable al calor pero algo sensible a la luz, normalmente existen pocas pérdidas durante los distintos tratamientos y procesos a los que se someten los alimentos.

#### Funciones de la vitamina K:

Está implicada en los procesos de coagulación de la sangre y también interviene en la generación de globulos rojos.

Existen varios vitámeros naturales aunque los dos principales son la vitamina K1 o filoquinona presente en las hojas de las plantas y la vitamina K2 o menaquinona sintetizada por las

bacterias intestinales. Las de origen sintético son incluso más potentes destacando la menadiona.

#### Determinación analítica de la vitamina K:

El análisis se realiza por cromatografía HPLC con detector en UV o medida electroquímica.

Los problemas relacionados a la cuantificación son similares a aquellos de la vitamina D3: bajas concentraciones e interferencias con las matrices de los alimentos, además de su inestabilidad. Por lo tanto se realiza una prepurificación con HPLC semipreparativa seguida por HPLC analítico para la cuantificación.

Dado que la vitamina K1 no es estable bajo condiciones alcalinas, se agrega fenilacetato de colesterol como estándar interno y la vitamina es extraída con hexano.

## 2.2. VITAMINAS HIDROSOLUBLES

Las vitaminas hidrosolubles no se almacenan en el cuerpo. Las 9 vitaminas hidrosolubles son vitamina C y todas las vitaminas B. Los excedentes o las cantidades excesivas de estas vitaminas salen del cuerpo a través de la orina. Deben consumirse regularmente para evitar carencias o deficiencias en el organismo. La vitamina B12 es una excepción, puede almacenarse en el hígado durante muchos años.

Las personas tienen una capacidad limitada para almacenar las vitaminas hidrosolubles de modo que se requiere un consumo continuo a pesar de que algunas son sintetizadas por la flora intestinal y una fracción se absorbe.

Por ser solubles en agua, la lixiviación es un mecanismo común de pérdida para todas ellas, es decir, se pierden en el agua de lavado, de remojo, en la cocción y en cualquier proceso que involucre el contacto con el agua.

### 2.2.1. VITAMINA B1 O TIAMINA:

La tiamina existe en la naturaleza como tiamina, monofosfato de tiamina, difosfato de tiamina, trifosfato de tiamina y unida a las proteínas. Las principales fuentes de vitamina B1 son los granos de los cereales, cáscara de arroz, germen de cereales, levaduras, clara de huevo, vegetales, frutas, patatas, huevos, leche, hígado y carne.

Debido a su estructura química, junto con el ácido ascórbico, la tiamina es una de las vitaminas más inestables sobre todo afectada por el pH y el calor, incluso se sugiere como índice de retención de nutrientes considerando que si soporta un determinado proceso las otras vitaminas también se conservan.

#### Funciones de la Tiamina:

Forma parte de una coenzima que interviene en el metabolismo energético y participa en la síntesis y metabolización de los hidratos de carbono. Participa también en la absorción de glucosa por parte del sistema nervioso.

La tiamina también influye en cuestiones relacionadas a la visión y a la salud ocular, es por eso que su deficiencia también puede causar enfermedades como el glaucoma.

Ayuda a prevenir enfermedades renales en personas que padecen diabetes.

#### Determinación analítica de Tiamina:

El método más ampliamente utilizado para la determinación de la vitamina B1, incluye una hidrólisis ácida seguida por una defosforilación enzimática de los ésteres y la cuantificación de la tiamina liberada.

La medición de la vitamina B1 en el extracto final se realiza mediante fluorometría después de oxidar a tiocromo que es un compuesto fluorescente. Más recientemente, se han publicado procedimientos por HPLC que se utilizan para cuantificar el propio tiocromo o a través de una derivatización postcolumna.

#### 2.2.2. VITAMINA B2 O RIBOFLAVINA:

La riboflavina se encuentra en los alimentos como riboflavina libre o fosforilada e integra el dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y el mononucleótido de flavina (FMN). Ambos compuestos son sensibles a la luz y a la radiación UV, pero son estables al calor y al oxígeno atmosférico.

Las principales fuentes de vitamina B2 son hígado, riñón, carne, pescado, leche, queso, huevos y vegetales.

La solubilidad de la riboflavina en el agua es más bien deficiente pero en álcalis diluido es fácilmente soluble.

#### Funciones de la Riboflavina:

Regulan los procesos de transferencia de hidrógenos en reacciones de oxidorreducción de aminoácidos y de otros compuestos.

Ayuda a nuestro organismo a sintetizar los ácidos grasos, mantener una visión normal, una piel saludable y a metabolizar la glucosa.

#### Determinación analítica de Riboflavina:

La vitamina B2 se extrae de la matriz alimentaria mediante hidrólisis ácida seguida por una etapa de defosforilación enzimática.

Se logra la mejor cuantificación y separación utilizando HPLC de fase reversa y el modo de detección es preferentemente realizado por fluorescencia dado que éste es más selectivo.

#### 2.2.3. NIACINA O VITAMINA B3:

Con este nombre se designa a dos vitámeros: el ácido nicotínico que se encuentra en las plantas y su correspondiente amida, la nicotinamida del reino animal que se produce a partir del triptófano.

A pesar de encontrarse ampliamente en la naturaleza, no está disponible. El tratamiento térmico -alcalino hace que la niacina esté disponible y también facilita el aprovechamiento del triptófano, precursor de esta vitamina en el organismo humano.

### Función de la Niacina:

La nicotinamida es indispensable para dos coenzimas que se encargan de la transferencia de hidrógenos en muchas reacciones metabólicas que actúan sobre las proteínas, hidratos de carbono y lípidos. Su deficiencia da lugar a la enfermedad pelagra, que ocasiona problemas de diarrea, dermatitis y demencia (enfermedad de las 3D).

### Determinación analítica de Niacina:

La determinación de la niacina se realiza mejor por un método microbiológico. El microorganismo de ensayo es *Lactobacillus plantarum*

El ensayo que usa la reacción de Königs es muy tedioso, necesita mucha experiencia y tiene una seria desventaja debido a los reactivos. Sin embargo, se obtienen resultados buenos y reproducibles.

### 2.2.4. ÁCIDO PANTOTÉNICO O VITAMINA B5:

Tiene una amplia distribución en la naturaleza.

Se encuentra en muchos alimentos, tanto en la forma libre como ligada. Se encuentra comúnmente en su forma alcohol, la provitamina pantenol y como pantotenato de calcio. Se encuentra en cereales, levaduras, hígado, huevo, leche, etc..

La estabilidad de esta proteína depende mucho del pH, siendo bastante estable a un pH entre 4-7, a pH más extremos puede sufrir hidrólisis ácida o alcalina.

### Función del ac.pantoténico:

El ácido pantoténico es necesario para formar la coenzima A y se considera crítico en el metabolismo y síntesis de carbohidratos, proteínas y grasas (interviene en una amplia variedad de procesos celulares).

Su deficiencia conduce a la irritabilidad, debilidad, insomnio y alteraciones de la función inmune.

### Determinación analítica del ácido pantoténico:

El ácido pantoténico debe ser liberado previamente.

La determinación de D-pantotenato suplementado en los alimentos se realiza mejor por un método microbiológico. El microorganismo de ensayo es *Lactobacillus plantarum*.

Su determinación también puede llevarse a cabo mediante HPLC-fluorimétrico.

### 2.2.5. VITAMINA B6 O PIRIDOXINA:

Reciben este nombre tres vitámeros biológicamente activos con una estructura química semejante: piridoxina o piridoxol (alcohol), piridoxal (aldehído) y piridoxamina (derivado amina).

En los vegetales se encuentra como piridoxol y en los alimentos de origen animal como piridoxal o piridoxamina.

Los tres vitámeros resisten la mayoría de los tratamientos térmicos, pero la piridoxina es el más estable de todos ellos por lo que es la forma que se utiliza para la fortificación

#### Funciones de la Piridoxina:

En forma de fosfato el piridoxal es la coenzima de un gran número de reacciones metabólicas implicadas en la síntesis de proteínas y de lípidos y en la producción de aminos indispensables como es la serotonina, adrenalina, dopamina etc. Su deficiencia causa desórdenes nerviosos, convulsiones y neuropatías.

#### Determinación analítica de Piridoxina:

El ensayo de vitamina B6 se realiza mediante un método microbiológico. Es necesaria una hidrólisis ácida prolongada para las muestras de origen animal. La respuesta del microorganismo de ensayo no es igual para todos los vitámeros.

#### 2.2.6. BIOTINA O VITAMINA B8:

La biotina se encuentra parcialmente en estado libre en vegetales, frutas, leche, salvado de arroz y parcialmente en forma unida a proteína en tejidos animales, semillas de plantas, levaduras. Fuentes importantes de biotina son el hígado, riñón, carne, levadura, yema del huevo, leche, hongos y vegetales.

#### Funciones de la biotina:

Interviene en el metabolismo de grasas, aminoácidos, hidratos y purinas, y se utiliza para problemas de cabello, la dermatitis seborreica o incluso para la diabetes.

#### Determinación analítica de la Biotina:

La determinación de D-biotina se realiza mediante método microbiológico.

El microorganismo de ensayo es *Lactobacillus plantarum*

La liberación de la biotina unida es realizada en forma óptima por hidrólisis ácida seguida por una digestión enzimática.

#### 2.2.7. FOLATOS O VITAMINA B9:

Son un grupo de compuestos que se diferencian por el número de residuos de ácido glutámico que contiene. El ácido fólico es el más importante y el más representativo, se utiliza para fortificar alimentos pero se destruye por oxidación la cual se acelera por las temperaturas altas.

El ácido fólico se encuentra en la naturaleza principalmente como conjugados y se encuentra en el hígado, riñón, músculos, leche, queso, vegetales de hoja oscura, coliflor, legumbres y germen de trigo.

#### Funciones de folatos:

Esta vitamina es muy importante para el funcionamiento y desarrollo del sistema nervioso central, compuesto por el encéfalo y la médula espinal y se necesita para la formación de los glóbulos rojos.

Su déficit causa anemia megaloblastica y defectos del tubo neural del feto.

#### Determinación analítica del ácido fólico:

El ensayo de la actividad del folato natural necesita de un tratamiento con deconjugasa ya que al presentar diferentes unidades de ácido glutámico es necesario someter al extracto de la muestra a un tratamiento enzimático.

La determinación se realiza mejor a través de un método microbiológico. El uso de *Lactobacillus casei* resistente al cloranfenicol como microorganismo de ensayo facilita el ensayo en forma considerable

También puede determinarse por un método HPLC-UV y el ácido tetrahidrofólico con fluorescencia.

#### 2.2.8. VITAMINA B12:

Presenta varios vitámeros y su estructura química es la más compleja de todas.

La presentación comercial más común de esta vitamina, que es la que se adiciona a los alimentos para su fortificación es la forma cianocobalamina.

Esta vitamina NO existe en alimentos vegetales y sólo se encuentra en la leche, la carne, el huevo y otros productos de origen animal como hígado, corazón y riñones. Debido a que los microorganismos la sintetizan, los alimentos fermentados la contienen y por ello muchas de sus preparaciones comerciales provienen de fermentaciones.

#### Funciones de la vitamina B12:

Interviene en la formación de glóbulos rojos y en el crecimiento y división celular. Así como en la formación de ADN y ARN.

#### Determinación analítica de la vitamina B12

El nivel presente en los alimentos es muy bajo y el método microbiológico es la única manera de estimar la vitamina B12 en forma satisfactoria. Los ensayos con *Lactobacillus leichmanii* son los más empleados.

#### 2.2.9. ÁCIDO ASCÓRBICO O VITAMINA C:

Existen varias sustancias que presentan una actividad biológica de vitamina C, pero son el ácido L-ascórbico y el ácido L-dehidroascórbico los dos isómeros que actúan como tal.

Se encuentra principalmente en vegetales frescos por lo que es necesario el consumo rutinario de frutas y verduras para obtener la cantidad requerida de esta vitamina y debido a su carácter hidrosoluble no es posible almacenarla en el organismo.

Es la vitamina más inestable (se oxida rápidamente) y la más reactiva debido a su estructura química por lo que su contenido residual en alimentos se usa como índice de retención de nutrientes.

Además del ácido ascórbico comercialmente existen los L-ascorbatos de sodio, potasio y calcio, así como el palmitato de L-ascorbilo que se añaden a los alimentos por su función como nutrientes, antioxidante, secuestrante y conservador.

#### Función del ácido ascórbico:

Es necesaria para la síntesis del colágeno, para la formación de los huesos, de la dentina de los dientes, de los cartílagos y de las paredes de los capilares sanguíneos; interviene en reacciones de óxidoreducción y de hidroxilación de hormonas esteroideas y aminoácidos aromáticos. Es fundamental para la regeneración de la vitamina E después de actuar como antioxidante celular y para la absorción intestinal del hierro.

Su deficiencia produce el escorbuto.

#### Determinación analítica del ácido ascórbico:

La determinación del ácido ascórbico puede realizarse fácilmente mediante titulación con DCFI (2,6-diclorofenolindofenol). El DCFI es de color azul profundo pero incoloro cuando es reducido por ácido ascórbico, pero sólo se está determinando el ácido ascórbico (AA), no su forma oxidada (ácido dehidroascórbico o ADA) y en algunos casos pueden ocurrir interferencias.

El método de Deutsch y Weeks (medición de ADA después de la oxidación de todo el AA). El ADA formado es luego derivatizado con o-fenilendiamina para formar un derivado fuertemente fluorescente, que puede cuantificarse fácilmente por la comparación con soluciones estándares.

Si ha de determinarse el ácido ascórbico "total", HPLC puede proporcionar una alternativa confiable suponiendo que utilizan condiciones apropiadas de extracción para la reducción ADA a AA previo a cuantificación con HPLC.

La determinación del conjunto de vitaminas hidrosolubles es de elevada aplicabilidad, aunque su análisis sea complejo debido a la inestabilidad de los analitos. La tendencia es llevar a cabo una separación cromatográfica de las diferentes vitaminas y su posterior determinación con técnicas de espectrometría de masas, de tal forma, que el análisis se simplificaría bastante al analizar todas ellas en conjunto.

## **BIBLIOGRAFÍA**

<https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-cap-11-vitaminas.pdf>.

<https://www.fao.org/3/ah833s/AH833S19.htm>. FAO. Capítulo 17.

<https://medineplus.gov>

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 26**

**ADITIVOS ALIMENTARIOS. DEFINICIÓN. CLASIFICACIÓN. LISTAS POSITIVAS. CRITERIOS DE PUREZA. NORMATIVA APLICABLE. MÉTODOS DE ANÁLISIS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. DEFINICIÓN**

### **2. CLASIFICACIÓN**

2.1. Colorantes

2.2. Conservantes o conservadores

2.3. Antioxidantes

2.4. Espesantes, emulgentes, espumantes, gelificantes y estabilizantes

2.5. Acidulantes, Correctores de acidez y estabilizantes

2.6. Potenciadores del sabor

2.7. Edulcorantes

2.8. Otros aditivos

### **3. LISTAS POSITIVAS**

### **4. CRITERIOS DE PUREZA**

### **5. NORMATIVA APLICABLE**

### **6. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

## **1. DEFINICIÓN**

Los aditivos son sustancias que se añaden a los alimentos con un propósito tecnológico (para mejorar su aspecto, textura, resistencia a los microorganismos, etc.) en distintas etapas de su fabricación, transporte o almacenamiento.

El Reglamento (CE) nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios define aditivo alimentario como “toda sustancia que normalmente no se consume como alimento en sí misma ni se use como ingrediente característico de los alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada (con un propósito tecnológico) a un alimento durante su fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento tenga por efecto, o quepa razonablemente prever que tenga por efecto, que el propio aditivo o sus subproductos se conviertan directa o indirectamente en un componente del alimento”

Según este Reglamento, no se consideran aditivos alimentarios:

- Los monosacáridos, disacáridos u oligosacáridos utilizados por sus propiedades edulcorantes ni los alimentos que los contengan.
- Los alimentos, ya sea deshidratados o concentrados, incluidos los aromatizantes, incorporados durante la fabricación de alimentos compuestos por sus propiedades aromáticas, sápidas o nutritivas y con un efecto colorante secundario.
- Las sustancias utilizadas en los materiales de recubrimiento o revestimiento que no formen parte de los alimentos y que no estén destinadas a ser consumidas con ellos.
- Los productos que contengan pectina y estén derivados de pulpa de manzana deshidratada o pieles de cítricos o membrillos, o de una mezcla de ambos, por la acción de un ácido diluido seguida de una neutralización parcial con sales de sodio o potasio («pectina líquida»).
- Las gomas base para chicle.
- La dextrina blanca o amarilla, el almidón tostado o dextrinado, el almidón modificado por tratamiento ácido o alcalino, el almidón blanqueado, el almidón modificado por medios físicos y el almidón tratado con enzimas amilolíticas,
- El cloruro de amonio.
- El plasma sanguíneo, la gelatina comestible, los hidrolizados de proteínas y sus sales, la proteína láctea y el gluten.
- Los aminoácidos y sus sales, a excepción del ácido glutámico, la glicina, la cisteína y la cistina y sus sales sin función tecnológica.
- Los caseinatos y la caseína.
- La inulina.

Para facilitar su uso, etiquetado y reconocimiento internacional los aditivos se nombran mediante un código compuesto por una letra (que si son de la normativa europea es la letra "E") seguida de tres cifras; la cifra de las centenas hace referencia al tipo de aditivos, clasificados en grupos.

Las otras cifras corresponden, además de al aditivo, a la familia y a la especie. Las demás categorías son solamente provisionales y tienden a modificarse frecuentemente.

El hecho de que un aditivo tenga asignado un número E da garantías de que el aditivo ha pasado controles de seguridad y que ha sido aprobado para su uso en la Unión Europea.

## **2. CLASIFICACIÓN**

Los aditivos alimentarios podrán asignarse a una de las clases funcionales descritas en el anexo I del Reglamento (CE) nº 1333/2008 sobre la base de su función tecnológica principal. La asignación de un aditivo alimentario a una clase funcional no impedirá que se utilice para varias funciones. A continuación se describen algunas de esas clases funcionales.

### **2.1. Colorantes**

Son sustancias que dan color a un alimento o le devuelven su color original; pueden ser componentes naturales de los alimentos y sustancias naturales que normalmente no se consumen como alimentos en sí mismas ni se emplean como ingredientes característicos de los alimentos. También se consideran colorantes los preparados obtenidos a partir de alimentos y otros materiales comestibles naturales de base mediante una extracción física, química, o física y química, conducente a la separación de los pigmentos respecto de los componentes nutritivos o aromáticos.

Un aditivo alimentario podrá incluirse en la lista comunitaria del anexo II dentro de la clase funcional de los colorantes únicamente si, además de servir a uno o varios de los fines generales para la inclusión de aditivos alimentarios, sirve a unos o varios de los siguientes fines:

- devolver la apariencia original a un alimento cuyo color se haya visto afectado por la transformación, el almacenamiento, el envasado y la distribución, pudiendo haber quedado mermado su atractivo visual.
- aumentar el atractivo visual de los alimentos.
- dar color a un alimento que, de otro modo, sea incoloro.

Existe un amplio número de aditivos colorantes autorizados. Algunos de ellos son el caroteno, la clorofila, antocianinas, riboflavina, curcumina, etc.

### **2.2. Conservantes o conservadores**

Son sustancias que prolongan la vida útil de los alimentos protegiéndolos del deterioro causado por microorganismos o que protegen del crecimiento de microorganismos patógenos.

Los conservantes químicos desempeñan por regla general una función inhibidora de gérmenes y se distingue entre:

- Efecto antimicótico: contra mohos
- Efecto antiputrefáctico: contra agentes saprógenos

- Efecto antilevaduras: contra los agentes fermentativos.

Los conservantes indicados en la lista de aditivos alimentarios de la Unión están identificados por el código E-2xx. Entre los más importantes se encuentran:

- Ácido Sórbico y sus sales potásica y cálcica (E200, E202 y E203), tienen efecto antimicótico principalmente, aunque también tiene la capacidad de impedir el crecimiento de otros microorganismos en tanto que inhibe sus procesos fisiológicos de deshidrogenación.
- Ácido benzoico y sus sales (E21x) es especialmente eficaz en alimentos ácidos, con efecto contra levaduras, bacterias (menos) y mohos. Sus principales inconvenientes son el que tiene un cierto sabor astringente poco agradable y su toxicidad, que aunque relativamente baja, es mayor que la de otros conservantes.
- Anhídrido sulfuroso y sulfitos (E22x) es un aditivo autolimitante en su uso, en el sentido de que por encima de una cierta dosis altera las características gustativas del producto. Es especialmente eficaz en medio ácido, inhibiendo bacterias y mohos, y en menor grado, levaduras. Actúa destruyendo la tiamina.

### **2.3. Antioxidantes**

Son sustancias que prolongan la vida útil de los alimentos protegiéndolos del deterioro causado por la oxidación, como el enranciamiento de las grasas y los cambios de color.

Para evitar el deterioro, los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos:

- Deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas.
- Eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o el presente en el espacio que queda sin llenar en los envases.
- Eliminando las trazas de ciertos metales, como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación.

Entre los antioxidantes más importantes se encuentran el ácido ascórbico y algunos derivados, el tocoferol, el ácido tartárico, el ácido ortofosfórico y el ácido cítrico.

### **2.4. Espesantes, emulgentes, espumantes, gelificantes y estabilizantes**

**Espesantes:** Son sustancias que aumentan la viscosidad de un alimento. Los espesantes alimentarios frecuentemente están basados en polisacáridos (almidones o gomas vegetales), proteínas (yema de huevo, colágeno). Algunos ejemplos comunes son el agar-agar, alginato, carragenano, colágeno, almidón de maíz, gelatina, goma guar, goma de algarrobo, pectina y goma xantana. Algunos agentes espesantes son agentes gelificantes que forman un gel que se disuelve en la fase líquida como una mezcla coloidal que forma una estructura interna débilmente cohesiva.

**Emulgentes:** Son sustancias que hacen posible la formación o el mantenimiento de una mezcla homogénea de dos o más fases no miscibles, como el aceite y el agua, en un producto alimenticio.

Un emulgente muy empleado es la lecitina, procedente de la soja y del huevo. También son empleados los esteroides, los monoglicéridos y diglicéridos.

Existen emulgentes sintéticos como los polisorbatos y los ésteres de sorbitano.

**Espumantes:** Son sustancias que hacen posible formar una dispersión homogénea de una fase gaseosa en un producto alimenticio líquido o sólido.

**Estabilizantes:** Son sustancias que posibilitan el mantenimiento del estado físico-químico de un producto alimenticio; incluyen las sustancias que permiten el mantenimiento de una dispersión homogénea de dos o más sustancias no miscibles en un producto alimenticio, las que estabilizan, retienen o intensifican el color de un producto alimenticio y las que incrementan la capacidad de enlace de los alimentos, en especial el entrecruzamiento de las proteínas, que permite unir trozos de alimento para formar un alimento reconstituido.

**Gelificantes:** Son sustancias que dan textura a un alimento mediante la formación de un gel. Algunos ejemplos son el agar-agar, alginato, carragenano, colágeno, almidón de maíz, gelatina, goma guar, goma de algarrobo, pectina y goma xantana

## **2.5. Acidulantes, Correctores de acidez y estabilizantes**

**Acidulantes:** Son sustancias que incrementan la acidez de un producto alimenticio o le confieren un sabor ácido, o ambas cosas. Los acidulantes actúan también como conservantes reguladores del pH, que provocan la inhibición del crecimiento microbiano y ayudan a mantener la calidad óptima del producto. Además, ayudan a reforzar el sabor y son un complemento indispensable de la aromatización de ciertos alimentos.

Algunos acidulantes importantes son el ácido acético, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido láctico y el ácido málico.

**Correctores de acidez:** Son sustancias que alteran o controlan la acidez o alcalinidad de un producto alimenticio. Pueden tratarse por lo tanto de ácidos o bases con el fin de regular el pH del producto alimenticio.

En ocasiones disimulan el exceso de dulzor de algunos alimentos o bebidas. Pueden aumentar la actividad de muchos aditivos que son antioxidantes. Estas sustancias pueden funcionar como neutralizante o de equilibrador del efecto de los ácidos.

Pueden influir de forma importante en la conservación de los productos, evitando el crecimiento microbiano y también contribuyendo en la retención de compuestos volátiles.

**Antiaglomerantes:** Son sustancias que reducen la tendencia de las partículas de un producto alimenticio a adherirse unas a otras.

## **2.6. Potenciadores del sabor**

Son sustancias que realzan el sabor o el aroma, o ambos, de un producto alimenticio.

Los potenciadores del sabor son sustancias que, a las concentraciones que se utilizan normalmente en los alimentos, no aportan un sabor propio, sino que potencian el de los otros componentes presentes. Además influyen también en la sensación de "cuerpo" en el paladar y en la de viscosidad, aumentando ambas. Esto es especialmente importante en el caso de sopas y salsas, aunque se utilizan en muchos más productos.

Los más importantes son el ácido L-glutámico y los glutamatos, el ácido guanílico y los guanilatos, y el maltol y etil-maltol, estos últimos empleados para resaltar los sabores dulces.

## **2.7. Edulcorantes**

Son sustancias que se emplean para dar un sabor dulce a los alimentos o en edulcorantes de mesa. Son aditivos alimentarios diferentes de los azúcares mono o disacáridos que confieren a un alimento un sabor dulce. Un aditivo alimentario podrá incluirse en la lista comunitaria dentro de la clase funcional de los edulcorantes únicamente si, sirve a unos o varios de los siguientes fines:

- a) la sustitución de azúcares en la producción de alimentos de valor energético reducido, alimentos no cariogénicos o alimentos sin azúcares añadidos.
- b) la sustitución de azúcares si esta permite incrementar el tiempo de conservación del alimento.
- c) la producción de alimentos destinados a una alimentación especial.

Los edulcorantes indicados en la lista de aditivos alimentarios de la Unión están identificados por el código E-9xx. Entre los más importantes se encuentran:

- Acesulfamo K (E-950): Es aproximadamente 200 veces más dulce que el azúcar, con una gran estabilidad ante los tratamientos tecnológicos y durante el almacenamiento.
- Aspartamo (E-951): Está formado por la unión de dos aminoácidos (fenilalanina y ácido aspártico), uno de ellos modificado por la unión de una molécula de metanol.
- Ciclamato y sus sales (E-952): Es unas 50 veces más dulce que la sacarosa, y tiene un cierto regusto desagradable, que desaparece cuando se utiliza mezclado con la sacarina. Es muy estable, y no le afecta la acidez ni el calentamiento.
- Sacarina y sus sales (E-954): Se utiliza como edulcorante desde principios del presente siglo. Es varios cientos de veces más dulce que la sacarosa. La forma más utilizada es la sal sódica, ya que la forma ácida es muy poco soluble en agua. Tiene un regusto amargo, sobre todo cuando se utiliza a concentraciones altas.

Otro grupo de edulcorantes son los polialcoholes derivados de monosacáridos como el Sorbitol (E-420), Manitol (E-421) y Xilitol (E-967).

## **2.8. Otros aditivos**

**Antiespumantes:** Son sustancias que impiden o reducen la formación de espuma.

**Humectantes:** Son sustancias que impiden la desecación de los alimentos contrarrestando el efecto de una atmósfera con un grado bajo de humedad, o que favorecen la disolución de un polvo en un medio acuoso. Algunos aditivos humectantes son el glicerol, el sorbitol y el maltitol.

**Almidones Modificados:** Las sustancias obtenidas por uno o más tratamientos químicos de almidones comestibles que pueden haber sufrido un tratamiento físico o enzimático y pueden ser diluidos o blanqueados con ácidos o bases.

**Endurecedores:** Son sustancias que vuelven o mantienen los tejidos de frutas u hortalizas firmes o crujientes o actúan junto con agentes gelificantes para producir o reforzar un gel.

**Gasificantes:** Son sustancias o combinaciones de sustancias que liberan gas y, de esa manera, aumentan el volumen de la masa.

**Sales de fundido:** Son sustancias que reordenan las proteínas contenidas en el queso de manera dispersa, con lo que producen la distribución homogénea de la grasa y otros componentes. dispersa, con lo que producen la distribución homogénea de la grasa y otros componentes.

### **3. LISTAS POSITIVAS**

En España, al igual que en todos los países de la Unión Europea, para que un aditivo pueda ser utilizado en la elaboración de un producto alimenticio, debe haber sido autorizado mediante su inclusión en las listas positivas de aditivos.

La autorización de uso de un aditivo está sujeta a tres condiciones:

1. se pueda demostrar una necesidad tecnológica suficiente y cuando el objetivo que se busca no pueda alcanzarse por otros métodos económica y tecnológicamente utilizables.
2. no representen ningún peligro para la salud del consumidor en las dosis propuestas, en la medida en que sea posible juzgar sobre los datos científicos de que se dispone.
3. no induzcan a error al consumidor.

Además debe demostrarse su necesidad de tal modo que su uso suponga ventajas tecnológicas y beneficios para el consumidor. Los motivos por los que deberá establecerse dicha necesidad son:

- Conservar la calidad nutritiva de un alimento.
- Proporcionar alimentos con destino a un grupo de consumidores con necesidades dietéticas especiales.
- Aumentar la estabilidad de un alimento o mejorar sus propiedades organolépticas.
- Favorecer los procesos de fabricación, transformación o almacenado de un alimento, siempre que no se enmascare materias primas defectuosas o prácticas de fabricación inadecuadas.

La autorización de un aditivo alimentario requiere una evaluación de su seguridad, que la realiza la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

El **Reglamento (CE) 1331/2008**, establece el procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios, el cual consta de varias etapas:

1. Inicio del procedimiento a iniciativa de la Comisión o en respuesta a una solicitud, que puede provenir de un Estado Miembro o de una persona o de un grupo de personas interesadas. Las solicitudes se dirigirán a la Comisión.
2. La Comisión recaba datos del dictamen de evaluación de la EFSA.
3. Adopción por parte de la Comisión de un reglamento por el que se autorice el uso o la modificación de las condiciones de un aditivo.

El expediente de la solicitud debe incluir toda la información científica disponible para hacer una evaluación del riesgo. Además, se aportará documentación sobre los datos científicos recogidos. El Comité Científico de la Alimentación en el año 2001 elaboró un documento orientativo para la solicitud de evaluación de un aditivo que la propia EFSA revalidó en el 2008.

Según este documento, en la solicitud debe constar la siguiente información:

- Datos sobre la identidad y caracterización del aditivo (incluyendo las especificaciones propuestas y el método analítico).
- Descripción del proceso de fabricación.
- Datos sobre la estabilidad, las reacciones químicas y el resultado final en los alimentos a los que se adiciona.
- Justificación de la necesidad y los usos propuestos.
- Evaluaciones y autorizaciones existentes.
- Evaluación de la exposición prevista de la población al aditivo.
- Datos biológicos y toxicológicos.

Tras la adopción del Dictamen y teniéndolo en cuenta, la Comisión presentará un proyecto de reglamento por el que se actualice la lista comunitaria de aditivos.

Solo los aditivos alimentarios que estén incluidos en la lista comunitaria del anexo II del **Reglamento (CE) 1333/2008** podrán comercializarse como tales y utilizarse en alimentos, en las condiciones de utilización que en él se especifican.

#### **4. CRITERIOS DE PUREZA**

El Reglamento (UE) 231/2012 establece especificaciones para los aditivos alimentarios indicando unos criterios de pureza determinados. Según este Reglamento, deben adoptarse especificaciones relativas al origen, los criterios de pureza y cualquier otra información necesaria sobre los aditivos alimentarios de las listas de la Unión que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) nº 1333/2008.

Para cada aditivo incluido en los anexos se describen unas especificaciones técnicas con sus respectivos criterios de pureza. En muchos casos son criterios únicos y específicos para cada

aditivo, aunque existen una serie de criterios que son controlados en un amplio número de aditivos como son:

- Humedad (determinación gravimétrica tras secado en estufa o método Karl Fischer)
- Cenizas sulfatadas (residuo tras incineración a 600°C en presencia de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Pérdida por desecación (Secado a 105°C durante 4 horas)
- Acidez o Alcalinidad
- Cloruros, Sulfuros y Fluoruros
- Arsénico, Plomo, Mercurio (Espectrofotometría de Absorción Atómica)
- Metales pesados (Espectrofotometría de Absorción Atómica)

## **5. NORMATIVA APLICABLE**

La normativa aplicable en el sector de los aditivos alimentarios engloba:

1. Reglamento (CE) Nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios.
2. Reglamento (CE) Nº 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios (aplicable en función del Reglamento 1333/2008).
3. Reglamento (UE) Nº 234/2011 de la Comisión, de 10 de marzo de 2011, de ejecución del Reglamento (CE) nº 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios.
4. Reglamento (UE) Nº 231/2012 de la Comisión, de 9 de marzo de 2012, por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo.

## **5. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

El contenido máximo de los aditivos en los distintos alimentos está regulado por el Reglamento (CE) Nº 1333/2008 y por ello es importante la determinación de su contenido

### Edulcorantes

Polialcoholes como el sorbitol y manitol se pueden analizar mediante métodos enzimáticos o HPLC con detector de índice de refracción.

Otros edulcorantes como el Acesulfamo K, Sacarina y Aspartamo se analizan mediante HPLC con detección UV.

### Conservantes

Ácido sórbico y ácido benzoico: se pueden analizar mediante cromatografía de gases o mediante HPLC con detección UV.

Sulfitos: son convertidos a  $\text{SO}_2$  mediante reflujo con una solución de HCl. El  $\text{SO}_2$  generado se arrastra con nitrógeno y reacciona con peróxido de hidrógeno que lo oxida a ácido sulfúrico. El  $\text{H}_2\text{SO}_4$  generado (proporcional al contenido de sulfito en la muestra) es valorado con solución de NaOH.

También se pueden analizar mediante cromatografía iónica con detección amperométrica tras extracción alcalina.

### Colorantes

La identificación y cuantificación de colorantes en alimentos se realiza mediante su aislamiento en cromatografía de líquidos con detección empleando el máximo de absorbancia indicado en sus especificaciones. De forma general, los rangos de los máximos de absorbancia de los colorantes se encuentran en los siguientes rangos de longitud de onda:

- 400-430nm -- Amarillos
- 430-470nm -- Naranjas
- 470-500nm -- Naranja-rojo
- 500-540nm -- Rojo-púrpura
- 540-570nm -- Púrpura
- 570-590nm -- Violeta
- 590-610nm -- Azul
- 610-700nm -- Azul verdoso

En muchas ocasiones, debido al carácter ácido/base de los colorantes se debe controlar el pH durante el análisis.

### Acidulantes y antioxidantes

Se puede realizar mediante cromatografía de gases o mediante cromatografía de líquidos con detección UV.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 27**

**MICROBIOLOGÍA APLICADA AL ANÁLISIS DE PRODUCTOS  
AGROALIMENTARIOS. METODOS DE ANÁLISIS. CRITERIOS  
MICROBIOLÓGICOS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA.**

#### **1.1. TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS**

#### **1.2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**

### **2. REGLAMENTO (CE) 2073/2005 RELATIVO A LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS APLICABLES A LOS PRODUCTOS ALIMENTICIO.**

#### **2.1. INTRODUCCIÓN**

#### **2.2. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA.

Por microorganismos, se entiende las bacterias, los virus, los hongos, los mohos, las algas, los protozoos parásitos, los helmintos parásitos microscópicos y sus toxinas y metabolitos.

Los microorganismos son seres vivos que necesitan que el alimento, el cual les sirve de vehículo y de hábitat, les brinde unas condiciones favorables: disponibilidad de nutrientes, temperatura adecuada, entorno no agresivo (condiciones de acidez, salinidad, humedad). En tales condiciones favorables, si les concedemos el tiempo necesario, se reproducirán pudiendo alcanzar dosis infectivas y producirán toxinas, en el caso de aquellos que son toxigénicos.

### 1.1. TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS

Las toxiinfecciones alimentarias son aquellas enfermedades que se producen por la ingestión de alimentos con presencia de gérmenes patógenos o sus toxinas.

Estos procesos están causados por la ingestión de distintas bacterias y sus toxinas. Así, la enfermedad puede tener su origen en la ingestión de bacterias vehiculadas en el alimento (infección) o de toxinas producidas por aquellas previamente formadas en el alimento (intoxicación). Ejemplos de infecciones serían la salmonelosis y de intoxicaciones el botulismo y la gastroenteritis por enterotoxina estafilocócica.

- a) ***Bacillus cereus***. Especie asociada al consumo de alimentos contaminados y causante de toxiinfecciones alimentarias. Estos brotes se han asociado a platos preparados listo para su consumo, así como salsas, cremas, sopas, postres lácteos, etc. Produce 2 tipos de toxinas: toxina emética o cereulida y enterotoxinas diarreicas. Se trata de toxinas termoestables, por lo que una vez formadas en el alimento, son muy difíciles de eliminar.
- b) ***Clostridium***. Se trata de un género de bacterias anaerobias, que en ausencia de oxígeno y poca acidez producen toxinas. Están ampliamente distribuidas en el medio ambiente y en la flora intestinal de animales y personas, pudiendo transmitirse a los alimentos y generar toxiinfecciones alimentarias. Las especies más importantes asociadas a la contaminación de alimentos son *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum*. Esta última produce la toxina botulínica que genera la toxiinfección conocida como botulismo, poco frecuente, pero con consecuencias graves, ya que afecta al sistema nervioso. Esta toxina es relativamente sensible al calor y se inactiva por calentamiento a 85°C durante 5 minutos.
- c) ***Escherichia coli***. Es una bacteria presente habitualmente en el intestino de personas y animales sanos, formando parte de la flora bacteriana. La mayoría de las cepas son inocuas pero algunas pueden causar graves intoxicaciones alimentarias a través del consumo de alimentos, como la cepa de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), o la cepa *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Para evitar riesgos, se recomienda cocinar bien los alimentos, ya que *E.coli* se destruye con tratamiento térmico. También es muy importante no romper la cadena de frío en el transporte y conservación de los alimentos desde la compra hasta el hogar.

- d) *Listeria monocytogenes*.** Es una bacteria ampliamente distribuida en el medio ambiente. La ingesta de alimentos contaminados con esta bacteria puede provocar listeriosis, enfermedad que puede ser grave en personas con el sistema inmunitario débil, mujeres embarazadas, personas mayores y niños de corta edad. Se trata de una bacteria muy resistente, que sobrevive y se multiplica en ambientes poco favorables, como bajas temperaturas, condiciones de acidez o salinidad y escasez de oxígeno. Además, es capaz de formar biofilms, estructuras de protección difíciles de eliminar. Sin embargo, el tratamiento térmico adecuado de los alimentos elimina la bacteria. Los alimentos más frecuentemente implicados en toxiinfecciones por *Listeria* son aquellos que se consumen sin tratamiento térmico previo, como embutidos cocidos y curados, salchichas, patés, quesos y otros productos lácteos elaborados con leche cruda, frutas y verduras.
- e) *Salmonella*.** Es una bacteria que provoca la llamada salmonelosis, siendo una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas a nivel mundial. En Europa, es la causa mayoritaria de brotes de toxiinfecciones alimentarias y de cuadros gastrointestinales, y el serotipo más predominante en los cuadros de salmonelosis humana es *Salmonella enteritidis*. Esta bacteria vive en el intestino de las personas y animales sanos y se transmite a las personas por consumo de alimentos contaminados, pero también se puede transmitir a través del contacto directo con animales o por el medioambiente. Muchas salmonelosis se encuentran asociadas al consumo de huevos y derivados elaborados con huevos crudos y/o de carne de pollo poco cocinada.
- f) *Staphylococcus aureus*.** Es una bacteria muy resistente en el medio ambiente y está ampliamente distribuida en la naturaleza. Su principal reservorio son los animales y las personas. Produce toxinas estafilocócicas, enterotoxinas muy resistentes que una vez formadas en el alimento son extremadamente difíciles de eliminar. Los alimentos más frecuentemente implicados en toxiinfecciones por estas bacterias son los alimentos consumidos en crudo, tanto de origen animal (leche, carne y huevos) como vegetal (frutas, verduras, etc.), y los productos derivados listos para su consumo.

## 1.2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Los puntos básicos a desarrollar en el análisis microbiológico de un alimento son los siguientes:

- 1. Procesado de la muestra.** En el análisis microbiológico es necesario homogeneizar el alimento para poder realizar un análisis representativo del mismo, sobre todo cuando se trata de un alimento sólido.
- 2. Siembra y aislamiento en medios de cultivo.** Se trata de que los microorganismos presentes en la muestra crezcan en un sustrato de laboratorio.

La siembra es el proceso mediante el cual se inoculan los medios de cultivo con una determinada cantidad de la muestra homogeneizada para su crecimiento. Para ello, se requiere trabajar en condiciones de esterilidad. Se distingue entre:

- **Siembra en masa**, que se caracteriza porque durante la incubación, las colonias de microorganismos crecen en el interior de la masa del agar.
- **Siembra en superficie**, que se caracteriza porque durante la incubación las colonias crecen en la superficie del agar.

Por su parte, el aislamiento consiste en obtener, a partir de un elevado número inicial de bacterias, un número reducido de ellas de modo independiente unas de otras. Para el aislamiento se pueden emplear varias técnicas:

- **Aislamiento por agotamiento por estrías.** Se trata de un método de agotamiento progresivo del inóculo sobre un medio sólido.
- **Aislamiento por siembra de diluciones seriadas.** El número de diluciones necesarias para conseguir aislar colonias dependerá de lo contaminado que esté el alimento. Cuanto mayor sea la carga microbiana inicial del alimento, mayor será el número de diluciones a realizar.

- 3. Identificación o recuento de los microorganismos aislados.** Se trata de determinar si el alimento contiene o no un determinado tipo de microorganismos y en qué cantidad.

**a) Investigación (métodos cualitativos).** Se trata de comprobar la ausencia o presencia de un determinado microorganismo, de modo que el resultado se expresará como presencia/ausencia de dicho microorganismo en una determinada cantidad de alimento (ejemplo: presencia/ausencia de Salmonella en 25 gramos de alimento).

**b) Recuento (métodos cuantitativos).** Si se pretende conocer la carga microbiana general o de un determinado grupo de microorganismos, se realiza un recuento, el cual consiste en contar el número de colonias aisladas crecidas en el medio de cultivo. Hay que tener en cuenta que cada colonia procede de una sola célula. En ocasiones, el recuento va seguido de una identificación mediante una serie de pruebas complementarias como las pruebas bioquímicas que se realizan para comprobar la capacidad de metabolización de determinados compuestos o la capacidad de producir determinados metabolitos.

## 2. REGLAMENTO (CE) 2073/2005 RELATIVO A LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS APLICABLES A LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El **Reglamento (CE) 2073/2005** relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece criterios microbiológicos para determinados microorganismos y las normas que deben seguir las empresas alimentarias por lo que respecta a los requisitos generales y específicos en materia de higiene establecidos en el Reglamento (CE) 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios.

Lo que se pretende proporcionar, por el bien de la seguridad alimentaria y la salud pública, son una serie de objetivos y puntos de referencia para ayudar a las empresas alimentarias y a las autoridades competentes de los Estados miembros de la UE a gestionar y supervisar la seguridad de los alimentos.

El Reglamento exige que las empresas alimentarias garanticen que los alimentos que manipulan, suministran y transforman cumplen dichos criterios. A tal fin, en cada fase de producción, transformación y distribución de los alimentos, las empresas alimentarias adoptarán medidas, como parte de sus procedimientos basados en los principios de análisis de peligros y puntos de control crítico (HACCP) y la aplicación de buenas prácticas de higiene, para garantizar que:

- a) el suministro, manipulación y transformación de materias primas y productos alimenticios bajo su control se realicen de forma que se cumplan los criterios de higiene del proceso.
- b) los criterios de seguridad alimentaria aplicables durante toda la vida útil de los productos puedan respetarse en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y utilización.

En la aplicación de esta norma, se debe tener en cuenta que es una herramienta legal abierta, debido a que los criterios microbiológicos están sometidos a constantes cambios en prevalencias, al progreso de la ciencia, tecnología y metodología, así como a la información que resulte de la evaluación de riesgos. Se tiene en cuenta también la experiencia en la aplicación de los mismos por los operadores de empresas alimentarias, y el control de su cumplimiento por parte de las autoridades competentes.

Además, en la actualidad, es obligatorio el marcado de fechas de los productos alimenticios, conforme al Reglamento (UE) 1169/2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, siendo responsabilidad del operador de la empresa alimentaria dicho marcado. Por ello, cuando sea necesario, las empresas alimentarias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil. Esto es aplicable especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria.

## 2.2. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS.

El Reglamento 2073/2005 define **criterio microbiológico** como un criterio que define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos alimenticios o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote.

El Reglamento establece 2 tipos de criterios microbiológicos que deben cumplir las empresas alimentarias:

- a) **criterio de seguridad alimentaria:** criterio que define la aceptabilidad de un producto o un lote de productos alimenticios y es aplicable a los productos comercializados
- b) **criterio de higiene del proceso:** criterio que indica el funcionamiento aceptable del proceso de producción; este criterio, que no es aplicable a los productos comercializados, establece un valor de contaminación indicativo por encima del cual se requieren medidas correctoras para mantener la higiene del proceso conforme a la legislación alimentaria.

Estos criterios están relacionados con los siguientes productos:

- 1) alimentos listos para el consumo. Se trata de aquellos alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos.
- 2) carnes frescas de aves de corral.
- 3) carne picada y preparados de carne.
- 4) productos cárnicos.
- 5) carne separada mecánicamente.
- 6) gelatina y colágeno.
- 7) productos lácteos.
- 8) ovoproductos.
- 9) moluscos bivalvos vivos.
- 10) productos de la pesca.
- 11) crustáceos y moluscos cocidos.
- 12) frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo).
- 13) brotes y semillas germinadas.
- 14) zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados (listos para el consumo).
- 15) canales.

Para cada categoría de alimentos, el Reglamento especifica lo siguiente:

- a) Los **microorganismos** para los cuales deben analizarse muestras, sus toxinas y metabolitos, y la razón de su selección.
- b) Un plan de toma de muestras que incluye el número de unidades que deben analizarse, frecuencia, etc. y preparación de muestras para las pruebas. El criterio de decisión sobre la aceptación de la muestra incluye los valores:
  - **n:** número de unidades que componen la muestra.
  - **c:** número de aceptación, que es el número máximo de unidades de muestra que pueden dar resultados insatisfactorios, o dicho de otro modo, el número de unidades de muestra que dan valores entre  $m$  y  $M$ .

- c) Los límites** para cada unidad de muestra analizada. Los límites microbiológicos  $m$  y  $M$ , los cuales separan las unidades analíticas conformes de las no conformes u otros límites (por ej., un nivel de riesgo).
- **$m$** : valor umbral de la cantidad de bacterias (presencia/ausencia o recuento). Un resultado se considera satisfactorio si todas las unidades de que se compone la muestra tienen un número de bacteria igual o menor que  $m$ .
  - **$M$** : nivel máximo de aceptabilidad. Valor límite de la cantidad de bacterias. Un resultado se considerará no satisfactorio si una o varias unidades de las que componen la muestra tienen un número de bacterias igual o mayor que  $M$ .
- d) Los métodos analíticos** de referencia que deben utilizarse.
- e) Fase de la cadena alimentaria en la que se aplica el criterio.** Por ejemplo, al final del proceso de fabricación, en el punto del proceso de fabricación en el que se prevé que el recuento de determinados microorganismos sea más elevado.
- f) Acción en caso de resultados insatisfactorios.** En el caso de los criterios de seguridad alimentaria, su incumplimiento supone la no comercialización o la retirada de los productos si están en el mercado, mientras que en el caso de los criterios de higiene del proceso, su incumplimiento da lugar a que deban revisarse los requisitos de higiene, los procesos o el sistema de autocontrol del establecimiento alimentario. Cuando se observe una tendencia a resultados insatisfactorios, las empresas alimentarias adoptarán sin demora las medidas adecuadas para impedir la aparición de riesgos microbiológicos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Reglamento (CE) 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011 , sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n o 1924/2006 y (CE) n o 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n o 608/2004 de la Comisión Texto pertinente a efectos del EEE.

Reglamento (CE) 853/2004 Del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

Principios y directrices para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos relativos a los alimentos. CAC/GL 21-1997. Adoptado en 1997. Revisado y renombrado en 2013.

Cuaderno de prácticas de Microbiología de los productos agroalimentarios. Curso 09/10. Area de Microbiología, Departamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería.

[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan\\_inicio.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan_inicio.htm)

<https://seguridadalimentaria.elika.eus/>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 28**

**ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG):  
MARCO LEGAL.  
TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SU DETECCIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## ÍNDICE

### **1. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG)**

#### 1.1. CONCEPTO

##### 1.1.1. Protocolo de Cartagena en Bioseguridad

### **2. MARCO LEGAL**

### **3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SU DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### 3.2. PROCESO DE DETECCIÓN DE OMGs.

##### 3.2.1. Extracción del ADN

##### 3.2.2. Cribado para la detección de los OMGs

##### 3.2.3. Identificación o detección específica de los OMGs presentes en la muestra

##### 3.2.4. Cuantificación de los OMGs identificados

#### 3.3. Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para alimentos y piensos modificados (EURL GMFF)

#### 3.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSGÉNICA

##### 3.4.1. Técnicas de inmunoensayo

#### 3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS BASADOS EN LA DETECCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

##### 3.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

##### 3.5.2. *Microarrays* de ADN

##### 3.5.3. Secuenciación de nueva generación (NGS)

## BIBLIOGRAFIA

## 1. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG)

### 1.1. CONCEPTO

La normativa (**Directiva 2001/18/CE**) define como organismo modificado genéticamente (OMG), el organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético haya sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural.

Según esta definición:

**a) se produce una modificación genética siempre que se utilicen, al menos, las técnicas que se enumeran en la parte 1 del Anexo IA:**

1. Técnicas de recombinación del ácido nucleico, que incluyen la formación de combinaciones nuevas de material genético mediante la inserción de moléculas de ácido nucleico obtenidas por cualquier medio fuera de un organismo) en un virus, plásmido bacteriano u otro sistema de vector y su incorporación a un organismo hospedador en el que no se encuentren de forma natural pero puedan seguir reproduciéndose.
2. Técnicas que suponen la incorporación directa en un organismo de material hereditario preparado fuera del organismo, incluidas la microinyección, la macroinyección y la microencapsulación.
3. Técnicas de fusión de células (incluida la fusión de protoplasto) o de hibridación en las que se formen células vivas con combinaciones nuevas de material genético hereditario mediante fusión de 2 o más células utilizando métodos que no se producen naturalmente.

**b) se considera que las técnicas enumeradas en la parte 2 del Anexo IA no dan lugar a una modificación genética:**

Las técnicas que no se consideran causantes de una modificación genética, con la condición de que no supongan la utilización de moléculas de ácido nucleico recombinante ni de organismos modificados genéticamente obtenidos mediante técnicas o métodos distintos de los que quedan excluidos en virtud del Anexo I B, son las siguientes:

1. Fertilización in vitro.
2. Conjugación, transducción, transformación o cualquier otro proceso natural.
3. Inducción poliploide.

No se aplicará la normativa de regulación de organismos modificados genéticamente a los organismos obtenidos mediante las técnicas de modificación genética que se enumeran en el Anexo IB (a condición de que no impliquen la utilización de moléculas de ácido nucleico recombinante) y que son las siguientes:

## 1. Mutagénesis

2. Fusión (incluida la fusión de protoplastos) de células vegetales de organismos que puedan intercambiar material genético mediante métodos tradicionales de multiplicación.

De manera general, un OMG es un organismo cuyo material genético ha sido alterado usando técnicas de ingeniería genética como es la transgénesis (inserción de uno o varios genes alóctonos en el genoma).

Se incluyen organismos como bacterias, levaduras, plantas, insectos, peces y animales. Su aplicación práctica mayoritarias es como fuente de alimentos (genéticamente modificados) y por otra ser organismos con uso en medicina (vacunas recombinantes, células del sistema inmune, tratamientos oncológicos,...).

### 1.1.1. Protocolo de Cartagena

El *Protocolo de Cartagena (PC) sobre Seguridad de la Biotecnología* es un acuerdo internacional centrado específicamente en el movimiento transfronterizo de **Organismos Vivos Modificados** (OVMs, otra forma de llamar a los OMGs) resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica.

## 2. MARCO LEGAL

- 1º. DIRECTIVA 2001/18/CE, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente.

Normativa fundamental sobre el cultivo de OMGs en donde se define un organismo modificado genéticamente (epígrafe 6 del tema). Asimismo, determina el procedimiento para otorgar autorizaciones de liberación intencionada y de comercialización de OMGs y los requisitos de Derecho de la Unión sobre la comercialización de semillas y material vegetal de reproducción. Limita el período de validez de las autorizaciones a 10 años, renovables e introduce el seguimiento obligatorio de los OMGs tras su liberación deliberada y comercialización.

Establece que el **etiquetado de OMG** y la **consulta al público** serán **obligatorios** de conformidad con los Reglamentos (CE) nº 1829/2003 y 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo.

La Comisión Europea está obligada a consultar con los comités científicos competentes cualquier cuestión relacionada con la salud humana o el medio ambiente.

- 2º. REGLAMENTO (CE) nº 1829/2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente.

Normativa fundamental que regula cómo se **autorizan** y **supervisan** los OMGs y cómo se **etiquetan** los alimentos y los piensos modificados genéticamente. El Reglamento pretende proteger: la vida y la salud de las personas; la sanidad y el bienestar de los animales; y los

intereses medioambientales y de los consumidores, al tiempo que se asegura el funcionamiento eficaz del mercado interior.

- 3º. REGLAMENTO (CE) 1830/2003, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de estos.

Normativa que tiene el fin de facilitar el etiquetado preciso, el seguimiento de los efectos en el medio ambiente y, cuando proceda, sobre la salud, y la aplicación de las medidas de gestión de riesgo adecuadas, incluida, en caso necesario, la retirada de los productos.

- 4º. LEY 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente.

Es la normativa básica nacional sobre el uso y regulación de OMGs en España. Los artículos 3 y 4 de la Ley 9/2003, establecen la distribución de competencias entre la Administración General del Estado y las Comunidades Autónomas. De igual manera, incorpora a nuestra legislación las normas sustantivas de la **Directiva 2001/18**.

Según lo dispuesto en la disposición adicional segunda de la Ley 9/2003 se regula las funciones de la **Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB)**, órgano colegiado de carácter consultivo cuya función es informar sobre las solicitudes de autorización correspondientes a OMGs. Actualmente está adscrita a la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico.

Según lo arreglado en la disposición adicional segunda de la Ley 9/2003 se regula las funciones del **Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (CIOMG)**, órgano colegiado competente de la Administración Central, por el que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de OMGs.

- 5º. REAL DECRETO 178/2004, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente.

Establece el Reglamento General para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003.

Además, decreta las funciones, estructura y composición de

- **Registro Central de organismos genéticamente modificados**
- **Consejo Interministerial de OMGs (CIOMG)**
- **Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB)**

- 6º. DIRECTIVA 2009/41/CE, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente (versión refundida).

**7º. DIRECTIVA (UE) 2015/412 por la que se modifica la Directiva 2001/18/CE en lo que respecta a la posibilidad de que los Estados miembros restrinjan o prohíban el cultivo de organismos modificados genéticamente (OMG) en su territorio.**

Esta normativa modifica la **Directiva 2001/18** y permite a los países de la UE limitar o prohibir los OMG que han sido autorizados o de conformidad con autorización a nivel de la UE, por una variedad de motivos.

A partir del 3 de abril de 2017, los países de la UE en los que se cultivan OMG debieron introducir medidas en las zonas fronterizas de su territorio para evitar una posible **contaminación transfronteriza** en países vecinos de la UE en los que está prohibido su cultivo, a menos que dichas medidas fueran innecesarias en vista de condiciones geográficas concretas.

**8º. REAL DECRETO 364/2017, por el que se modifica el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente.**

Transcribe a la Legislación nacional la Directiva 2015/412 sobre las medidas que habrán de adoptarse para impedir la presencia accidental de OMG en otros productos y, las actuaciones a realizar en zonas fronterizas con otros Estados miembros que hayan prohibido su cultivo.

**9º. DIRECTIVA (UE) 2018/350, por la que se modifica la Directiva 2001/18/CE del Parlamento y del Consejo en lo que respecta a la evaluación del riesgo para el medio ambiente de los organismos modificados genéticamente.**

Se establece una nueva metodología de ERMA (Evaluación de Riesgo Medioambiental).

**10º. ORDEN APA/1083/2018, de 8 de octubre, por la que se dictan medidas para evitar la contaminación transfronteriza derivada del cultivo de maíz modificado genéticamente hacia los estados miembros vecinos en los que esté prohibido el cultivo de dichos organismos modificados genéticamente.**

Esta orden tiene por objeto establecer medidas para evitar la contaminación transfronteriza derivada del cultivo de maíz modificado genéticamente en el confín entre Francia y España.

**11º. SENTENCIA DEL TRIBUNAL DE JUSTICIA DE LA UE. ASUNTO C-528/16, DE 25 DE JULIO DE 2018**

Al ser una sentencia dirigida a la normativa de la UE, en este caso sobre los OMGs, obliga a los diferentes Órganos de la UE, especialmente a la Comisión, a modificar dicha legislación para incluir los requerimientos que hace la normativa, a saber:

Las obligaciones dispuestas en la Directiva 2001/18/CE se han de aplicar a los organismos obtenidos mediante técnicas de mutagénesis que no se hayan venido utilizando de manera convencional.

Esto quiere decir que los organismos obtenidos mediante las consideradas *nuevas técnicas de mutagénesis dirigida*, entre las que se encuentra la edición génica, deben ser consideradas organismos modificados genéticamente y que por lo tanto su regulación debe regirse por lo establecido en la Directiva 2001/18/CE.

### 3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SU DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

La diversidad de los OMG (tanto a nivel taxonómico como en relación con su composición genética y secuencias insertadas) está en constante crecimiento y la detección de los mismos se está volviendo un desafío. La detección de los OMGs se lleva a cabo mediante la selección de

- características fenotípicas, como la producción de una proteína específica (métodos indirectos)
- material genético (ADN) que representa la modificación genética (métodos directos)

#### 3.2. PROCESO DE DETECCIÓN DE OMGs

En conformidad con la normativa de uso de OMGs en la UE, la metodología empleada por los laboratorios de control para analizar las muestras oficiales y detectar la presencia de OMG se basa principalmente en el análisis del ADN transgénico insertado por ingeniería genética en los vegetales de los principales cultivos de interés agronómico.

##### 3.2.1 Extracción del ADN

Al trabajar con el ADN, es importante aplicar métodos de extracción y de purificación de ácidos nucleicos para obtener ADN con la cantidad y calidad requerida para ser sometido a las diferentes amplificaciones que forman parte de los métodos de análisis de OMGs.

El método de obtención del ADN ha de cumplir al menos tres compromisos:

- a) Si el ADN diana está en bajos niveles en la muestra, el método ha de ser capaz de recuperarlo para poder ser amplificado, es decir, ha de mostrar alta sensibilidad.
- b) En mezclas complejas, el método de purificación ha de ser capaz de eliminar el resto de componentes para dejar un ADN de alta pureza.
- c) En ADN de muestras tomadas de productos sometidos a transformaciones que lo degraden (principalmente altas temperaturas y presiones), el método ha de evitar someter las moléculas de ADN extraído a más estrés y preservar su integridad, especialmente en las zonas diana de amplificación, pues una excesiva fragmentación en dichos lugares daría lugar a falsos negativos.

Aunque no siempre es requerido, si es recomendable evaluar la cantidad y calidad del ADN obtenido, que normalmente se suele hacer de la siguiente manera:

El método más preciso es realizar una electroforesis en gel de la muestra y comparar el tamaño de la banda obtenida con el de patrones de cantidad conocida que se corren en la misma electroforesis. En un lector de fluorescencia de geles se puede determinar la cantidad de ADN de la muestra problema. No obstante, al ser un proceso laborioso y largo, se recurre a otros métodos lo suficientemente precisos, basados en la absorción de luz por la muestra en espectrofotómetros, que pueden ser de fluorescencia o de luz ultravioleta.

En ambos casos el aparato mide la diferencia entre la intensidad de la luz que incide en la muestra y la que atraviesa. La diferencia es la luz absorbida y entre otros parámetros, es directamente proporcional a la cantidad de moléculas del medio que atraviesa la luz.

El ADN de doble hebra presenta un máximo de absorción de luz a la longitud de onda ( $\lambda$ ) de 260 nm. A esta longitud de onda y según la cantidad de luz absorbida y la longitud de paso por la muestra, los espectrofotómetros de ácidos nucleicos van a dar una estima de la cantidad de ADN presente en solución, medido como ng/ $\mu$ L.

Para evaluar la pureza de la solución del ADN extraído, se compara el cociente entre la cantidad de luz absorbida para el máximo de ADN (260 nm) y otras dos longitudes de onda.

- ✓ Cociente 260/280. La  $\lambda$  de 280 nm corresponde con el máximo de absorción para proteínas. Estima la proporción de proteínas y otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm o cercano a ello. Si el cociente  $<1,6$  indica una alta proporción de estas moléculas extraídas que estarían contaminando la muestra y darían menos calidad al extracto de ADN.
- ✓ Cociente 260/230. La  $\lambda$  de 230 nm corresponde con el máximo de absorción de moléculas orgánicas que pueden estar presentes en la solución. Si el cociente  $\leq 1,6$  indica la presencia de otros contaminantes copurificados.

Si los cocientes resultantes no son satisfactorios, se hace necesario un paso más de purificación de los ácidos nucleicos de la muestra.

### **3.2.2. Cribado para detección de OMGs**

Se realiza una estrategia de cribado analítico de las secuencias de ADN comunes en los OMGs, como las pertenecientes a *reguladores de la expresión de genes* (promotores y/o terminadores de la transcripción de los genes insertados, **p35S; tNOS, tE9**).

Otra estrategia complementaria consiste en determinar la presencia de determinados elementos que acompañan a la construcción transgénica, como pueden ser genes marcadores de determinada proteína, por ejemplo los que dan resistencia a determinados antibióticos (**nptII**) o los propios genes insertados con utilidad agronómica (**cry1Ab** de resistencia a insectos que son plaga de cultivos).

En determinados casos interesa detectar la presencia simultánea y en el mismo genoma de dos elementos de interés en el cribado. Esta diana de amplificación se denomina constructo **(CTP2+CP4; tNOS+nptII)**.

Si se desconoce la composición vegetal de la muestra, se deben hacer también análisis de PCR para cribado de especie o de endógeno (PCRs para detectar la presencia de maíz, soja, colza, algodón, arroz, patata, remolacha azucarera).

En todos los casos son secuencias de codificación de proteínas, encontradas en los OMG convencionales tanto autorizados como no autorizados. Estos métodos reaccionarán *positivamente* para todos los OMG que contengan las secuencias específicas de los elementos o *negativamente* si están ausentes. Se obtiene entonces un patrón de resultados a las diferentes PCRs de cribado. Los resultados positivos nos harán sospechar la presencia de aquellos OMGs que porten el ADN diana. Esta posibilidad se ha de confirmar en la siguiente etapa de análisis de los OMGs sospechosos.

### **3.2.3. Identificación o detección específica de los OMGs presentes en la muestra**

Se requiere de un método analítico de detección y de cuantificación del OMG a autorizar, validado por el Laboratorio Europeo de Referencia para OMGs en Alimentos y Piensos. Este método es público y es el empleado en los Laboratorios de Control Oficial de los Estados Miembros de la UE.

En función del resultado del cribado inicial, el segundo paso consistirá en comprobar mediante métodos específicos la presencia de:

- a) **OMGs autorizados,**
- b) **OMGs pendientes de autorización** (para su uso en piensos y que tengan validado el método de análisis). Su presencia está regulada por el Reglamento (UE) nº 619/2011).
- c) **OMGs retirados del mercado** (también conocido su método de análisis al haber estado autorizados previamente).

A pesar de la intolerancia hacia los OMG no autorizados en la UE, es posible encontrarlos en productos del mercado europeo. Por ello, su presencia en bajos niveles representa un reto para la detección, en particular si los OMGs no autorizados están ocultos por otro material genéticamente modificado sí autorizado.

Por otra parte, si el resultado global del análisis de detección de los posibles OMGs es negativo, se debe sospechar de la presencia de un *OMG prohibido en la UE* y que requeriría de estudios más amplios para su identificación.

### **3.2.4 Cuantificación de los OGMs identificados**

Finalmente, si se detecta la presencia de un OMGs de cualquiera de los tres grupos descritos en el punto anterior, y de acuerdo con la normativa europea (Reglamentos nº 1829/2003 y 619/2011), se precisa de un análisis cuantitativo para comprobar que el producto objeto de control cumple la legislación de etiquetado e información.

Ello se debe a que dicha normativa:

- obliga a informar al consumidor sobre alimentos o piensos que contengan, estén compuestos, o se hayan producido a partir de OMGs mediante declaración de su presencia en la etiqueta.
- permite una baja cantidad de estos transgénicos cuando su presencia sea accidental o técnicamente inevitable, en cuyo caso no es necesaria la información anterior.  
Esta presencia tolerada corresponde a una cantidad *no mayor* de:
  - a) El 0,9% de un OMG autorizado en la UE respecto del ingrediente considerado individualmente en un producto complejo o del alimento o pienso si consiste en un solo ingrediente.
  - b) El 0,1% de un OMG pendiente de autorización, calculado de la misma manera que en a) y para su sólo uso en alimentación de los animales.
  - c) El 0,1% de un OMG (calculado de la misma manera que en a)) tanto en alimentos como en piensos y durante el periodo transitorio de retirada del mercado.

### **3.3. Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para alimentos y piensos modificados (EURL GMFF)**

El Laboratorio de Referencia de la UE para alimentos y piensos modificados genéticamente realiza la evaluación científica y la validación de los métodos de detección de alimentos y piensos modificados genéticamente como parte del procedimiento de autorización de la UE. Por esta razón, y para ayudar a los laboratorios de control de OMGs, ha desarrollado una base de datos abierta con los métodos de referencia de análisis, denominado “GMOMETHODS”.

También tienen una aplicación web para ayudar a cualquier laboratorio (de control oficial o privado), a establecer estrategias de cribado y buscar los OMGs sospechosos tras aplicar estas estrategias denominadas “GMO-Matrix”.

### **3.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN EL ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA TRANSGÉNICA**

La detección de proteínas puede realizarse en muestras de alimentos frescos o procesados, cuando el procesamiento no haya afectado a las proteínas de las muestras, es decir, en aquellos casos en las que se dispone de muestras con un contenido proteico en cantidad y calidad adecuada.

A pesar de que los inmunoensayos son prácticos y efectivos, en general son menos sensibles que los métodos basados en ácidos nucleicos. Éstos son específicos sólo para la proteína codificada por la construcción OMG insertada, y no para el rasgo transgénico.

En el caso particular de los OMGs, puede ocurrir que la proteína no esté suficientemente expresada a pesar de contener el transgén, dando lugar a falsos negativos. Por ello, el resultado obtenido por determinación de proteínas sólo es presuntivo, y debe analizarse el ADN para confirmar el resultado. Se ha demostrado que la amplificación enzimática que tiene lugar en la PCR- ELISA mejora considerablemente la sensibilidad, además de permitir realizar un análisis múltiple a un coste relativamente bajo.

### 3.4.1. Técnicas de inmunoensayo

La tecnología de inmunoensayo con anticuerpos son ideales para la detección cualitativa y cuantitativa de muchos tipos de proteínas, cuando el analito diana es conocido.

#### A: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

El ELISA se ha convertido en el método alternativo por excelencia utilizado para la determinación de la presencia de un OGM a partir de la proteína transgénica expresada para muchos laboratorios privados de control por su menor coste.

Este ensayo se basa en la detección de la proteína inmovilizada sobre una fase sólida mediante su unión específica a anticuerpos marcados. El **formato ELISA más empleado es el denominado "sándwich"**, en el que el antígeno es reconocido por dos anticuerpos, demostrando una elevada sensibilidad y reproducibilidad.

#### B: Tiras de detección de flujo Lateral (LFD)

Los dispositivos de detección de flujo lateral (LFD) emplean los mismos principios de inmunoensayo que el ELISA en formato placa, pero recubren los anticuerpos u otros reactivos en una membrana de nitrocelulosa. La muestra se añade en un extremo de la tira LFD y viaja por capilaridad hasta el otro extremo. A medida que la muestra de fluido viaja a través de la membrana, la muestra se expone a zonas de anticuerpos reactivos al analito objetivo (por lo que la prueba está diseñada para detectar).

#### Ventajas:

- Son baratos, fáciles de usar y permiten detectar rápidamente la presencia o ausencia de proteínas codificadas por el gen OGM insertado
- Pueden utilizarse *in situ* con unos requisitos mínimos de experiencia y equipamiento
- Están disponibles en formato de peine para la detección de múltiples OMGs

### 3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS BASADOS EN LA DETECCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

Se fundamentan en la detección de una secuencia de ADN específica del OMG a analizar. Normalmente incluyen una reacción de amplificación que aumenta exponencialmente la concentración de ADN de interés, lo que permite alcanzar una elevada sensibilidad.

#### 3.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El método más empleado para la amplificación del ADN es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se basa en el empleo de una enzima polimerasa termoestable que sintetiza una cadena de ADN complementaria a una cadena de ADN sencilla. Para ello, necesita la presencia de secuencias cortas de ADN, denominadas cebadores, que deben ser complementarias de los extremos de la secuencia que se desea amplificar. La reacción consta de tres fases que se repiten un número determinado de ciclos: 1.Desnaturalización; 2. Alineamiento; y 3.Elongación.

En función del nivel de especificidad, los métodos de detección de OMGs basados en PCR se clasifican en 4 niveles:

- 1) **Métodos de cribado (*screening*)**, métodos cualitativos que amplifican secuencias que son comunes a ciertos grupos de transgénicos como los promotores o terminadores. Este cribado cualitativo puede reducir eficazmente el número de análisis posteriores.
- 2) **Métodos específicos de gen**, que identifican el propio gen introducido, asociado a la modificación genética específica. No obstante, el gen puede ser utilizado en varias transformaciones, por lo que no permiten determinar si el OMG es autorizado o no.
- 3) **Métodos específicos de construcción**, que posibilitan identificar el promotor usado y el propio transgén. Asimismo, permiten confirmar la presencia de material MG.
- 4) **Métodos específicos de evento**, que facilitan la identificación simultánea de una parte del transgén y una parte del genoma nativo del vegetal donde se ha integrado. Proporciona la información más precisa acerca de un evento OMG particular.

#### A. **La PCR en tiempo real (RTPCR)/ PCR cuantitativa (qPCR)**

La PCR en tiempo real, basada en ensayos fluorométricos de hibridación, es la técnica de referencia para la detección e identificación de los OMG.

La RTPCR se caracteriza por la detección y cuantificación de los productos amplificados a medida que la reacción tiene lugar. Para ello, la amplificación es monitorizada a partir de una señal (normalmente de fluorescencia) generada a medida que el proceso avanza. De este modo, el aumento de la señal en cada ciclo se corresponde con un incremento de la concentración del producto amplificado.

**Ventajas:** técnica rápida y sencilla, que disminuye las posibilidades de contaminación cruzada al eliminar el análisis postamplificación de la PCR convencional. Además, es una técnica sensible para la cuantificación precisa del material transgénico, incluso en niveles bajos, en alimentos y piensos, para poder determinar si cumplen con los requisitos legales.

##### ➤ **RTPCR Multiplex**

Debido a la capacidad de los equipos de detectar fluorescencia a diferentes  $\lambda$ , se pueden diseñar las **RTPCR multiplex**, en las que hay dos (dúplex) o más amplificaciones de ADNs diana diferentes en el mismo recipiente de reacción, lo que aumenta el rendimiento de los análisis.

Para ello, cada reacción individual de PCR va a llevar su sonda específica, marcada con un emisor (*reporter*) diferente, que emite fluorescencia a una  $\lambda$  específica, que va a ser leída por un sistema de captación del equipo en cada ciclo de amplificación.

Son reacciones típicas multiplex para análisis de OMGs, las dúplex de:

- Detección simultánea del promotor p35S y el terminador tNOS
- Cuantificación de un evento OGM y su endógeno correspondiente

**Desventajas:** se necesita tanto ajustar la proporción de los diferentes reactivos empleados en cada reacción simple, como usar un fluoróforo diferente para cada diana, lo que reduce la sensibilidad. Requiere un ajuste de las reacciones de cada analito y del programa de amplificación para reunirlos en una sola y mantener una buena sensibilidad.

➤ **Combinatory SYBR® Green Qpcr (CoSYPS)**

La técnica CoSYPS se enfoca en un conjunto limitado de pruebas de qPCR que permiten al usuario comprobar la presencia de eventos GM autorizados para fines comerciales en la UE. Se empezó a emplear en 2010.

Se basa en el uso del agente intercalante de ácidos nucleicos bicatenarios **SYBR Green**, el cual emite fluorescencia en la  $\lambda$  del verde cuando cambia su estructura al unirse a la doble hebra de ADN de los amplicones que se van formando en la reacción de PCR.

**B. PCR digital (dPCR)**

La PCR digital se considera una tecnología de tercera generación, basada en la división de las muestras en pequeñas particiones, que actúan como una reacción individual de RTPCR estándar y puntúan como positivo o negativo. Finalmente, la relación entre las particiones positivas y las totales se utiliza para calcular la concentración diana inicial.

**Ventajas:** debido al principio de partición de la muestra

- los resultados son muy precisos y exactos, incluso con números de copias diana muy bajos y con la presencia de inhibidores que afectarían al rendimiento en una RTPCR.
- permite la detección fiable de dianas raras en un alto contenido de ADN no diana, lo que es importante para el análisis de OMGs, donde un transgén podría estar presente en concentraciones mucho más bajas que el gen de referencia (endógeno).

**3.5.2. Microarrays de ADN**

Los *microarrays* o chips de ADN, permiten la detección paralela de un gran número genes procedentes de muestras de ADN complejas en un solo ensayo.

El método se basa en la unión de múltiples sondas a una superficie sólida (chip), con un punto individual que tiene muchos duplicados de la sonda. A continuación, el ADN aislado de la muestra que está hibridando se marca con fluorescencia. En esta etapa, el segmento de ADN marcado se combina con las sondas basadas en las secuencias de ADN complementario. Tras la fase de hibridación, se escanea el chip para comprobar la intensidad de la fluorescencia individual de cada punto.

La estricta regulación europea aplicada a los productos derivados de OMGs ha permitido el desarrollo de tecnología de arrays de ADN para la identificación de transgénicos autorizados y no autorizados. El sistema, **DualChip® GMO Kit**, facilita la identificación de 30 elementos transgénicos junto a los correspondientes controles para distintas especies vegetales utilizando cebadores biotinilados y un detector colorimétrico.

Las principales ventajas de los chips de ADN son la miniaturización, la alta sensibilidad y el rendimiento del cribado. No obstante, es un método bastante costoso, laborioso y más caro que otros métodos por RTPCR.

### 3.5.3. Secuenciación de nueva generación (NGS)

La tecnología NGS constituye un método alternativo para la detección de OMG autorizados y no autorizados, existiendo para ello diferentes enfoques. Los dos formatos comunes son la secuenciación del genoma completo (WGS) y la secuenciación dirigida después del enriquecimiento.

La secuenciación del genoma completo junto con las herramientas de informática puede realizarse asequiblemente en poco tiempo. Han demostrado ser aplicables para detectar el reordenamiento del ADN y la variación del número de copias así como el lugar de inserción del evento transgénico. No obstante, aún presenta problemas de sensibilidad.

Con la NGS también se podría dilucidar si dos o más OMGs detectados en la muestra corresponden a *eventos simples* o *eventos apilados* (dos o más eventos que se han introducido en el mismo genoma de la planta), lo que implica diferencias en el modo de evaluar si los OMGs de la muestra superan o no el umbral del 0,9%.

En la actualidad, el principal inconveniente de la NGS es su precio y la complejidad del análisis de los datos, lo que restringe su uso en muestras de rutina.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bonfini, L., In Silico Proposal of Screening Strategies for Detecting EU Authorised GMOs, EUR 30919 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021, ISBN 978-92-76-45218-8, doi:10.2760/462085, JRC127110.
2. Demeke, T., & Dobnik, D. (2018). Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(17), 4039–4050. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1010-1>
3. Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de marzo de 2001, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L106, de 17 de abril de 2001. <http://data.europa.eu/eli/dir/2001/18/2021-03-27>
4. Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente (versión refundida). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L125, de 21 de mayo de 2009. <http://data.europa.eu/eli/dir/2009/41/oj>

5. Directiva (UE) 2015/412 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de marzo de 2015 , por la que se modifica la Directiva 2001/18/CE en lo que respecta a la posibilidad de que los Estados miembros restrinjan o prohíban el cultivo de organismos modificados genéticamente (OMG) en su territorio. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L68, de 13 de marzo de 2015. <http://data.europa.eu/eli/dir/2015/412/oj>
6. Directiva (UE) 2018/350 de la Comisión, de 8 de marzo de 2018, por la que se modifica la Directiva 2001/18/CE del Parlamento y del Consejo en lo que respecta a la evaluación del riesgo para el medio ambiente de los organismos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L67, de 9 de marzo de 2018. <http://data.europa.eu/eli/dir/2018/350/oj>
7. Elizarda, D. (2020). "Validación de la técnica reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para cuantificación del promotor camv p-35s y del terminador t-nos en granos de soya". [Trabajo de fin de grado, Universidad Mayor de San Andrés].
8. Envirologix (2022). Immunoassays. Disponible en <https://www.envirologix.com/technology/gmo-protein-detection/>
9. European Commission, Directorate-General for Research and Innovation, (2017). New techniques in agricultural biotechnology, Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2777/574498>
10. European Network of GMO Laboratories (ENGL), Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques, 26 March 2019 (JRC116289)
11. Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., Alnutt, T., Broll, H., De Loose, M., Grohmann, L., Henry, C., Hougs, L., Moens, W., Morisset, D., Ovesna, J., Pecoraro, S., Pla, M., Prins, T., Suter, D., Zhang, D., Van Den Bulcke, M., Plan, D., Van Den Eede, G.(2011). Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorised genetically modified materials : Guidance document from the European Network of GMO Laboratories (ENGL). EUR 25008 EN. Luxembourg: Publications Office of the European Union. JRC6729
12. Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. *Boletín Oficial del Estado*, 100, de 26 de abril de 2003. <https://www.boe.es/eli/es/l/2003/04/25/9/con>
13. López Andreo, M. (2013). Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid].
14. Martínez, S., & Corona, B. (2007). Algunos conceptos relacionados con los organismos genéticamente modificados (OGMs). *Revista de Salud Animal* 29.
15. Orden APA/1083/2018, de 8 de octubre, por la que se dictan medidas para evitar la contaminación transfronteriza derivada del cultivo de maíz modificado genéticamente hacia los estados miembros vecinos en los que esté prohibido el cultivo de dichos

- organismos modificados genéticamente. *Boletín Oficial del Estado*, 252, de 18 de octubre de 2018. <https://www.boe.es/eli/es/o/2018/10/08/apa1083>
16. Reglamento (CE) no 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L268, 18 de octubre de 2003. <http://data.europa.eu/eli/reg/2003/1829/2021-03-27>
17. Reglamento (CE) no 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L268, 18 de octubre de 2003. <http://data.europa.eu/eli/reg/2003/1830/2019-07-26>
18. Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. *Boletín Oficial del Estado*, 27, de 31 de enero de 2004. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2004/01/30/178/con>
19. Real Decreto 364/2017, de 17 de abril, por el que se modifica el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente, aprobado mediante Real Decreto 178/2004, de 30 de enero. *Boletín Oficial del Estado*, 92, de 18 de abril de 2017. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2017/04/17/364>
20. Salisu, IB., Shahid, AA., Yaqoob, A., Ali, Q., Bajwa, KS., Rao, AQ. & Husnain, T. (2017) Molecular Approaches for High Throughput Detection and Quantification of Genetically Modified Crops: A Review. *Front. Plant Sci.* 8, 1670. doi: 10.3389/fpls.2017.01670
21. Santiago Felipe, S. (2015). *Integración de técnicas basadas en ADN para el desarrollo de biosensores aplicados en seguridad alimentaria* [Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València]. RiuNet.
22. Sentencia del Tribunal de Justicia (Gran Sala) de 25 de julio de 2018. Procedimiento prejudicial – Liberación intencionada en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente – Mutagénesis. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A62016CJ0528&qid=1653934825955>
23. Wang, X. J., Jiao, Y., Ma, S., Yang, J. T., & Wang, Z. X. (2020). Whole-Genome Sequencing: An Effective Strategy for Insertion Information Analysis of Foreign Genes in Transgenic Plants. *Frontiers in plant science*, 11, 573871. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573871>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 29**

**CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. COMPOSICIÓN. NORMAS DE CALIDAD. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS**

### **2. COMPOSICIÓN**

### **3. NORMAS DE CALIDAD**

**3.1. Real Decreto 4/2014, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.**

**3.2. Real Decreto 474/2014, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos.**

**3.3. Reglamento 543/2008, por el que se establecen normas en lo que atañe a la comercialización de carne de aves de corral.**

**3.4. Reglamento de ejecución (UE) 2019/627, por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.**

**3.5. Reglamento 1169/2009 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.**

### **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.**

### **5. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

## 1. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS.

El Reglamento 853/2004 define *carne* como las partes comestibles de los siguientes animales, incluida la sangre: ungulados domésticos de las especies bovina, porcina, ovina y caprina y solípedos domésticos, aves de corral, lagomorfos (incluye conejos, liebres y roedores), caza silvestre, caza de cría, caza menor y mayor silvestre.

Por su parte, el Código Alimentario Español define *derivados cárnicos* como los productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o despojos sometidos a operaciones específicas antes de su puesta al consumo.

## 2. COMPOSICIÓN

El Codex Alimentarius define la carne como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin”. La carne se compone de agua, proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos. Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne deriva de sus proteínas de alta calidad, que contienen todos los aminoácidos esenciales, así como de sus minerales y vitaminas de elevada biodisponibilidad, siendo rica en vitamina B12 y hierro.

En el Código Alimentario Español se distinguen cuatro clasificaciones de las carnes.

- a) **Según la especie animal productora.** Carnes de bóvidos, de ovinos, de cápridos, de súidos, de équidos, de camélidos y de cetáceos.
- b) **Según la clase de canal.** Se entiende por *clase*, el tipo de carne que dentro de cada especie animal proporciona la canal en general. Se establecerán distintas clases de carne, según la edad, características musculares y estado de engrasamiento del animal.
- c) **Según la categoría.** Se entiende por *categoría* el tipo de carne que dentro de la canal proporciona cada región anatómica en particular.
- d) **Según la forma en que han sido conservadas y su aptitud para el consumo humano.** Carnes frescas, refrigeradas, congeladas, defectuosas, impropias y nocivas.

En lo que se refiere a los derivados cárnicos, estos se clasifican en:

- 1) **Salazones, ahumados y adobados.** Se trata de carnes sometidas a la acción prolongada del cloruro sódico en forma sólida o de salmuera, que garantice su conservación por un periodo más o menos largo de tiempo.  
La salazón puede preceder a las operaciones de secado y ahumado, y cuando las carnes han sufrido estas últimas se denominan ahumadas. Dentro de este grupo se incluyen jamones y paletillas. En el caso de adición a la sal de especias o condimentos, al derivado cárnico se le aplicará el término de «adobado». En este grupo se incluye la carne picada, consistente en carne adicionada de ajo, perejil y otros condimentos autorizados, pudiendo añadirse tocino en proporción nunca superior al 2%.
- 2) **Tocinos.** Es el tejido adiposo subcutáneo, fresco, de cerdo sano, libre de tejidos no grasos, de color ligeramente blanco rosáceo, de consistencia compacta y untosa, obtenido por despique para su consumo en fresco, salado, condimentado o

industrializado. El tocino debe ser homogéneo, y su punto de fusión oscilar entre 35 y 50°C. Podemos distinguir entre:

- Tocino entreverado. Presenta fibras musculares entre el tejido adiposo.
- Panceta. Es el tocino entreverado fresco, salado o adobado.
- Bacón. Es el tocino entreverado sometido a salazón, adobo y ahumado.

**3) Embutidos, charcutería y fiambres.** Con el nombre genérico de embutidos se designan aquellos derivados, preparados a partir de carnes autorizadas, picadas o no, sometidas o no a procesos de curación, adicionadas o no de despojos comestibles y grasas de cerdo, productos vegetales, condimentos y especias e introducidos en tripas naturales o artificiales. En su elaboración podrá emplearse sal comestible, condimentos y aditivos autorizados. No se permitirá la adición de féculas.

Encontramos embutidos crudos, sometidos únicamente al adobo y amasado antes de llenado en tripa, madurados o no, y sometidos posteriormente al secado y ahumado o no, o embutidos escaldados, preparados con carne finamente picada, sometidos durante tiempo variable a la acción del agua de 70-80°C y ahumados o no posteriormente. Los embutidos se clasifican en:

- a) Embutidos de carne.** Elaborados exclusivamente con carnes autorizadas y grasa de cerdo. Por su composición, se considerarán «puro» o «mezcla», según contengan carne de una o más especies. Por su elaboración, crudos y escaldados. Por su consistencia, duros, blandos y pastosos. Por su color, encarnados y blancos, según tengan o no pimentón. Corresponden a este grupo el chorizo o el salchichón.
- b) Embutidos de vísceras.** Son aquellos que, además de los componentes de los embutidos de carne, contienen trozos de vísceras cocidas o encalladas antes de ser embutidos. Corresponden a este grupo las distintas clases de sabadeñas, longanizas gallegas, salchichas de hígado, etc.
- c) Embutidos de sangre.** Son aquellos de consistencia blanda o semiblanda, crudos o cocidos, en los que su principal constituyente es la sangre, a la que se ha adicionado carne, vísceras, manteca, tocino y productos vegetales varios, introducidos en tripa ancha. Corresponden a este grupo las distintas clases de botagueñas y morcillas
- d) Fiambres.** Son productos de variada composición, constituidos por carne de cerdo, de vacuno, tocino o sus mezclas, aves y sus mollejas, huevo, leche y especias varias, formando bloques protegidos del exterior por finas hojas de tocino, celofán u otras materias autorizadas y contenidos en membranas animales o cualquier otro envoltente autorizado. Corresponden a este grupo el Jamón de York o la Mortadela.

**4) Extractos y caldos de carne.**

**5) Tripas.** Se entiende por tripas naturales diversas regiones del aparato digestivo y vejigas de bóvidos, óvidos, suidos, équidos y piel de aves, utilizadas en la elaboración de embutidos. Las tripas artificiales se obtienen mediante distintos procesos técnicos, de tejidos animales sanos, o de diversos materiales celulósicos autorizados.

### 3. NORMAS DE CALIDAD.

#### 3.1. Real Decreto 4/2014, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.

Establece las características de calidad que deben reunir los productos procedentes del despiece de la canal de animales porcinos ibéricos, que se elaboran o comercializan en fresco así como el jamón, la paleta, la caña de lomo ibéricos elaborados o comercializados en España, para poder usar las denominaciones de venta.

- Jamón, es el producto elaborado con la extremidad posterior, con pata y hueso, que incluye la pieza osteomuscular íntegra, procedente de cerdos adultos, sometida al correspondiente proceso de salazón y curado-maduración.
- Paleta, es el producto elaborado con la extremidad anterior, con mano y hueso, que incluye la pieza osteomuscular íntegra, procedente de cerdos adultos, sometida al correspondiente proceso de salazón y curado-maduración.
- Caña de lomo, es el producto elaborado con el paquete muscular formado por los músculos espinal y semiespinal del tórax, los músculos longísimos, lumbar y torácico del cerdo, prácticamente libre de grasa externa, aponeurosis y tendones, adobado y embutido en tripas naturales o envolturas artificiales, el cual ha sufrido un adecuado proceso de curado-maduración. Incluye las denominaciones lomo embuchado y lomo, puesto que suponen adaptaciones geográficas del nombre del producto.

La denominación de venta de los productos regulados por este real decreto se compone de tres designaciones, que deben concordar en género y figurar por el siguiente orden:

##### 1) Designación por tipo de producto:

- Para productos elaborados: Jamón, paleta, caña de lomo o lomo embuchado o lomo.
- Para productos obtenidos del despiece de la canal comercializados en fresco: La designación de la pieza procedente del despiece, así como sus distintas preparaciones y presentaciones comerciales, en su caso.

##### 2) Designación por alimentación y manejo:

- **De bellota:** Para productos procedentes de animales sacrificados inmediatamente después del aprovechamiento exclusivo de bellota, hierba y otros recursos naturales de la dehesa, sin aporte de pienso suplementario.
- **De cebo de campo, de cebo:** Para los productos procedentes de animales cuya alimentación y manejo, hasta alcanzar el peso de sacrificio, no estén entre los contemplados en el punto anterior.

##### 3) Designación por tipo racial:

- **100% ibérico:** Cuando se trate de productos procedentes de animales con un 100% de pureza genética de la raza ibérica, cuyos progenitores tengan así mismo un 100% de pureza racial ibérica y estén inscritos en el correspondiente libro genealógico.
- **Ibérico:** Cuando se trate de productos procedentes de animales con al menos el 50% de su porcentaje genético correspondiente a la raza porcina ibérica.

### 3.2. Real Decreto 474/2014, norma de calidad de derivados cárnicos.

Establece la caracterización de los derivados cárnicos en función del tratamiento a los que han sido sometidos, los factores de composición y calidad, el etiquetado y, en particular, el marcado e identificación de jamones y paletas para el control del período de elaboración, el autocontrol y la trazabilidad, así como las características físico-químicas que deben cumplir. Con el nombre genérico de derivados cárnicos se designan los productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o menudencias de los animales y sometidos a operaciones específicas antes de su puesta al consumo. Podrán tener como ingredientes:

- Especias y condimentos.
- Agua.
- Vinos y licores.
- Grasas y aceites comestibles.
- Harinas, almidones y féculas de origen vegetal expresado en glucosa.
- Proteínas lácteas y proteínas de origen vegetal: máximo 3 %.
- Azúcares solubles totales expresados en glucosa: máximo 5 %.
- Gelatinas comestibles.
- Otros productos alimentarios autorizados.

Los derivados cárnicos se clasifican en:

**1) Derivados cárnicos tratados por el calor.** Aquellos elaborados con carne, a la que se le puede añadir sangre, grasa o menudencias, que se han sometido en su fabricación a un tratamiento térmico suficiente para alcanzar en su parte interna una coagulación parcial o total de sus proteínas. Adicionalmente pueden ser sometidos a tratamientos de ahumado y maduración. Según el tratamiento térmico utilizado en su elaboración, pueden ser:

- **Derivados cárnicos esterilizados.** Sometidos a tratamiento térmico o equivalente, que no requiere refrigeración para su conservación. Pertenecen a este grupo el jamón cocido y otras piezas cárnicas esterilizadas en conserva, las salchichas enlatadas, chóped enlatado y magro de cerdo en conserva.
- **Derivados cárnicos pasteurizados.** Derivados cárnicos sometidos a tratamiento térmico de pasteurización, mediante cocción u otro tratamiento térmico equivalente, que requieren refrigeración para su conservación. Pertenecen a este grupo el jamón cocido, paleta cocida, pechuga de pavo cocido, lacón cocido, las pastas cárnicas como las mortadelas, el chóped, magro de cerdo, butifarra, salchichas cocidas, cabeza de jabalí, o los chicharrones, entre otros productos. Cuando el jamón y la paleta cocida, la pechuga de pavo, pollo o ave y el magro de cerdo lleven fécula, se denominarán «fiambre de». Para estos productos se determinará: relación humedad/proteína, proteínas libres de colágeno en g/100 g, azúcares solubles totales expresados en g glucosa/100 g, almidón expresado en g glucosa/100 g empleando polarimetría, proteínas añadidas en g/100 g. de soja o lácteas.
- **Derivados cárnicos con tratamiento térmico incompleto.** Son aquellos sometidos a tratamiento térmico suficiente para alcanzar, en su parte interna, una coagulación parcial de las proteínas, sin que se consiga un efecto de pasteurización. Requieren

refrigeración para su conservación y tratamiento culinario previo para su consumo. Pertenecen a este grupo la panceta, el bacón, las morcillas y algunas butifarras.

2) Se entiende por **derivados cárnicos no tratados por el calor**, aquellos en cuya fabricación no han sufrido ningún tratamiento o han sido sometidos a un proceso de curado-maduración, acompañado o no de fermentación, de oreo, de marinado-adobado u otro proceso tecnológico no térmico, suficiente para conferirles las características organolépticas propias. Según las técnicas utilizadas para su elaboración, pueden ser:

- **Derivados cárnicos curado-madurados.** Pueden someterse opcionalmente a ahumado. Integran este grupo el Jamón y paleta, la cecina, la panceta curada o salada, el bacón adobado curado, tocino salado, pechuga curada, el jamón de pato, lomo embuchado, los chorizos, los salchichones, las sobrasadas y otros embutidos desecados como la lengua curada. Este grupo de productos se somete a las siguientes determinaciones: humedad máxima para lomo embuchado, grasa en g/100 g sobre sustancia seca (s.s.s.), hidratos de carbono en g glucosa/100 g s.s.s., proteína total en g/100 g s.s.s., relación colágeno/proteína en porcentaje, proteínas añadidas en g/100 g.
- **Derivados cárnicos oreados.** Integran este grupo los productos sometidos a un proceso de salazón o curación, seguido de un proceso de oreo. Requieren refrigeración para su conservación y tratamiento culinario previo a su consumo. Pertenecen a este grupo el lacón, la panceta oreada, el chorizo oreado y el chorizo criollo, entre otros.
- **Derivados cárnicos marinado-adobados.** Pueden recubrirse de pimentón. Suelen requerir refrigeración para su conservación y tratamiento culinario previo para su consumo. Pertenecen a este grupo el lomo adobado y los pinchos morunos. Se les realizan las siguientes determinaciones: relación humedad/proteína, azúcares solubles totales expresados en % glucosa, proteínas añadidas expresadas en porcentaje.
- **Derivados cárnicos salmuerizados.** Elaborado con carne en cuya fabricación ha sido sometido a un tratamiento con salmuera con el objetivo de mejorar su textura y sabor. Pertenecen a este grupo el codillo en salmuera.
- **Derivados cárnicos no sometidos a tratamiento.** Son aquellos elaborados con carne fresca, incluida la troceada o picada, a la que se añaden otros productos alimenticios, condimentos o aditivos. Pertenecen a este grupo el flamenquín cordobés, la hamburguesa, el steak tartare, la longaniza, la salchicha y el chorizo frescos.

### **3.3. Reglamento 543/2008, por el que se establecen normas en lo que atañe a la comercialización de carne de aves de corral.**

Dado que el contenido de agua presenta un interés particular en la comercialización de la carne de aves de corral congelada o ultracongelada, el Reglamento 543/2008, fija el contenido máximo de agua en las canales de aves de corral congeladas o ultracongeladas y define un sistema de control en mataderos así como en todas las etapas de la comercialización. Los pollos congelados y ultracongelados solo podrán comercializarse dentro de la Comunidad si

su contenido de agua no sobrepasa el mínimo técnico inevitable determinado por uno de estos dos métodos de análisis:

- a) Técnica de escurrido.** Técnica utilizada para determinar la cantidad de agua resultante de la descongelación de pollos congelados o ultracongelados, expresada en porcentaje en peso de agua escurrida. Si la cantidad de agua procedente del escurrido, expresada en porcentaje en peso de la canal, es superior a la cantidad límite, se considera que la canal ha absorbido un excedente de agua durante el tratamiento. La canal se descongelará por un procedimiento controlado que permita calcular el peso del agua escurrida.
- b) Test químico.** Este método se utiliza para determinar el contenido total de agua de los pollos congelados o ultracongelados. El límite superior del contenido total de agua de la canal se determinará a partir del contenido de proteínas de la canal, que puede estar vinculado al contenido de agua fisiológica.

### **3.4. Reglamento de ejecución (UE) 2019/627, por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.**

Establece los requisitos específicos para la realización de controles oficiales y frecuencia mínima de tales controles de carne fresca. También describe los requisitos relativos a la inspección ante mortem en el matadero y a la inspección post mortem. Finalmente, incluye las modalidades prácticas para los controles oficiales de *Salmonella* y *Campylobacter*.

### **3.5. Reglamento 1169/2009 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.**

Establece los requisitos específicos sobre la designación de la «carne picada».

**a) Criterios de composición:**

- carne picada magra: contenido de grasa  $\leq 7\%$  y relación colágeno/proteínas de carne  $\leq 12\%$
- carne picada de vacuno: contenido de grasa  $\leq 20\%$  y relación colágeno/proteínas de carne  $\leq 15\%$
- carne picada que contiene carne de porcino: contenido de grasa  $\leq 30\%$  y relación colágeno/ proteínas de carne  $\leq 18\%$
- carne picada de otras especies: contenido de grasa  $\leq 25\%$  y relación colágeno/ proteínas de carne  $\leq 15\%$

**b) En el etiquetado deberán figurar las expresiones siguientes:**

- «porcentaje de grasa inferior a ...»,
- «relación colágeno/proteínas de carne inferior a ...».

#### **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.**

La Orden de 31 de julio de 1979 establece los métodos oficiales de análisis:

- 1) ALMIDÓN** (Método cualitativo). El almidón reacciona con el yodo dando coloración azul.
- 2) ALMIDÓN** expresado en % de almidón (método cuantitativo). Consiste en extraer azúcares simples con etanol caliente 8%, permaneciendo el almidón. El residuo de almidón se solubiliza con ácido perclórico diluido, y se mide a 630 nm el color desarrollado al calentarlo con el reactivo antrona-sulfúrico.
- 3) CONSERVADORES.** Permite determinar Ácido p-hidroxibenzoico, Éster etílico del ácido p-hidroxibenzoico, Ácido salicílico, Ácido clorobenzoico, Ácido benzoico y Ácido sórbico. Consiste en una extracción de los conservadores por medio de una mezcla de éter y éter de petróleo y posterior identificación por cromatografía en capa fina.
- 4) NITRÓGENO TOTAL expresado en %.** Ataque del producto con sulfúrico concentrado, catalizado con sulfato de cobre y selenio, en el cual se transforma el nitrógeno orgánico en iones amonio, que en medio fuertemente básico, permite la destilación del amoníaco, que es recogido sobre ácido bórico. La posterior valoración con ácido clorhídrico permite el cálculo de la cantidad inicialmente presente de nitrógeno en la muestra. Es posible determinar el porcentaje de proteína total multiplicando el porcentaje N total por 6,25.
- 5) CENIZAS** expresadas en porcentaje de cenizas. El método consiste en la adición de solución de acetato de magnesio, desecación en baño de agua o baño de arena, incineración en horno a 550°C y posterior determinación de la masa del residuo, teniendo en cuenta la cantidad de óxido de magnesio proveniente de la adición de la solución de acetato de magnesio utilizada en primer lugar.
- 6) FÓSFORO.** El método consiste en una transformación en ácido pirofosfórico, posterior hidrólisis del mismo y medida del color producido al añadirle el reactivo molibdato-vanadato. El contenido en fósforo total, expresado en porcentaje de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, se calcula a partir de la lectura en el espectrofotómetro y con ayuda de la curva patrón.
- 7) CLORUROS.** La determinación del % de cloruros presentes en la muestra, expresado en cloruro sódico, se lleva a cabo mediante extracción de los cloruros del producto picado con agua caliente y alcohol y posterior determinación por el método Carpentier-Vohlard.
- 8) GRASA.** La determinación de la grasa en porcentaje de peso se realiza mediante la extracción de la grasa de la muestra previamente hidrolizada y desecada, por medio de hexano o éter de petróleo. Eliminación del disolvente por evaporación, desecación del residuo y posterior pesada después de enfriar.
- 9) HUMEDAD.** La determinación de la humedad en porcentaje se realiza mediante la formación de una pasta con ayuda de arena y etanol, que es sometida primeramente a un presecado en baño de María y a continuación secada a 102 ± 2°C hasta obtener un peso constante.

- 10) AZÚCARES TOTALES, REDUCTORES Y LACTOSA.** Los azúcares se disuelven en etanol diluido o en agua y, tras la eliminación del alcohol, se valoran por el método Luff-Schoorl antes y después de la inversión, expresando el resultado en porcentaje de azúcares. La diferencia entre el porcentaje de azúcares totales y el de azúcares reductores, multiplicado por 0,95 da el contenido en sacarosa de la muestra. El contenido en azúcares reductores, exceptuando la lactosa se obtiene multiplicando el valor de ésta por 0,675 y restando este resultado del contenido en azúcares reductores totales.
- 11) HIDROXIPROLINA.** La hidroxiprolina en porcentaje se determina mediante hidrólisis en medio ácido de las proteínas y oxidación de la hidroxiprolina. El derivado formado con el p-dimetilaminobenzaldehído se valora colorimétricamente. La cantidad de hidroxiprolina se puede transformar en colágeno multiplicándola por un factor de 8, ya que el porcentaje de hidroxiprolina en el colágeno es del 14%.
- 12) NITRITOS.** Los nitritos se utilizan en los productos cárnicos desde para garantizar su conservación y su seguridad a nivel microbiológico, en particular si se trata de productos curados, inhibiendo la multiplicación de *Clostridium botulinum*, bacteria causal del botulismo. Por otro lado, se reconoce que la presencia de nitritos en productos cárnicos puede propiciar la formación de nitrosaminas, algunas de las cuales son carcinógenas. Por consiguiente, la legislación en este ámbito debe lograr un equilibrio entre el riesgo de formación de nitrosaminas por la presencia de nitritos en productos cárnicos y sus efectos protectores. El Reglamento 1333/2008 establece las cantidades máximas de nitrito potásico y nitrito sódico que pueden añadirse durante la fabricación de productos cárnicos. En cuanto al método, del extracto obtenido, adicionándole ácido sulfanílico y  $\alpha$ -nactilamina, se lee la intensidad de la coloración mediante colorimetría o espectrofotometría. El contenido en nitritos de la muestra se expresa en ppm de  $\text{NO}_2\text{Ca}$ .
- 13) NITRATOS.** Según este método, al reaccionar los nitratos con la brucina en medio sulfúrico se produce una coloración amarilla-marrón, cuya intensidad es proporcional al contenido en nitratos presentes, lo que permite su valoración colorimétrica o espectrofotométrica. Llevar la absorbancia obtenida a la curva patrón y expresar el correspondiente contenido de nitratos en mg/kg.
- 14) pH.** Medida del potencial eléctrico creado en la membrana de un electrodo de vidrio, función de la actividad de iones hidrógeno a ambos lados de la membrana. Utilizar como referencia un electrodo de calomelanos.
- 15) MÉTODOS BIOLÓGICOS. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE ANIMAL.** Las proteínas musculares de las distintas especies animales, aunque muy similares entre sí, tienen en cada grupo zoológico una estructura específica que permite diferenciar carnes de especies distintas por métodos serológicos (técnica de Uhlenhuth). Sólo es aplicable a productos crudos. Se trata de una técnica de precipitación antígeno-anticuerpo en la que la reacción positiva se produce con la aparición de un anillo blanquecino, opalescente, antes de 15 minutos. Reacciones positivas posteriores a este tiempo deben considerarse inespecíficas puesto que, para un mismo antígeno, la reacción tiene lugar a distintos tiempos según sea el título del antisuero específico empleado.

## **5. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

De acuerdo con el Código Alimentario Español, se entiende por alimento adulterado todo alimento al que se haya adicionado o sustraído cualquier sustancia para variar su composición, peso o volumen, con fines fraudulentos o para encubrir o corregir cualquier defecto debido a ser de inferior calidad o a tener ésta alterada.

Los fraudes más frecuentes en el sector cárnico incluyen:

- a) Mayor contenido en grasa** respecto al declarado en el etiquetado.
- b) Exceso de Agua.** Más del 5% debe ser declarado en el etiquetado.
- c) Adición de carne de menor calidad, tendones o cartílagos.** El colágeno es una de las proteínas predominantes en el tejido conjuntivo, el cartílago y los huesos de los animales. El colágeno tiene menor interés nutricional y difiere del resto de proteínas de la carne en la cantidad y proporción de aminoácidos. Así, en el colágeno los niveles de glicinia, prolina, 4-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina son muy superiores a los que hay en los tejidos musculares. De hecho, la hidroxiprolina se encuentra de manera prácticamente exclusiva en el colágeno. Esto hace que la determinación de la cantidad de colágeno, y más concretamente del nivel de 4-hidroxiprolina, sea considerada una buena estimación de la calidad de un derivado cárnico, ya que una cantidad elevada de este compuesto es indicativa de la utilización de partes del animal de menor calidad en su elaboración.
- d) Presencia de proteínas no cárnicas.** De acuerdo con el Real Decreto 474/2014, los derivados cárnicos no podrán contener más de un 3% de proteínas lácteas y proteínas de origen vegetal. Para detectar la presencia de proteínas de soja o lácteas añadidas por encima del porcentaje permitido puede emplearse la técnica ELISA
- e) Presencia de carne de especies no declaradas.** A raíz de los controles oficiales llevados a cabo en 2012, se detectó que algunos productos alimenticios envasados contenían carne de caballo no declarada en la lista de ingredientes que figuraba en su envase o etiqueta. El porcentaje por debajo del cual se considera que no hay fraude es del 1%.

La identificación de la especie de la que procede la carne es una herramienta útil en el control de la calidad de los alimentos, no sólo por el interés económico, sino también por razones de salud, éticas y culturales. Así, la sustitución de especies cuya carne es de mayor calidad por otras más baratas, la fabricación de productos con menor cantidad de una determinada especie respecto a la declarada en el etiquetado, la presencia de carne en productos vegetarianos o la presencia de especies no permitidas para algunos grupos religiosos, como los alimentos declarados como kosher o halal ha impulsado el desarrollo de métodos analíticos para la identificación de especies animales en productos cárnicos. Destacan las técnicas basadas en análisis de proteínas y las basadas en análisis de ADN.

- **Técnicas basadas en análisis de proteínas**, como las electroforéticas, cromatográficas, e inmunológicas. Una de las limitaciones que presentan las técnicas electroforéticas y cromatográficas es que pueden generar perfiles proteicos similares para las distintas especies animales, dificultando su correcta identificación. Con relación a las técnicas inmunológicas, los resultados obtenidos son más sencillos de interpretar, aunque su

principal problema se presenta cuando los productos que se analizan han sido sometidos a tratamientos térmicos que desnaturalizan las proteínas. La técnica ELISA es capaz de detectar la presencia de proteínas de varias especies mediante una reacción específica entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo, permitiendo además la cuantificación de proteína al compararla con un patrón.

- **Técnicas basadas en análisis de ADN.** Las técnicas genéticas, concretamente las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una estrategia idónea para la detección e identificación de especies animales en alimentos. Los métodos genéticos presentan importantes ventajas, como la pequeña cantidad de muestra requerida para el análisis, el mayor grado de variabilidad genética examinado y la posibilidad de analizar muestras sometidas a distintos tratamientos tecnológicos, incluida la esterilización. Las técnicas de PCR convencionales son útiles para la identificación y la detección cualitativa de distintas especies animales en una mezcla mientras que la PCR en tiempo real es más adecuada cuando se pretende cuantificar el porcentaje de incorporación de una especie en un producto.

Los genes mitocondriales son idóneos para la identificación de especies ya que disponen de regiones conservadas, sobre las que se pueden diseñar cebadores para la amplificación de un amplio número de especies, y regiones variables, sobre las que se pueden diseñar cebadores a nivel de especie. En el caso de la identificación de variedades, orígenes geográficos o de individuos, resultan más apropiados por su mayor variabilidad la región de control D-loop del ADNA mitocondrial o secuencias de ADN nuclear como microsatélites o polimorfismos. También se utilizan los genes 12S rRNA y 16S rRNA para identificación de especies.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Reglamento (UE) 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) 922/72, (CEE) 234/79, (CE) 1037/2001 y (CE) 1234/2007.

Orden de 31 de julio de 1979 por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aceites y grasas, productos cárnicos, cereales y derivados fertilizantes, productos fitosanitarios, productos lácteos, piensos, aguas y productos derivados de la uva.

Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos.

Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.

Reglamento (CE) 543/2008 de la Comisión de 16 de junio de 2008 por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (CE) 1234/2007 del Consejo en lo que atañe a la comercialización de carne de aves de corral.

Reglamento de ejecución (UE) 2019/627 de la Comisión de 15 de marzo 2019, por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se modifica el Reglamento (CE) 2074/2005 de la Comisión en lo que respecta a los controles oficiales.

Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.

Reglamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios.

Decisión (UE) 2018/702 de la Comisión de 8 de mayo de 2018 relativa a las disposiciones nacionales notificadas por Dinamarca sobre la adición de nitritos a determinados productos cárnicos.

<https://www.ivami.com/es/>

[https://www.uv.es/gidprl/fraudes/tienen\\_carne\\_las\\_hamburguesas.html](https://www.uv.es/gidprl/fraudes/tienen_carne_las_hamburguesas.html)

[https://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr\\_composition.html#:~:text=La%20carne%20se%20compone%20de,como%20peque%C3%B1as%20cantidades%20de%20carbohidratos.](https://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html#:~:text=La%20carne%20se%20compone%20de,como%20peque%C3%B1as%20cantidades%20de%20carbohidratos.)

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 30**

**Leche y productos lácteos. Composición. Normas de calidad.  
Determinaciones analíticas. Detección de adulteraciones.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. COMPOSICIÓN**

#### **2.1. LECHE**

#### **2.2. PRODUCTOS LÁCTEOS**

### **3. NORMAS DE CALIDAD**

### **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

#### **4.1. LECHE.**

**4.1.1. Control durante el proceso de producción de la leche.**

**4.1.2. Métodos de análisis de la leche tratada térmicamente destinada al consumo humano directo.**

**4.1.3. Métodos oficiales de análisis de leche.**

**4.1.4. Métodos oficiales de análisis de determinados tipos de leche parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana.**

#### **4.2. PRODUCTOS LÁCTEOS**

**4.2.1. Queso.**

**4.2.2. Mantequilla.**

### **5. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

## 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el *Reglamento (UE) 1308/2013*, por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios, se entenderá por *leche* la secreción mamaria normal obtenida a partir de uno o más ordeños, sin ningún tipo de adición ni extracción. La denominación genérica de leche comprende únicamente la leche de vaca, de modo que se declarará la especie animal de la que procede la leche siempre que no sea la especie bovina.

Se considerará leche de consumo:

- a) **leche cruda**, no calentada a más de 40°C ni tratamiento de efecto equivalente.
- b) **leche entera**, entendida como leche tratada térmicamente.
- c) **leche semidesnatada**, es la leche tratada térmicamente cuyo contenido de materia grasa se haya reducido entre un 1,5% y un 1,8% (m/m) como máximo.
- d) **leche desnatada** es la leche tratada térmicamente cuyo contenido de materia grasa se haya reducido a un porcentaje de un 0,5% (m/m), como máximo.

En el *Código Alimentario Español* podemos encontrar una clasificación de la leche según el tratamiento que se le aplique:

- a) **Leche higienizada**. Leche natural sometida a un proceso tecnológico que asegure la total destrucción de gérmenes patógenos y la casi totalidad de la flora banal, sin modificación sensible de su naturaleza físico-química, características biológicas y cualidades nutritivas.
- b) **Leche certificada**. Es la procedente de explotaciones ganaderas en las que los procesos de producción, obtención, envasado y distribución están sometidos a un riguroso control sanitario oficial que garantice la inocuidad y valor nutritivo del producto.
- c) **Leches especiales**. Son las procedentes de la leche natural mediante ciertas operaciones que cambian o modifican su composición característica. En este grupo se incluyen la leche concentrada, desnatada, las leches fermentadas o acidificadas, leches enriquecidas y leches adicionadas de aromas y/o estimulantes.
- d) **Leches conservadas**. Son las procedentes de la leche natural manipulada industrialmente para asegurar la duración de su aprovechamiento alimenticio por más de treinta días. Se distinguen varios tipos: leche esterilizada, evaporada, condensada y leche en polvo.

En el momento de su venta, cada tipo de leche reunirá una serie de características establecidas en el *Código Alimentario Español*, en relación a los siguientes parámetros:

- 1) Materia grasa en porcentaje en peso.
- 2) Lactosa en porcentaje en peso.
- 3) Proteínas en porcentaje en peso.
- 4) Cenizas en porcentaje en peso.
- 5) Extracto seco magro en porcentaje en peso.
- 6) Acidez, expresada en gramos de ácido láctico por 100 mililitros de leche.
- 7) Prueba de la fosfatasa alcalina.
- 8) Humedad en porcentaje en peso.
- 9) Índice de solubilidad en ml.

En cuanto a los *productos lácteos*, el Reglamento (UE) 1308/2013 los define como aquellos productos derivados exclusivamente de la leche, pudiendo añadirse las sustancias necesarias para su fabricación, siempre que dichas sustancias no se utilicen para sustituir, enteramente o en parte, algún componente de la leche. Por su parte, el Código Alimentario Español (CAE) define *derivados de la leche* como los distintos productos obtenidos a partir de la leche mediante tratamientos tecnológicos adecuados, dentro de los cuales se distinguen los siguientes grupos: nata, mantequilla, quesos y quesos fundidos, sueros lácteos y requesón.

## 2. COMPOSICIÓN.

### 2.1. LECHE.

La leche cruda de mamíferos se compone de hidratos de carbono, grasas y proteínas, así como de vitaminas, minerales y otros componentes minoritarios. Esta mezcla es semejante en las diferentes especies, pero en distintas proporciones, lo que da lugar a diferencias entre la leche de vaca, oveja y cabra respecto a los valores de densidad, punto de congelación y acidez, superiores en la de oveja al tener más proteínas y menos agua. Entre los principales componentes de la leche distinguimos:

- a) **Agua.** Principal componente de la leche, que supone en torno al 87% de la misma.
- b) **Proteínas.** Constituyen el 3% de la leche. Distinguimos varios grupos:
  - **Caseínas.** Representan el 80% del total de proteínas de la leche. Existen cuatro tipos: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), kappa ( $\kappa$ ) y gamma ( $\gamma$ ). La caseína  $\kappa$  es la más importante por su relevancia en la coagulación de la leche al estabilizar a otras caseínas en presencia de calcio para formar las llamadas micelas.
  - **Proteínas del lactosuero o seroproteínas,** que suponen el 20% de las proteínas de la leche, como la  $\alpha$ -lactoalbumina, la  $\beta$ -lactoglobulina o la lactoferrina. Se trata de proteínas solubles que se mantienen en disolución cuando las caseínas precipitan.
- c) **Hidratos de carbono.** El azúcar predominante en leche (en torno al 5%) y que sólo se encuentra en la leche, es la **lactosa**, disacárido compuesto de glucosa y galactosa, de sabor dulce, sensible al calor, que puede ser fermentado por bacterias.
- d) **Materia grasa.** Representa el 4% de la leche y se encuentra en forma de pequeños glóbulos emulsionados en el suero. El tamaño de estos glóbulos varía con la especie.
- e) Los **minerales** de la leche se encuentran tanto disueltos como en estado coloidal formando compuestos con la caseína. Destaca la presencia de calcio.
- f) **Enzimas.** Proceden de la propia leche o son producidas por microorganismos presentes en la leche cuando se ordeña o que la contaminan tras su producción. Son indicadores del tratamiento térmico, de la calidad higiénica de la leche y de la especie de procedencia.

### 2.2. PRODUCTOS LÁCTEOS.

El Real Decreto 1113/2006, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos, define **queso** como el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido

de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre caseína y proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche.

El **Real Decreto 271/2014** define **yogur** como el producto de leche coagulada obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche o de leche concentrada, desnatadas o no, o de nata, o de mezcla de dos o más de dichos productos, con o sin la adición de otros ingredientes lácteos que previamente hayan sufrido un tratamiento térmico u otro tipo de tratamiento, equivalente, al menos, a la pasterización. El conjunto de los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en la parte láctea del producto terminado. Los microorganismos transforman el azúcar propio de la leche, la lactosa, en ácido láctico, lo que produce una acidificación y hace que las proteínas de la leche coagulen y las grasas y proteínas sufren una predigestión, transformándose en sustancias más sencillas. Todos estos procesos determinan el sabor, aroma y consistencia final del yogur. En general, la composición nutricional del yogur es muy similar a la de la leche, de la cual procede.

Según el **Reglamento 1308/2013**, las materias grasas lácteas se definen como productos presentados en forma de emulsión sólida y maleable, derivados exclusivamente de la leche o de determinados productos lácteos, en los que la materia grasa es el componente esencial; no obstante, pueden contener otras sustancias necesarias para su fabricación, siempre y cuando no se utilicen para sustituir total o parcialmente alguno de los componentes de la leche. En este grupo distinguimos varios productos, entre ellos la **mantequilla**, que es el producto con contenido de materia grasa láctea igual o superior al 80% e inferior al 90%, con contenidos máximos de agua del 16% y de materia láctea seca no grasa del 2%.

### **3. NORMAS DE CALIDAD.**

- 1) Real Decreto 1728/2007**, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo.
- 2) Real Decreto 752/2011**, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra.
- 3) Real Decreto 1533/1991**, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos.
- 4) Real Decreto 1181/2018**, relativo a la indicación del origen de la leche utilizada como ingrediente en el etiquetado de la leche y los productos lácteos. Se indicará el origen de la leche utilizada como ingrediente que represente un porcentaje superior al 50% respecto al total de ingredientes utilizados.

- 5) **Real Decreto 1054/2003**, por el que se aprueba la Norma de calidad para determinados tipos de leche conservada parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana. Establece los tratamientos, adiciones autorizadas y materias primas empleadas en su fabricación.
- 6) **Orden de 20 de octubre de 1983** por la que se aprueba la Norma General de Calidad para la leche concentrada destinada al mercado interior.
- 7) **Real Decreto 867/2008**, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación.
- 8) **Real Decreto 262/2011**, por el que se aprueba la norma de composición y características específicas para el **queso "Ibérico"**. Esta norma define los requisitos de composición y características que debe reunir el queso "Ibérico".
- 9) **Orden de 9 de julio de 1987** por la que se aprueban las normas de composición y características específicas para los quesos «Hispanico», «Ibérico» y «De la Mesta», destinados al mercado interior.
- 10) **Orden de 29 de noviembre de 1975** por la que se aprueban las normas de calidad para los quesos «Cheddar», «Edam», «Gouda», «Emmental», «Gruyère» y «Danablu». En ella se definen aquellos requisitos que debe reunir estos quesos para su adecuada comercialización en el mercado nacional.
- 11) **Real Decreto 271/2014**, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. Establece normas de calidad para elaboración y comercialización del yogur.
- 12) **Codex CXS 279-1971**. Los requisitos recomendados para la comercialización de la mantequilla en el comercio internacional se encuentran recogidos en esta norma del Codex Alimentarius.

#### **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.**

##### **4.1. LECHE.**

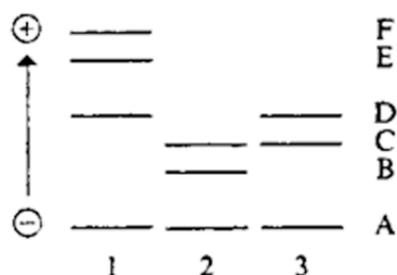
**4.1.1. Control durante el proceso de producción de la leche.** Según el Real Decreto 1728/2007, a lo largo del proceso de producción de leche se realizarán dos tipos de controles de calidad, uno en la explotación previo a la carga de la leche cruda de vaca en la cisterna de transporte, y otro en el centro lácteo previo a su descarga. Cuando no se superen los controles de calidad, se impedirá la comercialización de la leche. Se verificarán determinados parámetros a fin de comprobar que la leche reúne las condiciones higiénico-sanitarias adecuadas como el control de la temperatura y se analizará el punto crioscópico, grasa, proteína, extracto seco magro, células somáticas, colonias de gérmenes a 30°C y presencia de residuos de antibióticos.

**4.1.2. Métodos de análisis de la leche tratada térmicamente destinada al consumo humano directo.** Se establecen a través de la Decisión 92/608/CEE.

- 1) **Materia seca.** Se trata del residuo, expresado en porcentaje en masa, obtenido tras la desecación por evaporación del agua a  $102\pm 2^{\circ}\text{C}$  de una porción de muestra.
- 2) **Contenido en materia grasa.** Se determina por el método Roese-Gottlieb.
- 3) **Contenido en materia seca no grasa total.** Se expresa en porcentaje en masa y es igual al contenido de la materia seca menos el contenido en materia grasa.
- 4) **Contenido total en nitrógeno de la leche.** Se trata del contenido de nitrógeno, expresado en porcentaje en masa, determinado mediante el método Kjeldahl.
- 5) **Contenido total de proteínas.** Se trata de la proporción en masa de las partes proteicas de la leche por 100 partes de la leche de que se trate, obtenida al multiplicar por un factor adecuado el contenido de nitrógeno total de la leche. Así, el contenido de proteínas de la leche, expresado en porcentaje en masa, es igual a 6,38 multiplicado por el contenido de N total de la leche en %.
- 6) **Masa volúmica.** El peso específico de la leche es la razón existente entre la masa de un volumen determinado de leche a  $20^{\circ}\text{C}$  y la masa del mismo volumen de agua a  $20^{\circ}\text{C}$ . El peso específico a  $20^{\circ}\text{C}$  se determina mediante un hidrómetro.

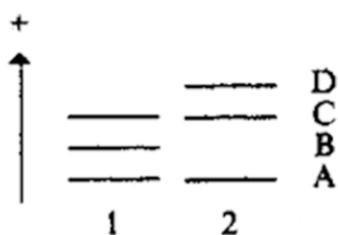
#### **4.1.3. Métodos oficiales de análisis de leche.** Establecidos en el Real Decreto 1533/1991.

- 1) **Detección de leche de vaca en mezclas con leche de oveja y cabra mediante extracción de la caseína y posterior separación por electroforesis en gel de poliacrilamida.** Se puede detectar la leche de vaca en estas mezclas ya que la caseína  $\alpha_1$  de leche de vaca presenta mayor movilidad electroforética que las caseínas  $\alpha_2$  de leches de oveja o cabra, por lo que se hace visible por encima de las bandas de caseína de oveja o cabra. Esta técnica permite detectar un 2% de leche de vaca en leche de oveja o en leche de cabra.
- 2) **Determinación de leche de vaca en leche de oveja o de cabra por inmunodifusión radial (método inmunológico).** Se basa en la precipitación de las inmunoglobulinas de la leche de vaca por la acción de un antisuero específico (inmunodifusión). Cuando la muestra contiene leche de vaca, se produce una reacción que se observa en forma de halo alrededor de la muestra. El diámetro de este halo es proporcional a la concentración. Una reacción negativa debe ser confirmada por la técnica electroforética de las caseínas.
- 3) **Determinación de leche de vaca en leche de oveja o de cabra mediante método electroforético,** separando las proteínas de suero en gel de poliacrilamida. Las  $\beta$  lactoglobulinas de leche de vaca presentan una mayor movilidad electroforética que las  $\alpha$  lactoalbúminas y las  $\beta$  lactoglobulinas de la leche de oveja y de cabra. Un resultado negativo debe ser confirmado por la técnica electroforética de las caseínas. En el diagrama se observa el orden de las bandas correspondientes a las proteínas de menor a mayor movilidad electroforética en leche de vaca (1), de cabra (2) y leche de oveja (3).



A= Seroalbúmina (BSA)  
B=  $\beta$  lactoglobulina de cabra  
C=  $\alpha$  lactoalbúmina de cabra y oveja  
D=  $\alpha$  lactoalbúmina vaca y  $\beta$  lactoglobulina oveja  
E=  $\beta$  lactoglobulina B de vaca  
F=  $\beta$  lactoglobulina A de vaca

- 4) **Determinación de leche de cabra en leche de oveja empleando un método electroforético** para separar las proteínas de suero en gel de poliacrilamida. La  $\beta$  lactoglobulina de leche de cabra presenta una menor movilidad electroforética que la  $\alpha$  lactoalbúmina y la  $\beta$  lactoglobulina de la leche de oveja. En el diagrama se observa el orden de las bandas de las proteínas de menor a mayor movilidad electroforética en la leche de cabra (1) y en la de oveja (2).



A= Seroalbúmina (BSA)  
B=  $\beta$  lactoglobulina de cabra  
C=  $\alpha$  lactoglobulina de cabra y oveja  
D=  $\beta$  lactoglobulina de oveja

- 5) **Determinación de leche de cabra en leche de oveja por inmunodifusión radial (método inmunológico)**. Se basa en la precipitación de las inmunoglobulinas de la leche de cabra por la acción de un antisuero específico (inmunodifusión). Cuando la muestra contiene leche de cabra, se produce una reacción que se observa en forma de halo alrededor de la muestra. El diámetro de este halo es proporcional a la concentración. Una reacción negativa debe ser confirmada por la técnica electroforética de las proteínas del suero.

4.1.4. **Métodos oficiales de análisis de determinados tipos de leche parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana**. Establecidos en la Orden de 26 de enero de 1989.

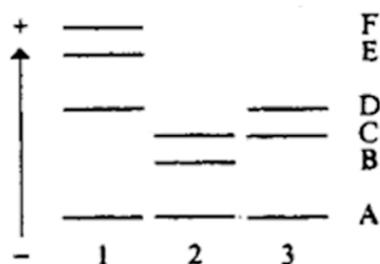
- 1) **Extracto seco**. La masa obtenida tras desecación en estufa de la muestra de leche constituye el extracto seco. Se expresa en porcentaje de la masa de la muestra.
- 2) **Humedad**. Se trata de la pérdida de masa durante un proceso de desecación a presión atmosférica en estufa a  $102 \pm 1^\circ\text{C}$  hasta obtención de una masa constante. La pérdida de masa se calcula en porcentaje de la masa de muestra.
- 3) **Materia grasa**. Se determina por el método Rose-Gottlieb. El contenido en materia grasa de la muestra se expresa en porcentaje.
- 4) **Sacarosa**. Método polarimétrico basado en el principio de inversión de Clerget: un tratamiento suave con ácido hidroliza completamente la sacarosa y su contenido se deduce del cambio de poder rotatorio del líquido filtrado antes y después de la inversión.

- 5) **Ácido láctico y lactatos.** El método se basa, previa eliminación de la materia grasa, en que las proteínas y la lactosa, el ácido láctico y los lactatos se transforman en acetaldehído que se determina colorimétricamente a 570 nm por reacción con p-hidroxidifenilo.
- 6) **Actividad de la fosfatasa.** Es una enzima que se encuentra adherida a la membrana del glóbulo graso o asociada con lipoproteínas. Su contenido aumenta de la fase calostrual en adelante. Al ser muy termolábil se puede inactivar por un calentamiento (unos segundos a 72°C o varios minutos a 60°C), por lo que es un indicador de la eficacia del tratamiento térmico de la pasteurización. La actividad fosfatasa de leche en polvo se determina con el método de Sanders y Sager modificado o el método Aschaffenburg y Mullen.

## 4.2. PRODUCTOS LÁCTEOS

### 4.2.1. QUESO.

- a) **Orden de 29 de noviembre de 1975.** En esta orden podemos encontrar
- **Extracción de la grasa** del queso mediante pentano o éter de petróleo.
  - **Contenido en materia grasa** (expresado en %). Se determina gravimétricamente por digestión del queso con ácido clorhídrico y subsiguiente extracción de la grasa de una solución ácido-alcohólica con la ayuda de éter dietílico y éter de petróleo, evaporación de los disolventes y posterior pesada de los residuos.
  - **Extracto seco.** Es la masa en porcentaje ponderal que queda tras una desecación.
- b) **Real Decreto 1113/2006.** Para quesos elaborados con leche de vaca, cabra y oveja, este RD establece el límite mínimo de **colesterol** dentro de los esteroides determinados por cromatografía gaseosa, que será del 98% sobre la fracción esterólica del insaponificable.
- c) El **Real Decreto 1533/1991** describe los siguientes métodos oficiales de análisis.
- **Nitratos y nitritos.** La grasa y la proteína se precipitan y filtran. Reducción del nitrato a nitrito, por medio de una columna de cadmio. Desarrollo de una reacción coloreada en el filtrado no reducido por adición de sulfanilamida y cloruro de N-1 naftiletildiamina. Medición de la absorbancia de la solución obtenida a 538 nm.
  - **Determinación de leche de vaca en queso de oveja o de cabra mediante método electroforético,** separando las proteínas de suero en gel de poliacrilamida. Las  $\beta$  lactoglobulinas de leche de vaca presentan una mayor movilidad electroforética que las  $\alpha$  lactoalbúminas y las  $\beta$  lactoglobulinas de leche de oveja y cabra. En el diagrama se observa el orden de las bandas correspondientes a las proteínas de menor a mayor movilidad electroforética en leche de vaca (1), de cabra (2) y leche de oveja (3).



- A= Seroalbúmina (BSA)
- B=  $\beta$  lactoglobulina de cabra
- C=  $\alpha$  lactoalbúmina de cabra y oveja
- D=  $\alpha$  lactoalbúmina vaca y  $\beta$  lactoglobulina oveja
- E=  $\beta$  lactoglobulina B de vaca
- F=  $\beta$  lactoglobulina A de vaca

- **Determinación de leche de cabra en queso de oveja mediante método electroforético**, separando las proteínas del suero por electroforesis en gel de poliacrilamida. La  $\beta$  lactoglobulina de leche de cabra presenta una menor movilidad electroforética que la  $\alpha$  lactoalbúmina y la  $\beta$  lactoglobulina de la leche de oveja. En el diagrama se observa el orden de las bandas correspondientes a las proteínas de menor a mayor movilidad electroforética en leche de cabra (1) y en la leche de oveja (2).



A= Seroalbúmina (BSA)  
B=  $\beta$  lactoglobulina de cabra  
C=  $\alpha$  lactoglobulina de cabra y oveja  
D=  $\beta$  lactoglobulina de oveja

#### 4.2.2. MANTEQUILLA.

En el Real Decreto 1533/1991 por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos, se establece que la extracción de la grasa en mantequilla se llevará a cabo mediante la separación de las fases acuosa y grasa mediante fusión, decantación y filtración.

Otros métodos de análisis relacionados con la mantequilla son:

- 1) Triglicérido del ácido enántico por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID).
- 2) Ácidos grasos por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID).
- 3) Humedad por gravimetría.
- 4) Extracto seco por gravimetría.
- 5) Materia grasa por gravimetría.

#### 5. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES.

El Reglamento (UE) 1308/2013 autoriza a que se realicen las siguientes modificaciones en la composición de la leche, únicamente si se indican en el envase del producto de forma claramente visible y legible y de manera indeleble:

- a) modificación del contenido natural de materia grasa de la leche mediante la retirada o la adición de nata o la adición de leche entera, semidesnatada o desnatada.
- b) enriquecimiento de la leche con proteínas procedentes de leche, con sales minerales o con vitaminas y la reducción del contenido de lactosa de la leche mediante su conversión en glucosa y galactosa. Cuando se añadan proteínas, el contenido en proteínas de la leche enriquecida deberá ser superior o igual a 3,8 % (m/m).

El texto del Código Alimentario Español define alimento adulterado como aquel alimento al que se haya adicionado o sustraído cualquier sustancia para variar su composición, peso o volumen, con fines fraudulentos o para encubrir o corregir cualquier defecto debido a ser de

inferior calidad o a tener ésta alterada. El fraude más frecuente consiste en modificar la composición de un alimento y reemplazar parte de sus componentes por otros más baratos.

Algunas de las adulteraciones específicas en leche son:

- 1) **Adición de neutralizantes y alcalinizantes**, como NaOH, KOH, carbonatos, bicarbonatos, cal, amoníaco. El pH de la leche da información acerca de su frescura. Una leche fresca es neutra o ligeramente ácida, pero si han actuado las bacterias lácticas, la lactosa se degrada transformándose en ácido láctico, y el pH disminuye. Por el contrario, valores de pH superiores a 7 indican que la leche presenta compuestos con características alcalinas, propios de leches mamáticas. A veces, estas sustancias prohibidas son añadidas deliberatamente a la leche “vieja” o mal conservada para corregir su pH y su acidez hacia valores típicos de muestras frescas o bien conservadas.
- 2) **Adición de grasa vegetal**. Su presencia se puede determinar por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID). Si en el cromatograma se obtiene un pico cuyo tiempo de retención corresponde al del beta-sitosterol, se concluye la presencia de grasa vegetal en la muestra. La presencia en el cromatograma de picos de otros fitosteroles, como el campesterol o el estigmasterol, refuerza esta conclusión.
- 3) **Aguado**. El punto crioscópico es un parámetro físico de gran interés para evaluar cuantitativamente la cantidad de agua añadida a una leche, lo que se conoce como aguado. La elevación del punto crioscópico indica aguado de la leche. Por el contrario, la acidificación de la leche o la adición de sales minerales rebajan el punto crioscópico.
- 4) **Sustitución o mezcla de leche de distintas especies**. En algunos casos se trata de un fraude económico debido al diferente precio de la leche de cada especie, pero en muchos otros se trata de un problema de manejo en explotaciones mixtas o de limpieza de tanques y cisternas. En cualquier caso, la presencia de leche de especies no deseadas da lugar a una pérdida de calidad en el producto final. La detección de adulteraciones por mezcla de leche de distintas especies se realiza mayoritariamente con métodos inmunoquímicos (ELISA e inmunocromatografía). Para ello se usa como marcador una proteína presente en la leche, la inmunoglobulina G.
  - *Sustitución de leche de vaca por leche de oveja o cabra*. Las principales diferencias que se observan entre la leche de estas tres especies se deben a la mayor riqueza de la de oveja en grasa y proteína. Esto hace que la viscosidad y el contenido en materia seca en leche de oveja sea mayor que la de las otras dos especies. La conductividad eléctrica es algo más baja en el caso de la leche de oveja que en el de vaca o cabra. Este parámetro tiene cierto interés práctico para el conocimiento indirecto del estado sanitario de la ubre, ya que los valores normales se ven incrementados cuando se producen infecciones mamáticas.
  - *Determinación de leche de vaca en mezclas con leche de oveja y cabra*. Se puede detectar leche de vaca en estas mezclas mediante extracción de la caseína y posterior separación electroforética en gel de poliacrilamida gracias a la mayor movilidad de la caseína de leche de vaca que de las caseínas de leche de oveja o cabra.

- *Determinación de leche de vaca en leche de oveja o de cabra* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas séricas. Las  $\beta$ -lactoglobulinas de leche de vaca presentan una mayor movilidad electroforética que las  $\alpha$ -lactoalbúminas y las  $\beta$ -lactoglobulinas de la leche de oveja y de la leche de cabra.
- *Determinación de leche de vaca en leche de oveja o de cabra* empleando un método inmunológico.
- *Determinación de leche de cabra en leche de oveja* mediante electroforesis de las proteínas del suero en gel de poliacrilamida.
- *Determinación de leche de cabra en leche de oveja* empleando un método inmunológico.
- *Determinación de suero de quesería en leche* mediante análisis de los glicomacropéptidos por HPLC.

**5) Adición de melamina.** Este compuesto se utiliza para elevar falsamente los niveles de proteínas de la leche ya que la melamina es una sustancia orgánica rica en nitrógeno. Se ha empleado en leches en polvo infantiles con el objetivo de modificar su cantidad de proteínas y que parecieran más nutritivas.

De acuerdo con el Real Decreto 1113/2006, queda prohibida la presencia en el queso de grasas, proteínas o ambas, distintas a las de la propia leche, así como la venta de quesos con un extracto seco lácteo inferior al 15%, expresado en m/m sobre el producto terminado. Entre las principales adulteraciones de las que puede ser objeto el queso se encuentra la adición de leche de vaca, más barata y fácil de producir, a quesos elaborados con leche de oveja o cabra.

En el caso del yogur, las proteínas de origen vegetal, como soja o guisante, pueden emplearse en la adulteración de estos productos lácteos. Dicha adulteración puede detectarse empleando técnicas tales como ELISA o electroforesis capilar.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Orden de 26 de enero de 1989 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de determinados tipos de leche parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana.

Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.

Reglamento (UE) 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) 922/72, (CEE) 234/79, (CE) 1037/2001 y (CE) 1234/2007.

Real Decreto 1728/2007, de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche.

Real Decreto 752/2011, de 27 de mayo, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra.

Real Decreto 1533/1991, de 18 de octubre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos.

Real Decreto 1181/2018, de 21 de septiembre, relativo a la indicación del origen de la leche utilizada como ingrediente en el etiquetado de la leche y los productos lácteos.

Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos.

Real Decreto 262/2011, de 28 de febrero, por el que se aprueba la norma de composición y características específicas para el queso "Ibérico".

Reglamento (CE) 258/97, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.

Real Decreto 1054/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad para determinados tipos de leche conservada parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana. Establece los tratamientos, adiciones autorizadas y materias primas empleadas en su fabricación, así como cuestiones relativas al etiquetado de estos productos.

Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt.

Orden de 29 de noviembre de 1975 por la que se aprueban las normas de calidad para los quesos «Cheddar», «Edam», «Gouda», «Emmental», «Gruyère» y «Danablu».

La leche, composición y características/ [López, A.L.; Barriga, D].- Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 2016.

<https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-buenas-practicas/buenas-practicas-sobre-alimentacion/caract-nutricionales.aspx>

[http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/02\\_17\\_37\\_10a\\_leche.pdf](http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/02_17_37_10a_leche.pdf)

<https://food.r-biopharm.com/es/analitos/adulteracion-de-alimentos/adulteracion-de-la-leche/>

<https://www.lechepuleva.es/la-leche/leche-fresca>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 31**

**VINOS. COMPOSICIÓN. CLASIFICACIÓN. DETERMINACIONES  
ANALÍTICAS. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **VINOS**

**1. COMPOSICIÓN**

**2. CLASIFICACIÓN**

**3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

**4. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. COMPOSICIÓN

La **uva fresca** es el fruto de la vid utilizado en vinificación, maduro o incluso ligeramente pasificado, que puede ser estrujado o prensado con medios corrientes de bodega e iniciar espontáneamente una fermentación alcohólica.

El **vino** se define como la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva. Su contenido en alcohol adquirido no puede ser inferior a 8,5% vol.

La composición varía desde la uva, materia prima para la fabricación de vino, pasando por el mosto, hasta llegar finalmente al vino tras la fermentación alcohólica, en la que los azúcares son transformados por las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en etanol y CO<sub>2</sub>.

**1. Agua.** El vino contiene principalmente agua, procedente de la uva (agua de vinificación), en torno al 80-90%. En ella se encuentran disueltas todas las sales minerales, microelementos y oligoelementos que la vid toma del suelo durante su crecimiento.

**2. Azúcares.** Representados en la uva por dos monosacáridos: glucosa y fructosa. La uva contiene de un 15 a un 25% de glucosa y fructosa.

En las uvas maduras los azúcares se encuentran casi en la misma proporción, aunque siempre hay un poco más de fructosa que de glucosa, siendo la relación glucosa/fructosa aproximadamente de 0,95. Durante la fermentación alcohólica estos azúcares son transformados en etanol y CO<sub>2</sub>, lo que hace que la relación glucosa/fructosa disminuya. Puesto que la mayoría de levaduras fermentan preferentemente la glucosa, al final de la fermentación la relación glucosa/fructosa es de 0,3.

La uva contiene además azúcares no fermentables, como la arabinosa, ramnosa y xilosa, del orden de 1 g/L. Estos azúcares, no consumidos tras la fermentación se denominan azúcares residuales y son importantes en el sabor dulce de un vino.

**3. Ácidos orgánicos.** Debemos distinguir entre los ácidos presentes en la uva y los originados en la fermentación.

**a) Ácidos procedentes de la uva.** Destacan el ácido tartárico, málico y cítrico. Los ácidos tartárico y málico representan el 90% de la acidez total del mosto. Desempeñan un papel importante en las características organolépticas del vino, siendo responsables de su carácter ácido. La determinación de la acidez total del mosto, conjuntamente con la del azúcar, permite calcular el índice de maduración de la uva (azúcar/acidez total), necesario para fijar el momento adecuado de la vendimia ( $\cong 38$ ).

- **Ácido tartárico.** Es el ácido específico de la uva y, por tanto, el más abundante en vino. Es sintetizado en las partes verdes de la planta como producto secundario del metabolismo de los azúcares. Aporta sabores frescos al vino. Es el ácido más fuerte, por lo que el pH del vino depende en gran medida, de su contenido. La concentración del ácido tartárico es mayor en el mosto (4-11g/L) que en el vino (1,5-4 g/L), ya que su concentración disminuye en el vino por precipitación en forma de sal, debido al enriquecimiento en alcohol. Esto se origina por la menor solubilidad de los tartratos (bitartrato potásico y tartrato de calcio) en presencia de etanol.

- **Ácido málico.** Es uno de los ácidos predominantes en la uva y su concentración se ve afectada por la variedad, tipo de suelo, características climáticas y prácticas culturales de la vid. Por ejemplo, los niveles de ácido málico son más elevados en mostos procedentes de zonas frías. Durante la fermentación maloláctica, el ácido málico es metabolizado a ácido láctico, de modo que disminuye durante dicha fermentación. Así, en vinos con este tipo de fermentación suele desaparecer. Este ácido es responsable de la sensación de verdor en el vino.
  - **Ácido cítrico.** Al igual que el málico, su contenido disminuye durante la fermentación maloláctica debido a la acción de las bacterias lácticas, originando ácido acético. Forma complejos solubles con el ión  $\text{Fe}^{3+}$ . Este ácido es responsable de sensaciones frutales y aromáticas.
  - **Otros ácidos orgánicos.** La uva contiene otros ácidos en menor concentración, que no juegan un papel importante en la acidez, pero participan en algunos mecanismos que influyen en los caracteres organolépticos de los vinos. Por ejemplo, el **ácido glucónico** procede de la oxidación de glucosa y fructosa en uvas afectadas por la podredumbre causada por hongos del género *Botrytis*.
- b) **Ácidos orgánicos.** Son producidos en la fermentación, destacando:
- **Ácido láctico.** El D(-)láctico procede de degradación de hexosas por levaduras durante fermentación alcohólica; el L(+)láctico procede de la degradación de ácido málico por bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica. Aporta suavidad.
  - **Ácido succínico.** Procede de la degradación de hexosas por levaduras durante la fermentación alcohólica.
  - **Ácido acético.** Es un producto secundario de la fermentación alcohólica. El olor desagradable a "picado" de algunos vinos es debido principalmente al ácido acético y al acetato de etilo, siendo el nivel sensorial de estos compuestos del orden de 0,6 g/L para el ácido acético y 0,1 g/L para el acetato de etilo. Puede proceder de:
    - » Degradación de hexosas por levaduras durante la fermentación alcohólica.
    - » Degradación de cítrico por bacterias lácticas durante fermentación maloláctica.
    - » Oxidación del etanol por bacterias acéticas (picado acético).
4. **Alcoholes.** Destacan los siguientes:
- a) **Etanol.** Es el constituyente más importante del vino después del agua. Procede de la fermentación alcohólica de los azúcares de la uva del mosto (glucosa y fructuosa), aunque la fermentación gliceropirúvica contribuye en cierta medida a su presencia. Actúa como soporte de los componentes aromáticos del vino.
  - b) **Otros alcoholes.** Dan lugar a la formación de ésteres, como el acetato de isobutilo, que participan en el aroma de los vinos.
  - c) **Poliolios o polialcoholes.** Destaca el glicerol, que es el constituyente más importante tras el agua y el etanol. Tiene sabor ligeramente dulce y aporta al vino cuerpo, consistencia, sensación de untuosidad y suavidad.
5. **Sustancias nitrogenadas.**
- a) **Nitrógeno inorgánico.** Se encuentra en forma de ión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Representa el 5-10% del nitrógeno total en mosto interviniendo en su fermentabilidad.

- b) Nitrógeno orgánico.** Los aminoácidos (30-40% del nitrógeno total) intervienen en el desarrollo de microorganismos. Por su parte, la precipitación de las proteínas por los taninos causa quiebra proteica en el caso de vinos blancos, ya que los vinos tintos no contienen proteínas en estado libre.
- 6. Enzimas.** Responsables de la actividad prefermentativa durante la vendimia y al inicio de la fermentación. Evolución de los vinos (desfangado y clarificación). Distinguimos dos grupos: oxidasas como polifeniloxidasas y lacasa (podredumbre) e hidrolasas como proteasas y pectinasas.
- 7. Sustancias minerales.** Se localizan, principalmente, en las partes sólidas de la uva como hollejos, semillas y paredes celulares de la pulpa. Las principales son fosfatos, sulfatos, cloruros, K, Mg, Fe Cu. Pueden originar alteraciones tales como:
- a) Quiebra férrica.** En vinos blancos, se forma un coloide inestable como resultado de la reacción entre el ión  $Fe^{+3}$  y el ácido fosfórico. En vinos tintos, el  $Fe^{+3}$  se combina con los compuestos fenólicos dando lugar a complejos coloreados que precipitan.
- b) Quiebra cuprosa.** En ambiente reductor y presencia de proteínas el  $Cu^{+1}$  se combina con anhídrido sulfuroso formando sulfuros insolubles.
- 8. Compuestos aromáticos.** Son los componentes del aroma y bouquet de los vinos. Fundamentalmente pertenecen a cuatro familias: ácidos, alcoholes, aldehídos y ésteres. Distinguimos:
- a) Aromas primarios o varietales.** Son propios de cada variedad.
- Sustancias volátiles aromáticas libres, responsables del aroma de la uva y del vino, tales como terpenoles (linalol, geraniol, citronelol,  $\alpha$ -terpineol, hotrienol) presentes mayoritariamente en los hollejos.
  - Sustancias volátiles combinadas, precursoras de los aromas, incluyendo polioles (derivados del linalol) libres o glicosilados y terpenilglicósidos.
- b) Aromas secundarios.** Se trata de los aromas prefermentativos y fermentativos.
- c) Aromas terciarios.** Son los aromas postfermentativos.
- 9. Compuestos fenólicos.** Sintetizados en la uva como producto secundario del metabolismo de azúcares. Son responsables del color y gran parte del sabor de vinos tintos.
- a) Pigmentos (flavonoides).**
- Antocianos como cianidina. Color rojo o azul en variedades tintas.
  - Flavonoles como la quercetina. Color amarillo en variedades tintas y blancas.
  - Flavanoles como la catequina. Color amarillo, sabor amargo, astringencia, estructura, cuerpo y estabilidad del vino en variedades tintas y blancas.
- b) Compuestos incoloros (no flavonoides).** La diferencia de sabor entre vino blanco y tinto se debe a estas sustancias, originariamente presentes en los hollejos de la uva.
- Ácidos fenólicos.
  - Estilbenos como el resveratrol.
  - Taninos hidrolizables (pirogálicos). No existen en la uva; proceden de la madera de los toneles donde se realiza la crianza del vino.

## 2. CLASIFICACIÓN.

Los **vinos especiales** son vinos que proceden de uva fresca, de mosto o de vinos que han experimentado tratamientos durante o después de su elaboración y cuyas características no sólo vienen determinadas por la uva, mosto o vino empleado, sino también por la técnica empleada en su elaboración. Estos vinos especiales comprenden:

- a) vinos de crianza bajo velo
- b) vinos de licor
- c) vinos espumosos
- d) vinos gasificados
- e) vino dulce cuyo azúcar residual procede de la uva
- f) vino helado (icewine - Eiswein)

En relación a su contenido en azúcar, se dice que un vino es:

- a) **Seco**. Contiene un máximo de 4 g/L de azúcar o un máximo de 9 g/L si el nivel de acidez total (expresado en gramos de ácido tartárico por litro) no es inferior en más de 2 g/L al contenido en azúcar.
- b) **Semiseco**. Cuando el grado de azúcar del vino sea superior a 4 g/L y no supere los 12-18 g/L, o cuando la diferencia entre el contenido en azúcar y el contenido de acidez total expresado en gramos por litro de ácido tartárico no supera los 10 g/L.
- c) **Semidulce**. Cuando el contenido en azúcar supera los 12-18 g/L y no excede 45 g/L.
- d) **Dulce**. Cuando el contenido en azúcar del vino es como mínimo de 45 g/L.

En relación a su contenido en **dióxido de carbono**, se dice que un vino es:

- a) **Tranquilo**, cuando su concentración en dióxido de carbono es inferior a 4 g/L a 20°C.
- b) **De aguja**, cuando dicha concentración es igual o superior a 3 g/L y máximo 5 g/L a 20°C.

Por su parte, el Reglamento 1308/2013 establece las **categorías de productos vitícolas**:

- 1) **Vino**. Es el producto obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva. El vino debe tener:
  - un grado alcohólico adquirido no inferior al 8,5% vol. o al 9% vol., en función de la zona vitícola de la que proceda la uva.
  - un grado alcohólico adquirido no inferior al 4,5% vol., si está acogido a una denominación de origen protegida o a una indicación geográfica protegida
  - un grado alcohólico total no superior al 15% vol.
  - una acidez total, expresada en ácido tartárico, no inferior a 3,5 g/L o a 46,6 miliequivalentes por litro.
- 2) **Vino nuevo en proceso de fermentación**. Se trata del producto cuya fermentación alcohólica aún no ha concluido y que aún no ha sido separado de las lías. Las lías de vino constituyen el residuo que se deposita en los recipientes que contienen vino después de la fermentación, durante el almacenamiento o después de un tratamiento autorizado.
- 3) **Vino de licor**. Producto que contiene un grado alcohólico adquirido superior o igual 15% vol. e inferior o igual a 22% vol. No obstante, un Estado, para su mercado interno, puede aplicar un grado alcohólico adquirido máximo superior a 22%, siempre que sea inferior o

igual a 24%. El vino de licor se elabora a partir de mosto de uvas y/o vino (incluyendo el mosto de uva parcialmente fermentado), al cual se adicionan, solos o en mezcla, destilados, aguardientes o alcohol de origen vitivinícola. Pueden agregarse uno o varios de los productos siguientes: mosto concentrado o caramelizado de uvas, uvas frescas sobremaduradas o pasificadas, mistela, caramelo.

- 4) Vino espumoso.** Son vinos especiales producidos a partir de uvas, de mostos o de vinos tratados según las técnicas aceptadas por la OIV, caracterizados en el descorche por la producción de una espuma más o menos persistente resultante del desprendimiento de dióxido de carbono de origen exclusivamente endógeno. La sobrepresión de este gas en la botella ha de ser de al menos 3,5 bares a 20°C. No obstante, para botellas de una capacidad inferior a 0,25L, la sobrepresión mínima se reduce a 3 bares a 20°C.

Según la técnica de producción, los vinos espumosos se denominan:

- de segunda fermentación en botella.
- de segunda fermentación en depósito hermético o granvas.

Por otro lado, se dice que el vino es:

- brut, cuando tiene como máximo 12 g/L de azúcar, con una tolerancia de +3 g/L.
- extraseco, cuando contiene entre 12 y 17 g/L con una tolerancia de +3 g/L.
- seco, cuando contiene entre 17 y 32 g/L con una tolerancia de +3 g/L.
- semisecco, cuando contiene entre 32 y 50 g/L.
- dulce, si sobrepasa los 50 g/L de azúcar.

- 5) Vino espumoso de calidad.** Se trata del producto obtenido mediante primera o segunda fermentación alcohólica de uvas frescas, mosto de uva, o de vino, que, al descorchar el envase, desprende dióxido de carbono procedente exclusivamente de la fermentación. Conservado a una temperatura de 20°C en envases cerrados, alcanza una sobrepresión debida al dióxido de carbono disuelto igual o superior a 3,5 bares y el grado alcohólico volumétrico total del vino base destinado a la elaboración de vino espumoso de calidad es de 9% vol. como mínimo.

- 6) Vino espumoso aromático de calidad.** Se trata del vino espumoso de calidad obtenido utilizando, para constituir el vino base, únicamente mosto de uva o mosto de uva parcialmente fermentado procedente de determinadas variedades de uva de vinificación.

- 7) Vino espumoso gasificado.** Se trata del producto obtenido a partir de vino sin denominación de origen protegida ni indicación geográfica protegida que, al descorchar el envase, desprende dióxido de carbono procedente total o parcialmente de una adición de este gas y que, conservado a una temperatura de 20°C en envases cerrados, alcanza una sobrepresión debida al dióxido de carbono disuelto igual o superior a 3 bares. Presentan características físicas análogas a las de los vinos espumosos, pero cuyo dióxido de carbono es parcial o totalmente de origen exógeno.

- 8) Vino de aguja.** Se trata del producto obtenido a partir de vino, de vino nuevo aún en fermentación, de mosto de uva o de mosto de uva parcialmente fermentado con un grado alcohólico adquirido no inferior al 7%vol. que, conservado a una temperatura de 20°C en

envases cerrados, alcanza una sobrepresión debida al dióxido de carbono endógeno disuelto no inferior a 1 bar ni superior a 2,5 bares.

- 9) **Vino de aguja gasificado.** Se trata del producto obtenido a partir de vino, vino nuevo aún en fermentación, mosto de uva o de mosto de uva parcialmente fermentado, con un grado alcohólico adquirido no inferior al 7%vol. y un grado alcohólico total no inferior al 9% vol., que, conservado a una temperatura de 20°C en envases cerrados, alcanza una sobrepresión debida al dióxido de carbono disuelto, añadido total o parcialmente, no inferior a 1 bar ni superior a 2,5 bares.
- 10) **Mosto de uva.** Producto líquido obtenido de uva fresca de manera natural o mediante procedimientos físicos. Se admite un grado alcohólico adquirido que no exceda el 1%vol.
- 11) **Mosto de uva parcialmente fermentado.** Es el producto procedente de la fermentación de mosto de uva, con un grado alcohólico adquirido superior al 1% vol. e inferior a las tres quintas partes de su grado alcohólico volumétrico total.
- 12) **Vino de uvas pasificadas.** Se trata del producto elaborado, sin aumento artificial del grado alcohólico natural, a partir de uvas secadas al sol o a la sombra para su deshidratación parcial, con un grado alcohólico total de al menos 16%vol. y un grado alcohólico adquirido de al menos 9%vol., y con un grado alcohólico natural de al menos 16 % vol. (o un contenido de azúcar de 272 gramos/litro).
- 13) **Vino de uvas sobremaduras.** Elaborado sin aumento artificial del grado alcohólico natural, con un grado alcohólico natural superior al 15%vol., un grado alcohólico total no inferior al 15 % vol. y un grado alcohólico adquirido no inferior al 12%vol.
- 14) **Vinagre de vino.** Se trata del vinagre obtenido exclusivamente por fermentación acética de vino y con una acidez total, expresada en ácido acético, no inferior a 60 g/L.

### **3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

El Reglamento 1308/2013 establece que se tendrán en cuenta los métodos de análisis recomendados y publicados por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). El Reglamento 251/2014, indica que la Comisión adoptará, en caso necesario, los métodos de análisis para determinar la composición de los productos vitivinícolas aromatizados basándose en métodos recomendados y publicados por la OIV.

#### **1. Masa volúmica y Densidad relativa a 20°C.**

La masa volúmica ( $\rho_{20}$ ) es el peso de un determinado volumen de vino a la temperatura de 20°C expresado en g/mL.

La densidad relativa a 20°C es la relación entre la masa de cierto volumen de vino o de mosto a 20°C y la masa del mismo volumen de agua a la misma temperatura. La densidad relativa a 20°C se obtiene multiplicando la masa volúmica por el factor 1,0018 y es adimensional (sin unidades).

La masa volúmica y la densidad relativa a 20°C son determinadas en la muestra por picnometría, densimetría electrónica mediante un resonador de flexión o por

densimetría mediante la balanza hidrostática. Estas determinaciones están relacionadas con el contenido de azúcares, por lo que disminuyen con la formación de alcohol. Cuanto mayor sea la concentración de azúcares, más denso será.

2. **Grado alcohólico.** El grado alcohólico volumétrico se puede obtener mediante varios métodos como la densimetría electrónica. En cualquier caso, se requiere la destilación previa del producto a analizar, midiéndose el grado alcohólico del destilado. Encontramos distintas definiciones de grado alcohólico:
  - Grado alcohólico volumétrico adquirido: número de volúmenes de alcohol puro a 20°C, contenidos en 100 volúmenes del producto considerado a dicha temperatura.
  - Grado alcohólico volumétrico en potencia: número de volúmenes de alcohol puro a 20°C, que pueden obtenerse por fermentación total de los azúcares contenidos en 100 volúmenes del producto considerado a dicha temperatura.
  - Grado alcohólico volumétrico total: suma de los grados alcohólicos volumétricos adquirido y en potencia.
  - Grado alcohólico volumétrico natural: grado alcohólico volumétrico total del producto antes de cualquier aumento artificial del grado alcohólico natural.
  - Grado alcohólico adquirido expresado en masa: número de kilogramos de alcohol puro contenido en 100 kilogramos del producto.
  - Grado alcohólico en potencia expresado en masa: número de kilogramos de alcohol puro que pueden obtenerse por fermentación total de los azúcares contenidos en 100 kilogramos del producto.
  - Grado alcohólico total expresado en masa: suma del grado alcohólico adquirido expresado en masa y del grado alcohólico en potencia expresado en masa.
3. **Extracto seco total o materias secas totales.** Es el conjunto de todas las sustancias que no se volatilizan en determinadas condiciones, expresado en g/L. Se determina mediante gravimetría, calculando la diferencia de peso de una muestra de vino antes y después de ser secada en una corriente de aire. También se puede calcular indirectamente a partir de la masa volúmica y el grado alcohólico volumétrico del vino. El extracto no reductor es el extracto seco total menos los azúcares totales, mientras que el extracto reducido es el extracto seco total menos los azúcares totales que excedan de 1 g/L, el sulfato potásico que exceda de 1 g/L, el manitol si hubiera, y todas las sustancias químicas que se puedan haber añadido al vino. El resto del extracto es el extracto no reductor menos la acidez fija expresada en ácido tartárico.
4. **Cenizas.** Es el residuo que queda tras la calcinación del extracto seco, expresado en g/L. Representa el 10% del extracto seco.
5. **Determinación de azúcares.**
  - a) **Azúcares reductores (Fructosa + glucosa).** Son aquellos azúcares que presentan un carbono libre en su estructura. Esto les permite reducir, en determinadas condiciones, a las sales cúpricas. Con este método se analizan azúcares reductores en conjunto, sin diferenciar glucosa y fructosa por separado. Primero, se eliminan todas las materias reductoras distintas de los azúcares mediante defecación a partir de las

soluciones de Carrez. Se realiza una valoración antes y después de la inversión según el método de Luff-Schoorl, basado en las propiedades reductoras de glucosa y fructosa sobre las sales cúpricas. Estos azúcares son oxidados con una solución de  $\text{Cu}^{2+}$ , el cual es reducido a  $\text{Cu}^+$ , y el  $\text{Cu}^{2+}$  que queda en exceso se determina retrovalorando con una solución de tiosulfato de sodio.

- b) Determinación de azúcares por HPLC con detector de índice de refracción. Permite determinar glucosa, fructosa y sacarosa.
- c) Glucosa y fructosa. Pueden determinarse por separado mediante método enzimático, expresándose en g/L.
6. **Acidez total (volumetría).** Es la suma de los ácidos valorables. El dióxido de carbono no se incluye en la acidez total. En vino, la acidez total se expresa en gramos de ácido tartárico por litro o en miliequivalentes por litro (meq/L). No existe límite máximo pero sí un mínimo de 3,5g/L para vinos de mesa. Es un parámetro relacionado con las características gustativas de verdor y frescor y proporciona estabilidad (defensa natural). El método consiste en la valoración potenciométrica o valoración ácido-base en presencia de azul de bromotimol como indicador del final de la reacción, mediante comparación con un patrón de coloración.
7. **Acidez volátil (destilación y volumetría).** Constituida por los ácidos de la serie acética que se encuentran en los vinos, bien en estado libre, bien en forma de sal. Se expresa en gramos de ácido acético por litro o meq/L. Es un parámetro de calidad que controla el estado sanitario del vino. Una acidez volátil alta indica un avinagrado. El método consiste en la valoración de los ácidos volátiles con NaOH, separados previamente del vino por destilación (arrastre de vapor de agua). La acidez del dióxido de azufre (tanto libre como combinado) destilado en dichas condiciones debe restarse de la acidez del destilado, así como la acidez del ácido sórbico eventualmente añadido al vino. El Reglamento Delegado (UE) 2019/934 establece el límite máximo de acidez volátil.
8. **Acidez fija.** Se calcula como la diferencia entre la acidez total y la volátil. Puede expresarse en meq/L, g de ácido sulfúrico/L o g de ácido tartárico/L.
9. **pH.** Su determinación en mosto y vino es una medida complementaria de la acidez total, puesto que permite medir la fuerza de los ácidos que contienen. La estabilidad de un vino, la fermentación maloláctica, el sabor ácido, el color, el potencial redox y la relación de dióxido de azufre libre y total están estrechamente relacionadas con su pH. La determinación del pH consiste en medir la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en el vino.
10. **Ácidos orgánicos,** como el ácido tartárico, málico, láctico y cítrico expresados en g/L. Pueden determinarse mediante HPLC con detector espectrofotométrico de absorbancia en el UV, empleando un método enzimático (excepto tartárico) o mediante electroforesis capilar. Los ácidos orgánicos también pueden determinarse mediante cromatografía iónica que permite una separación de la mayor parte de los ácidos orgánicos y la detección por conductimetría evitando las interferencias debidas a la presencia de componentes fenólicos.

- 11. Ácido cítrico.** El contenido en ácido cítrico se determina mediante método enzimático y se expresa en mg/L. Es el único ácido que cuenta con un límite establecido.
- 12. Ácido sórbico.** Se adiciona como antiséptico para eliminar levaduras. A dosis altas no tiene poder bactericida, pudiendo ser metabolizado por bacterias lácticas dando lugar a una enfermedad del vino llamada geraniol. La concentración en ácido sórbico del vino, expresada en mg/L, se puede determinar mediante:
- Espectrofotometría de absorción UV. El ácido sórbico separado por destilación con arrastre de vapor de agua se determina en el destilado mediante espectrofotometría. Contenidos inferiores a 20mg/L deben confirmarse por cromatografía en capa fina.
  - Cromatografía líquida (HPLC) con detector de diodos en serie.
  - Cromatografía de gases.
  - Detección de trazas por cromatografía de capa fina. El ácido sórbico se separa por cromatografía en capa fina y se evalúa su concentración en forma semicuantitativa.
- 13. Anhídrido sulfuroso.** Es el principal conservador de vinos y mostos, debido a sus propiedades antisépticas sobre levaduras y bacterias. Tiene actividad antioxidante y mejora las características organolépticas del vino, proporcionando un olor picante y sabor a azufre. El anhídrido sulfuroso presente en el vino procede de la práctica enológica llamada "sulfitado". Se encuentra en parte como gas ( $\text{SO}_2$ ), bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) y sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), constituyendo el llamado dióxido de azufre libre, y en parte combinado con acético, azúcares, taninos, colorantes, etc., constituyendo el dióxido de azufre combinado. Esta distinción es importante a efectos prácticos ya que el dióxido de azufre con acción antiséptica es el libre, mientras que el combinado constituye una reserva para la fracción libre. Las dos formas están en equilibrio, sobre el que influye el pH y la temperatura. A menor pH y mayor temperatura mayor proporción de dióxido de azufre libre. La suma del dióxido de azufre libre y combinado da el dióxido de azufre total. El Reglamento Delegado (UE) 2019/934 establece el límite máximo del contenido de anhídrido sulfuroso en mg/L.
- a) Método Ripper.** El dióxido de azufre libre se determina por valoración yodométrica directa. Es una valoración de oxidación-reducción con  $\text{I}_2$  como reactivo valorante en presencia de almidón como indicador. El dióxido de azufre total se determina por valoración yodométrica tras hidrólisis alcalina. La suma del dióxido de azufre libre y combinado permite obtener el dióxido de azufre total.
- b) Método de referencia (Paul).** Este método se emplea en vinos muy tintos donde no es posible observar el viraje de un indicador si se empleara el método Ripper y cuando el contenido de  $\text{SO}_2$  está próximo al límite permitido.
- 14. Sustancias volátiles.** Se determinan mediante CG-FID. Incluye:
- Alcoholes Superiores. Componentes naturales procedentes de los aminoácidos y responsables de defectos organolépticos cuando aumenta mucho su concentración.
  - Acetaldehído. Interviene en el aroma de los vinos (fruta madura).
  - Acetato de Etilo. Interviene en las características organolépticas del vino. Ocasiona, a concentraciones elevadas, defectos como el picado, cuyo olor se atribuye a este compuesto y no al ácido acético.

- Metanol. Se determina por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID).
15. **Glicerina.** Es un polialcohol que se produce al principio de la fermentación. Da suavidad y dulzor a los vinos. Aumenta mucho en el caso de Botritis y disminuye o casi desaparece en vinos con crianza biológica. Se determina mediante HPLC (IR) o método enzimático y se expresa en g/L.
  16. **Sulfatos.** Para su determinación se emplea un método gravimétrico. En caso de mostos o vinos ricos en dióxido de azufre, proceder previamente a la eliminación del dióxido de azufre. El contenido en sulfatos de mostos o vinos se expresa en miligramos por litro de sulfato de potasio. También puede determinarse el contenido en sulfatos mediante cromatografía iónica o electroforesis capilar.
  17. **Índice de folin-ciocalteu.** Sirve para medir el color del vino (contenido en polifenoles), permitiendo la determinación del contenido de polifenoles totales. El conjunto de compuestos fenólicos del vino se oxida con el reactivo de Folin-Ciocalteu, constituido por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que se reducen en la oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno. La coloración azul producida posee una absorción máxima a 750nm, siendo proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos. El resultado se expresa en forma de índice obtenido al multiplicar la absorbancia por 100, en el caso de los vinos tintos, por 20 en el caso de vinos blancos o por 16 en el caso de mostos concentrados rectificadas.
  18. **Dióxido de carbono.** Se distinguen dos métodos para la determinación del CO<sub>2</sub>:
    - a) **Método volumétrico.** Permite determinar la cantidad de CO<sub>2</sub> expresada en g/L en vinos tranquilos y vinos de aguja y espumosos.
    - b) **Método manométrico.** El dióxido de carbono de la muestra se fija con hidróxido sódico. A continuación, es liberado con ácido sulfúrico en un matraz al vacío conectado a un manómetro. El aumento de presión que resulta de ello permite calcular la cantidad de dióxido de carbono contenido en la muestra, que se expresa en g/L. El contenido en % en peso de CO<sub>2</sub> viene dado por:
$$\text{CO}_2\%(m/m) = \text{cantidad CO}_2 \times 100 / \text{masa volúmica muestra (kg/m}^3)$$
  19. **Medición de sobrepresión de vinos espumosos y de aguja.** El aparato que se utiliza para medir la sobrepresión en botellas de vinos espumosos y de aguja gasificado se llama afrómetro. Tiene distintas presentaciones que dependen del cierre de la botella (cápsula metálica, corona, tapón de corcho o de plástico). Tras la estabilización térmica y agitación de la botella, se mide la sobrepresión por medio del afrómetro. La sobrepresión se expresa en pascales (Pa).
  20. **Colorantes artificiales.** Para detectar su presencia se recurre al método Arata, basado en el distinto comportamiento de los colorantes naturales y artificiales cuando son fijados, en medio ácido, sobre fibras de lana de oveja. Si las fibras de lana aparecen coloreadas con un tono parecido al vino, entonces contiene colorantes artificiales.

- 21. Hierro.** Se determina por espectrofotometría de absorción atómica, previa dilución del vino y eliminación del alcohol, expresándose en mg/L de vino.
- 22. Histamina.** La determinación de las aminas biógenas, concretamente de la histamina, se realiza mediante cromatografía líquida con detector de fluorescencia, previa derivatización con o-ftaldialdehído (OPA). Los resultados se expresan en mg/L. La mayoría de las aminas biógenas del vino son de origen microbiano.
- 23. Ftalatos.** Se realiza por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS). La muestra se extrae con isohexano, el extracto se concentra por evaporación y, a continuación, se analiza GC/MS. Los resultados se expresan en mg/L.
- 24. Malvidina.** Es vigilado desde el punto de vista toxicológico. Actualmente en España, este tipo de viñedo ha sido arrancado prácticamente en su totalidad. La malvidina es oxidada por ácido nítrico convirtiéndose en una sustancia que emite fluorescencia verde bajo luz UV. La intensidad de esta fluorescencia se mide con espectrofotómetro.
- 25. Ferrocianuros.** Por clarificación azul, debido el color del precipitado que se forma, se conoce la práctica permitida para eliminación de Fe, que debe ser perfectamente controlada para asegurar la ausencia total de cianuros. El ferrocianuro potásico se usa en el vino para eliminar niveles elevados de hierro, puesto que reacciona con el Fe formando sales insolubles (ferrocianuro férrico) que precipitan. Estos precipitados se eliminan del vino mediante filtración. A continuación, se realiza su determinación para que no queden restos, ya que el ferrocianuro en exceso que queda en el vino se descompone lentamente formando ácido cianhídrico de gran toxicidad.
- 26. Determinación de las características cromáticas según CIElab.** Se emplea un método espectrofotométrico cuyo objeto es definir el proceso de medición y cálculo de las características cromáticas de los vinos a partir de los componentes tricromáticos X, Y y Z, tratando de imitar los observadores reales en lo que respecta a sus sensaciones al color. El color de un vino puede ser descrito mediante 3 atributos o cualidades específicas: tonalidad, luminosidad y cromatismo. La más característica es la tonalidad que es el color en sí mismo: rojo, amarillo, verde o azul. La luminosidad es el atributo de la sensación visual según el cual un vino parece más o menos luminoso. En cambio, el cromatismo o nivel de coloración está relacionado con la mayor o menor intensidad de color. La combinación de estos tres conceptos permite definir los múltiples matices de color que los vinos presentan. Las características cromáticas de un vino vienen definidas por las coordenadas colorimétricas o de cromaticidad que son la claridad, componente de color rojo/verde, componente de color amarillo/azul y por sus magnitudes derivadas que son la croma, el tono y la cromacidad.

#### **4. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

- a) Presencia de sacarosa.** La uva apenas contiene sacarosa y ésta desaparece en el transcurso de la fermentación. Por lo tanto, el vino no puede contener este azúcar si no se le ha añadido. Se determina por HPLC con detector de índice de refracción. De acuerdo con el

Reglamento Delegado (UE) 2019/934, únicamente está autorizada la edulcoración de vino realizada con mosto de uva, mosto de uva concentrado o mosto de uva concentrado rectificado.

**b) Presencia de colorantes.** La adición de colorantes artificiales al vino no está permitida. No obstante, en ocasiones se añaden pequeñas concentraciones para aumentar el brillo del vino. Para detectar su presencia se recurre al método Arata.

**c) Cenizas.** Su contenido es mayor en tintos que en blancos. Permite sospechar si un vino ha sido aguado cuando su valor es bajo. La alcalinidad de las cenizas mide la cantidad de ácidos orgánicos presentes en el vino en forma de sales más o menos disociadas. También pueden ser un indicio del aguado o confirmar la adición de sulfúrico.

**d) Determinación de las relaciones isotópicas del deuterio (D/H) en el etanol del vino.**

Este método permite la detección del aumento del grado alcohólico natural de mostos y vinos midiendo las relaciones isotópicas del deuterio (D/H) en el etanol del vino para determinar si se ha obtenido por fermentación o por adición. Para ello se emplea la resonancia magnética nuclear del deuterio (SNIFNMR/RMNFINS).

**e) Determinación de la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  por espectrometría de masas de relación isotópica del etanol del vino.**

La relación entre los isótopos de carbono se puede utilizar para determinar el tipo de fotosíntesis de una planta, C3 (ciclo de Calvin), C4 (Hatch y Slack) o CAM (Crassulacean acid metabolism), ya que en la fotosíntesis, la asimilación del gas carbónico por los vegetales se efectúa según estos 3 tipos de metabolismo, los cuales presentan un fraccionamiento isotópico diferente. De esta manera, los productos de las plantas, como los azúcares, presentan contenidos en  $^{13}\text{C}$  más elevados si proceden de plantas C4 o CAM que si proceden de plantas C3. Esta diferencia se mantiene en el contenido de  $^{13}\text{C}$  de los productos derivados de la fermentación de dichos azúcares, como etanol o el  $\text{CO}_2$ . La mayoría de vegetales como la vid y la remolacha, pertenecen al grupo C3, mientras que la caña de azúcar y el maíz al grupo C4. La medición del contenido en  $^{13}\text{C}$  del etanol permite determinar si dicho alcohol procede del azúcar de la uva o si procede de azúcar de una planta C4 (azúcar de caña o isoglucosa de maíz) añadido a los productos derivados de la uva, en cuyo caso el contenido en  $^{13}\text{C}$  será más elevado.

La combinación de esta información sobre el contenido en  $^{13}\text{C}$  con la obtenida mediante RMN, permite la cuantificación de la adición de mezclas de azúcares o de alcoholes procedentes de plantas C3 y C4.

El objetivo del método consiste en medir la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del etanol extraído a partir del vino previa fermentación. El contenido en  $^{13}\text{C}$  se determina en el gas carbónico resultante de la combustión completa de la muestra. El etanol debe extraerse del vino antes de la determinación isotópica mediante destilación del vino. Todas las etapas preparatorias deben efectuarse evitando que se pierda por evaporación cualquier cantidad significativa de etanol, lo que podría cambiar la composición isotópica de la muestra.

**f) Determinación de la relación entre isótopos de carbono  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en el  $\text{CO}_2$  de los vinos espumosos mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS).**

El espacio de cabeza de una botella de vino espumoso contiene una fase gaseosa rica en CO<sub>2</sub> en equilibrio con el CO<sub>2</sub> disuelto en el vino. Este se modifica durante la segunda fermentación debido a la adición de azúcar procedente de la uva, o de remolacha azucarera, caña de azúcar o maíz. Sin embargo, el contenido de CO<sub>2</sub> de estos vinos también puede incrementarse artificialmente mediante la adición de CO<sub>2</sub> industrial, lo cual constituye un fraude.

Los productos de plantas como los azúcares, presentan contenidos en <sup>13</sup>C distintos en función de que procedan de plantas C3, C4 o CAM debido al fraccionamiento isotópico diferente de sus rutas fotosintéticas. Esta diferencia se mantiene en el contenido de <sup>13</sup>C de los productos derivados de la fermentación de dichos azúcares, como el etanol o el CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> obtenido de la fermentación de azúcar procedente de una planta C3 posee una desviación isotópica del <sup>13</sup>C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en torno a los -17‰, -26‰, mientras que el CO<sub>2</sub> obtenido de la fermentación de azúcar procedente de una planta C4 posee una  $\delta^{13}\text{C}$  en torno a los -7‰, -10‰. Por su parte, el CO<sub>2</sub> industrial posee una  $\delta^{13}\text{C}$  por debajo de los -29‰ o por encima de los -10‰.

El CO<sub>2</sub> industrial procede de la combustión de combustibles fósiles o del tratamiento térmico de carbonatos, de manera que su contenido en <sup>13</sup>C será distinto al de los productos procedentes de plantas C3 o C4. Consecuentemente, la relación <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C del CO<sub>2</sub> de vinos espumosos dependerá su origen natural (C3 o C4) o artificial.

**g) Determinación de la relación de isótopos <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O del agua en vinos y mostos.**

Este método permite detectar la adición de agua a los vinos mediante la determinación de la relación isotópica <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O del agua de vinos y mostos en equilibrio isotópico inducido con dióxido de carbono, mediante espectrometría de masas para relaciones de isótopos (IRMS).

Según establece el Reglamento Delegado (UE) 2018/273, el centro europeo de referencia para el control en el sector vitivinícola mantendrá y actualizará una base analítica de datos isotópicos a escala de la Unión sobre la base de los datos notificados por los laboratorios designados de los Estados miembros. Dichos datos se obtendrán a partir de análisis isotópicos armonizados de los componentes del etanol y del agua de los productos vitivinícolas y a partir de controles pertinentes a lo largo de la comercialización.

**BIBLIOGRAFÍA**

Reglamento (UE) 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) 922/72, (CEE) 234/79, (CE) 1037/2001 y (CE) 1234/2007.

Reglamento (UE) 251/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 26 de febrero de 2014, sobre la definición, descripción, presentación y etiquetado de los productos vitivinícolas aromatizados, y por el que se deroga el Reglamento (CEE) 1601/91.

Reglamento Delegado (UE) 2019/934 de la Comisión de 12 de marzo de 2019 por el que se completa el Reglamento (UE) 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se

refiere a las zonas vitícolas donde el grado alcohólico pueda verse incrementado, las prácticas enológicas autorizadas y las restricciones aplicables a la producción y conservación de los productos vitícolas, el porcentaje mínimo de alcohol para subproductos y la eliminación de estos, y la publicación de las fichas de la OIV.

Reglamento Delegado (UE) 2018/273 de la Comisión de 11 de diciembre de 2017 por el que se completa el Reglamento (UE) n. o 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que atañe al régimen de autorizaciones para plantaciones de vid, el registro vitícola, los documentos de acompañamiento, la certificación, el registro de entradas y salidas, las declaraciones obligatorias, las notificaciones y la publicación de la información notificada, y por el que se completa el Reglamento (UE) n. o 1306/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que atañe a los controles y sanciones pertinentes, por el que se modifican los Reglamentos (CE) n. o 555/2008, (CE) n. o 606/2009 y (CE) n. o 607/2009 de la Comisión y por el que se derogan el Reglamento (CE) n. o 436/2009 de la Comisión y el Reglamento Delegado (UE) 2015/560 de la Comisión

García Cazorla, J., Xirau Vayreda, M., Azorín Romero, R. Técnicas usuales de análisis en enología. Dep. Legal 046 - 6 - 1.000 - 09/05.

Compendio de métodos internacionales de análisis de vinos y mostos. Organización Internacional de la Viña y del Vino. Edición 2022.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 32**

**OTRAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS. COMPOSICIÓN. CLASIFICACIÓN.  
DETERMINACIONES ANALÍTICAS. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **OTRAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS**

#### **1. BEBIDAS ESPIRITUOSAS**

1.1. COMPOSICIÓN

1.2. CLASIFICACIÓN

1.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

1.4. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES

#### **2. CERVEZA**

#### **3. SIDRA**

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. BEBIDAS ESPIRITUOSAS

### 1.1. COMPOSICIÓN.

Según el Reglamento 2019/787 sobre la definición, designación, presentación y etiquetado de las bebidas espirituosas, el cual es aplicable desde el 25 de mayo de 2021, se entenderá por **bebida espirituosa** aquella bebida alcohólica que cumpla los requisitos siguientes:

- a) está destinada al consumo humano
- b) posee cualidades organolépticas particulares
- c) tiene un grado alcohólico volumétrico mínimo de 15%
- d) ha sido producida:
  - directamente, usando por separado o en combinación, cualquiera de estos métodos:
    - » destilación, en presencia o no de aromas o productos alimenticios sápidos, de productos fermentados
    - » maceración o procedimiento similar de materias vegetales en alcohol etílico de origen agrícola, destilados de origen agrícola o bebidas espirituosas, o en una combinación de estos
    - » adición, por separado o en combinación, al alcohol etílico de origen agrícola, a destilados de origen agrícola o a bebidas espirituosas de cualquiera de los siguientes productos: aromas (de conformidad con Reglamento 1334/2008), colorantes (de conformidad con Reglamento 1333/2008), otros ingredientes autorizados (de conformidad con los Reglamentos 1333/2008 y 1334/2008), sustancias edulcorantes, otros productos agrícolas, productos alimenticios
  - añadiendo a una bebida espirituosa cualquiera de los siguientes productos, por separado o en combinación:
    - » otras bebidas espirituosas
    - » alcohol etílico de origen agrícola
    - » destilados de origen agrícola
    - » otros productos alimenticios
  - en caso de que en su producción se haya añadido agua destilada, desmineralizada, permutada o suavizada, la calidad del agua cumplirá la Directiva 98/83/CE y la Directiva 2009/54/CE y el grado alcohólico de la bebida espirituosa, después de la adición de agua, sigue siendo como mínimo de 15%vol.

El alcohol etílico y los destilados utilizados en la producción de bebidas espirituosas serán exclusivamente de origen agrícola; no contendrán alcohol de origen sintético. Se entenderá por alcohol etílico de origen agrícola el líquido que cumple los requisitos siguientes:

## **1.2. CLASIFICACIÓN**

Las bebidas espirituosas se clasifican en 44 categorías, entre las que podemos citar el Ron, Whisky, Brandy o el Vodka. Para cada una de estas categorías se establecen una serie de normas específicas.

## **1.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

Los métodos comunitarios de referencia para el análisis de bebidas espirituosas se recogen en el Reglamento 2870/2000.

**1) Grado alcohólico volumétrico.** El método adecuado para la determinación del grado alcohólico volumétrico real de las bebidas espirituosas consiste en una destilación tras la cual, el grado alcohólico volumétrico del destilado se determina por picnometría, densimetría electrónica o densimetría por balanza hidrostática. Las bebidas espirituosas se destilan con la finalidad de separar el extracto (sustancias que no pueden destilarse) del alcohol etílico y otros compuestos volátiles.

El grado alcohólico volumétrico real de las bebidas espirituosas es igual al número de litros de alcohol etílico contenidos en un hectolitro de una mezcla hidroalcohólica que tenga la misma densidad absoluta que el alcohol o la bebida espirituosa después de destilados. Los valores de referencia del grado alcohólico volumétrico (% vol) a 20 °C en función de la densidad absoluta a 20 °C de las mezclas hidroalcohólicas que deben utilizarse son los que figuran en la tabla internacional adoptada por la Organización Internacional de Metrología Legal en su recomendación n o 22. La densidad absoluta (o masa volúmica) es la masa por unidad de volumen en vacío de una bebida espirituosa a 20 °C. Se expresa en kilogramos por metro cúbico y su símbolo es  $\rho_{20}$  o  $\rho_{20}$ .

**2) Extracto seco total por gravimetría.** Por extracto seco total (o materia seca total) se entiende el conjunto de sustancias que no se volatilizan en determinadas condiciones físicas.

**3) Determinación de las sustancias volátiles y del metanol.**

El contenido de compuestos volátiles distintos del etanol y el metanol se considera equivalente a la suma de las concentraciones de:

- ácidos volátiles, expresados en ácido acético
- aldehídos expresados en etanal, como suma de etanal (acetaldehído) y de la fracción de etanal contenida en 1,1-dietoxietano (acetal)
- los alcoholes superiores siguientes: propan-1-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metilpropan-1-ol, determinados por separado, y 2-metilbutan-1-ol y 3-metilbutan-1-ol, determinados juntos o por separado.
- acetato de etilo.

Los métodos que permiten medir los compuestos volátiles son los siguientes:

**1) Acidez volátil de las bebidas espirituosas.**

La **acidez total** es la suma de acideces valorables. La acidez fija es la acidez del residuo después de haber evaporado la bebida espirituosa a sequedad. La **acidez total** y la acidez fija se determinan mediante valoración o mediante potenciometría.

La acidez volátil se calcula deduciendo la acidez fija de la acidez total. Los resultados pueden expresarse en miliequivalentes por litro, en mg de ácido acético por litro o en g de ácido acético por hl de alcohol puro al 100% vol.

- 2) Congéneres volátiles.** Los congéneres volátiles, que incluyen a los aldehídos (etanal y acetal), alcoholes superiores, acetato de etilo y al metanol, son las sustancias que se forman junto con el etanol durante la fermentación, la destilación y el envejecimiento de las bebidas espirituosas. La presencia de congéneres volátiles en las bebidas espirituosas se determina mediante la inyección de la bebida espirituosa, pura o adecuadamente diluida, en un sistema de cromatografía de gases (CG). Antes de la inyección, se añade a la bebida espirituosa un patrón interno adecuado como el pentan-3-ol. Los congéneres volátiles se separan en una columna y se detectan mediante un detector de ionización de llama (FID). La concentración de cada uno de los congéneres se determina en relación con el patrón interno a partir de los factores de respuesta obtenidos durante la calibración en condiciones cromatográficas idénticas a las del análisis de la bebida espirituosa. Las concentraciones se expresan en gramos por hectolitro de alcohol absoluto; antes del análisis es preciso determinar el grado alcohólico del producto.
- 4) Anetol.** La concentración de trans-anetol en la bebida espirituosa se determina por cromatografía de gases (CG) y se expresa en gramos por litro, con un decimal. Se añade la misma cantidad de un patrón interno, por ejemplo 4-alil-anisol (estragol) si no hay estragol presente de forma natural en la muestra, tanto a la muestra problema como a una solución de referencia de trans-anetol de concentración conocida, se diluyen ambas con solución de etanol al 45% y se inyectan directamente en el sistema de CG. Es necesario proceder a una extracción antes de la preparación de la muestra y del análisis en caso de que el licor contenga gran cantidad de azúcares.
- 5) Ácido glicirrónico.** Se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV.
- 6) Chalconas.** Se emplea un método de cromatografía de líquidos de alta resolución para verificar la presencia de chalconas en bebidas anisadas. Las chalconas son colorantes naturales de la familia de los flavonoides que se encuentran en la raíz de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*). Para que una bebida espirituosa anisada se denomine «pastis» debe contener chalconas.
- 7) Azúcares totales.** La cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de índice de refracción se emplea para determinar los azúcares totales (expresado en azúcar invertido) en las bebidas espirituosas, con la exclusión de los licores que contengan huevos y productos lácteos. Este método no está concebido para la determinación de bajos niveles de azúcares. El resultado final es la suma de sacarosa, maltosa, lactosa, glucosa y fructosa, expresado en azúcar invertido en g/L. El azúcar invertido se calcula como la suma de todos

los monosacáridos y disacáridos reductores presentes, más la cantidad estequiométrica de glucosa y fructosa calculada a partir de la sacarosa presente.

- 8) Determinación de los compuestos de la madera.** El método tiene por objeto determinar el furfural, el 5-hidroxi metil furfural, el 5-metil furfural, la vanillina, el siringaldehído, el coniferaldehído, el sinapaldehído, el ácido gálico, el ácido elágico, el ácido vanílico, el ácido siringico y la escopoletina por cromatografía líquida de alta eficacia.

#### 1.4. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES.

- 1) Detección de colorantes artificiales.** Se emplea un método cualitativo consistente en la fijación de los colorantes sintéticos en lana de oveja en medio ácido.
- 2) Determinación por espectrometría de masa isotópica de la relación de isótopos  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del etanol.** Los productos derivados de plantas C4, tales como los azúcares y el alcohol derivado por fermentación, presentan contenidos en carbono 13 más elevados que aquellos de sus homólogos provenientes de plantas C3. La mayor parte de los vegetales, tales como la vid y la remolacha, pertenecen al grupo C3, mientras que la caña de azúcar y el maíz pertenecen al grupo C4. La medida del contenido en carbono 13 permite entonces detectar y cuantificar el azúcar de origen C4 (azúcar de caña o isoglucosa de maíz) agregados a diversos productos. El contenido en carbono 13 es determinado sobre el  $\text{CO}_2$  resultante de la combustión completa de la muestra. Las abundancias de los principales isotómeros de masas 44, 45 y 46, resultantes de las diferentes combinaciones posibles de los isótopos  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$ , son determinadas a partir de corrientes iónicas medidas en tres colectores diferentes de un espectrómetro de masa isotópica.
- 3) Determinación de la distribución de deuterio en el etanol de bebidas alcohólicas por la aplicación de la resonancia magnética nuclear de deuterio (RMN-FINS/SNIF-RMN1).** La adición de azúcares exógenos antes de la fermentación del mosto repercutirá en la redistribución del deuterio en el etanol producido en la fermentación. En comparación con los valores de los parámetros relativos de una bebida testigo natural de la misma región, el aumento artificial del grado alcohólico natural con azúcar exógeno se traducirá en una serie de variaciones en las relaciones isotópicas D/H. Se efectúa la determinación de los parámetros R; (D/H)I; (D/H)II mediante RMN del deuterio en el etanol extraído de la bebida espirituosa: se completa eventualmente la determinación estableciendo la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del etanol.
- 4) Determinación del contenido de  $^{14}\text{C}$  en etanol.** Permite conocer si el origen del etanol de una muestra es biológico o fósil. El contenido en  $^{14}\text{C}$  se determina por centelleo líquido en muestras cuyo contenido en alcohol es, al menos, 85%. Se emplea como valor de referencia el  $^{14}\text{C}$  atmosférico.
- 5) Determinación de la relación de isótopos  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  del agua.** Este método permite detectar la adición de agua en bebidas alcohólicas mediante la determinación de la relación isotópica  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  del agua en equilibrio isotópico inducido con dióxido de carbono, mediante espectrometría de masas para relaciones de isótopos (IRMS). Alcanzado el

equilibrio, el CO<sub>2</sub> de la fase gaseosa se analiza mediante IRMS. La desviación isotópica del <sup>18</sup>O ( $\delta^{18}\text{O}$ ) se calcula comparando los resultados obtenidos al analizar la muestra problema frente a los resultados de una referencia de trabajo, que previamente ha sido calibrada respecto al patrón internacional V-SMOW. Los resultados finales se expresan en ‰.

**6) Determinación de la relación de isótopos <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C del glicerol en bebidas alcoholicas mediante cromatografía en fase gaseosa o cromatografía de alta resolución en fase líquida acoplada a espectrometría de masas de relación isotópica (GC-C-IRMS o HPLC-IRMS).** Como se ha comentado anteriormente, existe una correlación entre la cantidad de carbono 13 presente en los hidratos de carbono y la que aparece en los metabolitos correspondientes (etanol y glicerol), que resultan de la fermentación. Midiendo la concentración de carbono 13 del glicerol, se podría detectar la adición de glicerol procedente de maíz (C4) o de origen sintético (fuentes fósiles) en vinos y otras bebidas alcohólicas. Para separar el glicerol del vino se utiliza un cromatógrafo de gases o de líquidos. En el caso de la GC-C-IRMS, tras pasar por la columna de cromatografía, la muestra se somete a una etapa de combustión y reducción. El contenido de carbono-13 se determina en el gas de dióxido de carbono que resulta de la oxidación del glicerol contenido en la muestra. Una vez que se oxida el glicerol, se producen CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. El dióxido de carbono es transportado mediante un flujo de helio a la fuente IRMS para el análisis <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C.

## 2. CERVEZA.

El Real Decreto 678/2016, que establece la normativa básica de calidad para la elaboración y comercialización de la cerveza y de las bebidas de malta, define **cerveza** como el alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales.

El **mosto cervecero** es el producto obtenido a partir de malta molida o sus extractos, mediante un proceso de extracción acuosa por sacarificación enzimática. A continuación se clarificará, se agregará el lúpulo o sus derivados en este punto o también en etapas posteriores y se seguirá con un proceso de cocción. Podrán utilizarse otros productos amiláceos o también azúcares siempre y cuando la malta represente, al menos, el 50% en masa del total de la materia prima empleada.

Desde el punto de vista de la calidad alimentaria, además de los requisitos establecidos en su definición, la cerveza deberá presentar las siguientes características:

- 1) Un pH inferior o igual a 5,5.
- 2) Un amargor superior a 5 mg/L (1 mg/L de  $\alpha$  isoácidos en cervezas equivale a una unidad de amargor IBU), excepto en el caso de las bebidas de malta.

Según sus características, se distinguen los siguientes tipos de cerveza:

- a) **Cerveza de cereales.** Cuando en el mosto cervecero la presencia de malta de cebada sea inferior al 50% respecto al total de la malta llevará la denominación de «Cerveza de» seguida del nombre del cereal con mayor contenido en peso.
- b) **Cerveza extra.** Cerveza con un extracto seco primitivo superior o igual al 15% en masa.
- c) **Cerveza especial.** Cerveza con un extracto seco primitivo superior o igual al 13 por 100 en masa e inferior al 15 por 100 en masa.
- d) **Cerveza negra.** Cerveza que supere las 50 unidades de color, conforme al método analítico de la European Brewery Convention (EBC).
- e) **Cerveza de bajo contenido en alcohol.** Cerveza cuya graduación alcohólica esté comprendida entre el 1 y el 3 por 100 en volumen.
- f) **Cerveza sin alcohol.** Cerveza cuya graduación alcohólica sea menor al 1 por 100 en volumen.

Los métodos de análisis utilizados en los controles oficiales conformes con esta normativa son los recomendados por la European Brewery Convention (EBC) o, en su defecto, aquellos métodos de organismos nacionales e internacionales de reconocida solvencia.

- 1) **Grado alcohólico.** Se pueden utilizar los siguientes métodos alternativos: destilación y densimetría, Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIR), cromatografía de gases (bajo contenido en alcohol y sin alcohol), enzimático (bajo contenido en alcohol y sin alcohol).
- 2) **pH:** Potenciometría.
- 3) **Densidad y masa volúmica:** Densimetría.
- 4) **Extracto real:** Densimetría y cálculos.
- 5) **Extracto seco primitivo:** Cálculo mediante fórmula de Balling.
- 6) **Color:** Espectrofotometría a 430 nm.
- 7) **Amargor.** Se pueden utilizar los siguientes métodos alternativos: Espectrofotometría a 275 nm (unidades IBU, International Bitterness Unit) o Iso  $\alpha$  ácidos del lúpulo mediante HPLC.

En la elaboración, manipulación y venta al consumidor final de la cerveza se prohíben las siguientes prácticas:

- a) La transformación del almidón en azúcares, mediante hidrólisis exclusivamente ácida.
- b) Cualquier manipulación o trasvase fuera de las instalaciones productivas.
- c) La adición de alcohol, excepto el procedente del propio proceso de fermentación y elaboración de la cerveza.
- d) La sustitución del lúpulo o sus derivados por otros principios amargos.
- e) La neutralización después del proceso de fermentación.
- f) Otros ingredientes. En la elaboración de cerveza podrá utilizarse cualquier otro ingrediente empleado en alimentación humana o, en su caso, autorizado de conformidad con la normativa relativa a nuevos alimentos, distinto de los propios de cerveza o de su proceso de elaboración, siempre que no exceda el 2 por 100 en peso del producto final.

### **3. SIDRA.**

El Real Decreto 72/2017, por el que se aprueba la norma de calidad de las diferentes categorías de la sidra natural y de la sidra define sidra como el producto resultante de la fermentación total o parcial del mosto de manzana, al que se puede incorporar, posteriormente a la fermentación, los azúcares o jarabes azucarados, regulados en la normativa sobre determinados azúcares destinados a la alimentación humana, y anhídrido carbónico. También define la sidra natural como el producto resultante de la fermentación del mosto natural de manzana, cuyo contenido en gas carbónico y azúcares tiene origen endógeno exclusivamente.

Encontramos diferentes categorías de sidra natural:

- 1) **Sidra natural.** Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 5% vol. y su presión relativa en el interior de la botella será superior a 0,5 bares a 20°C.
- 2) **Sidra natural dulce.** Producto resultante de la fermentación parcial del mosto natural de manzana, cuyo contenido en gas carbónico y azúcares tiene origen endógeno exclusivamente. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 1% vol. e inferior o igual a 3% vol. y su contenido de azúcares totales será superior a 50 g/L.
- 3) **Sidra natural espumosa.** Producto resultante de la segunda fermentación de una sidra natural debida a los azúcares naturales de la misma o por adición de licor de tiraje, cuyo contenido en gas carbónico es de origen endógeno exclusivamente. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 5,5% vol. y su presión relativa en el interior de la botella, después de la segunda fermentación, será superior a 3 bares a 20°C.

En función de su contenido en azúcares, distinguimos:

- Brut Nature, inferior a 3 g/L.
  - Extra Brut, inferior a 6 g/L.
  - Brut, igual o inferior a 12 g/L.
  - Extra-seca, superior a 12 g/L. e igual o inferior a 20 g/L.
  - Seca, superior a 20 g/L. e igual o inferior a 30 g/L.
  - Semi-seca, superior a 30 g/L. e igual o inferior a 50 g/L.
  - Dulce, superior a 50 g/L.
- 4) **Sidra natural de bajo contenido en alcohol.** Se trata de sidra natural a la que se le elimina el alcohol por medios físicos. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 1% vol. e inferior o igual a 3% vol.
  - 5) **Sidra natural sin alcohol.** Se trata de sidra natural a la que se le elimina el alcohol por medios físicos, sin que se pierdan sus características organolépticas. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será inferior a 1% vol.

Desde el punto de vista de la calidad alimentaria, además de las características establecidas en sus respectivas definiciones, las diferentes categorías de sidra natural tendrán un extracto seco no reductor superior a 14 g/L y un contenido en cenizas superior a 1,8 g/L.

También encontramos diferentes categorías dentro de la sidra:

- 1) **Sidra.** Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 4% vol. en función de su contenido en azúcares:
  - Extra-seca, igual o inferior a 20 g/L.

- Seca, superior a 20 g/L. e igual o inferior a 30 g/L.
  - Semi-seca, superior a 30 g/L. e igual o inferior a 50 g/L.
  - Dulce, superior a 50 g/L.
- 2) Sidra extra.** Sidra elaborada a partir de la fermentación total o parcial del mosto natural de manzana. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 5% vol.
  - 3) Sidra con zumo de frutas.** Producto elaborado a partir de sidra al que se han añadido zumo de frutas o zumo de frutas a partir de concentrado o zumo de frutas concentrado. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 4% vol.
  - 4) Sidra aromatizada.** Producto elaborado a partir de sidra al que se han añadido aromas. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 4% vol.
  - 5) Sidra de hielo.** Bebida obtenida de la fermentación total o parcial del mosto de manzanas congeladas (crioextracción) o mosto congelado de manzana (crioconcentración). Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 8% vol. y su concentración de azúcares totales será igual o superior a 100 g/L.
  - 6) Cóctel de sidra.** Bebida obtenida a partir de sidra y su mezcla con zumos de fruta o bebidas refrescantes. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será inferior a 4% vol., debiendo estar la sidra presente en el producto acabado en proporción superior al 50%.
  - 7) Sidra de bajo contenido en alcohol.** Es aquella sidra a la que se le elimina el alcohol por medios físicos. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 1% vol. e inferior o igual a 3% vol.
  - 8) Sidra sin alcohol.** Es aquella sidra a la que se le elimina el alcohol por medios físicos, sin que se pierdan sus características organolépticas. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será inferior a 1% vol.

Desde el punto de vista de la calidad alimentaria, además de las características establecidas en sus respectivas definiciones, las diferentes categorías de sidra tendrán un extracto seco no reductor superior a 13 g/L y un contenido en cenizas superior a 1,5 g/L, en el caso de la sidra, 1,8 g/L, en el caso de la sidra extra y 0,6 g/L, en el caso del cóctel de sidra.

Finalmente, las diferentes categorías de sidra natural y de sidra tendrán una acidez volátil, constituida por todos los ácidos de la serie acética, inferior a 2,2 g/L de ácido acético y un contenido en metanol inferior a 200 mg/L.

La comprobación analítica de las características de estos productos se llevará a cabo mediante los métodos de preparación de muestra y de análisis establecidos por la European Cider Makers' Association (AICV), la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) y aquellos métodos de otros organismos nacionales e internacionales de reconocida solvencia.

Para la elaboración y conservación de las diferentes categorías de sidra natural están prohibidas las siguientes prácticas:

- a) Adición de CO<sub>2</sub> exógeno.
- b) Adición de agua.
- c) Adición de alcohol o bebidas alcohólicas.
- d) Adición de mosto de manzana concentrado.
- e) Adición de sacarosa.
- f) Desalcoholización, excepto para sidras naturales de bajo contenido o sin alcohol.

**g)** Adición de colorantes, edulcorantes y aromas.

Para la elaboración y conservación de las diferentes categorías de sidra están prohibidas las siguientes prácticas:

- a)** Empleo de mosto de manzana concentrado para la sidra extra y la sidra de hielo.
- b)** Adición de zumos de otras frutas, zumos de otras frutas a partir de concentrado y zumos de otras frutas concentrados.
- c)** Adición de alcohol o bebidas alcohólicas.
- d)** Desalcoholización, excepto para las sidras sin alcohol o de bajo contenido en alcohol.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Reglamento (UE) 2019/787 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de abril de 2019 sobre la definición, designación, presentación y etiquetado de las bebidas espirituosas, la utilización de los nombres de las bebidas espirituosas en la presentación y etiquetado de otros productos alimenticios, la protección de las indicaciones geográficas de las bebidas espirituosas y la utilización de alcohol etílico y destilados de origen agrícola en las bebidas alcohólicas, y por el que se deroga el Reglamento (CE) n. o 110/2008.

Reglamento (CE) 2870/2000 de la Comisión de 19 de diciembre de 2000 que establece métodos comunitarios de referencia para el análisis de las bebidas espirituosas.

Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta.

Real Decreto 72/2017, de 10 de febrero, por el que se aprueba la norma de calidad de las diferentes categorías de la sidra natural y de la sidra.

Compendio de métodos internacionales de análisis de vinos y mostos. Organización Internacional de la Viña y del Vino. Edición 2022.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 33**

**ACEITES. CLASIFICACIÓN. COMPOSICIÓN. CRITERIOS DE CALIDAD.  
CRITERIOS DE PUREZA. ADULTERACIONES EN ACEITE DE OLIVA.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CLASIFICACIÓN**

#### **1.1 ACEITES DE ORIGEN VEGETAL**

1.1.1. Aceites de frutos oleaginosos

1.1.2. Aceites de semillas oleaginosas.

#### **1.2. ACEITES DE ORIGEN ANIMAL**

### **2. COMPOSICIÓN**

### **3. CRITERIOS DE CALIDAD**

### **4. CRITERIOS DE PUREZA**

### **5. ADULTERACIONES EN ACEITE DE OLIVA**

### **6. BIBLIOGRAFÍA**

## 1. Clasificación

Los aceites alimentarios son grasas alimentarias líquidas a temperatura ambiente. Se caracterizan porque en su composición hay ácidos grasos con mayor número de insaturaciones.

Los aceites se clasifican en aceites de origen vegetal y aceites de origen animal.

### 1.1 Aceites de origen vegetal

a) Aceites de frutos oleaginosos: son aceites de oliva y de orujo de oliva.

El aceite de oliva es el que procede únicamente de los frutos del olivo (*Olea europea L.*).

Deberán tener aspecto limpio y transparente olor y sabor agradable con los aromas propios y característicos de cada aceite. No deberán tener trazas del disolvente usado en la extracción y dar reacción – en el ensayo de jabón.

El aceite de oliva puede ser:

. Aceite de oliva virgen: Obtenidos del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos y otros medios físicos que no hayan tenido más tratamiento que lavado, decantación, centrifugación y filtrado. El aceite de oliva virgen puede ser:

- Aceite de oliva virgen extra (AOVE)
- Aceite de oliva virgen (AOV)
- Aceite de oliva lampante, no es apto para consumo en la forma en que se obtiene y debe ser refinado.

El Consejo Oleícola Internacional reconoce una calidad intermedia ente el AOV y el Aceite de Oliva lampante denominada Aceite de Oliva Corriente.

. Aceite de oliva refinado obtenido a partir del aceite de oliva por refinación.

. Aceite de oliva obtenido por mezcla de aceite de oliva virgen apto para consumo humano y aceite de oliva refinado.

Otros aceites procedentes de las aceitunas que derivan del proceso de obtención de los aceites de oliva vírgenes son los aceites de orujo de oliva dentro de los que se diferencian:

. Aceite de orujo de oliva crudo obtenido por tratamiento de los orujos con disolventes adecuados.

. Aceite de orujo de oliva refinado obtenido a partir de aceite de orujo de oliva crudo por técnicas de refinado que no modifican la estructura glicérica inicial.

. Aceite de orujo de oliva mezcla aceite de orujo refinado con aceites de oliva vírgenes distinto del lampante.

b) Aceites de semillas oleaginosas.

Se definen como los obtenidos de las semillas oleaginosas expresamente autorizadas, sometidas a refinación completa previa su utilización como aceites para consumo humano.

Se autorizan los aceites de semillas oleaginosas que se relacionan de acuerdo con las siguientes denominaciones:

Aceite refinado de soja.—Procedente de las semillas de soja (Glycine soja, SEZ, Soja Híspida, Dolichos Soja L.).

Aceite refinado de cacahuete.—Procedente de la semilla de cacahuete (Arachis hipogea L.).

Aceite refinado de girasol.—Procedente de las semillas de girasol (Helianthus annuus, L.).

Aceite refinado de algodón.—Procedente de las semillas de algodón (género Gossypium).

Aceite refinado de germen de maíz.—Procedente del germen de las semillas de maíz (Zea mays).

Aceite refinado de colza o nabina.—Procedente de la semilla de colza (Brassica napus B. campestris), cuyo contenido en ácido erúico sea igual o menor del 5 por 100.

Aceite refinado de cártamo.—Procedente de las semillas de cártamo (Carthamus tinctorius, L.).

Aceite refinado de pepita de uva.—Procedente de las semillas de la vid (Vitis europea L.).

Aceite refinado de semillas.—Procedente de la mezcla de dos o más aceites de semillas oleaginosas de los autorizados en esta reglamentación.

**1.2 Aceites de origen animal:** se pueden incluir en el grupo de los aceites los aceites de pescado que por ser ricos en ácidos grasos poliinsaturados son líquidos a temperatura ambiente.

## **2. Composición:**

Hay que diferenciar entre la fracción saponificable y la fracción insaponificable.

### Fracción saponificable:

Representa entre el 98% y el 99,5% del peso del aceite de oliva. Formada principalmente por triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres.

Más del 90% de los aceites son triglicéridos que son ésteres de glicerina con ácidos grasos. Pueden ser mono, di o triglicéridos según el número de ácidos grasos esterificados a la glicerina. Los más abundantes son los triglicéridos simples en los que los 3 ácidos grasos son iguales. Los mixtos son aquellos en los que un ácido graso es diferente.

Los aceites se caracterizan por los ácidos grasos que forman la combinación en los triglicéridos dentro de ciertos límites, según el aceite del que se trate predominan unos ácidos grasos u otros.

En aceite de oliva predomina el ácido oleico (53-83%) seguido del ácido palmítico (7,5%-20) y después los ácidos linoleico, esteárico y palmitoleico.

En aceite de girasol predomina el ácido linoleico (48 - 74%) seguido del ácido oleico, palmítico esteárico y araquídico.

En aceite de soja predomina el ácido linoleico, en aceite de coco el ácido láurico y en aceite de palma el ácido palmítico.

Fosfolípidos: están formados por ácidos grasos, glicerol y ácido fosfórico más una base nitrogenada. Son fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol.

Ceras: formados por un ácido graso y un alcohol alifático esterificado.

Glicolípidos: son un ácido graso más un glicerol y un oligosacárido.

Ácidos grasos libres: en la naturaleza se encuentran de 4 a 26 átomos de carbono. Pueden ser mono, poliinsaturados o saturados. Los insaturados tienen la insaturación en posición cis.

Fracción insaponificable:

Son componentes menores que no tiene ácidos grasos en su composición por lo que no dan reacción con KOH. Suponen entre el 1,5% y el 0,5% del peso del aceite de oliva.

Son los hidrocarburos, alcoholes terpénicos (eritrodiol y uvaol) y alifáticos, con número par de carbonos (entre 18 y 28) y que esterificados con ácidos grasos dan lugar a las ceras; vitaminas liposolubles (K, E, D y A), esteroides y tocoferoles.

Son componentes muy importantes y útiles para la caracterización de un aceite.

Dentro de los hidrocarburos se encuentran los carotenos, concretamente beta-caroteno, y el escualeno.

Los esteroides son alcoholes superiores. Se encuentran libres o esterificados. Aunque se encuentran en baja concentración sirven para caracterizar las grasas.

En aceite de oliva el 93% es B-sitosterol, en grasas animales el mayoritario es el colesterol, en aceite de girasol también hay B-sitosterol y destaca el estigmasterol y delta 7 estigmastenol.

Otros esteroides son brasicasterol, campesterol, avenasterol. En soja el campesterol puede llegar a ser un 20%.

Dentro de los tocóferoles destaca el  $\alpha$ -tocóferol, una de las formas de la vitamina E, es muy abundante en aceites vegetales sobre todo en aceite de germen de trigo y soja. Es antioxidante retrasando la oxidación de los aceites.

Otros componentes:

Clorofilas y pigmentos, metales naturales, polifenoles, compuestos aromáticos.

Humedad e impurezas, productos de la oxidación

Componentes extraños: contaminantes como metales, PCBs y Dioxinas, pesticidas, jabones, disolventes.

Aditivos: antioxidantes, colorantes, emulsionantes.

### **3. Criterios de calidad**

El deterioro del aceite se produce principalmente por reacciones de oxidación, que rompen las cadenas de los ácidos grasos dando lugar a alcoholes, cetonas, aldehídos que producen mal olor y sabor y determinan el enranciamiento y, por reacciones de hidrólisis, donde se produce una reacción entre los triglicéridos del aceite y el agua en la que intervienen enzimas dando lugar a la formación de ácidos grasos libres.

Los criterios de calidad se miden por métodos analíticos, que determinan parámetros que indican en función de los valores obtenidos el deterioro hidrolítico y oxidativo que ha habido del aceite y, también dan información sobre el proceso de elaboración del aceite.

Por ejemplo, el patrón de calidad de un aceite de oliva virgen está definido por ser un zumo de aceituna obtenido a partir de aceitunas sanas con un grado de maduración óptimo y evitando que cualquier tratamiento cambie la naturaleza de sus componentes.

Los factores que afectan a la calidad de un aceite de oliva son el procesado, almacenamiento y transporte del fruto, grado de madurez, calidad del fruto y época de cosecha.

Dentro de los criterios de calidad recogidos en las diferentes legislaciones aplicables a los diferentes tipos de aceites se encuentran:

#### **3.1. Aspecto**

Debe ser límpido mantenido a 20°C+/-2°C durante 24 horas.

#### **3.2. Olor y sabor**

Normales con aromas propios y característicos, sin acusar síntomas de rancidez, alteración o contaminación.

#### **3.3. Color**

Varía de amarillo a verde. Entre los factores que afectan al color del AOV se encuentran la variedad de la aceituna, la madurez, zona de cosecha, proceso de elaboración, conservación).

En aceites de oliva se usa el índice específico ABT mezclando cantidades variables de fosfato monopotásico y disódico en cantidades crecientes de azul de bromotimol.

#### **3.4. Grado de acidez**

Es el porcentaje de ácidos grasos libres con respecto al ácido oleico. Cuanto más bajo sea el grado de acidez, mayor calidad tendrá el aceite de oliva virgen. La hidrólisis se ve favorecida por la humedad alta y la temperatura.

La determinación se realiza por disolución de la muestra en una mezcla de disolventes orgánicos y valoración (la valoración se hace por medio de una volumetría) posterior de los ácidos grasos libres, mediante una disolución acuosa de hidróxido sódico.

El grado de acidez para:

AOVE  $\leq$  0.80 %

AOV  $\leq$  2.0%

Lampante  $>$  2.0%

AO  $\leq$  1.00%

En aceites de semilla  $\leq$  0.2%

### 3.5. Determinaciones relacionadas con la oxidación debida al oxígeno, la luz y el calor.

La oxidación es un proceso que da lugar a reacciones en cadena por radicales libres.

En la oxidación primaria se forman peróxidos siendo el índice de peróxidos una medida de la oxidación primaria.

La muestra de aceite, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con una disolución saturada de yoduro potásico. El yodo liberado es valorado posteriormente con una disolución titulada de tiosulfato sódico. El nº de miliequivalentes de yodo liberados es igual al número de miliequivalentes de compuestos peroxídicos presentes en el aceite. Se utiliza almidón como indicador.

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

$$IP = \frac{V \cdot N \cdot 1000}{P}$$

V: ml de solución valorada de tiosulfato sódico empleados en el ensayo.

N: Normalidad exacta de la disolución de tiosulfato sódico empleada.

p: peso, en gramos, de la muestra problema

El límite de IP establecido en la legislación para un AOVE y AOV es  $\leq$  20.0 mEq O<sub>2</sub>/ kg de grasa

La prueba espectrofotométrica en el UV a diferentes longitudes de onda es la medida del coeficiente de extinción a diferentes longitudes de onda (232 y 268, 270 nm según el disolvente usado) que proporciona información sobre la calidad del aceite, su conservación y modificaciones por procesos tecnológicos.

Con la oxidación lipídica se generan en primer lugar hidroperóxidos del ácido linoleico poco estables que absorben a 232nm.

Los radicales libre provenientes de la descomposición de los hidroperóxidos se asocian (oxidación secundaria) para formar productos no radicales (aldehídos y cetonas) que absorben cerca de los 270 nm.

El coeficiente de extinción específica aumenta conforme la oxidación es mayor hasta fases muy avanzada. Complementa la información obtenida con el IP.

Para llevar a cabo esta determinación se disuelve una muestra de aceite en el disolvente requerido (isooctano o ciclohexano) y se determina la absorción de la solución a las longitudes de onda prescritas, frente al disolvente puro. Las extinciones específicas a 232 nm y 270 nm se calculan para una concentración del 1 % p/v en una cubeta de 10 mm.

Los AOVEs no deben tener más de 2,50 para el K 232 y 0,22 para K 270

El AOV como máximo 2,60 y 0,25 respectivamente.

También estos coeficientes de extinción específica sirven como criterio de pureza ya que durante refinado se forman trienos conjugados que absorben a 270nm

Así mismo también hay que determinar la variación específica Delta K para el que hay límites establecidos en la legislación. Expresa la variación del coeficiente de extinción alrededor de los 270nm en el caso del ciclohexano y de 268nm en el caso del isooctano. En aceites de oliva vírgenes el Delta K es 0. Permite detectar la presencia de aceites refinados y aceites de orujo.

### **3.6. Humedad y materias volátiles**

Da información de los productos que deben eliminarse casi en su totalidad durante un proceso de elaboración correcto.

La humedad y las materias volátiles se determinan por la pérdida de masa que se produce cuando la muestra se calienta hasta peso constante en estufa a  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

En AOV es inferior a 0,2% y en el resto inferior a 0,1%.

### **3.7. Impurezas**

Son el conjunto de sustancias insolubles en un disolvente orgánico y que no hayan sido determinadas como agua y materias volátiles bajo las condiciones del método empleado.

El contenido se expresa en forma de porcentaje en masa. Estas impurezas incluyen impurezas mecánicas, sustancias minerales, hidratos de carbono, sustancias nitrogenadas, varias resinas, detergentes cálcicos, ácidos grasos oxidados, lactonas de ácidos grasos, y (parcialmente) detergentes alcalinos, ácidos grasos hidroxilados y glicéridos.

Se pesan 20gramos de aceite y se disuelve en 200mL de disolvente seguido de agitación. Se deja reposar se filtra y se pesa el filtrado.

La polaridad del disolvente influirá en la cantidad de impurezas retenidas por lo que el dato debe ir acompañado del disolvente utilizado, es frecuente el éter de petróleo por lo que serán las impurezas en éter de petróleo.

Las impurezas han de ser inferiores a 0.2% en aceites de oliva vírgenes e inferiores a 0.1% en el resto.

La humedad y las impurezas afectan a la conservación del aceite haciendo que aparezcan malos olores y sabores y potenciar la alteración del aceite.

### **3.8. Jabones**

Es una prueba cualitativa que se estudia en aceites refinados. Los jabones no pueden estar presentes.

La muestra se trata con acetona y azul de bromofenol se agita y se decanta. Si la capa cetónica superior aparece de color azul revela la presencia de jabón. Si es naranja/amarilla es negativo.

### **3.9. Pruebas organolépticas**

Se hacen con un panel de catadores formado por un jefe de panel y mínimo 8 catadores, previamente seleccionados y entrenados mediante técnicas de análisis sensorial, y con métodos estandarizados.

Se catan los aceites de oliva vírgenes y la cata tiene 3 criterios muy claros:

- Presencia o ausencia de frutado
- Presencia o ausencia de defectos
- Intensidad de estos si están presentes.

Se utiliza la mediana del frutado y la mediana del defecto.

Se entiende por mediana del defecto la mediana del atributo negativo percibido con mayor intensidad. El CV (%) de todos los valores no puede ser superior al 20%.

Como resultado el aceite de oliva se clasifica en Extra (sin defectos), virgen (con defectos leves) y lampante (defectos grandes). La mediana de frutado en AOVE y AOV debe ser superior a 0.

Estos tres grupos, además se caracterizan por características químicas.

### **3.10. Ésteres etílicos**

La materia orgánica presente en el aceite con el tiempo puede fermentar produciendo etanol el cual con los ácidos grasos libres forma los ésteres etílicos.

El aceite, al que se habrán añadido la cantidad adecuada de patrones internos, se fracciona mediante cromatografía con columna de gel de sílice hidratado. La fracción que contiene los ésteres etílicos se recupera y se analiza directamente mediante cromatografía de gases con columna capilar donde los ésteres se separan en función del número de átomos de carbono.

Los ésteres de etanol se identifican a partir de sus tiempos de retención respecto del heptadecanoato de metilo y de mezclas de ésteres etílicos de los principales ácidos

grasos del aceite de oliva (palmítico y oleico). El contenido en ésteres etílicos se expresará como la suma de los contenidos de los ésteres etílicos de C16 a C18. Solo se determinan en AOVE. Un valor de ésteres etílicos por encima de 35 mg/Kg indica presencia de fermentaciones.

### 11. Disolventes halogenados

Son el cloroformo, tricloroetileno, tetracloroetileno entre otros.

En el caso del aceite de oliva los límites establecidos en la legislación a nivel europeo para todas las categorías de aceites de oliva son los siguientes:

- Contenido máximo de cada disolvente halogenado detectado: 0,1 mg/kg
- Contenido máximo de la suma de los disolventes halogenados detectados: 0,2 mg/kg.

La determinación se realiza por cromatografía de gases head space con detector ECD.

### 3.11. Otros parámetros de calidad

Además en los aceites se controlan otros parámetros como metales (Cu, Fe, Pb y As), microorganismos y toxinas, PCBs, pesticidas y aditivos.

## 4. Criterios de pureza

Los criterios de pureza son una serie de pruebas que se utilizan para el estudio y caracterización de las grasas que permiten conocer, por ejemplo, si un aceite de oliva es virgen, de oliva, de orujo o si contiene aceites de calidades inferiores o de diferente origen vegetal.

Destacan los siguientes entre los establecidos en las diferentes legislaciones aplicables a aceites de oliva y aceites vegetales

**4.1. Índice de iodo:** nos indica de forma aproximada el grado de insaturación de un aceite. Mide la cantidad de iodo necesaria para saturar los dobles enlaces. A menor índice de iodo más ácidos grasos saturados contiene.

**4.2. Índice de refracción:** el grado de insaturación de una grasa y su estructura están relacionados con el índice de refracción. Se mide con un refractómetro.

**4.3. Índice de Bellier:** es la temperatura a la que se produce la precipitación de las sales de los ácidos grasos de los aceites cuando están saponificados y disueltos según lo establecido en el método.

**4.4. Índice de saponificación:** es la cantidad de hidróxido potásico expresada en mg necesaria para saponificar 1 gramo de aceite. Da información del peso molecular siendo un índice indirecto, a mayor índice de saponificación menor peso molecular.

**4.5. Densidad.** Se mide la densidad con un picnómetro. Está relacionada con el tipo de ácidos grasos que forman parte de la grasa.

**4.6. Prueba de Halphen:** Este método tiene por objeto la detección cualitativa del aceite de algodón en mezcla con otros aceites o grasas vegetales o animales. A la muestra de aceite se le adiciona una solución de azufre disuelto en sulfuro de carbono y alcohol amílico. Se calienta a 110°C y si aparece color rojo es positivo debido a la estructura del grupo ciclopropeno del gosispol.

Aunque estos índices están legislados, hoy en día la composición de una grasa es identificada de forma mucho más precisa usando técnicas cromatográficas.

#### **4.7. Perfil de ácidos grasos**

El perfil de ácidos grasos está basado en componentes de la fracción saponificable y es característico de cada tipo de aceite permitiendo caracterizar la mayoría de las grasas y detectar adulteraciones.

La determinación analítica de los ésteres metílicos de ácidos grasos se lleva a cabo disolviendo los triglicéridos en heptano y se añade potasa y metanol produciéndose una transesterificación formándose los ésteres metílicos de los ácidos grasos que son volátiles a la temperatura de trabajo, siendo los ácidos grasos con menos átomos de carbono y más saturados más volátiles.

Los ésteres metílicos se analizan por la técnica de cromatografía de gases que permite estudiar los ácidos grasos según su número de carbonos y el número de insaturaciones. Se utilizan columnas capilares muy polares y detector de ionización de llama. La inyección se realiza con división de flujo y se obtiene el % de cada ácido graso respecto al total.

#### **4.8. Esteroles**

En ocasiones el estudio de ácidos grasos no es suficiente para caracterizar la grasa ya que la proporción de ácidos grasos de los diferentes aceites está en unos rangos que pueden solaparse.

El estudio de los esteroides, que forman parte de la fracción insaponificable, sirve también para caracterizar la grasa.

El método analítico permite determinar el porcentaje y el contenido total de esteroides de los aceites de oliva y de orujo de oliva. Este método puede ser utilizado para la detección de aceites de otra naturaleza en los aceites de oliva y de orujo de oliva.

Los aceites, con  $\alpha$ -colestanol añadido como patrón interno, se saponifican con una disolución de hidróxido potásico en etanol y la materia insaponificable se extrae con éter etílico. La fracción de esteroides se separa de la materia insaponificable mediante cromatografía en capa fina (TLC) con una placa de gel de sílice básico. Las fracciones recuperadas del gel de sílice se transforman en éteres de trimetilsililo y se analizan entonces por cromatografía de gases con columna capilar.

Para la identificación de los diferentes picos se utilizan los tiempos de retención de los mismos y se comparan con mezclas de los esteroides analizadas en las mismas condiciones. La elución de los esteroides se efectúa en el orden siguiente: colesterol, brasicasterol, 24- metilcolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol,  $\Delta$ -7-

campesterol,  $\Delta$ -5,23- estigmastadienol, clerosterol,  $\beta$ -sitosterol, sitostanol,  $\Delta$ -5-avenasterol,  $\Delta$ -5,24- estigmastadienol,  $\Delta$ -7-estigmastenol,  $\Delta$ -7-avenasterol.

Este método permite el cálculo del contenido de esteroides totales en mg/kg y la composición porcentual de esteroides donde el porcentaje de cada uno de los esteroides simples es la relación entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de los esteroides.

#### 4.9. Isómeros trans

Los isómeros trans de los ácidos grasos aparecen en el proceso de refinado y transesterificación.

Se analizan con CG FID igual que los ácidos grasos pero para una óptima separación se necesitan columnas muy largas que permitan la separación de los ácidos grasos cis y trans.

#### 4.10. Ácidos grasos saturados en posición 2 de los TG.

Tiene por objeto detectar la presencia de aceites esterificados con glicerina. En la naturaleza los ácidos grasos palmítico y esteárico esterifican con mayor proporción en posición 1 y 3 y los insaturados oleico y linoleico en posición 2 ó beta.

Los aceites obtenidos por esterificación ofrecen una distribución diferente con ácidos saturados en la posición central.

Se determina el contenido de ácidos saturados (suma de palmítico y esteárico) en posición 2 de los triglicéridos.

En aceite de oliva se determina el porcentaje de ácido palmítico en posición la 2, o  $\beta$  de los triglicéridos, mediante la evaluación del monopalmitato de 2-glicerilo. Al determinar el monopalmitato de 2-glicerilo se determinan posibles mezclas con aceites esterificados.

Tras una preparación previa, la muestra de aceite es sometida a la acción de la lipasa pancreática, la cual realiza una hidrólisis parcial y específica en las posiciones 1 y 3, o  $\alpha$  y  $\alpha'$ , de las moléculas de triglicéridos, lo cual implica la aparición de monoglicéridos en posición 2, ó  $\beta$ . Los monoglicéridos se separan de los diglicéridos y triglicéridos por cromatografía de columna. Se determina a continuación el porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo en la fracción monoglicéridica, previa silanización de los grupos hidroxilo libres de la glicerina, mediante cromatografía de gases en columna capilar.

Los distintos monoglicéridos se identifican en función de sus tiempos de retención obtenidos, comparándolos con los correspondientes a las mezclas patrón de monoglicéridos analizadas en las mismas condiciones.

El porcentaje de monopalmitato de glicerilo se calcula a partir de la relación entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de todos los monoglicéridos (véase la figura 2), según la fórmula siguiente:

$$\text{Monopalmitato 2 de glicerilo} = (\text{Amp} / \sum A) * 100$$

siendo: Amp = el área del pico correspondiente al monopalmitato de glicerilo

$\Sigma A$  = la suma de las áreas de todos los picos de los monoglicéridos.

#### 4.11. Ésteres no glicerídicos

Esta prueba se realizará en el caso de haber comprobado la presencia de aceites esterificados mediante la determinación de ácidos grasos en posición 2 de los triglicéridos, para saber si la esterificación se ha realizado con alcoholes diferentes de la glicerina.

La muestra se disuelve en hexano y se separa en una placa de cromatografía en capa fina. Si tiene ésteres no glicéridicos aparece una mancha por encima de los triglicéridos. Se pueden usar patrones de etilenglicol o propilenglicol para identificación del alcohol.

#### 4.12. Estigmastadienos

El estigma 3,5 dieno es un hidrocarburo que no se encuentra en aceite de oliva virgen pero que debido a las altas temperaturas del proceso de refinado y de la decoloración se forma a partir del B-sitosterol por deshidratación con la formación de un doble enlace. Permite por lo tanto detectar presencia de aceite refinado en aceites de oliva vírgenes.

Tras aislar la fracción insaponificable se procede a la separación de los hidrocarburos esteroideos por cromatografía en columna de gel de sílice y posterior análisis de la fracción de interés por CG capilar.

$$\text{Estigmastadienos (mg/ Kg)} = (\text{As} * \text{Mc} / \text{Ac} * \text{Mo}) * 1000$$

Donde:

As= área del pico de estigmastadienos (si el pico se halla dividido en dos o más, súmese el área de los mismos)

Ac= área del pico correspondiente al patrón interno

Mc= Peso del patrón añadido, en microgramos

Mo= Peso de aceite empleado, en gramos

#### 4.13. Contenido de triglicéridos con número equivalente de carbonos 42 (diferencia entre el contenido teórico y el contenido experimental por HPLC)

A veces el perfil de esteroides y de ácidos grasos no es suficiente para detectar presencia de aceites de otros orígenes vegetales debido a que estos parámetros pueden variar por diferentes factores como el origen geográfico, las condiciones climatológicas y la variedad de la aceituna.

La diferencia entre el contenido teórico y el contenido experimental por HPLC es una prueba que permite detectar la presencia de pequeñas cantidades de aceites de

semillas. Se calcula el contenido teórico de triglicéridos con número equivalente de carbonos (ECN) 42 a partir del perfil de ácidos grasos por CG. Este contenido se corresponde dentro de ciertos límites con el determinado por HPLC en fase inversa y detector de índice de refracción en el caso de aceites de oliva sin mezclas con otros aceites de semillas. Diferencias entre el contenido teórico y el experimental con valores superiores a los establecidos en la legislación indica presencia de aceites de semillas.

#### **4.14. Eritrodiol y uvaol**

Detecta la presencia de aceite de orujo ya que son compuestos con mayor presencia en la piel y en el hueso de la aceituna.

El análisis se realiza igual que para el perfil de esteroides siendo en este caso la banda de interés la correspondiente a los dialcoholes tripterpénicos.

El resultado se expresa en porcentaje de eritrodiol y uvaol respecto al conjunto eritrodiol más esteroides.

#### **4.15 Contenido de ceras**

Las ceras son ésteres grasos que encontramos en la aceituna de forma natural, en la piel y también en las hojas. El aceite de oliva virgen las adquiere, en cantidades mínimas, en el proceso de extracción, por lo que hasta unos valores el contenido de ceras actúa como criterio de calidad.

La determinación se realiza mediante fraccionamiento del aceite al que se le habrá añadido previamente el patrón interno adecuado, mediante cromatografía en columna de gel de sílice. Se recupera la fracción eluida y se analiza por cromatografía de gases con columna capilar.

### **5. Adulteraciones en aceite de oliva**

#### **5.1 Adulteración de aceite de oliva con aceite refinado**

La presencia de isómeros trans de los ácidos grasos en cantidades altas indica presencia de aceites refinados. En aceite de oliva virgen están legislados la suma de los isómeros trans oleico y la suma de los isómeros trans linoleicos+ linolénicos con unos límites establecidos dependiendo de cada tipo de aceite. En AOV aptos para consumo humano el límite establecido es inferior o igual a 0,05% respectivamente.

También el análisis de 3,5 estigmastadieno permite detectar presencia de aceite refinado en aceites de oliva vírgenes.

El límite establecido en la legislación para este parámetro en AOV es inferior o igual a 0.05 y 0.50, este último en el caso del aceite de oliva lampante.

Otro parámetro útil para detectar aceites refinados en aceite de oliva es el Delta K, ya que en el tratamiento con tierras, en la refinación del aceite los dobles enlaces del ácido linoleico se conjugan y hace que haya un incremento de la absorbancia a 270nm.

En aceite de oliva el valor debe ser inferior o igual que 0.01. Para diferenciar si la absorción a 270nm se debe a aceites refinados o a oxidación lipídica se hace midiendo

el K270nm antes y después de pasar el aceite por una columna de alúmina que es muy polar y retiene a los compuestos polares como las dicetonas. Si después de pasar por la columna el K270nm baja es por oxidación secundaria.

## 5.2 Adulteración de aceite de oliva con aceites de semillas

Para la detección de adulteración de aceite de oliva con aceites de semillas se puede estudiar el perfil de ácidos grasos. Destacan por el contenido de ácido palmítico los aceites de palma; el ácido esteárico es elevado en las grasas animales, el ácido linoleico en los aceites de soja, girasol y maíz, el ácido linolénico en colza y soja y el ácido oleico está presente en mayor contenido en aceite de oliva y orujo de oliva. En la legislación aplicable a aceite de oliva y de orujo, la composición de ácidos grasos (%) está comprendida entre unos intervalos en el caso de los ácidos mayoritarios, como:

Ácido oleico 55,0-83,0 %,

Ácido Linoleico 2,5-21,0 %,

Ácido palmítico 7,5-20,0 % ,

Ácido esteárico 0,5-5,0 %,

Ácido palmitoleico 0,3-3,5%.

Para los ácidos grasos minoritarios, se establecen unos límites que no deben ser superados ya que son relevantes para la detección de adulteraciones.

Ácido linolénico  $\leq 1,00\%$ ,

Ácido mirístico  $\leq 0,03\%$ ,

Ácido araquídico  $\leq 0,6\%$ ,

Ácido gadoleico  $\leq 0,4\%$ ,

Ácido behénico  $\leq 0,2$ ,

Ácido lignocérico  $\leq 0,2\%$

El estudio del perfil de esteroides también va a permitir detectar la adición de aceites de semilla.

Hay esteroides característicos según el origen botánico, por lo que la adición de aceites de semilla a los aceites de oliva va a cambiar la composición de los esteroides. Ninguna grasa vegetal puede tener valores por encima de 0,5% de colesterol. El aceite de soja por ejemplo se caracteriza por el campesterol, el de girasol por el Delta 7 estigmastenol, el aceite de colza por el brassicasterol, teniendo cada aceite un rango para los diferentes esteroides que permiten su caracterización y la detección de adulteraciones.

En la legislación aplicable a aceite de oliva se establecen los límites para determinados esteroides así como para el contenido de esteroides totales.

- Colesterol (%)  $\leq 0.5$
- Brassicasterol (%)  $\leq 0.1$
- Campesterol (%)  $\leq 4.0$
- Estigmasterol (%)  $<$  campesterol
- Bsitosterol app (%)  $> 93.0$
- Delta-7- estigmastenol (%)  $\leq 0.5$
- Esteroles totales mg/kg  $\geq 1000$

Un parámetro que aporta información adicional es el contenido de triglicéridos con número equivalente de carbonos 42 (diferencia entre el contenido teórico y el contenido experimental por HPLC)

Diferencias entre el contenido teórico y el experimental con valores superiores a los establecidos en la legislación indica presencia de aceites de semillas. En aceite de oliva vírgen comestible esta diferencia no supera el valor de 0,20.

También el análisis de esterenos (campestadienos y estigmastadienos), hidrocarburos que se forman por refinación a partir de los esteroles permiten detectar presencia de aceites de semillas en aceites de oliva vírgenes. En aceites de oliva virgen aptos para consumo el límite establecido en la legislación para el parámetro estigmastadienos es inferior o igual a 0,05 mg/kg.

### **5.3. Adulteración de aceite de oliva con aceites esterificados**

Se detecta analizando monopalmitato de 2-glicerilo. El límite establecido en la legislación varía según qué tipo de aceite y en función del contenido de ácido palmítico.

En aceite de oliva vírgen el límite es 0.9% o 1,0 si el ácido palmítico es superior a 14%.

### **5.4 Adulteración de aceite de oliva con aceite de orujo**

La adición de aceite de orujo al aceite de oliva se puede detectar por medio de las siguientes determinaciones:

El eritrodíol y uvaol son dialcoholes triperpénicos presentes en mayor concentración en la piel y en el hueso de la aceituna. El límite para la suma de eritrodíol y uvaol en % del total de esteroles para aceite de oliva es  $\leq 4.5\%$ .

Otro parámetro útil para detectar orujos en aceite de oliva es el Delta K, ya que en el tratamiento con tierras, en la refinación del aceite de orujo los dobles enlaces del ácido linoleico se conjugan y hace que haya un incremento de la absorbancia a 270nm. En aceite de oliva el valor debe ser inferior o igual que 0.01. Para diferenciar si la absorción

a 270nm se debe a aceites refinados o a oxidación lipídica se hace midiendo el K270nm antes y después de pasar el aceite por una columna de alúmina que es muy polar y retiene a los compuestos polares como las dicetonas. Si después de pasar por la columna el K 270 nm baja es por oxidación secundaria.

El contenido de ceras también sirve para detectar adición de orujo ya que están presentes en la piel de la aceituna. En aceites de oliva vírgenes aptos para consumo humano el límite establecido en la legislación para el contenido de ceras es 150mg/kg para la suma de C42+C44+C46 en mg/kg. En cantidades superiores a 350 mg/Kg indica la presencia de aceite de orujo.

La presencia de isómeros trans en cantidades altas también pueden indicar presencia de aceites de orujo. En aceite de oliva virgen están legislados la suma de los isómeros trans oleico y la suma de los isómeros trans linoleicos+ linolénicos con unos límites establecidos dependiendo de cada tipo de aceite. En AOV aptos para consumo humano el límite establecido es inferior o igual a 0,05% respectivamente.

## **6. Bibliografía**

- REGLAMENTO (CEE) 2568/91, de la Comisión, de 11 de julio (DOCE L 248, de 05.09.1991), relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

- REGLAMENTO (UE) 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013 (DOUE L 347, de 20.12.2013), por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) no 922/72, (CEE) no 234/79, (CE) no 1037/2001 y (CE) no 1234/2007. Corrección de errores en DOUE L 130, de 19.5.2016.

- REAL DECRETO 308/1983, de 25 de enero (BOE de 21 de febrero), por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles.

- REAL DECRETO 308/1983 a 1.09.2021. 2.- REAL DECRETO 760/2021, de 31 de agosto (BOE de 1 de septiembre), por el que se aprueba la norma de calidad de los aceites de oliva y de orujo de oliva.

- REAL DECRETO 227/2008, de 15 de febrero (BOE de 5 de marzo), por el que se establece la normativa básica referente a los paneles de catadores de aceite de oliva virgen.

- Codex STAN 33-1981 y posteriores modificaciones norma para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva.

- Codex STAN 210-1999 y posteriores modificaciones norma para aceites vegetales específicos.

- Norma comercial COI de aplicación para los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. Norma COI/T.15/NC No 3 en su última revisión.

- Obtención del aceite de oliva virgen. Luis Civantos López-Villata. Editorial Agrícola española S.A.

- Consejo Oleícola Internacional <https://www.internationaloliveoil.org/>

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 34**

**ZUMOS DE FRUTAS. COMPOSICIÓN. CRITERIOS DE CALIDAD. OTRAS  
BEBIDAS ANALCOHÓLICAS. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.  
DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ZUMOS DE FRUTAS**

### **2. COMPOSICIÓN**

#### 2.1 INGREDIENTES AUTORIZADOS

#### 2.2. TRATAMIENTOS Y SUSTANCIAS AUTORIZADAS

### **3. CRITERIOS DE CALIDAD**

### **4. OTRAS BEBIDAS ANALCOHÓLICAS**

#### 4.1. BEBIDAS REFRESCANTES

#### 4.2 HORCHATA

### **5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

### **6. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

## **1. ZUMOS DE FRUTAS**

Actualmente, junto a otros grupos de alimentos, las frutas constituyen parte fundamental de nuestra alimentación. Su riqueza en vitaminas, elementos minerales, fibra, etc., hace que su consumo sea imprescindible para conseguir una alimentación sana y equilibrada. Al igual que las frutas, sus derivados, en forma de zumos (extraídos de éstas normalmente mediante un proceso físico), se han convertido actualmente en un componente imprescindible en cualquier dieta saludable. Gracias a la tecnología aplicada, son una buena fuente de nutrientes (antioxidantes y otros compuestos bioactivos) y de hidratación, y constituyen una buena opción para el consumidor, ya que permite conservar casi todas las propiedades de la fruta de la que proceden.

Dependiendo del tipo de fruta se obtienen zumos, como la naranja, que pueden ser consumidos como tales, o purés, como el melocotón, que por su consistencia no pueden ser consumidos directamente y se consumen como néctares o bien mezclados con otras frutas como la uva.

El proceso de elaboración depende del tipo de materia prima utilizada. Para ciertas frutas como melocotón, pera, albaricoque, tomate, etc. se emplea un tipo de maquinaria diferente a la que se utiliza para otras como naranjas y mandarinas, pero todas tienen unas etapas de procesado que son comunes. Estas etapas empleadas, normalmente, en la industria son: recepción, selección, lavado, extracción, pasteurización y desaireación (con el fin de destruir los posibles microorganismos, eliminar el aire y reducir la oxidación de la vitamina C) y envasado.

Atendiendo a la actual legislación el zumo de frutas se define como: el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de las partes comestibles de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por refrigeración o congelación, de una o varias especies mezcladas, que posea el color, el aroma y el sabor característicos del zumo de la fruta de la que procede.

Se diferencian varias categorías de productos englobados como zumos y productos similares:

- Zumo de fruta: se trata del zumo exprimido que se obtiene de las partes comestibles de las frutas sanas y maduras. Una vez se exprime pasa por un proceso térmico que permite conservar sus propiedades organolépticas y nutricionales. Los azúcares añadidos no están permitidos por la ley. El zumo de fruta es fruta exprimida 100% sin azúcares añadidos.
- Zumo de fruta a partir de concentrado: producto obtenido a partir de un zumo concentrado, restituyéndole el agua extraída en su proceso de concentración. De nuevo, los azúcares añadidos no están permitidos por la ley.
- Zumo concentrado: se obtiene de manera similar al zumo de fruta, con la diferencia de que se le somete a un proceso físico de eliminación del agua, lo que facilita su transporte y obtener finalmente zumos de gran diversidad de sabores y procedencias.

- Néctar de frutas: son los zumos, purés o concentrados, a los que se añade agua y a los únicos a los que se les pueden añadir azúcares, edulcorantes o miel. Tanto el contenido mínimo de zumo de fruta como los ingredientes permitidos están limitadas y reguladas por la legislación vigente.
- Zumo de fruta extraído con agua: el producto obtenido por difusión en agua de: fruta pulposa entera cuyo zumo no puede extraerse por procedimientos físicos, o fruta entera deshidratada.
- Zumo de frutas deshidratado/en polvo: el producto obtenido a partir de zumo de una o varias especies de fruta por eliminación física de la práctica totalidad del agua.

Se puede reincorporar al zumo la pulpa, las células y el aroma, obtenidos por los medios físicos apropiados, que procedan de la misma especie de fruta. En el caso de los cítricos, el zumo de frutas debe proceder del endocarpio. No obstante, el zumo de lima puede obtenerse a partir del fruto entero. Cuando los zumos se obtienen a partir de frutas que incluyen pepitas, semillas y pieles, estos no se deben incorporar al zumo.

La mezcla de zumos de frutas y de puré de frutas en la producción del zumo está permitida.

## **2. COMPOSICIÓN**

La composición química de los zumos depende en gran medida del tipo de fruta y de su estado de madurez. Los componentes fundamentales son agua, hidratos de carbono y ácidos orgánicos, mientras que los compuestos nitrogenados y lípidos son escasos. Además, poseen importancia algunos componentes secundarios por su valor nutritivo (vitaminas y minerales).

A continuación se detallan los más importantes:

- Agua: es el componente principal de los zumos de frutas (alrededor del 90% del peso total). El resto está representado por el contenido total de sólidos solubles.
- Hidratos de carbono: constituyen el grupo de principios inmediatos que siguen cuantitativamente en importancia al agua, representando entre el 75-85% del total de sólidos solubles. Los azúcares más comunes son la fructosa, glucosa y sacarosa. Además de los azúcares mayoritarios ya mencionados, en los zumos de fruta se encuentra una gran variedad de otros azúcares y alcoholes de azúcar (maltosa, xilosa y sorbitol).  
En las frutas se encuentran, además, hidratos de carbono no aprovechables, que constituyen la denominada fibra alimentaria, fundamentalmente en forma de fibra soluble (pectinas). En los zumos, la cantidad de fibra depende de si el zumo incluye parte de la pulpa de la fruta de partida o de si ha sido filtrado y clarificado.
- Ácidos orgánicos: constituyen (después de los azúcares) el segundo componente más abundante entre los sólidos solubles en los zumos de fruta. Típicamente representan alrededor del 1% del peso total de un zumo de fruta. Los ácidos más predominantes son los ácidos cítrico, málico o tartárico, en función de la fruta empleada. También están presentes pequeñas cantidades de otros ácidos, como son el oxálico, ascórbico,

isocítrico, citramálico, galacturónico, siquímico, láctico, quínico, succínico, fumárico y malónico.

- **Proteínas:** las frutas no contribuyen de manera importante al aporte proteico de la dieta y sus proteínas son de carácter principalmente funcional, al ser en su mayoría enzimas. Conviene subrayar la importancia de las enzimas pectolíticas que se encuentran en algunos zumos.
- **Aminoácidos libres:** aunque la cantidad de aminoácidos libres en el zumo de naranja es relativamente alta, en otros zumos, como el de manzana, el nivel puede ser muy inferior, siendo los mayoritarios entre estos la glicina y la alanina.
- **Lípidos:** su contenido no es significativo en los zumos de frutas, encontrándose apenas trazas, por lo que su contribución al valor calórico es realmente insignificante.
- **Vitaminas:** en las frutas son micronutrientes de gran interés, entre las que se destacan los valores de vitamina C (ácido ascórbico y dehidroascórbico). Otras vitaminas hidrosolubles que están presentes en los zumos de frutas, aunque en menores cantidades, son las B1, B2, B3, B6 (niacina) y la vitamina B9 (ácido fólico). Dentro de las vitaminas liposolubles (A, D y E) destaca la presencia en algunos zumos de provitamina A (b-caroteno).
- **Minerales:** el más destacado es el potasio (sobre todo en el zumo de tomate), que puede llegar a constituir aproximadamente el 50% del contenido mineral; existe poco sodio, y pueden ser fuentes importantes de elementos minoritarios tales como Fe, Cu, Zn y Mn.
- **Compuestos fenólicos:** el grupo más abundante en las frutas y sus zumos son los flavonoides.

Según el Real Decreto 781/2013, en la preparación de zumos de frutas, purés de frutas y néctares de frutas, se podrán emplear todas las frutas, incluyendo al tomate, como materias primas.

Actualmente el ámbito de la legislación de zumos está restringido a los zumos de frutas únicamente (incluido el tomate), excluyéndose cualquier producto derivado de otros vegetales (hortalizas). A los productos análogos obtenidos a partir de otros vegetales y hortalizas se les aplica de momento la legislación horizontal para los alimentos en general, y las escasas normas relativas a su caracterización que se contienen en las normas internas de la industria europea (AIJN). En la legislación española se aplican a los “zumos” de otros vegetales y hortalizas, en la medida que no hayan sido derogadas o modificadas por la legislación posterior, las normas contenidas en la legislación anterior a nuestra entrada en la Unión Europea (Real Decreto 667/1983).

## 2.1 INGREDIENTES AUTORIZADOS

Los ingredientes autorizados recogidos en el Real Decreto 781/2013 incluyen:

- vitaminas y minerales
- aditivos alimentarios
- aromas, pulpas y células restituidos (zumos de frutas)
- sales de ácidos tartáricos restituidas (zumos de uva)

- aromas, pulpas y células restituidos, azúcares y/o miel, y/o edulcorantes (néctares de fruta)
- azúcares y/o miel a determinados productos especiales
- zumo de limón y/o de zumo de lima y/o de zumo concentrado de limón y/o de zumo concentrado de lima, con el fin de corregir el sabor ácido
- sal, especias y hierbas aromáticas (zumo de tomate y al zumo de tomate a partir de concentrado)

## 2.2. TRATAMIENTOS Y SUSTANCIAS AUTORIZADAS

Sólo se les podrán aplicar los tratamientos siguientes y añadir las sustancias que se indican a continuación:

- Procedimientos mecánicos de extracción
- Procedimientos físicos habituales, incluida la extracción (difusión) de agua
- Sulfitación de las uvas mediante dióxido de azufre (zumos de uva)
- Preparados enzimáticos: pectinasas (para la descomposición de la pectina), proteinasas (para la descomposición de las proteínas) y amilasas (para la descomposición del almidón)
- Gelatina alimentaria
- Taninos
- Sílice coloidal
- Carbón vegetal
- Nitrógeno
- Bentonita como arcilla absorbente
- Coadyuvantes de filtración químicamente inertes y agentes de precipitación
- Coadyuvantes de adsorción químicamente inertes

## 3. CRITERIOS DE CALIDAD

El sector de los zumos es un sector agroalimentario altamente regulado que cuenta con su propia legislación. Sumado a la legislación horizontal relevante para todo el sector agroalimentario en las distintas materias como seguridad alimentaria, etiquetado o medio ambiente, el sector cuenta con su propia legislación sectorial.

La legislación de los zumos y néctares se manifiesta en tres niveles o ámbitos distintos: a nivel europeo (Directiva comunitaria de zumos), a nivel nacional y a nivel internacional (Norma para zumos del Codex Alimentarius).

Directiva comunitaria de zumos y productos similares

La Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares, regula la elaboración y etiquetado de los zumos. Asimismo, establece criterios mínimos de calidad para los zumos procedentes de concentraos referentes a los grados Brix y establece también la cantidad mínima de zumos de frutas de los néctares.

Desde su publicación, esta Directiva se ha ido actualizando con varias modificaciones. La última más relevante fue la modificación a través de la Directiva 2012/12/EU del Parlamento

Europeo y del Consejo de 19 de abril de 2012, que introdujo entre otras cosas, la prohibición de la adición de azúcares en los zumos. Esta Directiva fue transpuesta en España con el Real Decreto 781/2013, de 11 de octubre, por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

#### Real Decreto 1518/2007

El R.D 1518/2007 de 16 de noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables. En España, los parámetros químicos de calidad de los zumos más comunes en nuestro mercado o que son objeto de comercio exterior (naranja, albaricoque, mandarina, manzana, melocotón, pera y piña) están reconocidos legalmente, a diferencia del resto de países europeos donde solamente constituyen un Código o Guía de Buenas Prácticas de obligado cumplimiento. Los parámetros de calidad para el zumo de uva ya se regularon anteriormente por el R.D 1044/1987, de 31 de julio, inmediatamente después de nuestro ingreso en la UE.

A modo de ejemplo se indican a continuación los parámetros físico-químicos de autenticidad y calidad recogidos para el caso de la naranja, para los cuales se encuentran establecidos unos valores o límites: densidad relativa, grado brix correspondiente, acidez valorable a pH 8,1, ácido cítrico, ácido D-isocítrico, ácido cítrico/ácido D-isocítrico, ácido L-ascórbico, glucosa, fructosa, glucosa/fructosa, maltosa, isomaltosa, índice de formol y parámetros isotópicos:  $\delta^{18}\text{O}$  agua, (D/H)l etanol,  $\delta^{13}\text{C}$  azúcar,  $\delta^{13}\text{C}$  etanol,  $\delta^{13}\text{C}$  pulpa y  $\delta^{13}\text{C}$  ácidos.

Según la normativa española vigente, en relación a los criterios de autenticidad y calidad de los productos regulados, los parámetros grado brix, maltosa e isomaltosa, deben considerarse como parámetros absolutos de autenticidad y calidad para los que no deben admitirse tolerancias. El resto de los parámetros se refieren a criterios relevantes de autenticidad y calidad, que deberían cumplir como mínimo cualquiera de los productos que se regulan en dicha reglamentación, y que se valorarán en su conjunto teniendo en cuenta las observaciones recogidas en el anexo I del Real Decreto y toda la información relevante disponible respecto al producto y a su trazabilidad. El cumplimiento de estos parámetros mínimos, no implica que no tengan que ajustarse también a otros que afecten a su autenticidad y calidad, y especialmente los recogidos en la Norma del Codex Alimentarius y en el Código de Prácticas para evaluación de zumos de frutas y vegetales de la Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea (AIJN).

#### Norma Codex 247

El Codex Alimentarius tiene por objeto desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados (códigos de prácticas) bajo el Programa Conjunto FAO/OMS de Normas Alimentarias. No son de obligado cumplimiento, pero la normativa Comunitaria tiene muy en cuenta los principios establecidos en este código a la hora de desarrollar la normativa aplicable, puesto que el objetivo de la norma internacional del Codex es armonizar las legislaciones alimentarias entre todos los países y facilitar el comercio internacional de alimentos.

En este sentido, la Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005), que sustituyó, con carácter general, a las normas específicas vigentes hasta entonces para los diversos zumos de frutas y hortalizas existentes, es la norma general del Codex para zumos y néctares, y sirve de referente para los desarrollos legislativos que se producen en los distintos países.

#### **4. OTRAS BEBIDAS ANALCOHÓLICAS**

##### **4.1. BEBIDAS REFRESCANTES**

A parte de la legislación horizontal relevante para todo el sector agroalimentario, el sector cuenta con su propia normativa que regula las bebidas refrescantes en España: el Real Decreto 650/2011, de 9 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria en materia de bebidas refrescantes (BOE de 19 de mayo de 2011).

Se definen las bebidas refrescantes como las bebidas analcohólicas, carbonatadas o no, preparadas con agua de consumo humano, aguas preparadas, agua mineral natural o de manantial (en lo sucesivo agua), que contengan uno o más de los siguientes ingredientes: anhídrido carbónico, azúcares, zumos, purés, disgregados de frutas y/o vegetales, extractos vegetales, vitaminas y minerales, aromas, aditivos autorizados u otros ingredientes alimenticios.

Denominaciones:

- «Agua de seltz»: bebida constituida, por agua y un mínimo de seis gramos por litro de anhídrido carbónico.
- «Agua de soda»: bebida constituida, por agua y un mínimo de seis gramos por litro de anhídrido carbónico que se caracteriza por contener bicarbonato sódico.
- «Agua aromatizada»: agua, con o sin anhídrido carbónico, que contiene aromas.
- «Gaseosa»: la bebida incolora preparada con agua, anhídrido carbónico, aromas, azúcares y/o edulcorantes y aditivos autorizados.
- «Otras bebidas refrescantes»: la denominación genérica de bebida refrescante se podrá concretar con una denominación que se corresponda con su composición o características. Entre otras, con carácter enunciativo y no limitativo se encuentran:
  - Las bebidas refrescantes de zumos de frutas, que se caracterizan por contener zumos, purés, disgregados de frutas o sus mezclas.
  - Las bebidas refrescantes de extractos, que se caracterizan por contener extractos de frutas, de otros vegetales o de ambos.
  - Las bebidas refrescantes mixtas, que están constituidas por bebidas refrescantes y otros alimentos.
  - Las bebidas refrescantes para diluir y los productos sólidos para la preparación de bebidas refrescantes, que serán aquellas que una vez reconstituidas cumplan lo establecido en esta disposición.

- Las bebidas refrescantes aromatizadas, que se caracterizan por contener agentes aromáticos con adición de otros ingredientes alimenticios.

Los productos terminados estarán caracterizados por no contener alcohol en cantidad superior al 0.5 por cien en volumen.

Las bebidas refrescantes podrán contener cualquiera de los ingredientes siguientes, los cuales deberán cumplir con su correspondiente normativa:

- Agua de consumo humano, agua preparada, agua mineral natural o de manantial
- Anhídrido carbónico
- Azúcares, los definidos en la normativa en vigor sobre determinados azúcares destinados a la alimentación humana y aquellos obtenidos de la fruta
- Zumos, purés, disgregados de frutas o de vegetales o sus mezclas
- Jarabe compuesto o preparado básico
- Extractos de frutas, de vegetales o de ambos
- Cafeína y quinina
- Aditivos y aromas autorizados de conformidad con las normativa vigente
- Vitaminas y minerales
- Otros ingredientes utilizados en alimentación humana o autorizados de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 258/97
- Coadyuvantes tecnológicos

#### 4.2. HORCHATA

Es el producto nutritivo de aspecto lechoso, obtenido mecánicamente a partir de los tubérculos *Cyperus sculentus*, sanos, maduros, seleccionados y limpios, rehidratados, molturados y extraídos con agua potable, con o sin adición de azúcar, azúcares o sus mezclas, con color, aroma y sabor típicos del tubérculo del que proceden, con un contenido mínimo de almidón, grasa y azúcares, según se especifica para cada tipo de horchata de chufa que se enumera a continuación (Real Decreto 1338/1988, de 28 de Octubre):

- Horchata de chufa natural
- Horchata de chufa natural pasteurizada
- Horchata de chufa pasteurizada
- Horchata de chufa esterilizada
- Horchata UHT
- Horchata de chufa concentrada
- Horchata de chufa condensada pasteurizada
- Horchata de chufa condensada congelada
- Horchata de chufa en polvo

En la preparación de las horchatas de chufa se autoriza el empleo de: chufa, agua potable y azúcares. En todo caso, estos ingredientes cumplirán los requisitos que les exigen sus reglamentaciones específicas, si las hubiera, o en su defecto el Código Alimentario español.

En las horchatas naturales no podrá emplearse ningún tipo de aditivo.

Únicamente podrán utilizarse como agentes aromáticos la canela y/o corteza de limón y sus esencias o extractos, de acuerdo con el Real Decreto 1771/1976.

## **5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

En el caso de los zumos, los métodos recogidos en el R.D. 1518/2007 y los establecidos en la Orden de 29 de enero de 1988 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de zumos de frutas y otros vegetales y sus derivados, se utilizarán como métodos oficiales de análisis. También podrán utilizarse de forma complementaria o alternativa los métodos aprobados por organismos nacionales (UNE) o internacionales como el Codex Alimentarius o cualquier otro método debidamente validado.

A continuación se recogen los parámetros analíticos objeto del control oficial, así como los métodos de análisis:

- Grado Brix: EN 12143 (1996). IFU n.º 8
- Acidez total: EN 12147 (1996). IFU n.º 3
- Fructosa: EN 1140 (1994). IFU n.º 55. EN 12630 (1999). IFU n.º 67
- Glucosa: EN 1140 (1994). IFU n.º 55. EN 12630 (1999). IFU n.º 67
- Sacarosa: EN 12146 (1994). IFU n.º 56. EN 12630 (1999). IFU n.º 67
- Ácido cítrico: EN 1137 (1994). IFU n.º 22.
- Ácido D-isocítrico: EN 1139 (1994). IFU n.º 54
- Densidad relativa 20/20º: EN 1131 (1994). IFU n.º 1. IFU n.º 1A
- Índice de formol: EN 1133 (1994). IFU n.º 30
- Cenizas: EN 1135 (1994). IFU n.º 9
- Fósforo: EN 1136 (1994). IFU n.º 50
- Potasio: EN 1134 (1994). IFU n.º 33
- Sorbitol: EN 12630 (1998) IFU n.º 67. IFU n.º 62
- Ácido D-málico: EN 12138 (1997). IFU n.º 64
- Ácido L-málico: EN 1138. IFU n.º 21
- Ácido ascórbico: EN 14130. IFU n.º 17-A
- Parámetros isotópicos:
  - $\delta^{18}\text{O}$  agua: EN V 12141 (1997),
  - (D/H)I Etanol 2H-NMR: AOAC 995.17 (1999),
  - $\delta^{13}\text{C}$  azúcar: EN V 12140 (1997),
  - $\delta^{13}\text{C}$  etanol: J. AOAC Vol 79, n.º 1 (1996),
  - $\delta^{13}\text{C}$  pulpa: EN V 13070 (2001),
  - $\delta^{13}\text{C}$  ácidos: Anal. Chim. Acta 299 (1994)

## 6. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES

Los problemas de autenticidad más importantes que se pueden encontrar en la actualidad, en lo que respecta a los zumos de frutas, se enumeran a continuación: adición de agua, adición de azúcar, sustitución parcial de zumo directo por zumo procedente de concentrado, adición no declarada de productos procedentes de frutas de menor coste, adición no declarada de vitamina C, adición no declarada de otros ácidos orgánicos (ejm. cítrico, málico), adición de aromas (naturales o sintéticos) y declaración errónea del origen o de la variedad de la fruta empleada, entre otros.

La evaluación de la autenticidad de los zumos de frutas es compleja y no sigue la misma estrategia para todos los tipos de frutas y productos. Puesto que un número considerable de métodos analíticos y parámetros asociados conforman los métodos oficiales de análisis de zumos de frutas, no sería realista suponer que todos los controles analíticos posibles pueden aplicarse a cada muestra individual para cubrir todos los aspectos del fraude alimentario. Una evaluación típica de la autenticidad de una muestra de zumo de frutas, sin información previa sobre un posible fraude, podría abordarse teniendo en cuenta: en un primer lugar, una visión general de perfil analítico y, en un segundo lugar, una visión más específica a través de análisis dirigidos. Lo ideal sería realizar una evaluación de la vulnerabilidad del producto seleccionado para orientar mejor el enfoque analítico.

La estrategia analítica para la evaluación de la autenticidad de los zumos de frutas puede clasificarse en los siguientes grupos de análisis:

- Análisis de isótopos estables
- Huellas dactilares metabólicas, por ejemplo, cribado de zumos por 1H-NMR
- Parámetros obtenidos mediante técnicas cromatográficas, pruebas enzimáticas, absorción atómica, espectrometría de plasma acoplado inductivamente (ICP), métodos clásicos de química húmeda (métodos convencionales)
- Detección de marcadoras de adulterantes específicos
- Huellas dactilares cromatográficas
- Análisis biomoleculares

A continuación se indica en el siguiente cuadro una selección de parámetros convencionales y su aplicabilidad (se indican los objetivos analíticos frecuentes):

| Contenido en fruta   | Adición de azúcar   | Adición de ácidos orgánicos   | Fruta exógena  | Adición de agua  | Tecnología (cítricos)                                  |
|--|---|---|--|--|--|
| Índice formol<br>Ácido L-málico<br>K, Mg, Ca, P<br>Ácido D-isocítrico<br>Prolina<br>Sorbitol | Maltosa/isomaltosa<br>Glucosa<br>Fructosa<br>Glucosa/fructosa<br>Sacarosa<br>Azúcares totales<br>Sacarosa vs azúcares totales<br>Sorbitol | Acidez total<br>Ácido L-málico<br>Ácido D-málico<br>Ácido D-isocítrico<br>Ácido cítrico<br>Cítrico/isocítrico<br>P<br>Ácido ascórbico | Prolina<br>Ácido cítrico<br>Glucosa/fructosa<br>Sacarosa<br>Perfil carotenoides<br>Carotenoides totales<br>$\beta$ -caroteno<br>Sorbitol | Grado<br>Brix/densidad<br>Cl<br>Sulfato<br>Nitrato<br>Na | Ca<br>Peptinas solubles en agua<br>Pulpa centrifugable |

El siguiente cuadro ofrece un resumen de los métodos analíticos empleados en la actualidad y las cuestiones de autenticidad que abordan.

| <b>Técnica analítica</b>   | <b>Datos indicativos/Analito/Parámetro</b>   | <b>Información relacionada con la autenticidad</b>   |
|--|--|--|
| Análisis de isótopos estables  | Relaciones isotópicas de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, estroncio   | Diversas cuestiones de autenticidad (ejm. Adición de: agua exógena, azúcar exógeno, ácidos orgánicos exógenos; origen geográfico, tratamiento del suelo,.....) |
| Huella digital metabolómica utilizando <sup>1</sup> H-NMR (perfiles) | Perfil global a partir del espectro de <sup>1</sup> H-NMR + selección de parámetros de composición   | Tipo de fruta, origen geográfico, adición de otras frutas  |
| Métodos convencionales   | Principales parámetros de composición  | Los parámetros de composición están fuera de las especificaciones establecidas o los límites AIJN  |
| Cromatografía (HPLC/UV, HPLC/IC, HPLC/UV(DAD) o MS)                  | Marcadores específicos (ejm: arbutina, phloridzin, sorbitol, iso-pimpinellina, bergapteno, 7-metoxicumarina, eriocitrina naringina, hesperidina y ácido tartárico) | Tipos de fruta no declarada  |
| Técnicas cromatográficas (GC, HPLC) como métodos de huella dactilar  | Marcadores de huellas dactilares   | Adición de azúcar, ácidos, frutas extrañas   |
| Biomoleculares   | Análisis de ADN  | Tipo de fruta no declarada (diferenciación entre mandarina o naranja y entre diferentes tipos de mango)  |

Para el futuro cabe esperar que la técnica de perfiles por RMN u otras técnicas metabolómicas mejoren sustancialmente los análisis de los zumos de frutas. Sin embargo, seguirá siendo necesario confirmar la observación analítica mediante métodos específicos. Es probable que las técnicas isotópicas satisfagan una parte importante de esta necesidad.

En relación a otras bebidas analcohólicas cabe destacar, entre otras, las siguientes determinaciones que actualmente se llevan a cabo en laboratorios de análisis de alimentos para el control de calidad de estos productos y/o detección de adulteraciones:

- sucralosa y ciclamato (<sup>1</sup>H-RMN)
- anetol (HPLC)
- sulfatos (cromatografía iónica)
- ácido glicirrónico (HPLC)
- ácido cítrico (UV-Vis)
- glucosa/fructosa/sacarosa (UV-Vis)
- sorbitol (UV-vis)
- ácido D-isocítrico (UV-Vis)
- ácido sórbico, ácido benzoico y parabenos (HPLC-DAD)
- azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, maltosa, maltotriosa (HPLC-refractometría/cromatografía iónica)
- masa volúmica a 20°C, densidad (densímetro electrónico)
- residuo seco soluble (grado Brix- refractometría)
- cenizas (incineración-pesada)
- residuo seco total (deseccación)
- volumen neto (gravimetría)
- acidez e índice de formol (valoración potenciométrica)
- dióxido de azufre total (espectrometría UV-Vis/ método Monier-Williams)
- P (espectrofotometría UV-Vis)
- Na, K, Ca, Mg (espectrometría de absorción atómica)
- prolina (espectrometría)
- teobromina (HPLC-UV)
- acesulfamo K
- aspartamo, sacarina (HPLC)
- quinina (HPLC)
- glicósidos de estevios (HPLC/DAD)
- hidroximetilfurfural (HPLC-UV)
- cafeína (HPLC-UV)
- estragol, metileugenol, safrol, pulegona (GC-MS)
- compuestos aromáticos (GC-MS)
- distribución enantiomérica de las formas S y R de las moléculas quirales (GC-MS)

## **BIBLIOGRAFÍA**

Asociación Española de Fabricantes de Zumos. (2011) El libro del zumo, Asozumos, Editorial Agrícola Española, S.A.

Codex Alimentarius. Normas internacionales de los alimentos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Organización Mundial de la Salud.

Directiva 2001/112/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2001, relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

Directiva 2012/12/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de abril de 2012, por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

Foodintegrity Project <https://foodintegrity.fera.co.uk/>

La Asociación Nacional de Fabricantes de Zumos y Gazpachos (antiguo Asozumos) <https://www.zumosygazpachos.com/es/>

Real Decreto 1338/1988, de 28 de octubre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración y Venta de Horchata de Chufa.

Real Decreto 1518/2007, de 16 de noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables.

Real Decreto 650/2011, de 9 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria en materia de bebidas refrescantes.

Real Decreto 781/2013, de 11 de octubre, por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 35**

**CONSERVAS VEGETALES Y DE PESCADO. NORMAS TÉCNICAS GENERALES. NORMAS  
ESPECÍFICAS. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

1. INTRODUCCIÓN.
2. CONSERVAS VEGETALES  
NORMAS TÉCNICAS GENERALES.  
NORMAS ESPECÍFICAS.  
CALIDAD DIFERENCIADA: DOP E IGP  
DETERMINACIONES ANALÍTICAS.
3. CONSERVAS DE PESCADO  
NORMAS TÉCNICAS GENERALES.  
NORMAS ESPECÍFICAS.  
CALIDAD DIFERENCIADA: DOP E IGP  
DETERMINACIONES ANALÍTICAS.
4. BIBLIOGRAFÍA

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. INTRODUCCIÓN.**

El Código Alimentario Español, aprobado por Decreto el 21 de septiembre de 1967, es el cuerpo orgánico de normas básicas y sistematizadas relativas a los alimentos, condimentos, estimulantes y bebidas, sus materias primas y otros factores, que tiene como finalidad definir qué se entiende por alimento, determinar sus condiciones mínimas y establecer las condiciones básicas de los procedimientos de preparación, conservación, envasado, distribución, transporte, publicidad y consumo (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967).

En la Sección primera de su Capítulo XXVI se recoge lo relativo a conservas animales y vegetales, definiendo qué es **conserva y semi-conserva**, estableciendo una clasificación en base al tipo de alimento y enumerando qué operaciones serán preceptivas en su preparación, incluyéndose lavado de materias primas, escaldado, tratamiento con anhídrido sulfuroso gaseoso o en disolución, pelado de las frutas, vacío parcial en el espacio de cabeza de los envases, o la esterilización de los envases cerrados.

Asimismo, se establecen las sustancias complementarias que pueden emplearse (agua potable, edulcorantes, zumos, vinos y alcoholes, grasas, especias, aditivos...) y las características que debe tener el producto final

Según lo indicado en él, el término *conserva* hace referencia a aquellos productos obtenidos a partir de alimentos perecederos de origen animal o vegetal, con o sin adición de otras sustancias autorizadas, contenidos en envases apropiados, herméticamente cerrados, tratados exclusivamente por calor de forma que se asegure su conservación

Las *semi-conservas* son productos establecidos para un tiempo limitado, por un tratamiento apropiado y mantenidos en recipientes impermeables al agua a presión normal. Su duración puede prolongarse almacenándolos en frigoríficos .

En el siguiente tema se tratará qué normativa aplica a las conservas vegetales y de pescado y los parámetros analíticos que se analizan en ellas.

## **2. CONSERVAS VEGETALES**

Frutas y hortalizas son alimentos perecederos, por lo que a lo largo de su historia el ser humano ha desarrollado diversos métodos para conservarlas, evitar su deterioro y poder consumirlas con posterioridad a su estación de producción. En la actualidad, la tecnología de conservación de alimentos es cada vez más eficaz, y ofrece alimentos seguros, nutritivos, y de mayor duración.

El sector de las conservas vegetales constituye un grupo de especial relevancia dentro de la industria alimentaria española, gracias a la capacidad de producción hortofrutícola

de nuestro país, su amplia distribución territorial y al importante comercio exterior de este tipo de productos.

#### **NORMAS TÉCNICAS GENERALES.**

#### **Real Decreto 2420/1978 por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de conservas vegetales.**

El **Real Decreto 2420/1978**, que aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria (RTS) para la elaboración y venta de conservas vegetales, tiene por objeto definir a efectos legales qué es **conserva y semi-conserva vegetal** y fijar, con carácter obligatorio, las normas de elaboración y comercialización de conservas de productos de origen vegetal.

Se define **Conserva Vegetal** como aquel alimento elaborado a base de productos de origen vegetal, con o sin adición de otras sustancias alimenticias y alimentarias permitidas, sometido a tratamientos autorizados que garanticen su conservación y contenido en un envase apropiado. Los tratamientos técnicos autorizados incluyen el tratamiento térmico, la congelación, la deshidratación o el encurtido.

Las materias primas utilizadas para la elaboración de semiconservas y conservas vegetales serán fundamentalmente:

- Los productos de origen vegetal: frutas, cereales, hortalizas, legumbres, tubérculos y hongos comestibles, así como sus derivados.
- Agua, grasas y aceites comestibles, vino, aguardientes y licores, vinagres, zumos, azúcares, sal y otros condimentos y especias recogidas en el Código Alimentario Español.
- Según el tipo de semiconserva y conserva, podrán utilizarse solamente los aditivos autorizados.

#### **Orden 21 de noviembre de 1984 Normas de Calidad para Conservas Vegetales**

La Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de conservas vegetales indica que podrán ser objeto de normas específicas aquellos productos contenidos en los grupos genéricos en ella establecidos. Estas normas son aprobadas en 1984 a través de la Orden de 21 de noviembre de Normas de Calidad para Conservas Vegetales. Cada una de ellas se establece en los distintos anexos del documento y aplica a diferentes productos. El primer anexo hace referencia a una norma técnica general y los siguientes a diferentes productos como albaricoque, melocotón, peras, cerezas, mandarinas, frutos rojos, ensaladas de frutas, alcachofas, espárragos...

En la norma técnica general se detallan:

- **Factores generales de calidad:** defectos tolerables y excluyentes, caracteres organolépticos, defectos superficiales, textura, integridad, homogeneidad o turbidez.

- **Características técnicas** como pH, sólidos solubles, espacio libre de cabeza en bote, contenidos netos y tolerancias
- **Características comerciales**, estableciéndose las características “Extra”, “Primera” y “Segunda” dependiendo del grado de selección y esmero en el proceso de elaboración y estableciéndose una tolerancia en defectos de entre el 5 y el 15%

En cada anejo relativo a un producto se detalla el **objeto** de esa norma, las **definiciones** y **denominaciones comerciales** que aplican, las **condiciones** y **factores específicos**, las **leyendas** específicas, las **categorías comerciales** y un cuadro de **exigencias y tolerancias** de calidad para esa conserva.

#### **NORMAS ESPECÍFICAS.**

Además de la reglamentación general expuesta hasta el momento, existe normativa específica para ciertos productos:

#### **Real Decreto 863/2003, de 4 de julio, por el que se aprueba la Norma de Calidad para la elaboración comercialización y venta de confituras, jaleas, “marmalades” de frutas y crema de castañas.**

Este Real Decreto transpone al ordenamiento español la Directiva 2001/113 relativa a estos productos. Sin embargo queda en vigor parte del Real Decreto 670/1990 en lo relativo a la mermelada extra y a la mermelada. Su objeto es definir y fijar las condiciones y características que deben cumplir las confituras, jaleas y “marmalades” de frutas y crema de castañas para su presentación, comercialización y consumo.

#### **Real Decreto 670/1990 por el que se aprueba la norma de calidad para confituras, jaleas y marmalade de frutas, crema de castañas y mermelada de frutas.**

Esta norma está derogada casi en su totalidad desde la entrada en vigor del Real Decreto 863/2003, pero sigue estando vigente lo señalado en los apartados 2.7, «Mermelada extra», y 2.8, «Mermelada» y las referencias relativas a dichos producto que aparecen en el anejo, como son las definiciones de las materias primas, los tratamientos autorizados de las mismas y las sustancias que se pueden añadir.

#### **Real Decreto 679/2016, por el que se establece la Norma de Calidad de las aceitunas de mesa.**

Las aceitunas de mesa disponen de su propia legislación al constituir, junto con el aceite de oliva, un sector con relevancia especial para España. La norma de calidad es de aplicación a todas las aceitunas de mesa elaboradas y comercializadas en España. En la norma se definen los conceptos aplicables a este producto y se establece una tipología en base al color: verde, cambiante, negra natural y negra (oscurecidas mediante oxidación). Asimismo se enumeran los procesos básicos de elaboración, las formas de presentación, los ingredientes que pueden emplearse, las características del producto

terminado, los defectos que pueden presentarse y las categorías comerciales: Extra, Primera (equivale a "I" o Selecta) y Segunda (equivale a "II" o estándar), así como la información suministrada al consumidor.

#### **CALIDAD DIFERENCIADA: DOP E IGP**

El Reglamento 1151/2012 sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios regula las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP). En el sector de las conservas y semiconservas vegetales, España cuenta con numerosos productos que gozan de estas figuras de protección, como la DOP Pimiento del Piquillo de Lodosa, la DOP Aceituna Aloreña de Málaga, la IGP Espárrago de Navarra o la IGP Berenjena de Almagro entre otras. Puede consultarse esta información en la web <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/>

#### **DETERMINACIONES ANALÍTICAS.**

Las características técnicas de una conserva vegetal son:

1. **PH.** Se medirá mediante potenciómetro sobre el producto homogeneizado, referido a 20°C. En las conservas vegetales, en que la esterilización térmica no se realice en autoclave el pH no deberá ser superior a 4,6.
2. **Sólidos solubles.** Se medirá mediante lectura refractométrica, referida a 20°C, del producto homogeneizado o del líquido de gobierno. Se expresará en grados Brix.
3. **Espacio libre de cabeza de bote:** la altura del espacio libre o cabeza del bote en las conservas no debe ser superior al 10% de la altura interior del envase. Para envases de capacidad superior a 1.700 ml., la altura no superará el 7% de la misma.
4. **Contenido neto.** Es la cantidad del producto que existe en el interior del envase. Puede medirse en masa o en volumen. **La cantidad nominal:** Es la masa o volumen del producto que se consigna en el etiquetado y **el contenido efectivo** es la cantidad (masa o volumen) de producto que contiene realmente el envase. Cuando se exprese en unidades de volumen, se entenderá referido a la temperatura de 20°C. Todas ellas se determinan por gravimetría
5. **Peso escurrido efectivo:** es la masa del producto que permanece sobre un tamiz, ligeramente inclinado, de malla de 5 mm y alambre de 1 mm al cabo de 2 minutos. Su determinación se realiza por gravimetría. El contenido neto y el peso escurrido deberán ser los máximos que permita el proceso de elaboración.
6. **Tolerancias.** El error máximo por defecto tolerado en el contenido de un envase está fijado en la normativa.

La RTS de 1978 define los **defectos tolerables y excluyentes**, siendo **tolerable** todo aquél que no afecte gravemente al aspecto o comestibilidad del producto. Pueden admitirse en las proporciones que fijen los límites y tolerancias que se establezcan en las normas

específicas. Su determinación se hará en tanto por ciento en unidades de masa que contengan el defecto en relación al peso escurrido o al contenido neto (en caso de no existir líquido de gobierno). Se considera defecto **excluyente** aquél que afecta gravemente al producto, haciéndolo impropio para el consumo y para estos defectos no habrá tolerancia.

La Orden de 21 de noviembre de 1984 por la que se aprueban las **normas de calidad para las conservas vegetales** establece tanto la clasificación de los caracteres organolépticos, como los posibles defectos en cada tipo de producto.

El **Real Decreto 863/2003**, de 4 de julio, por el que se aprueba la norma de calidad para la elaboración, comercialización y venta de confituras, jaleas, "marmalades" de frutas y crema de castañas establece que los productos recogidos en esta normativa deben tener un contenido de materia seca soluble (expresado en grados brix), determinada por refractómetro, igual o superior al 60%, excepto para los productos en los que los azúcares hayan sido sustituidos total o parcialmente por sustancias edulcorantes (Boletín Oficial del Estado (BOE), 2003).

El etiquetado deberá incluir la indicación del contenido total de azúcares mediante los términos «contenido total de azúcares ... gramos por 100 gramos», en el que la cifra indicada representa el **valor refractométrico** del producto acabado, determinado a 20 °C, con una tolerancia de más o menos 3 grados refractométricos.

La determinación del **peso neto escurrido** de las aceitunas se realizará según se establece en el anexo II del RD 679/2016 (norma de calidad de las aceitunas de mesa). Se realiza por gravimetría y supone dos pasos:

1. **Escurreido previo:** La determinación del peso escurrido en las elaboraciones de aceitunas se llevará a cabo por vaciado y distribución uniforme del contenido de un envase sobre un cedazo circular UNE de 2,5 mm de luz de malla cuadrada. Se usará un cedazo de 20 cm de diámetro para envases de 1,5 kg de peso neto o menor y de 30 cm si el contenido es mayor de 1,5 kg de peso neto. El cedazo se inclinará un ángulo comprendido entre 17 y 20 grados para facilitar el drenaje, sin sacudirlo o vibrarlo. Se dejará drenar durante dos minutos.
2. **Peso neto escurrido:** El peso neto escurrido se calculará efectuando la operación consistente en restar, al peso del cedazo más aceitunas, el peso del cedazo seco.

### **3. CONSERVAS DE PESCADO**

Cuando se habla genéricamente de “**pescados**”, se incluyen las subcategorías pescados frescos, congelados, mariscos/moluscos/crustáceos y conservas de pescado y moluscos. En 2020 se produjo un aumento del 10.5% respecto a 2019 en el consumo de productos de la pesca. La media española en cuanto al consumo per cápita **de conservas de pescado** es de 4,85 kilos, incrementándose la compra de conservas de pescados y moluscos, así como la facturación en España durante el año 2020, debido en parte al aumento del precio medio (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021).

España es, además, el primer productor de conservas de pescado y marisco de la UE y el segundo a nivel mundial con una producción estimada en 2020 de 359.081 toneladas valoradas en 1.745 millones de € (Canthynnus, 2021).

#### **NORMAS TÉCNICAS GENERALES.**

En el Capítulo XII del Código Alimentario Español, **sobre Pescados y derivados**, se detalla qué se considera “pescado”, así como la denominación específica de las especies más importantes objeto de consumo o comercio exterior. A efectos del Código se comprende en la denominación genérica de «pescados» a los animales vertebrados comestibles, marinos o de agua dulce (peces, mamíferos, cetáceos y anfibios) frescos o conservados por distintos procedimientos autorizados. Las reglamentaciones correspondientes establecerán las características sanitarias, de calidad y dimensiones mínimas, que deben reunir los pescados destinados a consumo humano, en fresco o conservado.

El código establece una clasificación de estos productos, definiendo cada uno de ellos: pescados frescos, congelados, salados, ahumados y desecados.

En la Sección 2ª del mismo capítulo se recogen los **productos derivados de la pesca**, definiéndose como aquellos productos obtenidos a partir de pescados de buena calidad y comprobado estado de frescura, para cuya elaboración se han utilizado procedimientos tecnológicos que garantizan su salubridad de un modo absoluto.

Estos productos se clasifican en semiconservas, conservas, sopas de pescado y bullabesas y platos cocinados.

Las **semiconservas de pescado** son aquellos productos estabilizados por un tratamiento apropiado y mantenidos en recipientes impermeables al agua a presión normal. Su tiempo de conservación es limitado y puede prolongarse almacenándolas en frigoríficos. Los pescados semiconservados podrán presentarse enteros, troceados en filetes lisos y en filetes enrollados. Como líquidos de cobertura, se utilizarán aceites comestibles y vinagres, solos o mezclados entre sí, sustancias aromáticas, aderezos, condimentos y especias. Todos los productos utilizados en las semiconservas reunirán las condiciones exigidas las reglamentaciones correspondientes.

El Capítulo XIII hace referencia al **marisco (crustáceos y moluscos)** y derivados, entendiéndose como los animales invertebrados comestibles, marinos o continentales (crustáceos y moluscos), frescos o conservados por distintos procedimientos autorizados y que se detallan en el Código. La Sección 2ª de este capítulo engloba los **productos derivados**, definidos como los productos constituidos total o parcialmente por crustáceos y moluscos de buena calidad, de comprobado estado de frescura y elaborados por procedimientos tecnológicos que garanticen su salubridad y se clasifican en semiconservas, conservas, sopas de marisco y platos cocinados.

Los mariscos semiconservados podrán presentarse enteros o troceados, y como líquidos de cobertura se utilizarán aceites, vinagres, sus diluciones y sus mezclas a distintas proporciones, sustancias aromáticas, hortalizas, especias, etc.

**Real Decreto 1521/1984 por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de los establecimientos y productos de la pesca y acuicultura con destino al consumo humano.**

Este Real Decreto, en gran parte derogado, sigue estando vigente en lo que se refiere a las denominaciones de los productos conservados, presentando una relación de 116 especies, entre peces y moluscos, con las denominaciones normalizadas de los productos conservados. En su Anexo 7, además, se concreta la determinación del peso escurrido en conservas de pescado.

**NORMAS ESPECÍFICAS.**

**Orden de 15 de octubre de 1985, por la que se aprueba la norma de calidad para el mejillón, almeja y berberecho en conserva.**

Tiene como fin regular las condiciones generales técnicas y comerciales que deben reunir las conservas de **mejillones, almejas y berberechos**. Se entiende por mejillones, almejas y berberechos en conserva los productos obtenidos a partir de moluscos de las especies cuyo nombre científico se señala en esta norma, envasados con los medios de cobertura adecuados, en recipientes herméticos y esterilizados convenientemente por tratamiento térmico.

Se definen además las **formas de presentación**, los **medios de cobertura** permitidos para cada uno de los productos, los **factores de composición y calidad** en cuanto a la materia prima, la elaboración y las características del producto final, enumerando condiciones para su aspecto, olor y sabor y textura y color.

El **etiquetado de los envases y la rotulación de los embalajes** deberán cumplir el Real Decreto 2058/1982 por el que se aprueba la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios envasados.

Establece también la **clasificación comercial** basada en la talla en grande, mediano y pequeño para los tres moluscos. Opcionalmente podrá rotularse «gigantes» cuando cumplan las condiciones estipuladas en la norma. Las tolerancias permitidas son de 10% de piezas de un tamaño de la categoría inmediatamente inferior.

Por último, se indican también los **defectos excluyentes**, que suponen desde el incumplimiento de criterios microbiológicos, de sus características organolépticas o de criterios de calidad, hasta defectos en los envases o en el etiquetado del producto.

**Reglamento (CEE) 2136/89, de 21 de junio por el que se establecen normas comunes de comercialización para las conservas de sardinas.**

Este Reglamento define las normas a las que deberá ceñirse la comercialización de las conservas de sardinas y las denominaciones comerciales de las conservas de sardinas y de productos tipo sardina en la Unión Europea.

Se entiende por **conservas de sardinas** los productos preparados a base de peces de la especie *Sardina pilchardus*. Las **conservas de productos tipo sardina** son los productos presentados del mismo modo que las sardinas en conserva, pero preparados a partir de peces de otras especies como *Sardinella aurita* o *Sprattus sprattus*.

Únicamente podrán comercializarse los productos que hayan sido envasados con cualquier medio de cobertura apropiado, en recipientes cerrados herméticamente y que hayan sido esterilizados mediante un tratamiento adecuado.

El Reglamento establece qué **presentaciones** pueden comercializarse, qué **medios de cobertura** pueden emplearse, así como los **criterios que debe cumplir el producto tras la esterilización**.

La **denominación de venta** que figure en los envases de las conservas de sardina se determinará en función de la relación existente entre el peso de las sardinas contenido en el recipiente, previa esterilización, y el peso neto, expresado en gramos, dependiendo del medio de cobertura del que se trate. Las conservas de productos tipo sardina podrán comercializarse bajo una denominación comercial consistente en la palabra «sardinas» junto con el nombre científico de la especie y la zona geográfica donde haya sido capturada. El nombre científico deberá incluir el nombre genérico y el nombre específico en latín.

**Reglamento (CEE) 1536/92 de 9 de junio por el que se aprueban normas comunes de comercialización para las conservas de atún y bonito.**

El Reglamento 1536/92 establece las normas a que deberá ajustarse la comercialización de las conservas de atún y de bonito en la UE.

Se considera **conserva de bonito** aquellas preparadas exclusivamente con pescado de alguna de las especies incluidas en el punto II de su Anexo y que incluyen especies de los géneros *Thunnus sp.*, *Sarda sp.*, *Euthynnus sp.* y *Auxis sp.* No estará autorizada la mezcla de especies de pescado diferentes en un mismo envase, excepto en los preparados culinarios a base de carne de atún o de bonito en los que haya desaparecido la estructura muscular de la misma, que podrán contener carne de otros pescados que hayan sido sometidos al mismo tratamiento siempre que el porcentaje de atún o de bonito, o su mezcla, sea como mínimo igual al 25% del peso neto.

Se definen también las **denominaciones de venta** y los **medios de cobertura** y cómo han de ser estos designados. Así mismo se indica qué **información** debe aparecer en los envases dependiendo de la **presentación y denominación comercial** y **criterios** de la relación entre el peso de pescado contenido en el envase una vez esterilizado y el peso neto, expresados en gramos, dependiendo de las presentaciones y del medio de cobertura.

#### **CALIDAD DIFERENCIADA: DOP E IGP**

El Reglamento 1151/2012 sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios regula las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP). En los productos de la pesca, España cuenta con varios productos que gozan de estas figuras de protección:

- La DOP “Mexillón de Galicia – Mejillón de Galicia”.
- Las IGP “Mojama de Isla Cristina”, “Mojama de Barbate”, “Melva de Andalucía”, “Caballa de Andalucía”

Puede consultarse esta información en la web <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/>

#### **DETERMINACIONES ANALÍTICAS.**

- **Determinación de peso neto y escurrido por gravimetría**

La **determinación del contenido neto** consiste en pesar el envase lleno y vacío, lavarlo y secarlo, y restar ambos pesos. La cifra resultante será el contenido neto.

**Determinación del contenido escurrido:** se realiza escurriendo el pescado durante tres minutos sobre un tamiz de malla de 3 mm y determinando su masa por pesada (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1984)

- **Histamina en productos de la pesca**

El Reglamento (CE) 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece los criterios de seguridad alimentaria de histamina en

productos pesqueros. Está relacionada con una mala higiene en la manipulación de los alimentos o por una mala conservación del pescado (Generalitat de Catalunya, 2021).

La determinación de histamina puede realizarse con HPLC con detector de fluorescencia o siguiendo métodos enzimáticos.

- **Contaminantes**

El Reglamento 1881/2006 establece los límites máximos para determinados contaminantes en productos alimenticios, incluidos los productos de la pesca y de la acuicultura:

**Metales pesados:** principalmente **mercurio**, que se acumula en el músculo de los grandes predadores. El metilmercurio es el componente orgánico de mercurio más común en la cadena alimentaria. La determinación de mercurio se realiza por espectrometría de absorción atómica con analizador directo (AAS-AMA), y la determinación de metilmercurio se realiza mediante extracción selectiva y cuantificación por AAS-AMA.

Otros metales pesados como el **cadmio** y el **plomo**, podrían estar presentes también en los productos de la pesca. La determinación de otros metales pesados se realiza por ICP-MS. El **estaño inorgánico** se determina en alimentos enlatados, como son las conservas y semiconservas de productos de la pesca.

- **Control de genuinidad del producto**

Para la identificación de la especie de procedencia es necesario disponer de marcadores bioquímicos (ácidos nucleicos, proteínas,...) que permitan su discriminación frente a especies similares (AESA/Genoma España, 2005). El desarrollo de marcadores moleculares eficaces para trazabilidad y detección de fraude en productos pesqueros procesados y no procesados se pueden aplicar a derivados de pescado y pescado fresco. Los métodos de análisis incluyen ADN Barcoding, PCR-clonación, RFLP y T-RFLP (genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido mediante fragmentos de restricción), secuenciación forense informativa (FINS), y secuenciación de última generación (NGS) (Abd el Gawad, 2016).

La detección de otros posibles fraudes en este tipo de productos se realiza mediante la identificación de aceite de oliva por su perfil de ácidos grasos por GC-FID o la comprobación del etiquetado para determinar el fraude en la composición y etiquetado nutricional.

#### **4. BIBLIOGRAFÍA**

- Abd el Gawad, A. (2016). Trazabilidad en pesquerías y sostenibilidad de sus derivados alimentarios en Egipto mediante metodologías de adn. *Dialnet*.
- AESA/Genoma España. (2005). *Aplicaciones de Biotecnología en Seguridad Alimentaria*.
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (21 de Septiembre de 1967). Decreto 2484/1967 por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/1967/BOE-A-1967-16485-consolidado.pdf>
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (2 de Junio de 1978). Real Decreto 2420/1978 por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de conservas vegetales. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/1978/BOE-A-1978-25634-consolidado.pdf>
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (21 de Noviembre de 1984). Orden de 21 de noviembre de 1984 por la que se aprueban las normas de calidad para las conservas vegetales. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/1984/BOE-A-1984-26465-consolidado.pdf>
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (01 de Agosto de 1984). Real Decreto 1521/1984 por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los Establecimientos y Productos de la Pesca y Acuicultura con Destino al Consumo Humano. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/1984/BOE-A-1984-18430-consolidado.pdf>
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (15 de Octubre de 1985). Orden de 15 de octubre de 1985 por la que se aprueba la Norma de Calidad para el Mejillón, Almeja y Berberecho en conserva. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1985-21750>
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (25 de Mayo de 1990). Real Decreto 670/1990, de 25 de mayo, por el que se aprueba la norma de calidad para confituras, jaleas y marmalade de frutas, crema de castañas y mermelada de frutas. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/1990/BOE-A-1990-12154-consolidado.pdf>
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (05 de Julio de 2003). Real Decreto 863/2003, de 4 de julio, por el que se aprueba la Norma de calidad para la elaboración, comercialización y venta de confituras, jaleas, "marmalades" de frutas y crema de castañas. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/2003/BOE-A-2003-13473-consolidado.pdf>
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (17 de Diciembre de 2016). Real Decreto 679/2016, de 16 de diciembre, por el que se establece la norma de calidad de las aceitunas de

mesa. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/2016/BOE-A-2016-11953-consolidado.pdf>

Canthynnus. (30 de Junio de 2021). *Canthynnus*. Obtenido de <https://canthynnus.com/2021/06/30/el-sector-de-las-conservas-de-pescado-y-marisco-en-cifras/>

Generalitat de Catalunya. (16 de Septiembre de 2021). *GENCAT*. Obtenido de <https://acsa.gencat.cat/es/detall/article/Histamina>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2021). *Informe de consumo alimentario en España*.

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 36**

**ALIMENTOS ESTIMULANTES: CAFÉ. TE. CACAO. COMPOSICIÓN. NORMAS DE CALIDAD. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

1. ALIMENTOS ESTIMULANTES
2. CAFÉ. COMPOSICIÓN. NORMAS DE CALIDAD. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.  
DETECCIÓN DE ADULTERACIONES  
COMPOSICIÓN  
NORMAS DE CALIDAD  
DETERMINACIONES ANALÍTICAS  
DETECCIÓN DE ADULTERACIONES
3. TE. COMPOSICIÓN. NORMAS DE CALIDAD. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.  
DETECCIÓN DE ADULTERACIONES  
COMPOSICIÓN  
NORMAS DE CALIDAD  
DETERMINACIONES ANALÍTICAS  
DETECCIÓN DE ADULTERACIONES
4. CACAO. COMPOSICIÓN. NORMAS DE CALIDAD. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.  
DETECCIÓN DE ADULTERACIONES.  
COMPOSICIÓN.  
NORMAS DE CALIDAD.  
DETERMINACIONES ANALÍTICAS.  
DETECCIÓN DE ADULTERACIONES
5. BIBLIOGRAFÍA

## 1. ALIMENTOS ESTIMULANTES

Los alimentos estimulantes son productos de origen vegetal que contienen sustancias farmacológicamente activas, estimulantes del Sistema Nervioso Central, con efectos tónicos y excitantes. Vienen usándose desde la más remota antigüedad por sus propiedades para eliminar la fatiga, aumentar la alerta y combatir el sueño.

Con el nombre de xantinas, metilxantinas o bases xánticas se conocen un grupo de principios activos alcaloídicos de origen natural derivados de la purina y en el que se incluyen sustancias como la **cafeína** (1,3,7-trimetilxantina), la **teobromina** (3,7-dimetilxantina) y la **teofilina** (1,3-dimetilxantina). Estas sustancias las encontramos en las plantas del **café**, del **té** y del **chocolate** (López Briz & Giner García, 2013).

El Código Alimentario Español es el cuerpo orgánico de normas básicas y sistematizadas relativas a los alimentos, condimentos, **estimulantes** y bebidas, sus materias primas y otros factores, que tiene como finalidad definir qué se entiende por alimento, determinar sus condiciones mínimas y establecer las condiciones básicas de los procedimientos de preparación, conservación, envasado, distribución, transporte, publicidad y consumo. El Capítulo XXV está dedicado a **Alimentos estimulantes y derivados**. En él se determinan las manipulaciones permitidas en este tipo de productos, así como las prácticas prohibidas (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967).

En el siguiente tema se expondrá la normativa que aplica a estos productos, su composición y las determinaciones analíticas y fraudes asociados a cada uno de ellos.

## 2. CAFÉ. COMPOSICIÓN. NORMAS DE CALIDAD. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES

Se define **café** como las semillas sanas y limpias procedentes de diversas especies del género botánico *Coffea* (Boletín Oficial del Estado (BOE), 2012). El café tiene una gran importancia económica a nivel mundial, ya que sus semillas, tostadas, molidas y en infusión, constituyen la bebida no alcohólica más consumida actualmente. Las dos especies más importantes desde el punto de vista económico son *Coffea arabica* (café arábica) y *Coffea canephora* (café robusta), pero es *C. arabica* la que suministra la mayor cantidad y mejor calidad de semillas (Rojo Jiménez, 2014). A partir de los frutos maduros del arbusto se obtienen los granos de café verde. Durante su tostado se producen las reacciones químicas y físicas responsables de la formación de las sustancias que le aportan sus cualidades sensoriales (sabor, aroma, etc.). El tueste del café produce una reacción química denominada Reacción de Maillard, que da lugar a la aparición de melanoidinas, pigmentos responsables en parte de las propiedades organolépticas del café, como el sabor y el aroma.

## COMPOSICIÓN

Un grano de café contiene normalmente un 34% de celulosa, un 30% de azúcares, un 11% de proteínas, de un 6 a un 13% de agua, y entre un 2 y un 15% de materia grasa.

Otros componentes destacables son minerales, como el potasio, calcio, magnesio y fósforo, ácidos orgánicos (cafeilquínicos o clorogénicos), polifenoles o alcaloides, como la cafeína (1-2.5%) y la trigonelina. Aunque en el grano verde de café encontramos vitaminas como B1, B2, B5, C e incluso E, casi todas se pierden en el tostado, reduciéndose también los ácidos clorogénicos libres. Por el contrario, la niacina que no ofrece el café en crudo se obtiene a partir de la trigonelina cuando el grano se calienta durante el tueste. (Rojo Jiménez, 2014).

Los polisacáridos son el componente mayoritario del café tostado. Derivan de arabinogalactanos, galactomananos y pectinas procedentes del café verde. Los mono y disacáridos normalmente se destruyen durante la torrefacción, sin embargo a veces pueden aparecer trazas de algunos de ellos (arabinosa, manosa...). Los esteroides más importantes del café tostado son el sitosterol, estigmasterol, campesterol y cicloartenol. Diterpenos como el kahweol, el cafestol y sus esteres son destruidos durante el tueste y parecen ser el origen de monoterpenos volátiles, naftalenos y quinolinas.

Algunos ácidos alifáticos como el ácido láctico, pirúvico, glicólico, oxálico, tartárico y cítrico también se generan durante el proceso de tostado. Entre los compuestos volátiles que conforman el aroma encontramos compuestos aromáticos, como el eugenol y el guaiacol, y compuestos heterocíclicos como el maltol. (Rojo Jiménez, 2014)

## NORMAS DE CALIDAD

**Real Decreto 1676/2012, de 14 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad para el café.**

Mediante este RD se aprueba la Norma de Calidad para café y se derogan varios apartados de la Sección 1ª del Código Alimentario Español, quedando su contenido sustituido por las definiciones, denominaciones y características incluidas en la norma de calidad.

Su objeto y ámbito de aplicación comprende al café tostado y los extractos del café que figuran en el anexo de la norma. En ella se establecen las definiciones de café y del término **descafeinado**, entendido como el proceso mediante el cual se elimina la mayor parte de la cafeína al café y a los extractos de café. Asimismo se incluyen las denominaciones y características de cada tipo de café:

- **Café de tueste natural:** el obtenido al someter el café verde o crudo en grano a la acción del calor, de forma que adquiera el color, aroma y otras cualidades características.

- **Café torrefacto:** café tostado en grano, con **adición de sacarosa o jarabe de glucosa**, antes de finalizar el proceso de tueste, en una proporción máxima del **15%** (expresados en sustancia seca).
- **Café de tueste natural (porcentaje) y café torrefacto (porcentaje):** obligatoriamente figurarán los porcentajes y corresponde a las mezclas realizadas con café de tueste natural y torrefacto.
- **Café molido de tueste natural/Café molido torrefacto:** café obtenido después de los procesos industriales de molido y envasado del café tueste natural o torrefacto.
- **Café molido de tueste natural (porcentaje) y torrefacto (porcentaje):** mezcla realizada con cafés de tueste natural y torrefactos, sometidos a los procesos industriales de molido y envasado.

Todos ellos podrán incluir la denominación «descafeinado» si tras la aplicación del proceso de descafeinado contienen como máximo 0,1% de cafeína anhidra sobre materia seca.

- **Café soluble, café instantáneo, extracto de café o extracto de café soluble:** es el producto concentrado obtenido por extracción de los granos de café tostados, utilizando solamente agua como medio de extracción, con exclusión de cualquier procedimiento de hidrólisis por adición de ácido o base.
- **Café torrefacto soluble o café torrefacto instantáneo, extracto de café torrefacto en pasta y extracto de café torrefacto líquido:** producto equivalente al anterior pero obtenido a partir de café torrefacto

Estos productos podrán incluir la denominación «descafeinado» si tras la aplicación del proceso de descafeinado contienen como **máximo 0,3%** de cafeína anhidra sobre materia seca.

Dependiendo de la denominación deberá presentar unas características en cuanto a humedad, contenido mínimo de cafeína, cenizas totales, sólidos solubles del extracto acuoso o contenido en materia seca.

Las materias primas y otros ingredientes permitidos son: Café en grano, verde o crudo, con un **máximo de humedad del 13%**, sacarosa o jarabe de glucosa solamente en el café torrefacto y azúcares alimenticios en el extracto de café líquido y aditivos autorizados.

**REAL DECRETO 2323/1985, de 4 de diciembre (BOE de 14 de diciembre), por la que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, almacenamiento, transporte y comercialización de sucedáneos de café.**

Los **sucedáneos de café** son los productos de origen vegetal, tostados, destinados a efectuar preparaciones que reemplacen a la infusión de café como bebida frutiva. Pueden comercializarse en grano o molidos con textura de sémola, polvo, granulados o prensados y son **achicoria, malta de cebada tostada y cebada tostada**.

## **DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

Las determinaciones analíticas habituales en café son:

- Humedad y cenizas por gravimetría
- Cafeína por HPLC-DAD
- Sólidos solubles del extracto acuoso. El extracto acuoso del café es la infusión obtenida de una mezcla de café/agua al 10% en masa, tras la ebullición durante cinco minutos. Se determina por refractometría.
- Acrilamida: El Reglamento 2017/2158 por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos, incluye el café tostado, soluble y los sucedáneos del café. El análisis se realizará por LC/MS-MS.
- Contaminantes: es de aplicación el reglamento 1881/2006 donde se establecen límites máximos para **Ocratoxina A (OTA)**. Su determinación se realiza por HPLC-FLD. El café es uno de los alimentos con límites máximos de presencia de esta micotoxina, pero sólo aplicables al café tostado en grano y molido (5 µg/kg) y al café soluble (10 µg/kg). Actualmente no existen límites máximos de esta micotoxina en el café verde, lo que supone un riesgo emergente, ya que en el mercado se encuentran disponibles productos a base de café verde que no sufren tratamiento térmico que reduzca la presencia de OTA en el producto final (Elika, 2019). Existen también estudios de presencia de **cadmio y plomo** en granos de café debido a la contaminación en suelos agrícolas. Su determinación se realiza por realiza por ICP-MS (Viñán Guamán, 2019).
- Residuos de plaguicidas: son de aplicación los Límites Máximos de Residuos recogidos en el Reglamento 396/2005.

## **DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

El café de la variedad Arábica, producido en Centroamérica y Sudamérica, y el café Robusta, procedente de África, Brasil y Asia, suponen la casi totalidad de la producción mundial. El Arábica es, por su aroma y sabor, muy apreciado, por lo que su precio es superior al Robusta, más fuerte y amargo. De igual modo existe adulteración del café de alta calidad puro Arábica con otras especies de peor calidad o con sucedáneos como achicoria o malta tostada. Para detectar estos fraudes se pueden emplear diversas técnicas, desde la identificación de la especie empleando PCR hasta GC-MS para detectar la presencia de 16-O-metilcafestol, molécula identificada como una sustancia marcadora de la variedad robusta. El análisis con RMN también permite obtener información de la genuinidad de la muestra.

Otro fraude lo constituye el empleo de “café agotado” por una utilización anterior, lo que se determina por una mayor cantidad de extracto acuoso del establecido en la legislación.

### 3. TÉ. COMPOSICIÓN. NORMAS DE CALIDAD. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES

Según el Código Alimentario Español, se define **té** como las hojas jóvenes y las yemas, sanas y limpias de las distintas especies del género botánico *Thea*, en buen estado de conservación, convenientemente preparadas para el consumo humano y poseyendo el aroma y gusto característico de su variedad y zona de producción.

En la actualidad el género ha pasado a denominarse *Camellia*, siendo el té la infusión realizada con las hojas secas molidas o brotes del arbusto *Camellia sinensis* o *Camellia viridis* en agua caliente que se emplea como bebida estimulante. El arbusto ha crecido silvestre a lo largo de la historia en Extremo Oriente aunque hoy día se cultiva en muchos otros lugares. El té proviene principalmente de la China continental, India, Sri Lanka, Taiwán, Japón, Nepal, Australia y Kenia (Fundación Española de Nutrición).

Los cuatro tipos principales de té se distinguen según su procesamiento. *Camellia sinensis* es un arbusto, cuyas hojas, si no son secadas según se recolectan, comienzan a oxidarse. Para prevenir este proceso de oxidación se calientan las hojas con el objetivo de quitar su humedad. Los tipos de té, según su procesamiento, son:

- **Té blanco:** hojas jóvenes (brotes nuevos del arbusto) que no se han oxidado.
- **Té verde:** sin oxidación y las hojas se secan en ausencia de humedad y son fragmentadas rápidamente después de ser recogidas.
- **Té negro:** es el más oxidado de todos y el que más teína posee.
- **Té rojo:** variedad fermentada de una manera especial que se elabora con hojas grandes de té que se comprimen y almacenan durante años bajo condiciones específicas para que unas cepas bacterianas transformen el té verde en rojo.

#### COMPOSICIÓN

En la hoja fresca de la planta destaca la presencia de agua, proteínas (15-20%), glúcidos (35%), minerales (calcio, fósforo, hierro, sodio y potasio), vitaminas (ácido ascórbico y algunas del complejo B), bases púricas (cafeína, teobromina y teofilina) y derivados polifenólicos (flavonoides) (Hernández Figueroa, Rodríguez-Rodríguez, & Sánchez-Muñiz, 2004)

Las hojas frescas del árbol del té contienen una alta cantidad de **flavanoles** (derivados de los flavonoides) de estructura monomérica, conocidos como **catequinas**, así como sus formas polimerizadas. El té contiene también **cafeína**. Cuando las catequinas toman contacto con las polifenol-oxidasas, como ocurre cuando se enrollan las hojas del té para la producción del oolong y del té negro, la oxidación produce estructuras diméricas y poliméricas de los flavanoles dando origen a las **teaflavinas** (estructuras diméricas) y a las **tearrubiginas** (estructuras poliméricas), que son los derivados que le aportan el color y sabor característico al té negro. De esta forma, el té verde contiene una alta

concentración de catequinas y baja cantidad de teaflavinas y tearrubiginas, el oolong contiene cantidades intermedias de estos productos, y el té negro contiene bajas cantidades de catequinas y alto contenido de los dímeros y polímeros. Esta diferente composición es responsable de los diferentes efectos fisiológicos atribuidos a estos tres tipos de té. Además de los flavanoles, el té, particularmente el té verde, contiene también una pequeña cantidad de una gran variedad de **flavonoides** como la quercetina, la miricetina, y el kanferol, entre otros, todos ellos en la forma de glicósidos. (Valenzuela B., 2004).

## **NORMAS DE CALIDAD**

### **Real Decreto 1354/1983, de 27 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico - Sanitaria (RTS) para la elaboración, circulación y comercio de té y derivados.**

Esta norma tiene por objeto definir, a efectos legales, lo que se entiende por té y fijar, con carácter obligatorio, las normas de elaboración, comercialización y, en general, la ordenación jurídica de los productos. También será de aplicación a los productos importados.

La norma establece la siguiente clasificación en base al proceso de elaboración:

- **Té verde:** Es el té preparado, sin el proceso de fermentación y que no haya sufrido disminución alguna de sus principios activos.
- **Té negro o té:** Es el té elaborado por fermentación, aunque conservando sus mismos principios activos. Presenta especificaciones en cuanto a humedad, cafeína, extracto acuoso, taninos, cenizas, fibra cruda y nitrógeno establecidos en la norma
- **Té semifermentado o té oolong:** Es el té en cuya reparación se ha interrumpido el proceso de fermentación para obtener unas características organolépticas determinadas.
- **Té descafeinado:** Es el té, verde o negro o semifermentado, desprovisto de la mayor parte de su cafeína. Como **máximo** deberá presentar un **0.12%**
- **Extracto soluble de té:** Es el producto soluble en agua obtenido por parcial o total evaporación de la infusión de té.
- **Te aromatizado:** Son los tés definidos anteriormente, a los que por adición de sustancias aromatizantes autorizadas, plantas aromáticas o especias, se les comunica un aroma o sabor característicos.

La RTS establece además las manipulaciones permitidas y prohibidas.

## **DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

Las determinaciones realizadas sobre este producto son:

- Humedad y cenizas: gravimetría

- Cenizas insolubles en ácidos: se incinera la muestra, se tratan las cenizas por ebullición en ácido clorhídrico y el residuo insoluble se filtra y se pesa.
- Extracto acuoso: Permite evaluar un posible agotamiento del té por un uso anterior. Se obtiene calentando una cantidad determinada de té en agua y calculando la diferencia de peso inicialmente y tras el calentamiento que origina el extracto.
- Taninos: Se emplea el método de Lowenthal, que consiste en un ensayo volumétrico. Los taninos se obtienen al realizar la diferencia entre la valoración de la muestra total y la valoración de la muestra sin taninos. Para eliminar los taninos se precipitan con gelatina y caolín.
- Fibra cruda: el contenido en fibra de una muestra se calcula después de ser digerida con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio y calcinado el residuo. La diferencia de pesos después de la calcinación nos indica la cantidad de fibra presente.
- Nitrógeno: método Kjeldahl
- Cafeína (teína): HPLC-DAD
- Residuos de plaguicidas: son de aplicación los Límites Máximos de Residuos recogidos en el Reglamento 396/2005. La mayoría de las notificaciones en la categoría «cacao y preparaciones de cacao, café y té» se refieren al té, principalmente de China (Elika, 2019).

#### **DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

Desde mediados del siglo XVIII aparecen adulteraciones relacionadas con el té, que era mezclado con hojas de endrina, regaliz, fresno y otras plantas convenientemente teñidas con azul de Prusia (Lluesa Sanjuan, 2019). En la actualidad, el fraude más común es con especies muy similares al té, en algunos casos se ha detectado ADN de plantas relacionadas con la familia del perejil. Para su detección se emplean técnicas biomoleculares: se secuencian el genoma y se compara con una base de datos como GenBank.

#### **4. CACAO. COMPOSICIÓN. NORMAS DE CALIDAD. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES.**

El cacao es un alimento que se obtiene de los frutos del árbol de cacao, *Theobroma cacao* pertenece a la familia Sterculiaceae, planta originaria de América tropical, pero que es muy cultivado en lugares con climas cálidos. Se destina mayoritariamente a la producción de chocolate, aunque también a la producción de manteca de cacao, cacao líquido o cacao en polvo. El cacao es la parte que se obtiene de las semillas, que fermentan, se desecan, obteniéndose después una pasta o chocolate puro, utilizado como alimento y estimulante. Presenta como alcaloides teobromina, teofilina y cafeína (Gómez Pastor, 2020) (Cano Carmona, Cano Ortiz, & Cano Ortiz, 2009).

## COMPOSICIÓN.

Los granos de cacao fermentado y desecados al aire están compuestos por (Gómez Pastor, 2020):

- **Lípidos:** Son el componente mayoritario, aproximadamente el 50%. La grasa de cacao presenta un 97-99% de triglicéridos, un 0,5-2% de ácidos grasos libres (esteárico, palmítico principalmente) y sustancias insaponificables (estearinas) y purinas.
- **Proteínas y aminoácidos (15-17%):** suponen el 60% del nitrógeno total del cacao. En los granos sin tratar encontramos mayoritariamente:  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -fructosidasa y  $\beta$ -glucosidasa, las cuáles se inactivan mayoritariamente en el tratamiento del cacao.
- **Carbohidratos (20-21%):** compuestos mayoritariamente por almidón. También está formado por como pentosanos, galactanos, mucílagos y celulosa. Entre los carbohidratos solubles destacan estaquiosa, rabinosa y sacarosa. Los azúcares reductores que se han formado en la hidrólisis de la sacarosa durante la fermentación proporcionan un aroma en la etapa del tostado.
- **Teobromina y cafeína (alcaloides):** la teobromina se encuentra en un 1,2% y produce acción estimulante. La cafeína en el cacao es muy inferior, diez veces menos que la teobromina.
- **Compuestos fenólicos:** polifenoles.
- **Ácidos orgánicos:** ácido acético, cítrico, succínico y málico. Se forman en la fermentación y dan un sabor característico al cacao.
- **Compuestos volátiles:** hacen que el cacao presente su aroma característico. Dan el sabor amargo astringente que tienen los granos de cacao formado en la fermentación.
- **Compuestos aromáticos:** los más abundantes son el ácido acético seguido en una concentración mucho menor por 3-Metilbutanal y 2-Metilbutanal.
- **Humedad (5%)**

## NORMAS DE CALIDAD.

**Real Decreto 823/1990, de 22 de junio, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de productos derivados de cacao, derivados de chocolate y sucedáneos de chocolate.**

Esta reglamentación tiene por objeto definir, a efectos legales, qué se entiende por productos derivados de cacao, de chocolate y sucedáneos de chocolate y fijar, con carácter obligatorio, las normas de dichos productos.

Está modificada por el Real Decreto 1055/2003, que se verá a continuación, y derogada en parte por el Real Decreto 176/2013. Sin embargo se mantienen las definiciones y denominaciones de los productos derivados de cacao, de chocolate y sucedáneos de chocolate los productos destinados a la alimentación humana, así como manipulaciones permitidas y particularidades de etiquetado y rotulación.

**Real Decreto 1055/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria sobre los productos de cacao y chocolate destinados a la alimentación humana.**

La Directiva 2000/36/CE hizo necesaria la aprobación de este Real Decreto, que se aplicará a los productos de cacao y chocolate destinados a la alimentación humana definidos en la norma:

- **Manteca de cacao:** materia grasa obtenida de granos o parte de granos de cacao.
- **Cacao en polvo, cacao:** producto obtenido por la transformación en polvo de granos de cacao limpios, descascarillados y tostados y que contenga un **20% sobre materia seca**, como mínimo, **de manteca de cacao** y, como máximo, un 9% de agua.
- **Cacao magro en polvo, cacao magro, cacao desgrasado en polvo, cacao desgrasado:** cacao en polvo que contenga **menos del 20% de manteca de cacao** calculado sobre materia seca.
- **Chocolate en polvo:** producto consistente en una mezcla de cacao en polvo y azúcares que contenga, como mínimo, un **32% de cacao en polvo**.
- **Chocolate en polvo para beber, chocolate familiar en polvo, cacao azucarado, cacao en polvo azucarado:** producto consistente en una mezcla de cacao en polvo y de azúcares que contenga, como mínimo, un **25% de cacao en polvo**.
- **Chocolate:** producto obtenido a partir de productos de cacao y azúcares. Podrá añadirse leche o materia seca de leche y almendras, avellanas u otros frutos de cáscara partidos o enteros.
- **Chocolate con leche:** producto obtenido a partir de productos de cacao, azúcares y leche o productos lácteos, y que cumpla una serie de características en cuanto a contenido de materia seca total de cacao, extracto seco de leche, materia seca y desgrasada de cacao materia grasa láctea y materia grasa total.
- **Chocolate familiar con leche:** producto obtenido a partir de productos de cacao, azúcares y leche o productos lácteos.
- **Chocolate blanco:** producto obtenido a partir de manteca de cacao, leche o productos lácteos y azúcares y que contenga, como mínimo, un **20% de manteca de cacao** y, al menos, un **14% de extracto seco de la leche**.
- **Chocolate relleno:** es el producto relleno cuya parte exterior esté constituida por uno de los productos definidos en los cuatro puntos anteriores.
- **Chocolate a la taza y chocolate familiar a la taza:** producto obtenido a partir de productos de cacao, azúcares y harina o almidón de trigo, de arroz o de maíz.
- **Bombón de chocolate:** Es el producto del tamaño de un bocado constituido por chocolate relleno o chocolate junto a otras materias comestibles, siempre que el **chocolate suponga el 25%** del peso total del producto.

Se incluyen en los siguientes apartados las características que han de tener las grasas vegetales que se adicionen a la manteca de cacao (menor al 5% en relación con el producto acabado), los ingredientes facultativos autorizados y la adición de sustancias comestibles, cómo realizar el cálculo de los porcentajes exigidos en cada definición de producto y el etiquetado.

### **DETERMINACIONES ANALÍTICAS.**

El Real Decreto 822/1990 por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio del cacao y chocolate ha sido derogado casi en su totalidad, pero sigue vigente el Título VI relativo a los métodos de análisis y el Anexo en el que están recogidos esos métodos. Todos ellos llevan asociada una Norma del IOCC (Internacional Office of Cocoa and Chocolate), de la AOAC (Association of Analytical Communities) o una Norma UNE.

Los análisis realizados en muestras de cacao y chocolate son los siguientes:

- Examen organoléptico
- Humedad
- Cenizas
- Nitrógeno total
- Proteínas de leche
- Grasa total
- Lecitina
- Lactosa
- Sacarosa
- Extracción de la grasa
- Índice de yodo
- Índice de refracción
- Residuo insaponificable al éter de petróleo
- Composición de ácidos grasos: CG-FID
- Esteroles: CG-FID
- Presencia de isómeros trans por espectroscopia infrarroja

Residuos de plaguicidas: son de aplicación los Límites Máximos de Residuos para el cacao en grano recogidos en el Reglamento 396/2005.

Contaminantes: además es de aplicación el Reglamento 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Por el momento no hay un límite fijado para Ocratoxina A, pero sí para benzo(a)pireno.

### **DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

El precio de mercado del cacao se ha visto incrementado en los últimos años, por lo que existen sospechas de adulteración del cacao en polvo con otros ingredientes más baratos, entre los que destaca la harina de algarroba por ser un producto con características similares en cuanto a color, aroma y sabor (Renuncio Gabarda, 2017).

Además del perfil de ácidos grasos por GC-FID, la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), es una metodología analítica rápida y de gran exactitud que permite el desarrollo numerosas aplicaciones para evaluar la composición, el procesamiento y certificación de la calidad de alimentos.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Boletín Oficial del Estado (BOE). (21 de Septiembre de 1967). Decreto 2484/1967 por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/1967/BOE-A-1967-16485-consolidado.pdf>

Boletín Oficial del Estado (BOE). (27 de Abril de 1983). Real Decreto 1354/1983 por el que se aprueba la Reglamentación Técnico - Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de té y derivados. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/1983/BOE-A-1983-15103-consolidado.pdf>

Boletín Oficial del Estado (BOE). (22 de Junio de 1990). Real Decreto 822/1990 por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio del cacao y chocolate. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1990-15103>

Boletín Oficial del Estado (BOE). (22 de Junio de 1990). Real Decreto 823/1990 por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de productos derivados de cacao, derivados de chocolate y sucedáneos de chocolate. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/1990/BOE-A-1990-15104-consolidado.pdf>

Boletín Oficial del Estado (BOE). (1 de Agosto de 2003). Real Decreto 1055/2003 por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria sobre los productos de cacao y chocolate destinados a la alimentación humana. Obtenido de [chrome-extension://efaidhttps://www.boe.es/buscar/pdf/2003/BOE-A-2003-15599-consolidado.pdf](https://www.boe.es/buscar/pdf/2003/BOE-A-2003-15599-consolidado.pdf)

Boletín Oficial del Estado (BOE). (14 de Diciembre de 2012). Real Decreto 1676/2012 por el que se aprueba la norma de calidad para el café. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/pdf/2012/BOE-A-2012-15656-consolidado.pdf>

Cano Carmona, E., Cano Ortiz, A., & Cano Ortiz, A. (2009). Plantas prohibidas o restringidas por su toxicidad: flora psocotrópica. *Boletín del Instituto de Estudios Giennenses*(200), 73-123. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3177054>

Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (23 de Febrero de 2005). Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R0396:20080410:ES:PDF>

Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (20 de Noviembre de 2017). Reglamento 2017/2158 por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para

reducir la presencia de acrilamida en los alimentos. Obtenido de <https://www.boe.es/doue/2017/304/L00024-00044.pdf>

Elika. (20 de Septiembre de 2019). Informe anual RASFF 2018 sobre alertas alimentarias. Obtenido de <https://seguridadalimentaria.elika.eus/informe-anual-rasff-2018-sobre-alertas-alimentarias/>

Elika. (29 de Mayo de 2019). Riesgo emergente: Ocratoxina A en café verde. Obtenido de <https://seguridadalimentaria.elika.eus/riesgo-ocratoxina-cafe-verde/>

Fundación Española de Nutrición. (s.f.). *Té*. Obtenido de <https://www.fen.org.es/vida-saludable/alimentos-bebidas>

Gómez Pastor, D. (9 de Julio de 2020). El cacao: condiciones de cultivo, composición y valor nutricional. Obtenido de <https://fundacion-antama.org/el-cacao-condiciones-de-cultivo-composicion-y-valor-nutricional/>

Hernández Figueroa, T., Rodríguez-Rodríguez, E., & Sánchez-Muñiz, F. (Diciembre de 2004). El té verde ¿una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares?. *ALAN [online]*, 54(4), 380-394. Obtenido de <[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000400003&lng=es&nrm=iso](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000400003&lng=es&nrm=iso)>

Llusa Sanjuan, P. (2019). *Fraudes Alimentarios en el siglo XVIII y XIX en España*. Madrid. Obtenido de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/PAULA%20LLUESA%20SANJUAN.pdf>

López Briz, E., & Giner García, R. (15 de Noviembre de 2013). Chocolate, café, té y otros estimulantes: bebidas energéticas avant la lettre (I). *Revista Española de Drogodependencias*, 38(4), 391-409.

Renuncio Gabarda, L. (Julio de 2017). Aplicación de espectroscopia de infrarrojo cercano para identificar adulteraciones de cacao con harina de algarroba. Valencia.

Rojo Jiménez, E. (2014). Café I (G. Coffea). *Reduca (Biología). Serie Botánica*, 7 (2), 113-132.

Valenzuela B., A. (2004). El consumo de té y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. *Rev. chil. nutr. [online].*, 32(2), 72-82. Obtenido de <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182004000200001&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182004000200001&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0717-7518. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182004000200001>.

Viñán Guamán, J. (Abril de 2019). Determinación de plomo en café industrial y artesanal comercializados en la provincia de Loja. Guayaquil. Obtenido de

<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/39737/1/Tesis%20Vi%C3%B1an%202019.pdf>

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 37**

**EDULCORANTES NATURALES: MIEL. CRITERIOS DE CALIDAD. CLASIFICACIÓN. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES. AZÚCARES: TIPOS. DETERMINACIONES**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. EDULCORANTES NATURALES: MIEL**

1.1 CRITERIOS DE CALIDAD

1.2 CLASIFICACIÓN

1.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

1.3.1 MÉTODOS AOAC

1.3.2 MÉTODOS IHC

1.4 DETECCIÓN DE ADULTERACIONES

1.4.1 MÉTODOS ISOTÓPICOS

1.4.2 1H-RMN

1.4.3 MELISOPALINOLOGÍA

1.4.4 OTROS MÉTODOS

### **2. AZÚCARES: TIPOS**

2.1 DETERMINACIONES

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. EDULCORANTES NATURALES: MIEL**

Los edulcorantes naturales y derivados vienen recogidos en el Código Alimentario Español (Capítulo XXIII, aprobado por Decreto 2484/1967). Son sustancias naturales que estimulan el sentido del gusto produciendo un sabor dulce, entre los que se encuentran la miel y los azúcares (sacarosa,..). Por otro lado, dentro de los edulcorantes alimentarios también encontramos a los aditivos edulcorantes, los cuales son sustancias (naturales o sintéticas) que se emplean para dar un sabor dulce a los alimentos o como edulcorantes de mesa, pero con poder energético nulo o muy inferior a la sacarosa, pero estos no son objeto de este tema.

La miel es un producto natural que se comercializa y consume en todo el mundo. Desde hace miles de años la miel ha sido producida por las abejas de la misma manera y ofrece un amplio espectro de versatilidad. Ya nuestros antepasados utilizaban la miel y no sólo como alimento dulce, sino que era conocida como un remedio universal, un apreciado producto de belleza, un eficaz conservante e incluso se aceptaba como medio de pago. Hoy en día, la miel se utiliza principalmente para el consumo humano, ya sea como miel pura o como ingrediente edulcorante en otros productos alimenticios.

La miel es principalmente una solución concentrada de azúcares, compuesta principalmente por glucosa y fructosa, junto con otros componentes como ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas, acetilcolina, flavonoides y minerales en cantidades mínimas, y partículas sólidas derivadas de su recolección. El color de la miel puede tener desde un tono casi incoloro a un tono pardo oscuro. Puede tener una consistencia fluida, espesa o cristalizada (en parte o en su totalidad), y el sabor y el aroma pueden variar, pero se derivan del origen vegetal.

En la producción de miel en sí deben considerarse dos etapas, la primera que incluye tanto la recolección y el procesamiento de los fluidos vegetales por parte de las abejas, y una segunda etapa en la que se lleva a cabo la extracción y el procesamiento de la miel por parte de los apicultores y los envasadores de miel. Esta última incluye una serie de pasos que pueden variar en función de la miel que se procesa. En general, el proceso de producción sigue seis pasos principales: extracción, deshumidificación, licuefacción y mezcla, calentamiento, pasteurización, cristalización y envasado final.

La miel, su composición, sus especificaciones y los métodos de caracterización están claramente definidos y descritos en normas o estándares internacionales (CODEX, UE, ISO) y las guías de diferentes asociaciones comerciales y apícolas. La norma del Codex para la miel fue adoptada por la Comisión del Codex Alimentarius en 1981 y revisada posteriormente en 1987 y 2001. Esta es de aplicación voluntaria y sirve en muchos casos como base para la legislación nacional. El Consejo Europeo siguiendo las recomendaciones del Codex emitió la Directiva 2001/110/CE, posteriormente modificada por la Directiva 2014/63/UE, que establece los parámetros de producción y comercialización de la miel en los Estados miembros de la UE. Si la miel se comercializa en la UE, debe cumplir los requisitos esta Directiva.

## 1.1 CRITERIOS DE CALIDAD

La definición de miel figura en la Directiva 2001/110/CE sobre la miel de la UE. En ella se indica que la miel es la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure.

Cuando se comercializa la miel como tal, o cuando se utiliza en un producto cualquiera destinado al consumo humano, no se le puede añadir ningún ingrediente alimentario, incluidos los aditivos alimentarios, ni ninguna otra sustancia aparte de miel, y debe estar exenta, en la medida de lo posible, de materias orgánicas e inorgánicas ajenas a su composición. Con excepción a la miel para uso industrial, no debe tener un gusto o un olor extraños, ni haber comenzado a fermentar, presentar un grado de acidez modificado artificialmente, ni haberse calentado de manera que las enzimas naturales se destruyan o resulten poco activas. Sin perjuicio de lo dispuesto relativo a la miel filtrada, no se puede retirar de la miel el polen, ni ningún otro de sus componentes específicos, excepto cuando resulte inevitable en el proceso de eliminación de materia orgánica o inorgánica ajena a ella.

Cuando se comercializa como miel o es utilizada en cualquier producto destinado al consumo humano, la miel debe cumplir los criterios de composición que figuran a continuación:

### Contenido de azúcares.

a) Contenido de fructosa y glucosa (suma de ambas):

- Miel de flores: no menos de 60 g/100 g.
- Miel de mielada, mezclas de miel de mielada con miel de flores: no menos de 45 g/100 g

b) Contenido de sacarosa:

- En general: no más de 5 g/100 g
- Falsa acacia «*Robinia pseudoacacia*», alfalfa «*Medicago sativa*», Banksia de Menzies «*Banksia menziesii*», Sulla «*Hedysarum*», Eucalipto rojo «*Eucalyptus camaldulensis*», *Eucryphia lucida*, *Eucryphia milliganii*, Citrus spp: no más de 10 g/100 g
- Espliego «*Lavandula spp.*», borraja «*Borago officinalis*»: no más de 15 g/100 g

### Contenido de agua

- En general: no más del 20%
- Miel de brezo «*Calluna*» y miel para uso industrial en general: no más del 23%
- Miel de brezo «*Calluna vulgaris*» para uso industrial: no más del 25%

### Contenido de sólidos insolubles en agua

- En general: no más de 0,1 g/100 g
- Miel prensada: no más de 0,5 g/100 g

Conductividad eléctrica:

- Miel no incluida en la enumeración de los dos párrafos más abajo indicados, y mezclas de estas mieles: no más de 0,8 mS/c
- Miel de mielada y miel de castaño, y mezclas de éstas, excepto con las mieles que se enumeran a continuación: no menos de 0,8 mS/cm
- Excepciones: madroño «Arbutus unedo», argaña «Erica», eucalipto, tilo «Tilia spp», brezo «Calluna vulgaris», manuka o jelly bush «Leptospermum», árbol del té «Melaleuca spp.».

Ácidos libres:

- En general: no más de 50 miliequivalentes de ácidos por 1000 g
- Miel para uso industrial: no más de 80 miliequivalentes de ácidos por 1000 g

Índice diastásico y contenido en hidroximetilfurfural (HMF), determinados después de la elaboración y mezcla.

a) Índice diastásico (escala de Schade):

- En general, excepto miel para uso industrial: no menos de 8
- Mieles con un bajo contenido natural de enzimas (por ejemplo, mieles de cítricos) y un contenido de HMF no superior a 15 mg/kg: no menos de 3

b) HMF:

- En general, excepto miel para uso industrial: no más de 40 mg/kg (condicionado a lo dispuesto anteriormente)
- Miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical y mezclas de estas mieles: no más de 80 mg/kg

El Código Alimentario Español estableció, entre otras, las siguientes prohibiciones en la elaboración, conservación y envasado de la miel:

- Alimentar las abejas artificialmente, con azúcar o sustancias distintas a la propia miel, durante su período normal de producción
- La caramelización o adición de caramelo
- La adición de agua
- La adición de cualquier clase de azúcar, melaza, dextrina, fécula, agar, gelatina y tanino
- La adición de colorantes naturales o artificiales, edulcorantes artificiales, conservadores, sustancias aromáticas y cualquier otra extraña
- Que exceda del 3% el contenido de impurezas constituidas por polen, cera, residuos de insectos y otras sustancias insolubles
- La elaboración y venta de sucedáneos de la miel
- La utilización del nombre de «Miel» para cualquier producto azucarado de naturaleza distinta y el uso en las etiquetas de los envases de tales productos de nombres o dibujos de abejas, panales o colmenas, o cualquier otro que pueda llevar a confusión
- La denominación o declaración de miel en aquellos productos que no la contengan
- La sustitución de la miel en los productos alimenticios en que figure su nombre, o en los que por su tradicional preparación se presuma su existencia

Mieles alteradas. Se considerarán así, y por tanto no aptas para el consumo, ni para confitería las que tengan color, olor o sabor anormales, las que tengan sustancias insolubles en suspensión que, por dilución, den sedimento en cantidad que exceda al 1% y las que por su

análisis químico, examen microscópico del sedimento u organoléptico, acusen enfermedad, alteración o defectos.

## **1.2 CLASIFICACIÓN**

Las principales variedades de miel son las siguientes:

Según su origen:

- Miel de flores o miel de néctar: es la miel que procede del néctar de las plantas.
- Miel de mielada: es la miel que procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas.

Según el modo de producción y/o presentación se definen los siguientes tipos de miel:

- Miel en panal: es la miel depositada por las abejas en los alvéolos operculados de panales recientemente contruidos por ellas, o en finas hojas de cera en forma de panal realizadas únicamente con cera de abeja, sin larvas y vendida en panales, enteros o no.
- Miel con trozos de panal o panal cortado en miel: es la miel que contiene uno o más trozos de miel en panal.
- Miel escurrida: es la miel que se obtiene mediante el escurrido de los panales desoperculados, sin larvas.
- Miel centrifugada: es la miel que se obtiene mediante la centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.
- Miel prensada: es la miel obtenida mediante la compresión de los panales, sin larvas, con o sin aplicación de calor moderado, de hasta un máximo de 45 °C.
- Miel filtrada: es la miel que se obtiene eliminando materia orgánica o inorgánica ajena a la miel de manera tal que se genere una importante eliminación de polen.

Estas definiciones se aplican a la miel que se comercializa directamente. Si la miel tiene un sabor u olor extraños, o está empezando a fermentar o ha fermentado, o ha sido sobrecalentada, sólo es apta para uso industrial o para su utilización como ingrediente de otros productos alimenticios que se elaboran ulteriormente. La transformación de la miel está limitada por la directiva comunitaria sobre la miel y consiste únicamente en filtrado y homogeneización a temperatura controlada.

Las denominaciones anteriores relativas a las principales variedades de miel y a la miel de uso industrial se reservarán a los productos que en ellos se definen y se deberán utilizar en el comercio para designarlos. Estas denominaciones se pueden sustituir por la mera denominación «miel», salvo en los casos de la miel filtrada, la miel en panal, la miel con trozos de panal o panal cortado en miel, y la miel para uso industrial.

Así mismo, dichas denominaciones, salvo en los casos de la miel filtrada y de la miel para uso industrial, podrán verse completadas con indicaciones que hagan referencia: al origen floral o vegetal, si el producto procede totalmente o en su mayor parte del origen indicado y si posee las características organolépticas, fisicoquímicas y microscópicas de dicho origen, al origen

regional, territorial o topográfico, si el producto procede enteramente del origen indicado, a criterios de calidad específicos. Pueden estar amparadas en figuras de calidad como Denominación de Origen Protegida (DOP) o Indicación Geográfica Protegida (IGP) y deberán además cumplir los requisitos recogidos en los pliegos de condiciones correspondientes.

Por otro lado, deberá mencionarse en la etiqueta el país o los países de origen en los que la miel y, en su caso, sus mezclas hayan sido recolectada.

Cuando la miel para uso industrial se haya utilizado como ingrediente en un alimento compuesto, el término «miel» podrá emplearse en la denominación de dicho alimento compuesto en lugar del término «miel para uso industrial». No obstante, en la lista de ingredientes deberá utilizarse el término completo.

### **1.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

Según el Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel, los métodos de control previstos en la Orden Ministerial de 12 de junio de 1986, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel, continúan vigentes.

Estos métodos incluyen la medida de los siguientes parámetros: prolina, análisis microscópico del sedimento, azúcares reductores, sacarosa aparente, composición en azúcares, acidez libre, lactónica y total, cenizas, humedad, hidroximetilfurfural, actividad diastásica, conductividad eléctrica y sólidos insolubles en agua.

Asimismo, podrán utilizarse aquellos otros métodos de análisis validados internacionalmente o aprobados por el «Codex Alimentarius», para verificar el cumplimiento de lo dispuesto por la Directiva 2001/110/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel, en tanto se adopten nuevos métodos por la Unión Europea.

#### **1.3.1 MÉTODOS AOAC**

El Compendio Internacional de Métodos de la AOAC proporciona detalles de los métodos de la AOAC para los principales parámetros físicos y químicos de la miel. Éstos también se han incluido en la Norma del Codex 12-1981 y sus revisiones posteriores. Algunos de los principales parámetros y métodos relacionados son:

- AOAC 969.38B Determinación del contenido de humedad
- AOAC 980.23 Hidroximetilfurfural (HMF)
- AOAC 958.09 Actividad de la diastasa
- AOAC 998.12 Detección del azúcar C4 en la miel

#### **1.3.2 MÉTODOS IHC**

Además de los métodos oficialmente reconocidos, la Comisión Internacional de la Miel (IHC) ha colaborado probado una amplia gama de métodos diferentes para comprobar la

autenticidad de la miel. Los métodos armonizados para los que se dispone de criterios de precisión incluyen:

- Humedad (método refractométrico), conductividad eléctrica, contenido de cenizas, pH, acidez libre (valoración)
- Hidroximetilfurfural (HPLC, o métodos White/Winkler)
- Diastasa (método Schade, ensayo de amilasa Phadebas)
- Azúcares (por HPLC o GC)
- Materia insoluble, actividad invertasa, prolina y recambio específico

#### **1.4 DETECCIÓN DE ADULTERACIONES**

En los últimos años, el consumo de miel a nivel mundial se ha incrementado debido a la tendencia actual hacia el consumo de productos naturales que no contengan ningún aditivo ni conservante. Los adulterantes potenciales de la miel han evolucionado más rápidamente que los métodos para detectarlos, por ello, se hace necesario el desarrollo de nuevos métodos analíticos que permitan la detección de adulteraciones presentes en la misma.

El estudio de la autenticidad de la miel debe abordar dos aspectos fundamentales: genuinidad y pureza, y el correcto etiquetado con respecto al origen geográfico y botánico. En primer lugar, la miel "pura" puede haber sido diluida deliberadamente mediante la adición de azúcar, jarabe y/o agua u otra miel de inferior calidad, o puede haberse alimentado deliberadamente a las abejas con azúcar para aumentar el volumen de producción de miel por colmena. En segundo lugar, si la miel tiene una descripción más detallada que indique origen botánico, geográfico o topológico, la descripción puede ser falsa aunque el producto sea miel pura. Hay otras posibles descripciones e informaciones incorrectas, como las afirmaciones sobre la salud declaraciones de salud, si es "ecológica", tiene "actividad antibacteriana", etc., que son difíciles de evaluar.

Como la miel tiene un precio más elevado que las sustancias dulces como el azúcar y los jarabes industriales, la dilución mediante la adición de estos azúcares exógenos en alguna fase de la elaboración podría ser una vía atractiva para su adulteración. Los métodos existentes y regulados para analizar el espectro de azúcares de la miel pueden mostrar que la miel cumple con su especificación en cuanto a la composición cualitativa y cuantitativa de los azúcares. Sin embargo, estos métodos son limitados cuando se requiere identificar la adición de azúcar por diferentes tipos de jarabes de distintas fuentes botánicas.

La mayoría de los materiales edulcorantes empleados a granel para su adulteración se derivan del azúcar de caña, del azúcar de remolacha o de la hidrólisis del almidón. El almidón suele provenir del maíz, pero en la actualidad hay nuevas fuentes, como el arroz, fácilmente disponibles en el mercado. Algunas formas de jarabe de arroz incluso han sido modificadas bioquímicamente para para que sean más difíciles de detectar.

Actualmente existen numerosas publicaciones donde se recoge estudios de investigación dedicados al desarrollo de nuevos métodos analíticos para comprobar la calidad y la autenticidad de la miel, incluyendo parámetros físicos (conductividad eléctrica, propiedades reológicas, rotación, color y actividad del agua) y componentes químicos (humedad, azúcares, enzimas, HMF, acidez y pH, índice de formaldehído, sólidos insolubles, ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales, compuestos volátiles y semivolátiles), pero la mayoría todavía no forman parte de los métodos oficiales.

#### 1.4.1 MÉTODOS ISOTÓPICOS

El método isotópico oficial que se emplea actualmente permiten detectar la adición fraudulenta del 7% de azúcar procedente de maíz o caña, pero desgraciadamente la práctica de la adulteración de mieles es cada vez más sofisticada, haciéndose necesario el empleo de técnicas isotópicas acopladas a técnicas separativas. Por este motivo, se desarrolló un nuevo método de análisis que ha permitido la determinación de las relaciones isotópicas  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de los azúcares mayoritarios (sacarosa, glucosa y fructosa), mediante el acoplamiento de cromatografía de líquidos a espectrometría de masas isotópica (HPLC-IRMS). Dicho método aporta sustanciales ventajas en cuanto a reducción del tiempo de análisis requerido y simplicidad en el procedimiento, preservando en todo momento las relaciones isotópicas originalmente presentes en la muestra y mejorando incluso los límites de detección establecidos actualmente por el método AOAC 998.12.

Además, varias investigaciones científicas han empleado con éxito la combinación de relaciones isotópicas de varios bioelementos ligeros para verificar el país de origen de una serie de productos alimenticios, incluido el caso de la miel.

#### 1.4.2 $^1\text{H}$ -RMN

Recientemente se ha desarrollado un enfoque analítico innovador que utiliza el perfil de protón-RMN (Resonancia Magnética Nuclear) junto con procedimientos de cuantificación y modelos estadísticos adecuados, para abordar las adulteraciones y las desviaciones de calidad más comunes en la miel. Esta técnica de RMN presenta una serie de ventajas como su alta reproducibilidad y que requiere una preparación de la muestra muy sencilla. Además, los espectros de RMN pueden utilizarse como "huellas dactilares" para comparar, discriminar o clasificar muestras, mientras que su poder de elucidación estructural puede utilizarse para caracterizar biomarcadores nuevos o desconocidos.

Al tener un amplio potencial de cribado, basado en una observación global de todos los componentes solubles de la miel, el perfil de RMN se utiliza también para comprobar la autenticidad. Dado que es independiente de las posibles manipulaciones del polen, también proporciona una herramienta complementaria para comprobar el origen botánico y geográfico declarado, más allá de la detección de la adición de azúcar y el rápido seguimiento

de muchos parámetros de calidad de la miel. Esta técnica espectroscópica también produce una huella dactilar única para cada muestra, que puede utilizarse para comprobar la trazabilidad a lo largo de la cadena de suministro. Un importante ejemplo de su aplicabilidad, es que este método se ha utilizado para caracterizar marcadores conocidos de la miel de Manuka, el metilglioxal y la dihidroxiacetona, y junto con un marcador de RMN recientemente identificado, la leptosperina la técnica ha permitido discriminar la miel de Manuka de otros tipos de miel floral de Oceanía. La técnica de RMN se considera actualmente como uno de los métodos más potentes para detectar las diversas formas de adulteración descritas anteriormente, aunque todavía no forma parte de los métodos oficiales de análisis.

#### 1.4.3 MELISOPALINOLOGÍA

La melisopalinología, o análisis del polen, es una parte esencial de las pruebas de autenticidad de la miel. Los granos de polen de diferentes tipos de plantas tienen una morfología distintiva que puede ser identificada por examen microscópico. Esta técnica, que requiere la opinión de un experto, se utiliza para determinar el país de origen relacionando el tipo de polen con la flora característica del origen geográfico, o para verificar la autenticidad cuando se reivindica un origen botánico concreto.

Sin embargo, el método tiene algunas limitaciones, principalmente debido a la variabilidad natural de las cantidades de polen de fuentes botánicas. Por ejemplo, en algunos casos el polen específico puede estar "infrarrepresentado", como en el caso de los cítricos y la lavanda, mientras que en otros, como el nomeolvides, el polen está "sobrerrepresentado"

El polen también está disponible como producto y el defraudador podría filtrar todo el polen y volver a añadir el polen deseado.

Sin embargo, a pesar de sus limitaciones, el análisis del polen sigue siendo un método útil para controlar el país de origen.

#### 1.4.4 OTROS MÉTODOS

Otros métodos de análisis que actualmente se están empleando para detectar distintas adulteraciones están enfocados a la detección de distintos biomarcadores, enzimas exógenas, oligosacáridos,... aunque todavía no son métodos oficiales incluyen entre otras, técnicas cromatográficas (ejm. LC-UV, LC-ELSD, LC-MS, GC, HPLC, HPAEC-PAD, LC-MS/MS, LC-HRMS, etc), espectroscópicas (FT-MIR – NIR), biomoleculares, ....

## **2. AZÚCARES: TIPOS**

Según el Real Decreto 1052/2003, que recoge la Reglamentación técnico-sanitaria sobre determinados azúcares destinados a la alimentación humana, con el nombre específico de azúcar (sacarosa), designa exclusivamente al producto obtenido industrialmente de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* y *L. var. rapa*), o de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, L.).

A efectos de esta disposición, se distinguen los siguientes tipos de azúcares:

- Azúcar semiblanco: sacarosa purificada y cristalizada, de calidad sana, limpia y comercial
- Azúcar o azúcar blanco: sacarosa purificada y cristalizada, de calidad sana, limpia y comercial
- Azúcar blanco refinado o azúcar extrablanco: el producto que responde a las características señaladas para el azúcar blanco con ciertas características adicionales
- Azúcar líquido: solución acuosa de sacarosa
- Azúcar líquido invertido: solución acuosa de sacarosa parcialmente invertida por hidrólisis, en la cual la proporción de azúcar invertido no es preponderante
- Jarabe de azúcar invertido: solución acuosa, eventualmente cristalizada, de sacarosa parcialmente invertida por hidrólisis, en la que el contenido de azúcar invertido (cociente de fructosa por dextrosa:  $1,0 > 0,1$ )
- Jarabe de glucosa: solución acuosa purificada y concentrada de sacáridos nutritivos, obtenida a partir del almidón o de la fécula y/o de la inulina
- Jarabe de glucosa deshidratado: jarabe de glucosa parcialmente desecado cuya materia seca constituye al menos el 93 por cien en peso
- Dextrosa o dextrosa monohidratada: D-glucosa purificada y cristalizada que contiene una molécula de agua de cristalización
- Dextrosa o dextrosa anhidra: D-glucosa purificada y cristalizada que no contiene agua de cristalización, cuya materia seca constituye al menos el 98 por cien en peso
- Fructosa: D-fructosa purificada y cristalizada, con un contenido de fructosa, 98 por cien como mínimo y un contenido de glucosa, 0,5 por cien como máximo.
- Azúcar terciado (amarillo): de color amarillento o pardo, pegajoso al tacto, soluble casi totalmente en agua, dando una solución amarillenta turbia.
- Azúcar moreno de caña: de color moreno, pegajoso al tacto, soluble casi totalmente en agua, dando una solución amarillenta y turbia, teniendo como materia prima los jugos depurados de la caña de azúcar.

Estos dos últimos casos están recogidos en el Real Decreto 1261/1987, que se encuentra derogado, exceptuando en estos dos casos.

Además de la definición incluida en este texto, dicha reglamentación recoge requisitos adicionales establecidos para cada tipo de azúcar (ejm. polarización, color, materia seca...), así como las distintas presentaciones que podrán tener. En el caso del azúcar semiblanco, azúcar o azúcar blanco y el azúcar blanco refinado o azúcar extrablanco, por ejemplo, podrán presentarse, entre otras formas: en polvo, glacé, candi, panes, pilé, granulado y cuadradillo.

## 2.1 DETERMINACIONES

La orden del 18 de julio de 1989, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para el control de determinados azúcares destinados al consumo humano, recoge de forma detallada la metodología enumerada a continuación:

- Cenizas de conductividad o conductimétricas (método por atribución de puntos)
- Cenizas de conductividad o conductimétricas
- Coloración en solución
- Dióxido de azufre (método colorimétrico de Carruthers, Heaney y Oldfield)
- Dióxido de azufre (método volumétrico de Monier-Williams)
- Pérdida de masa por desecación
- Materia seca total (refractometría)
- Equivalente en dextrosa (método de valoración Constante Larie-Eynon)
- Materia seca (por desecación en vacío)
- Cenizas sulfatadas o sulfúricas
- Poder rotatorio (polarización)
- Tipo de color (método del Instituto de Brunswick)
- Azúcares reductores, expresados en azúcares invertidos (método del Instituto de Berlín)
- Azúcares reductores, expresados en azúcares invertidos (método de Knight y Allen)
- Azúcares reductores, expresados en azúcares invertidos o en D-glucosa

Aunque no se utiliza normalmente en este sentido, las técnicas de IRMS ( $^{13}\text{C}$ ) y SNIF-NMR pueden utilizarse para determinar si la sacarosa se describe correctamente como "caña" o "remolacha".

Otros alimentos edulcorantes naturales no recogidos en la normativa citada con anterioridad podrían incluir: jarabe de agave, jarabe de arce, azúcar/sirope de palma o coco,..

En estos casos se deben utilizar métodos avanzados para una evaluación en profundidad de la autenticidad (perfil cromatográfico de algunos oligosacáridos,  $^{13}\text{C}$ -IRMS,  $^{13}\text{C}$  SNIF-NMR,...).

MATERIAL NO OFICIAL

## **BIBLIOGRAFÍA**

Carter J. F y Chesson Lesley A. (2017) Food forensics. Stable Isotopes as a Guide to Authenticity and Origin. CRC Press.

Cabañero A.I, Recio J.L y Rupérez M. (2006) Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry: A New Perspective on Honey Adulteration Detection. J. Agric. Food Chem. 54, 9719-9727 971.

Codex Alimentarius. Normas internacionales de los alimentos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Organización Mundial de la Salud.

Directiva 2001/110/CE del Consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel.

Directiva 2014/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de mayo de 2014 por la que se modifica la Directiva 2001/110/CE relativa a la miel.

Edulcorantes naturales y derivados del Código Alimentario Español, aprobado por Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre (BOE de 21 de octubre, p. 14379).

<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/legislacion>.

Orden de 18 de julio de 1989, (BOE 25 de julio de 1989) por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para el control de determinados azúcares destinados al consumo humano.

Pascual-Maté A., Osés S.M., Fernández-Muiño M.A. y Sancho M.T. (2018) Methods of analysis of honey, Journal of Apicultural Research, 57:1, 38-74.

Real Decreto 1261/1987, de 11 de septiembre (BOE de 14 de octubre), por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, almacenamiento, transporte y comercialización de los azúcares destinados al consumo humano.

Real Decreto 1052/2003, de 1 de agosto (BOE del 2 de agosto), por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria sobre determinados azúcares destinados a la alimentación humana.

Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto (BOE del 5 de agosto), por el que se aprueba la norma de calidad relativa a la miel.

Real Decreto 523/2020, de 19 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel.

Sevastyanov V.S. (2015) Isotope Ratio Mass Spectrometry of Light Gas-Forming Elements. CRC Press.

Siddiqui A.J., Musharraf S.G, Choudhary M.I., Rahm A. (2017) Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. FoodChemistry, 217, 687–698.

Thrasyvoulou A., Tananaki C., Goras G., Karazafiris E., Dimou M., Liolios V., Kanelis D. y Gounari S. (2018) Legislation of honey criteria and standards, Journal of Apicultural Research, 57:1, 88-96.

MATERIAL NO OFICIAL

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 38**

### **CEREALES Y HARINAS. COMPOSICION. DETERMINACIONES ANALITICAS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

- 1. Introducción**
- 2. Clasificación**
- 3. Características morfológicas y estructurales.**
- 4. Composición química**
- 5. Valor nutricional.**
- 6. Descripción de las diferentes cereales**
- 7. Métodos de análisis de los cereales.**
- 8. Harinas**
- 9. Clasificación de las harinas.**
- 10: Determinaciones analíticas de las harinas**
- 11. Bibliografía.**

MATERIAL NO OFICIAL

## Cereales y harinas. Composición. Determinaciones analíticas

### 1.-Introducción

Según el CAE se denomina cereal a las plantas gramíneas y a sus frutos sanos, enteros, maduros y secos incluyendo el trigo sarraceno o alforfón que pertenece a la familia de las poligonáceas.

Debido a sus características, en la mayoría de los casos no pueden ser consumidos tal y como se producen en la naturaleza, sino que tienen que ser previamente transformados.

Su uso como alimento varía según el área geográfica así en las regiones más pobres del planeta su consumo es más elevado (70 a 90%) mientras que en los países desarrollados representa un 25%.

### 2.-Clasificación

- Trigo
- Centeno
- Arroz
- Maíz
- Cebada
- Mijo
- Arroz
- Sorgo
- Triticale

### 3.-Características morfológicas y estructurales:

A partir de las gramíneas productoras de cereal se obtienen frutos secos con una sola semilla. Este tipo de fruto es una cariósipide que habitualmente se conoce como grano y cuyas propiedades morfológicas son bastante similares en las diversas especies.

Cariósipide consta de:

1-Pericarpio cubierta externa que envuelve a la semilla adhiriéndose íntimamente a ella.

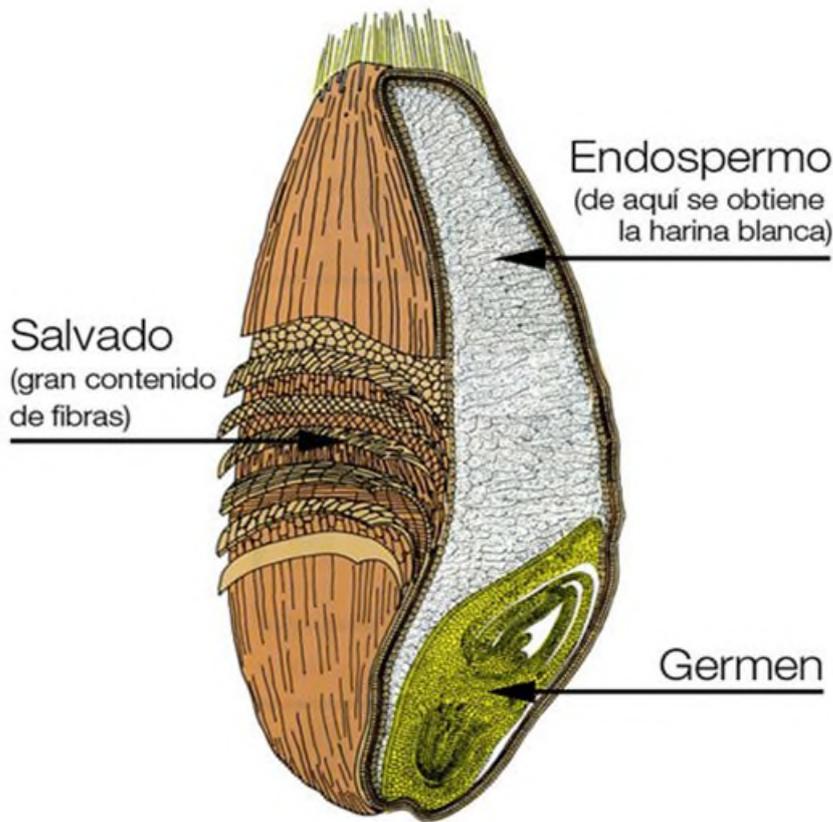
2-Semilla que contiene dos partes diferenciadas:

2.1 Embrión o germen

2.2-Endospermo rodeado por una epidermis nucelar y por la cubierta de la semilla.

En el arroz, la cebada y la avena los granos están envueltos por unas cubiertas florales, las glumas que permanecen pegados a ellos incluso después de la trilla y se conocen como la cáscara que forma parte de la paja.

En el resto de los cereales las glumas se desprenden durante el proceso de trillado por lo que estos reciben el nombre de granos desnudos



#### 4.-Composición química

La composición química de los cereales es bastante homogénea

##### 1. **Hidratos de carbono**

.-El almidón es el componente más abundante, siendo junto con las legumbres y patatas fuente de este polisacárido. Se encuentra principalmente en el endospermo.

- Azúcares libres en el germen.
- Celulosa y hemicelulosa en el pericarpio

2. **Lípidos** se encuentran en cantidades relativamente pequeñas y se almacenan preferentemente en el germen y capas de aleurona. Predominado el ácido linoleico.

3. **Proteínas** se encuentran localizadas en las diferentes partes que constituyen el grano.

Según su solubilidad

Albumina y globulina que son solubles.

Glutelina y prolamina son insolubles y constituyen el gluten.

## 5.-Valor nutricional.

Los cereales contienen todos los aminoácidos esenciales aunque son deficitarios en lisina. El maíz además es deficitario en triptófano.

Constituyen una buena fuente de vitamina del Grupo B, también contienen tocoferoles que se concentran mayoritariamente en el germen y el salvado.

Los minerales más abundantes son fósforo y potasio se localizan en el pericarpio. Entre los micronutrientes el más abundante es el hierro.

## 6.-Descripción de las diferentes especies de cereales

6.1-**Trigo** es el fruto procedente de las diferentes especies del genero *Triticum*. Las dos --especies de trigo más cultivadas en la actualidad son el denominado trigo panadero (*triticum aestivum*) que constituye el 90y 95% del total y le trigo semolero o trigo para pasta (*triticum durum*) con aproximadamente el 5 o 10% del trigo cultivado.

Además de estas 2 especies, se cultivan pequeñas extensiones de trigos denominados ancestrales, que despiertan interés debido a las propiedades nutricionales que se les atribuyen. Cabe destacar entre ellos el Kamut un trigo alotetraploide relacionado con el trigo semolero y la espelta emparentada con el trigo panadero.

La espelta, se considera el cereal más antiguo que se ha cultivado en Europa, a diferencia del trigo blando y duro se trata de un grano vestido

Podemos afirmar que el trigo es el principal cereal panificable a escala mundial. Las proteínas de su endospermo son capaces de desarrollar una red tridimensional cuando amasa la harina en presencia de agua: el gluten.

Celiaquía es una enfermedad autoinmune del intestino delgado que se manifiesta en individuos genéticamente predispuestos y que conduce, cuando se ingieren alimentos que contienen gluten, a la malabsorción de los nutrientes

Además de la celiaquía, existen otros desórdenes alimentarios relacionados con el gluten como las reacciones alérgicas al trigo

6.2-**Avena** es uno de los cereales más ricos en nutrientes (conocida como la reina de los cereales). En un comienzo la producción de avena se destinaba a alimentación animal poco a poco se ha industrializado para la elaboración de productos de consumo humano. Rica en fibra soluble, los Beta glucanos que previenen el cáncer, regulan el colesterol, el azúcar...

De la avena se obtienen productos como copos de avena, harina de avena, de la cascarilla de la avena se extrae furfural

6.3-**Maíz** utilizado en alimentación animal pero también consumo humano ya que carece de gluten y se utiliza en la elaboración de productos destinado a los celíacos y también los almidones modificados de mías que se emplea en la industria alimentaria

6.4-**Cebada** se utiliza en alimentación animal y para la elaboración de bebidas alcohólicas como la cerveza y el whiskey

6.5-**Centeno** se utiliza para hacer harina y para la elaboración de ciertos aguardientes. Se utiliza para hacer pan ya que junto con el trigo son los ú, en formulaciones de alimentos aptos para celíacos. Actualmente se utiliza para la elaboración de productos farináceos ya sea en combinación con harinas de otros cereales (harinas compuestas) o utilizando harina de sorgo pura, sin mezclas, los productos que elaboran son pan, pastas, cereales para desayuno y galletas entre otros

6.6-**Mijo** en Asia y África constituye una fuente importante en la alimentación

6.7-**Arroz** es el segundo cereal más producido después del maíz y es el cereal más importante para la alimentación humana.

6.8-**Teff** se cultiva en Etiopía. Carece de gluten. Sus harinas son siempre integrales debido a que el grano es tan pequeño que no permite la separación del salvado durante la molienda destacan por su alto contenido en minerales.

## 7.-Métodos de análisis de los cereales

Se enfocan hacia el trigo que es el cereal más utilizado y del que se obtienen más productos derivados.

Dentro del trigo distinguimos:

- Trigo duro se utiliza para la obtención de pastas alimenticias.
- Trigo blando del que se obtiene la harina para la elaboración de pan, galletas, bizcochos

Trigo duro:

Los índices que definen la calidad son:

- Criterios de calidad física
- Criterios de calidad tecnológica o química.

### Criterios de calidad física

--**Peso específico** también denominado peso hectolitro o densidad aparente.

Expresa el peso del grano por unidad de volumen en Kg/hl. Está influenciado por los espacios intercalares, el contenido en agua del grano y la cantidad de impurezas presente en la muestra.

El peso específico nos da una idea del rendimiento en sémola del grano

PH <78 Kg/hl deficiente

78-82 Kg/hl normal

> 82 excelentes

---**Peso 1000 granos** es un factor relacionado con la producción y calidad. Se realiza para determinar los rendimientos de los cereales

---**Humedad** se determina a 130° durante 2 horas, Presenta un interés tecnológico, pues de ella depende la elección del momento de la recolección, el secado, almacenamiento y su transformación industrial. En el caso del trigo blando el conocimiento de la humedad es fundamental para el proceso de acondicionamiento, que consiste en preparar el grano de trigo para la obtención de la harina.

#### **Criterios de calidad química**

--**Cenizas** representan el contenido en sales minerales .El conocimiento del nivel de cenizas es de gran importancia debido a su relación con la calidad y el rendimiento de la sémola que será mayor a medida que el porcentaje de cenizas es más bajo. El contenido en cenizas se expresa sobre sustancia seca (s.s.s)

Se determina gravimétricamente por incineración a 900°

**Proteínas** se determina por el método de Kjeldal y el factor de conversión a aplicar es 5.7.

El contenido en proteína se expresa sobre sustancia seca (ss.)

-**Índice de Sedimentación** (S: D: S) mide la fuerza del gluten, basándose para ello en las propiedades de floculación de las proteínas en medio ácido.

La unidad de medida es ml de sedimento.

Se mide el esponjamiento de la fracción del gluten del trigo en una solución de dodecil sulfato.

--**Gluten** se determina mediante el lavado en una solución salina. Es responsable de la cohesión de la sémola cuando se forma la pasta cuando se nos referimos al trigo duro. En el caso de los trigos blandos se determina en la harina que se tratara en este tema más adelante.

-**Índice de caída o falling number** mide la actividad amilasa de las sémolas y las harinas: los trigos germinados o en vía de germinación presentan una actividad amilasica muy elevada lo que dificulta la transformación industrial.

El índice es dado por la medida del tiempo en segundos que un anillo tarda en atravesar el gel de almidón en un tubo viscosímetro.

Las dos determinaciones que se indican a continuación son exclusivamente para los trigos duros:

--**Índice de amarillos** indica la coloración del grano .Es preferible el color amarillo ámbar que da idea de un contenido elevado de b carotenos.

--**Vitrosidad** es el porcentaje de granos vítreos. A mayor vitrosidad mayor rendimiento de la sémola .La vitrosidad indica la dureza y la compacidad del grano.

Las determinaciones analíticas que se realizan en el resto de los cereales son:

- **Peso hectolitro**
- **Peso mil semillas.**
- **Humedad**
- **Proteínas** factor de conversión en proteína 6.25

## **8.-Harinas**

La harina se consigue mediante los procesos de molienda y molturación de los cereales

El trigo es transformado en harina de la cual se elaboran diferentes productos como pan, galletas,

Según la Norma de Calidad para las harinas, las sémolas y otros productos de la molienda de cereales Harina es el producto obtenido de la molturación del grano de cereal y constituida fundamentalmente por el endospermo, con una granulometría tal que el 90% de sus partículas pase a través de un tamiz de 180 micras de luz de malla, a excepción de la harina de trigo morena, en que pasa el 80% de las partículas.

La denominación estará formada por el genérico <<harina>>seguido del nombre del cereal de procedencia.

## **9.-Clasificación de las harinas**

1-Harina de trigo es la harina obtenida por molturación de grano de trigo *Triticum aestivum* o la mezcla de este con el *triticum durum* en la proporción de un máximo del 20% de este último, lista para su venta al consumidor final o destinado en la elaboración de otros productos alimenticios

2-Harina integral es el producto resultante de la molturación del grano de cereal y cuya composición corresponde al grano de cereal integro.

La denominación estará formada por el genérico <<harina integral>> o << harina de grano entero>>seguido del nombre del cereal de procedencia.

3-Harina con salvado es el producto resultante de la mezcla de una harina con salvado procedente de uno o varios cereales.

La denominación será descriptiva, constituida por la genérica harina, el nombre del cereal de procedencia, el genérico salvado y el porcentaje de salvado adicionado; si el salvado procede de un cereal diferente al de la harina, en la denominación se indica también el nombre del cereal o cereales de procedencia, en orden decreciente según el porcentaje de salvado aportado.

4- Harina semolosa es el producto procedente de la molturación del grano de uno o varios cereales o de la mezcla posterior de diversos productos de la molienda de un

mismo cereal o distintos cereales que se caracteriza por presentar una granulometría heterogénea (harinas, sémolas gruesas y sémolas finas) no pudiendo catalogarse de forma genérica en ninguna de estas denominaciones individuales

La denominación estará formada por el genérico <<harina integral>> seguido del nombre del cereal o cereales de procedencia. En orden decreciente de peso...

5-Mezcla de harinas es la resultante de mezclar harinas de diferentes granos de cereales o que ha sido obtenida por la molturación conjunta de diferentes cereales.

La denominación será <<mezcla de harinas >> pudiendo ir seguida por el nombre de los cereales de procedencia. La mezcla de harina de tres o más cereales podrá denominarse <<harina multicereales>>.

#### 6-Harinas procesadas

Harina acondicionada es la harina a la cual se añaden determinados ingredientes como aditivos, enzimas, gluten u otros ingredientes, para modificar o complementar únicamente sus características naturales

Harina tratada es la harina obtenida mediante procesos especiales de elaboración, ya sea por el tipo de tratamiento aplicado a las materias primas empleadas o por el proceso seguido para su obtención.

Son harinas tratadas, sin ser limitativa la relación:

Harina de cereales malteados aquella obtenida a partir de cereales que hayan sufrido un malteado previo.

Harina dextrinada aquella que debido al tratamiento térmico o por hidrólisis ácida, contiene dextrina

Harina micronizada aquella con una granulometría tal que el 95% de las partículas pasa a través de un tamiz de 100 micras de luz de malla.

Harina tratada térmicamente aquella que se somete a un tratamiento de calor en condiciones controladas de tiempo, presión y temperatura de forma que se establezca el producto.

La denominación de las harinas tratadas estará constituida por el término <<harina>>, el nombre del cereal y una indicación referente al proceso especial seguido para su elaboración a alguna característica distintiva

Harina preparada es la mezcla de cualesquiera de las harinas definidas anteriormente en proporción  $\geq$  al 51% junto con otros ingredientes (productos lácteos, ovoproductos, azúcares, edulcorantes, etc.), destinadas a la elaboración de productos concretos o a facilitar alguna fase de la elaboración de productos concretos.

La denominación será descriptiva, incluirá los términos <<harina>> y <<preparada>>, completada con la elaboración de productos concretos.

## 10.-Determinaciones analíticas de las harinas

**Humedad** se determina a 130° durante 2 horas. La humedad de una harina no debe exceder del 15%, por encima la harina se endurece y fermenta

**Cenizas** se define como el residuo resultante de la incineración de una muestra en condiciones determinadas.

El contenido en cenizas está directamente relacionado con el grado de extracción, ya que la mayoría de sustancias minerales presentes en la harina, se encuentran en la corteza del grano de trigo y sus alrededores este contenido oscila entre 0.45% a 1.40%

Se define el Grado de extracción como la cantidad de harina de unas condiciones determinadas características que se obtiene a partir de 100 kg de harina limpia.

Cuanto más bajo es el contenido en cenizas, más bajo es el grado de extracción y mayor la calidad de la harina, ya que indica que contiene menos salvado.

**Calidad panadera** de las harinas que viene dada por

Gluten que es un medida indirecta del proteína .El gluten es el responsable de los alveolos del pan, ya que forma una red tridimensional que atrapa el CO<sub>2</sub> formado durante la fermentación del pan

Alveografo mide las propiedades reológicas de la harina. Simula el comportamiento de la masa imitando la formación de los alveolos originados por el CO<sub>2</sub> durante la fermentación producida por las levaduras. Se basa en la medida de la presión de aire requerida para inflar una burbuja de masa.

Para ello se mezcla una cantidad de harina agua y sal y se forma una lámina de masa. Posteriormente se insufla aire sobre la masa formando una burbuja que se rompe.

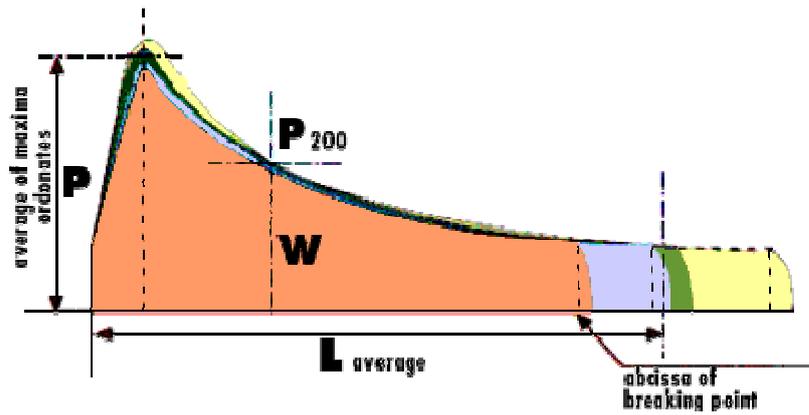
Con ello obtenemos un gráfico llamado alveograma y en él se encuentran los siguientes parámetros:

W es la fuerza de una harina y queda definida por el área bajo la curva.

P es la altura y nos da la capacidad de resistir a la deformación.

L es la extensibilidad, es la capacidad de la harina de ser estirada cuando se mezcla con agua.

P/L es el equilibrio de la masa



Índice de caída ya explicado anteriormente.

### 11. Bibliografía.

R.D 679/2016 Norma de calidad de las harinas, sémolas y otros productos de la molinenda de cereales.

Análisis nutricional de los alimentos Ed Acribia

Análisis de los alimentos Suzanne Nielsen.Ed Acribia

Química de los alimentos Salvador Badui Ed.Pearson

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 39**

### **PIENSOS Y SUS MATERIAS PRIMAS. COMPOSICION. DETERMINACIONES ANALITICAS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

1. Introducción.
2. Piensos y sus materias primas .Clasificación y definición.
3. Valor nutritivo de un pienso
4. Clasificación y composición de los alimentos.
5. Métodos de análisis
6. Bibliografía

MATERIAL NO OFICIAL

## PIENSOS Y SUS MATERIAS PRIMAS. COMPOSICION. METODOS DE ANALISIS.

### 1.-Introducción

La alimentación animal es la rama de la zootecnia que se ocupa del estudio de todos los aspectos encaminados a proporcionar la cantidad de sustancias nutritivas adecuadas para procurar un estado óptimo de los animales domésticos: Para ello se va a estudiar

- Valoración de las necesidades de los animales
- Valoración del contenido de nutrientes
- Racionamiento o forma de aportar la cantidad de alimentos necesarios para cubrir de forma óptima las necesidades de dichos animales.

### 2.-Piensos y sus materias primas. Clasificación y definición

El Reglamento (CE) 767/2009 sobre comercialización y utilización de piensos nos da las definiciones siguientes:

**Materia prima** son productos de origen animal o vegetal cuyo principal objetivo es satisfacer las necesidades nutritivas de los animales, en estado natural, fresco o conservado y los productos derivados de su transformación industrial así como las sustancias orgánicas e inorgánicas tanto si contienen aditivos como si no destinadas a la alimentación de los animales por vía oral, directamente como tales o transformados o en la preparación de piensos compuestos o como soporte de remezclas.

**Pienso compuesto** mezcla de al menos 2 materias primas para piensos tanto si contienen aditivos como si no para la alimentación de los animales por vía oral.

Dentro de los piensos compuestos distinguimos:

- **Piensos completos** es la mezcla de materias primas que por su composición sea suficiente para garantizar una ración diaria.
- **Piensos complementarios** las mezclas de alimentos que contengan porcentajes elevados de determinadas sustancias y que por su composición, solo garanticen la ración diaria si se asocian a otros alimentos para animales.

Otros tipos de piensos son:

**Piensos destinados a objetivos de nutrición específica** tienen el objetivo de satisfacer la necesidad nutritiva específica de los animales cuyo proceso de asimilación, absorción o metabolismo está afectado y por tanto, beneficiarse de la ingestión de un pienso adecuado para su estado

**Pienso medicamentoso** RD 1409/2009 toda la mezcla de premezclas medicamentosas y de piensos preparada previamente a su comercialización y destinada a ser administrada a los animales sin transformación, en razón de las propiedades curativas, preventivas o a otras propiedades de la premezcla.

**Pienso ecológico** Reglamento (CE) 834/2007 es pienso compuesto de ingredientes de la agricultura ecológica y sustancias agrarias naturales.

**Aditivos** el Reglamento 183/2003 los define como las sustancias, microorganismos y preparados con una función reconocida y deben ser autorizados por la reglamentación y publicados en el DOUE para poder ser comercializados.

**Preparados de aditivos** que contienen aditivos tecnológicos para conseguir una adecuada estabilidad del preparado como por ej. el caso de las vitaminas que incorporan antioxidante.

**Premezclas** son mezclas de uno o varios aditivos que pueden tener como soporte una o más materias primas y también agua. Una premezcla no se puede suministrar directamente a los animales ni tampoco a través del agua de bebida.

Formula del pienso requiere niveles adecuados de proteína, energía, vitaminas y minerales en su dieta la cual variara según la edad de cada animal, tamaño, peso y etapa de reproducción.

### **3.-Valor nutritivo de un pienso**

El valor nutritivo de un pienso es la capacidad que tiene para cubrir las necesidades de los animales, en función de su concentración e principios nutritivos, particularmente energía y proteína

La concentración energética depende de muchos factores, aumenta con su contenido en grasa, disminuye con el contenido en cenizas y habitualmente es el primer factor limitante de la producción ganadera pues condiciona en gran medida la ingesta, la productividad y el índice de transformación de la ración por el animal

En cuanto al contenido a proteínas es igualmente esencial para la producción ganadera pues un déficit implica una limitación a nivel de la producción de los animales y una menor eficacia en la utilización de la ración

Por otro lado la cantidad de minerales y vitaminas es sumamente variable en los piensos e independiente de su valor energético y proteico. Las dietas deben contener unas cantidades mínimas cuya proporción puede formularse en el pienso según el nivel de producción

Por tanto para que un animal este correctamente alimentado, debe ingerir diariamente una determinada cantidad de energía, que a su vez debe estar equilibrada en proteína, grasa en hidratos de carbono (azúcares, almidón, celulosa, hemicelulosa) Además tendrá que ingerir agua, vitaminas y minerales.

### **4.-Clasificación y composición de los alimentos para el ganado**

Aunque cada animal utiliza de forma distinta los diferentes tipos de alimentos, para todos y en general se puede hacer una clasificación básica de los alimentos fundamentada en el contenido de nutrientes por unidad de peso, a modo de densidad nutritiva, muy relacionado con la composición química y según que fracción de nutrientes predomine sobre otros.

Así tenemos

**A-Alimentos de volumen o groseros** ocupan mucho volumen y poco valor nutritivo .Podemos distinguir en este grupo los alimentos fibrosos y los alimentos succulentos.

A.1- Alimentos fibrosos con alto contenido en fibra que solo puede ser aprovechado por los rumiantes. Podemos destacar aquí los forrajes de los cuales entran a formar parte todas las partes fibrosas de las plantas que son aprovechables por los rumiantes y otros herbívoros.

Dependiendo de su tipo de conservación tenemos: henos, ensilados, forrajes verdes, subproductos fibrosos

A.2-Alimentos groseros succulentos con alto contenido en humedad (> 80%) pero bajo contenido en fibra.

Básicamente se engloba dentro de este grupo las raíces y tubérculos (nabo, zanahoria...) y gramíneas y leguminosas en estados vegetativos muy temprano y siempre que se consuman frescos. Se trata de alimentos de muy alto valor nutritivo si descontamos el agua que contienen, tienen una cantidad de energía similar a los alimentos concentrados si lo referimos a materia seca. Su contenido en materia seca y fibra bruta es bajo pero se incluyen dentro de este grupo porque los animales necesitan ingerir gran cantidad para saciar su apetito.

B- Alimentos concentrados se denominan así porque tienen gran cantidad de elementos nutritivos en relación a su peso: Aquí se incluyen todos los granos de cereales y sus harinas, los granos de leguminosas .los de oleaginosas, las tortas o harinas de oleaginosas y todos los piensos compuestos

Estos alimentos se utilizan de forma común en el racionamiento de animales monogástricos y para complementar las dietas forrajeras de rumiantes altamente productores. Tienen un bajo contenido en humedad y se conservan bastante bien, Tienen un bajo contenido en fibra.

Atendiendo al contenido general de nutrientes y a que tipo predomina en los mismos se pueden clasificar en:

B, 1-Alimentos energéticos

B.2-Alimentos proteicos

B.3-Alimentos equilibrados generalmente son piensos compuestos destinados a la producción

B.4-Alimentos correctores y minerales aportan minerales necesarios para equilibrar los minerales en las distintas dietas del ganado: Se pueden incluir aquí otros productos que contiene vitaminas o aminoácidos esenciales que permiten corregir las deficiencias que de estos nutrientes puedan existir en las dietas.

Cualquier alimento contiene:

- Agua
- Elementos minerales
- Materia orgánica (proteína, grasa, hidratos de carbono).

La proporción en cada uno de estos componentes es muy variada según el tipo de alimento. Así por ejemplo, el contenido de agua puede variar desde un 85% en una hierba joven s solo un 10% en un pienso compuesto; una harina de carne o de pescado puede contener un 70% de proteína y la paja de un cereal solo un 3%.

### **5.-Métodos de análisis**

Se realiza siguiendo el sistema analítico llamado análisis inmediato o análisis de Weende .En este sistema de análisis los alimentos se dividen en seis fracciones:

1-Humedad se determina mediante desecación en estufa a 103º durante 4 horas.

2-Cenizas Las cenizas están consideradas, de forma general, como el residuo inorgánico de una muestra que se obtiene al incinerar la muestra seca a 550ºC. Están constituidas por óxidos, carbonatos, fosfatos y sustancias minerales.

3-Proteína bruta Para la determinación analítica del contenido en proteína total o “proteína bruta”, se determina por lo general el contenido de nitrógeno tras eliminar la materia orgánica con ácido sulfúrico, calculándose finalmente el contenido de proteína con ayuda de un factor (en general 6,25.

En el tratamiento Kjeldahl de alimentos no se determinan sólo proteínas o aminoácidos libres, sino también ácidos nucleicos y sales de amonio. También se determina el nitrógeno ligado de compuestos aromáticos, como pirazina, ciclopentapirazina, pirrol y oxazol, así como el nitrógeno orgánico ligado de las vitaminas, tales como la B<sub>1</sub> (tiamina), la B<sub>2</sub> (riboflavina) y la nicotinamida.

No obstante, como por lo general los alimentos sólo contienen cantidades traza de compuestos aromáticos nitrogenados y de vitaminas, el error así cometido se considera despreciable. Además, por este método no se determinan el nitrógeno nítrico, el cianhídrico, el de la hidracina, ni el del grupo azo, por lo cual el método es particularmente interesante y relativamente específico para la determinación de las proteínas.

4-Extracto etéreo (EE) o Grasa bruta (GB). Método Soxhlet Extracción de los materiales liposolubles de la muestra con éter de petróleo con pesada posterior del extracto tras la evaporación del disolvente.

Con materias de origen vegetal se hace referencia siempre a EE y no a GB ya que, además de grasa, el éter extrae importantes cantidades de pigmentos vegetales, ceras, etc. Con muestras de origen animal, es conveniente preceder la extracción con una hidrólisis ácida.

5-Fibra bruta (FB). La técnica determina el residuo que persiste después de dos hidrólisis sucesivas, una ácida y otra alcalina. En cierto modo, intenta simular el ataque gástrico e intestinal que se produce *in vivo*. Es una fracción que se encuentra únicamente en las muestras de origen vegetal; las de origen animal han de contener cantidades inferiores a un 2%.

Sistema Van Soest.

Sin embargo, durante los últimos años, los nutricionistas del ganado han empleado la fibra detergente neutra (FDN), la fibra detergente ácida (FDA) y la lignina detergente ácida (LDA) como indicadores de la energía dietética y de la ingesta, especialmente para las raciones de los rumiantes.

Los nutricionistas del ganado han empleado la fibra detergente neutra (FDN), la fibra detergente ácida (FDA) y la lignina detergente ácida (LDA) como indicadores de la energía dietética y de la ingesta, especialmente para las raciones de los rumiantes.

Como resultado de ello, estas fracciones de fibra han sustituido las formulaciones de la ración de fibra cruda (FC) en numerosas partes del mundo. Hoy en día, los valores de la FDA y la FDN se utilizan con frecuencia para calcular la cantidad de forraje que pueden digerir los animales, los nutrientes digeribles totales y otros valores energéticos, además del valor de pienso relativo (un índice que se utiliza para repartir el forraje correcto para el rendimiento específico del animal) para determinar el precio del heno y evaluar las capacidades de gestión del forraje, cosecha y almacenamiento. El sistema detergente para el análisis del pienso lo desarrolló Peter Van Soest en el Departamento de agricultura estadounidense en la década de los 60 y es, hoy en día, uno de los conjuntos más importantes de ensayos de pienso de la nutrición de los rumiantes, aunque también cada vez más de la investigación de los no rumiantes.

. El concepto subyacente al análisis de la fibra detergente es que las células vegetales se pueden dividir en paredes celulares menos digeribles (compuestas por hemicelulosa, celulosa y lignina) y en contenidos celulares principalmente digeribles (compuestos por almidón y azúcares) Estos dos componentes se pueden separar utilizando dos detergentes: uno neutro y uno ácido. La fibra detergente neutra es un buen indicador del volumen y, en consecuencia, de la ingesta de pienso.

La fibra detergente ácida es un buen indicador de la digestibilidad y, en consecuencia, de la ingesta energética. En resumen, con el método van Soest, se realizaron mejoras para reducir los errores de las recuperaciones pobres de hemicelulosa y lignina. El método permite fraccionar secuencialmente las fracciones de fibra en FDN, FDA y LDA, Lignina detergente ácida (consulte la figura 1) y, en consecuencia, es un mejor método para calcular, por ejemplo, la ingesta energética de los animales procedente de pienso

El Reglamento 152/2009 establece los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos.

## **6.- Bibliografía**

Nutrición animal de McDonald 5ª edición

Nutrición y alimentación del ganado: Carlos de Blas

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 40**

**PRODUCTOS FERTILIZANTES. COMPOSICIÓN. CLASIFICACIÓN.  
DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. PRODUCTOS FERTILIZANTES**

### **2. COMPOSICIÓN**

- 2.1. Nutrientes principales
- 2.2. Nutrientes secundarios
- 2.3. Micronutrientes
- 2.4. Formulación
- 2.5. Tolerancias

### **3. CLASIFICACIÓN**

### **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

- 4.1. Nitrógeno
- 4.2. Fósforo
- 4.3. Potasio
- 4.4. Otras determinaciones

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. PRODUCTOS FERTILIZANTES.

Los productos fertilizantes y abonos están regulados por la normativa europea y nacional.

El 19 de junio de 2019 se publicó el **Reglamento (UE) 2019/1009** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019, por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) n.º 1069/2009 y (CE) n.º 1107/2009 y se deroga el **Reglamento (CE) n.º 2003/2003**. Este reglamento se aplica a partir del **16 de julio de 2022**, fecha desde la cual, de acuerdo con lo previsto en su artículo 51, queda derogado el Reglamento (CE) n.º 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 2003 relativo a los abonos.

A nivel nacional los fertilizantes y abonos están regulados por el **Real Decreto 506/2013**, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes.

Según este Real Decreto (R.D.), un **producto fertilizante** es aquel “utilizado en agricultura o jardinería que, por su contenido en nutrientes, facilita el crecimiento de las plantas, aumenta su rendimiento y mejora la calidad de las cosechas o que, por su acción específica, modifica, según convenga, la fertilidad del suelo o sus características físicas, químicas o biológicas. Se incluyen en esta definición los abonos, los productos especiales y las enmiendas.

Además, deberá estar incluido en algún grupo de los fertilizantes incluidos en el Anexo I de dicho R.D. y deberá cumplir los siguientes **requisitos**:

- Que aporte nutrientes a las plantas de manera eficaz o mejore las propiedades del suelo.
- Que se disponga, para el producto, de métodos adecuados de toma de muestras, de análisis y de ensayo para poder comprobar sus riquezas y cualidades.
- Que, en condiciones normales de uso, no produzca efectos perjudiciales para la salud y el medio ambiente.

Un **abono o fertilizante** “es un producto cuya función principal es proporcionar elementos nutrientes a la planta”.

## 2. COMPOSICIÓN.

Las plantas son capaces de captar el carbono, hidrógeno y oxígeno procedentes del aire y el agua, pero necesitan otros elementos químicos esenciales para el desarrollo de la vida vegetal y el crecimiento de las plantas. Los fertilizantes contienen esos elementos químicos que son clasificados como:

- Los **nutrientes principales** son el N, el P y el K.
- Los **nutrientes secundarios** son el Ca, Mg, Na y S.
- Los **micronutrientes** son el B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo y Zn.

Algunos nutrientes pueden encontrarse **quelados o complejados** al encontrarse ligados a moléculas reconocidas como agentes quelantes o como agentes complejantes, respectivamente.

## 2.1. Nutrientes principales

### 2.1.1. Nitrógeno

Las plantas contienen entre un 1-3% de nitrógeno en su estructura.

El nitrógeno es un elemento esencial para la formación de aminoácidos esenciales, que por la unión de enlaces péptidos forman las proteínas, sustancias que son parte de los tejidos vegetales. Las proteínas son indispensables a la vida de las plantas y de los animales. El nitrógeno también es parte de compuestos del metabolismo, como la clorofila y los alcaloides, así como de muchas hormonas, enzimas y vitaminas. Todos estos procesos se producen en la planta con gasto de energía ATP y  $NADPH_2$ . La planta absorbe nitrógeno por medio de sus raíces en estado mineral, nítrico y amoniacal.

El 90-95% del nitrógeno del suelo está en forma orgánica, pero en los fertilizantes se puede encontrar en forma nítrica, amoniacal, amídica (cianamídica y uréica) y orgánica.

### 2.1.2 Fósforo

Las plantas contienen de 0,3-3% de fósforo en su estructura. Es un elemento fundamental debido a que forma parte de la estructura básica de la energía química ATP, el cual es utilizado en la fase oscura para la asimilación de  $CO_2$  y la formación de azúcares como la glucosa. Sin este elemento el desarrollo y crecimiento de la planta no existiría. Además, forma parte de ciertas enzimas, proteínas, fosfolípidos, ARN y ADN; el ATP participa en varias reacciones de transferencia de energía, el ARN y el ADN son componentes de la información genética; también el fósforo forma parte del ácido fítico presente en las semillas. El fósforo está disponible en el suelo en forma de iones fosfóricos monovalente ( $H_2PO_4^-$ ), bivalente ( $HPO_4^{2-}$ ) y trivalente ( $PO_4^{3-}$ ).

El **Fósforo asimilable** por la planta es el fósforo soluble en agua y citrato amónico neutro (iones mono y bivalentes). Y el **Fósforo soluble en los ácidos minerales** es la suma de los tres iones.

### 2.1.3. Potasio

Las plantas contienen entre un 0,05 y 1,0 % de potasio en su estructura. Es un activador de procesos metabólicos los cuales implican la conservación del agua en la planta y la presión de la turgencia de las células, mediante la apertura y cierre estomático. También promueve la acumulación y traslado de los carbohidratos elaborados en las hojas hacia los órganos de reserva de las plantas. El potasio se absorbe por la planta en forma de ión potasio  $K^+$

Los fertilizantes potásicos son predominantemente sales solubles en agua, en forma de cloruros, sulfatos, nitratos y fosfatos. Algunos abonos y enmiendas orgánicas contienen potasio que forma compuestos insolubles.

## 2.2. Nutrientes secundarios

- Calcio (expresado como CaO): es esencial para el crecimiento de las raíces y como un constituyente del tejido celular de las membranas.
- Magnesio (expresado como MgO en fertilizantes): Es el constituyente central de la clorofila.
- Sodio (expresado como Na<sub>2</sub>O):
- Azufre (expresado como SO<sub>3</sub>): es un constituyente esencial de proteínas y también está involucrado en la formación de la clorofila.

## 2.3. Micronutrientes

Son parte de sustancias claves en el crecimiento de la planta, siendo comparables con las vitaminas en la nutrición humana. Son absorbidos en cantidades minúsculas, su rango de provisión óptima es muy pequeño. El contenido en B, Cu, Co, Fe, Mn, Mo y Zn se pueden garantizar según la solubilidad:

- Total
- En agua
- Quelada
- Complejada

## 2.4. Formulación

Los fertilizantes se designan mediante la fórmula NPK, con uno, dos o tres números que representan la riqueza de cada elemento fertilizante, normalmente expresada en % en masa del producto: NPK → XX – YY – ZZ

Siendo:

XX: % en masa de Nitrógeno

YY: % en masa de Fósforo (en forma de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)

ZZ: % en masa de Potasio (en forma de K<sub>2</sub>O)

El **contenido declarado en nutrientes principales y secundarios** se indica en la fórmula con números enteros. El **contenido declarado en micronutrientes** se designa con su símbolo químico y con los decimales indicados en la legislación.

Los **nutrientes secundarios** deben declararse siempre y cuando estén presentes en las cantidades mínimas:

- 2% de óxido de calcio (CaO),
- 2% de óxido de magnesio (MgO),
- 3% de óxido de sodio (Na<sub>2</sub>O),
- 5% de trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>).

Por ejemplo: Se trata de un abono órgano-mineral NPK, producto sólido que contiene las siguientes riquezas: 10% de carbono (C) orgánico; 7% de nitrógeno (N) total, 5% de nitrógeno (N) orgánico, 2% de nitrógeno (N) amoniacal; 10% de pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) soluble en citrato amónico neutro y en agua; 7% de

óxido de potasio ( $K_2O$ ) soluble en agua; 3% de óxido de calcio ( $CaO$ ) soluble en agua; 2,4% de óxido de magnesio ( $MgO$ ) soluble en agua; 0,1% de hierro ( $Fe$ ) total; 0,02% de zinc ( $Zn$ ) total.

La denominación será: *ABONO ÓRGANO-MINERAL NPK (Ca-Mg) 7-10-7 (3 – 2,4) con hierro (Fe) y zinc (Zn)*

El anexo II del RD 506/2013 establece las disposiciones generales de identificación y etiquetado de los productos fertilizantes.

### 2.5. Tolerancias

El anexo III del RD 506/2013 establece las tolerancias para los productos fertilizantes; indicadas como las diferencias admisibles entre el valor encontrado en el análisis del contenido de un elemento o de otra característica específica, con respecto a su valor declarado.

Los márgenes de tolerancia incluidos son valores negativos (por defecto) de porcentaje en masa.

En todos los productos fertilizantes, la tolerancia admisible será también positiva (valores por exceso), en magnitudes equivalentes al doble de lo establecido para las tolerancias por defecto que se especifican.

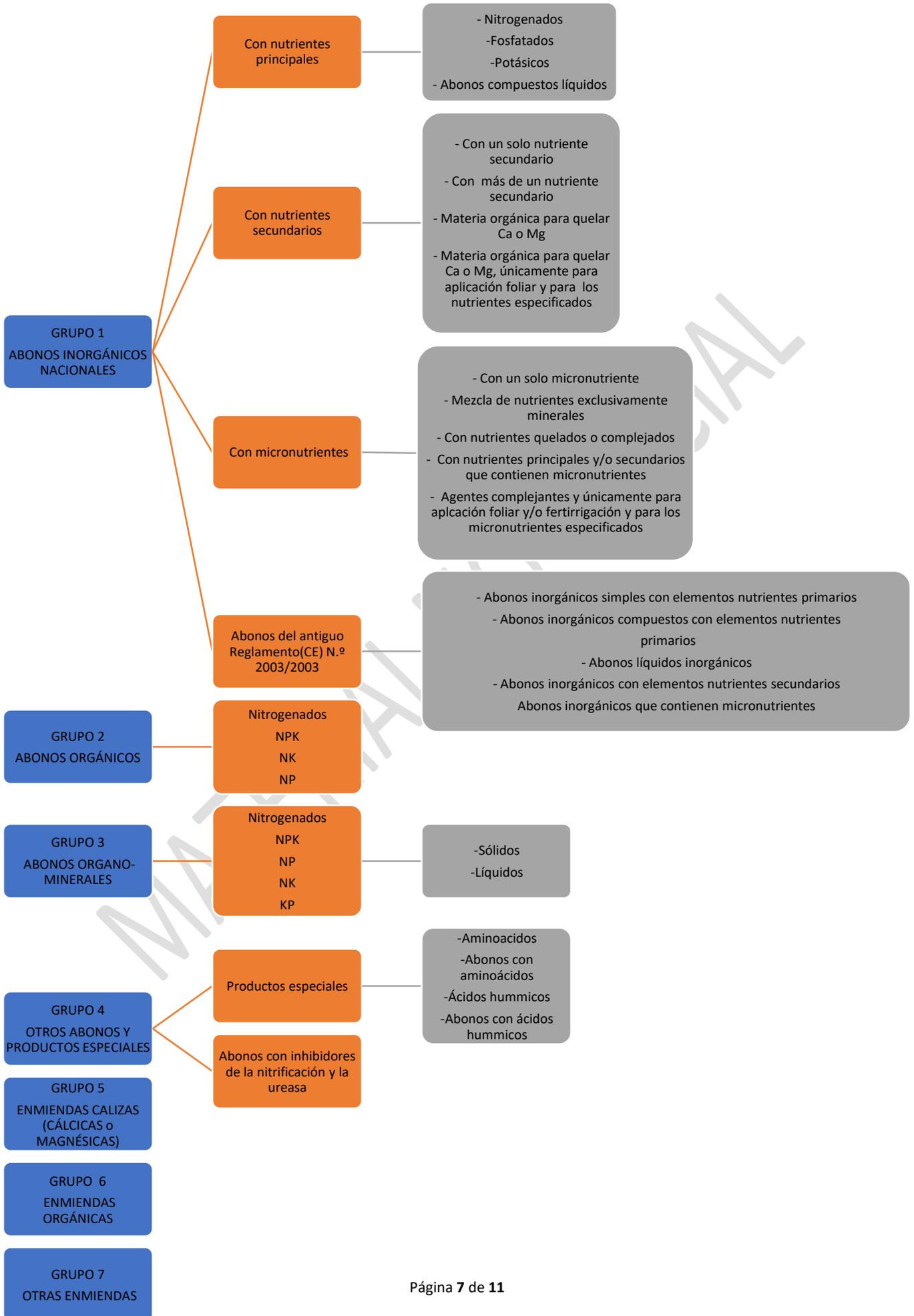
El fabricante no podrá beneficiarse sistemáticamente de los márgenes de tolerancia que figuran en la legislación

No se admite tolerancia alguna en los contenidos mínimos y máximos.

## 3. CLASIFICACIÓN

El Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes, clasifica, en su anexo I los tipos de fertilizantes autorizados. La Orden APA/104/2022, de 11 de febrero modifica el anexo I de dicho real decreto, creando un apartado 4 en el grupo 1 con el fin de incluir la mayoría de los diferentes tipos de abonos inorgánicos del anexo I del Reglamento 2003/2003 del Parlamento Europeo. La anterior nomenclatura “Abono CE” se sustituye por “Abono del grupo 1.4”

La clasificación queda cómo indica la siguiente tabla.



En el Real Decreto 506/2013 se define **abono inorgánico** o **abono mineral** como el “abono obtenido mediante extracción o mediante procedimientos industriales de carácter físico o químico, cuyos nutrientes declarados se presentan en forma mineral. Por convenio, la cianamida cálcica, la urea y sus productos de condensación y asociación y los abonos minerales que contienen nutrientes quelados o complejados se clasifican como abonos inorgánicos”.

El Real Decreto 506/2013 hace referencia al **abono CE** definido como “el abono inorgánico pertenecientes a uno de los tipos que figuran en el anexo I del Reglamento (CE) nº 2003/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de octubre de 2003, relativo a los abonos”. Esa denominación cómo se ha indicado anteriormente se ha modificado por “**Abono del grupo 1.4**”

El **abono inorgánico nacional** se refiere a los “abonos inorgánicos no incluidos en el Reglamento (CE) nº 2003/2003, y que esté incluido en el grupo 1 del anexo I del RD 506/2013”.

También se definen los **abonos orgánicos** que son los “productos cuya función principal es aportar nutrientes para las plantas, los cuales proceden de materiales carbonados de origen animal o vegetal”. Y los **abonos orgánicos-minerales** que son los “productos cuya función principal es aportar nutrientes para las plantas, los cuales son de origen orgánico y mineral, y se obtienen por mezcla o combinación química de abonos inorgánicos con materiales carbonados de origen animal o vegetal o abonos inorgánicos”.

Los **productos especiales** son “productos que aportan a otro material fertilizante, al suelo o a la planta, sustancias para favorecer y regular la absorción de los nutrientes o corregir determinadas anomalías de tipo fisiológico”.

Los abonos se pueden presentar en forma de líquido, en solución, en suspensión o hidrosolubles. Los abonos pueden ser simples, compuestos, complejos, de mezcla.

La definición de producto fertilizante establece que se consideren como tales los abonos, los productos especiales y las enmiendas. Una **enmienda** es “la materia orgánica o inorgánica, capaz de modificar o mejorar las propiedades y características físicas, químicas o biológicas del suelo, cuyos tipos se incluyen en los grupos 5, 6 y 7, del anexo I del RD 506/2013”. Pueden ser:

- **Enmiendas calizas:** es la enmienda que contiene Ca y/o Mg, esencialmente en forma de óxido, hidróxido, carbonato o silicato, utilizada principalmente para mantener o aumentar el pH del suelo o para modificar sus propiedades físicas.
- **Enmiendas orgánicas:** es la enmienda procedente de materiales carbonados de origen vegetal o animal, utilizada fundamentalmente para mantener o aumentar el contenido en materia orgánica del suelo, mejorar sus propiedades físicas y mejorar también sus propiedades o actividad química o biológica.
- **Otras enmiendas:** hace referencia a las utilizadas fundamentalmente para mejorar las propiedades físicas, químicas o biológicas del suelo.

#### 4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Los métodos analíticos de referencia están indicados en el anexo IV del Reglamento (CE) nº 2003/2003 y en el anexo VI del Real Decreto 506/2013.

Existe un amplio número de determinaciones debido a la variabilidad de la composición de los fertilizantes y es fundamental conocer el tipo de fertilizante a analizar para elegir las determinaciones y métodos de análisis correctos. Entre las determinaciones más comunes podemos encontrar:

##### 4.1. Nitrógeno

Detección de nitratos: El óxido nítrico producido por la reacción del ácido nítrico con sales ferrosas, en ácido sulfúrico concentrado, se une a un exceso de sal ferrosa originando un complejo de color pardo.

Nitrógeno Total: Se determina en abonos que contengan nitrógeno solamente en forma nítrica, amoniacal y ureica mediante dos métodos diferentes. Se emplea el Método **Kjendahl**. En caso de que en el producto fertilizante haya nitratos, hace falta un catalizador para la digestión Kjeldahl.

Nitrógeno amoniacal: Se determina en los productos fertilizantes minerales abonos nitrogenados y compuestos, en los que el nitrógeno se encuentre exclusivamente en forma de sales de amonio o de sales de amonio y de nitratos.

Se determina el nitrógeno amoniacal, liberando el amoníaco presente en el fertilizante, mediante la adición de hidróxido sódico y la posterior destilación. El exceso de ácido se valora con una solución de hidróxido de sodio o potasio.

Nitrógeno nítrico y amoniacal: Se emplea para abonos nitrogenados y compuestos, en los que el nitrógeno se encuentre exclusivamente en forma nítrica o en forma amoniacal y nítrica.

Se puede llevar a cabo la determinación por tres métodos: Método Ulsch, Método Arnd y Método Devarda

Nitrógeno ureico: Nitrógeno total en la urea. Se determina en los productos fertilizantes minerales, en la urea exenta de nitratos. La urea se transforma cuantitativamente en amoníaco por ebullición en presencia de ácido sulfúrico. El amoníaco obtenido se destila en medio alcalino y el destilado se recoge en un exceso de solución valorada de ácido sulfúrico. Se valora el exceso de ácido con una solución valorada alcalina.

##### 4.2. Fósforo

Fósforo soluble en agua: Extracción en agua por agitación en condiciones determinadas.

Fósforo soluble en Citrato amónico neutro: Extracción del fósforo a la temperatura de 65 °C por medio de una solución de citrato amónico neutro (pH = 7) en condiciones determinadas.

Determinación de Fósforo: Conversión a ortofosfato por medio de los procesos de descomposición de la materia orgánica e hidrólisis. El ortofosfato forma el complejo de molibdato-fosfato amarillo altamente coloreado por reacción con la solución de molibdovanadato y se cuantifica espectrofotométricamente a 450nm.

#### **4.3. Potasio**

Potasio soluble en agua (abonos minerales): El potasio de la muestra que se vaya a analizar se disolverá en agua. Después de eliminar o de fijar las sustancias que puedan afectar a la determinación, el potasio se precipitará en medio ligeramente alcalino, con un exceso de tetrafenilborato de sodio y se valora el exceso con solución de sal de amonio cuaternaria. También es posible analizarlo mediante ICP-AES

Potasio total (abonos orgánicos): Consiste en solubilizar el potasio insoluble en agua, tras calcinar y tratar con ácido clorhídrico y nítrico determinando el contenido total.

#### **4.4. Otras Determinaciones**

Cenizas: Determinación gravimétrica tras calcinación a 540°C.

Agua total: Gravimétricamente tras desecación en estufa a 100-130°C. No se puede emplear en abonos que contengan otros componentes volátiles.

Humedad en enmiendas calizas: Gravimétrico por desecación en 105°C.

Determinación de calcio: Mediante manganimetría del calcio extraído por precipitación en forma de oxalato.

Determinación de magnesio de las enmiendas calizas: mediante el método por espectrometría de absorción atómica.

Azufre: El azufre se oxida a sulfato empleando NaOH y peróxido de hidrógeno. A continuación, se precipita en forma de sulfato de bario empleando cloruro de bario. El precipitado se calina a 790°C y se pesa el residuo.

Determinación de magnesio: por espectrometría de absorción atómica o mediante complexometría.

Determinación de cobre: En abonos simples a base de nitrato amónico con alto contenido en nitrógeno, la muestra se disuelve en ácido clorhídrico diluido y el contenido en cobre se determina por espectrometría de absorción atómica

Cloruros: Determinación volumétrica empleando solución estandarizada de nitrato de plata y empleando cromato potásico como indicador.

Materia orgánica: Se determina la total por calcinación, sobre muestra natural. Se aplica a abonos organominerales con el lavado previo con ácido clorhídrico y a abonos orgánicos y a enmiendas orgánicas sin el lavado previo con ácido clorhídrico.

Metales pesados: Se determinan por absorción atómica o ICP-MS

Microbiológicas en orgánicos: Escherichia coli y Salmonella.

Determinación de Co, Cu, Fe, Mn y Zn empleando espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS)

Determinación de B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo y Zn utilizando ICP-AES

Aminoácidos: Se determinan mediante HPLC. Previamente se hacen reaccionar con el reactivo OPA (Ortoftalaldehído) y FNIC-Cl (fluorenil metil cloro formiato) para formar derivados fluorescentes (Derivación Precolumna).

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes.
- Orden APA/161/2020, de 20 de febrero, por la que se modifican los anexos I, III y VI del Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes.
- Reglamento (CE) n° 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 2003 relativo a los abonos
- Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019 por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) n°1069/2009 y (CE) n°1107/2009 y se deroga el Reglamento (CE) n° 2003/2003
- Orden de 1 de diciembre de 1981 por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aguas, aceites y grasas, carne y productos cárnicos, fertilizantes, productos fitosanitarios, leche y productos lácteos, productos orgánicos, fertilizantes, suelos y productos derivados de la uva y similares.
- Orden de 17 de septiembre de 1981 por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aceites y grasas, aguas, carnes y productos cárnicos, fertilizantes, productos fitosanitarios, leche y productos lácteos, piensos y sus primeras materias, productos orgánicos fertilizantes, plantas, suelos, productos derivados de la uva y similares y toma de muestras.
- Real Decreto 1110/1991, de 12 de julio, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de productos orgánicos fertilizantes.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 41**

**PRODUCTOS FITOSANITARIOS. CLASIFICACIÓN. MECANISMO DE ACCIÓN. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. PRODUCTOS FITOSANITARIOS**

- 1.1. Introducción
- 1.2. Composición
- 1.3. Tipos de formulados

### **2. MECANISMO DE ACCIÓN**

- 2.1. Insecticidas
- 2.2. Acaricidas
- 2.3. Fungicidas
- 2.4. Herbicidas
- 2.5. Rodenticidas

### **3. CRITERIOS DE CALIDAD**

### **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

- 4.1. Análisis de sustancias activas mediante cromatografía de líquidos con detector de matriz de diodos (LC-DAD)
- 4.2. Análisis de sustancias activas mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)
- 4.3. Determinación de ditiocarbamatos (determinación yodométrica)
- 4.4. Análisis de Azufre
- 4.5. Análisis de Cobre
- 4.6. Determinación de la humedad o contenido en agua (Método Karl-Fischer)
- 4.7. Determinación de Propiedades Físicas

## 1. PRODUCTOS FITOSANITARIOS.

### 1.1. Introducción

Según el artículo 2 del REGLAMENTO (CE) Nº 1107/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, se entiende por **productos fitosanitarios** a los productos que contengan o estén compuestos de sustancias activas, protectores o sinergistas, y que estén destinados a uno de los usos siguientes:

- Proteger los vegetales o los productos vegetales de todos los organismos nocivos o evitar la acción de estos, excepto cuando dichos productos se utilicen principalmente por motivos de higiene;
- Influir en los procesos vitales de los vegetales, como las sustancias que influyen en su crecimiento, pero de forma distinta de los nutrientes;
- Mejorar la conservación de los productos vegetales, siempre y cuando las sustancias o productos de que se trata no estén sujetos a disposiciones comunitarias especiales sobre conservantes;
- Destruir vegetales o partes de vegetales no deseados, excepto las algas, a menos que los productos sean aplicados en el suelo o el agua para proteger los vegetales;
- Controlar o evitar el crecimiento no deseado de vegetales, excepto las algas, a menos que los productos sean aplicados en el suelo o el agua para proteger los vegetales.

El citado Reglamento (CE) Nº 1107/2009, establece que una sustancia solo debe incluirse en un producto fitosanitario si se ha demostrado que presenta un beneficio claro para la producción vegetal y no cabe esperar que tenga efectos adversos en la salud humana o animal o efectos inaceptables sobre el medio ambiente. Se establecen unos criterios armonizados para todos los Estados miembros que deben aplicarse en la primera aprobación de una sustancia activa, así como en sus sucesivas renovaciones.

A su vez, los Reglamentos (UE) Nº 283/2013 y 284/2013 de la Comisión establecen los requisitos sobre datos aplicables a las sustancias activas y a los productos fitosanitario, respectivamente.

### 1.2. Composición

Los productos fitosanitarios pueden contener en su formulación sustancias activas, protectores, sinergistas, coformulantes y adyuvantes.

Las sustancias activas, como su nombre indica, son sustancias químicas, naturales o sintéticas, así como microorganismos que le confieren su acción fitosanitaria. Asimismo se debe atender a que el término "organismo nocivo" se refiere siempre a un agente biótico, bien patógeno o en todo caso capaz de producir plaga.

Las sustancias o preparados denominados protectores son añadidas a los productos fitosanitarios para eliminar o reducir los efectos fitotóxicos del producto fitosanitario en determinadas plantas.

Las sustancias sinergistas son sustancias que pueden aumentar la actividad de las sustancias activas de un producto fitosanitario.

Las sustancias coformulantes son los destinados a usarse en un producto fitosanitario o en un adyuvante, sin ser sustancias activas, ni protectores ni sinergistas.

Las sustancias adyuvantes son coformulantes, o preparados que contienen coformulantes, que se comercializan para que el usuario las mezcle con un producto fitosanitario, con el fin de mejorar la eficacia u otras propiedades plaguicidas.

Los productos fitosanitarios pueden contener una o varias sustancias activas, con concentraciones variables que se expresan en su etiquetado en %p/v o %p/p dependiendo de si el formulado es líquido o sólido.

### 1.3. Tipos de formulados

Atendiendo a la forma física de presentación de los formulados fitosanitarios, se pueden clasificar en materiales y productos técnicos, formulaciones sólidas, formulaciones líquidas y dispositivos formulados y/o preparados. Algunos de los formulados de los distintos tipos son, entre otros:

- Materiales técnicos (TK) y productos técnicos (TC)
- Formulaciones sólidas:
  - Para uso directo: Polvos secos (DP), Granulados (GR)
  - Para uso en dispersión: Gránulos dispersables en agua (WG), Polvos mojables (WP), Polvos mojables en bolsas hidrosolubles (WP-SB)
  - Para disolución en agua: Polvos solubles en agua (SP), Gránulos solubles en agua (SG), Tabletas solubles en agua (ST)
- Formulaciones líquidas:
  - Soluciones simples: Concentrados solubles (SL), Líquidos miscibles en aceite (OL), Líquidos de ultra-bajo volumen (UL)
  - Soluciones para dispersión: Concentrados emulsionables (EC), Concentrados dispersables (DC)
  - Emulsiones: Emulsión aceite en agua (EW), Microemulsiones (ME)
  - Suspensiones: Suspensiones concentradas (SC), Suspensiones encapsuladas (CS), Dispersión en aceite (OD)
  - Formulaciones líquidas de carácter múltiple: Suspo-emulsiones (SE)
- Dispositivos formulados y/o preparados: Espirales para mosquitos (MC), Dispensadores de aerosoles (AE), Mallas o redes tratadas con insecticidas de larga duración (LN), Bolsas de almacenamiento tratadas de larga duración (LB)

## **2. MECANISMOS DE ACCIÓN.**

### **2.1. Insecticidas**

- **Organoclorados:** contienen cloro en su molécula. No se conoce con precisión el mecanismo de acción tóxica, pero provoca alteraciones nerviosas, temblores y parálisis de los insectos. Insecticidas como el DDT o el HCH pertenecen a este grupo, siendo de los primeros en descubrirse. Son insecticidas prohibidos, con elevada persistencia, especificidad polivalente y se acumulan en los tejidos grasos. Pertenecen a este grupo insecticidas como el lindano, endosulfan, aldrín, etc.
- **Organofosforados:** son los derivados del ácido fosfórico. Actúan en los insectos a nivel del sistema nervioso inhibiendo la producción de la acetilcolinesterasa, lo que provoca la autoacumulación de la acetilcolina que terminan por autoenvenenar al insecto. Pertenecen a este grupo: malatión, fenitrotión, metil azinfos, dimetoato, clorpirifos, metil-pirimifos, etc. Algunos de estos insecticidas son muy reactivos con macromoléculas biológicas como las proteínas y ácidos nucleicos, provocando efectos mutagénicos.
- **Carbamatos:** son los derivados del ácido carbámico. Al igual que los organofosforados son inhibidores de la acetilcolinesterasa y no son acumulativos. Presentan una gran versatilidad en uso fitosanitario, pudiendo actuar como insecticidas fungicidas o herbicidas, gracias al poder de sustitución de radicales de distinto tipo. Son carbamatos el Carbaril, aldicarb, metiocarb, pirimicarb o metomilo, entre otros.
- **Piretroides:** Son Inhibidores del flujo de iones en los canales de sodio y potasio. Actúan sobre el sistema nervioso provocando agitación que desemboca en una parálisis general. Algunos piretroides son Cipermetrina, deltametrina, lambda cihalotrin.
- **Neonicotenoides:** Son miméticos de la acetilcolina. Ej: acetamiprid, imidacloprid
- **Reguladores de la hormona juvenil:** Inhiben la de formación de quitina. Ej: Clorfluazurón, teflubenzurón.

### **2.2. Acaricidas**

Son los productos que se utilizan para matar ácaros. Suelen ser derivados químicos del estaño, sulfoorgánicos, halogenados o dinitros. Muchos insecticidas y fungicidas poseen acción acaricida (como la abamectina, aldicarb o el azufre).

### **2.3. Fungicidas**

Son los productos que sirven para combatir los hongos, actuando mediante la alteración del metabolismo del hongo (cobre, fenoles, orgánicos aromáticos, quinonas, oxativas y derivados fosfóricos) o su estructura celular (azufre, thiuran, dodina, imidazoles. Los primeros incluyen el cobre, fenoles, etc). Otros pueden tener ambas acciones según el compuesto, como los ditiocarbamatos (zineb, maneb y mancozeb)

## 2.4. Herbicidas

Son productos con varios mecanismos de acción para el control de malas hierbas:

- Herbicidas activos sobre respiración celular: derivados fenólicos
- Herbicidas que bloquean la fotosíntesis: triazinas, ureas, uracilos
- Herbicidas que alteran síntesis de proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos: imidazolinonas, sulfonilureas, glifosato
- Herbicidas que modifican la división celular: fenoxiderivados y carbamatos.

## 2.5 Rodenticidas

Suele tratarse de anticoagulantes por bloqueo de la vitamina K1, que impide la síntesis de la protrombina. También pueden actuar como tóxicos para el sistema nervioso hipnóticos. Los rodenticidas inorgánicos como el fosforo de aluminio o de zinc, son precursores de fosforo de hidrógeno (PH<sub>3</sub>), que se trata de un gas muy tóxico para los animales y el ser humano.

## 3. CRITERIOS DE CALIDAD

Los criterios de calidad de los productos fitosanitarios son regulados por FAO (La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) mediante la publicación de especificaciones en su "Manual sobre la elaboración y uso de las especificaciones de plaguicidas de la FAO y la OMS". Existen unas especificaciones generales que regulan las **tolerancias** en el contenido de sustancia activa en los formulados fitosanitarios. La diferencia entre el contenido indicado en el etiquetado y el contenido real de sustancia activa en el producto fitosanitario deberá cumplir lo indicado en la siguiente tabla.

| Contenido declarado en g/kg o g/l a 20 ± 2 °C                  | Tolerancia   |
|--|--|
| hasta 25   | ± 15% del contenido declarado para formulaciones "homogéneas" (EC, SC, SL, etc.), <u>o</u><br>± 25% para formulaciones "heterogéneas" (GR, WG, etc.) |
| Superior a 25 y hasta 100                                      | ± 10% del contenido declarado  |
| Superior a 100 y hasta 250                                     | ± 6% del contenido declarado   |
| Superior a 250 y hasta 500                                     | ± 5% del contenido declarado   |
| Superior a 500   | ± 25 g/kg or g/l   |
| <b>Nota</b> En cada intervalo está incluido el límite superior |  |

FAO ha publicado especificaciones técnicas para algunos formulados fitosanitarios en lo referente a su contenido en **impurezas relevantes y propiedades físicas**.

Dependiendo del tipo de formulado, se requiere controlar distintos parámetros y propiedades físicas como son el contenido en agua, pH, acidez/basicidad, persistencia de la espuma, estabilidad de la emulsión, suspensibilidad, estabilidad de la solución, humectabilidad, etc.

También es necesario realizar **pruebas de estabilidad de almacenamiento prolongado**, para determinar la estabilidad de las sustancias activas. Tras su almacenamiento durante 14 días a 54°C se reanalizan las muestras para determinar el contenido en sustancia activa, el cual no debe haberse reducido en un porcentaje mayor al indicado en las especificaciones técnicas correspondientes.

#### Impurezas relevantes

Cualquier **impureza** capaz de crear un efecto adverso, por encima o más allá de un ingrediente activo, es potencialmente relevante y por lo tanto debe tener una especificación para su control. Estos efectos adversos pueden reflejar los peligros tóxicos o no tóxicos. Sin embargo la relevancia no está determinada solo por los peligros presentados por una impureza. Una impureza potencialmente relevante puede ser designada como no-relevante si la evidencia disponible indica que no hay probabilidad significativa que sus peligros se manifiestan en la práctica.

Los límites adoptados son el resultado estudios científicos de cada caso. El asesoramiento de expertos de la OMS u otra fuente autorizada siempre será tomado en cuenta. En ausencia de datos u otra información normalmente se adoptará los criterios de clasificación de la GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) para las mezclas como límites máximos por defecto aceptables para las impurezas relevantes: 10g/kg para irritantes de los ojos y la piel y 1 g/kg para la sensibilización a los productos químicos, mutágenos, cancerígenos y tóxicos para la reproducción.

Por otro lado, el Reglamento (CE) Nº 1107/2009 en su Anexo III establece la lista coformulantes no permitidos en productos fitosanitarios, y que por lo tanto no deben estar presentes en ningún producto comercializado.

#### **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

CIPAC (Collaborative International Pesticides Analytical Council) es una organización no gubernamental y sin ánimo de lucro, que se encarga de validar y publicar métodos de análisis de sustancias activas de productos fitosanitarios. Se encarga de promover el acuerdo internacional sobre métodos para el análisis de plaguicidas y métodos de prueba físico-químicos para formulaciones y de programas de **ensayos colaborativos** para la evaluación de métodos de análisis.

Los manuales de CIPAC contienen métodos de análisis para un amplio número de sustancias activas y de métodos de ensayo de propiedades físico-químicas de productos fitosanitarios. Son manuales en constante transformación debido al desarrollo de nuevos métodos de análisis para distintas sustancias activas. Cuando no existe método CIPAC o AOAC para una determinada sustancia activa, el laboratorio puede desarrollar su propio método de análisis siguiendo el proceso indicado en la guía CIPAC para validación de métodos analíticos de formulados.

##### **4.1. Análisis de sustancias activas mediante cromatografía de líquidos con detector de matriz de diodos (LC-DAD)**

Es el método de análisis más habitual para la determinación del contenido en sustancias activas en formulados fitosanitarios. La mayor parte de los productos fitosanitarios se analizan mediante LC en fase reversa con una columna apolar y fases móviles polares (metanol, acetonitrilo, agua o disoluciones acuosas ligeramente ácidas). Un pequeño grupo de sustancias activas se analizan mediante LC en fase normal, empleando fases móviles apolares como isooctano, n-hexano, 2-propanol, etc. El detector más habitual es el de matriz de diodos (DAD) con el que se obtiene un espectro UV-visible de las sustancias que eluyen a través de la columna.

Se preparan diluciones de los formulados en los disolventes apropiados (normalmente similares a la fase móvil) y se determina el contenido en sustancia activa mediante comparación de áreas de los picos cromatográficos con soluciones preparadas de estándares analíticos de riqueza certificada.

Este método permite la comparación de espectros de las sustancias activas que contienen los formulados fitosanitarios con el espectro de los estándares analíticos.

#### **4.2. Análisis de sustancias activas mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)**

El análisis de formulados fitosanitarios mediante CG-FID es menos habitual que mediante LC-DAD. En este caso las sustancias son volatilizadas en el inyector y a continuación son arrastradas con un gas portador a través de una columna capilar. Las distintas sustancias eluyen a distintos tiempos dependiendo de la temperatura, tipo de relleno de la columna y su afinidad por la sustancia.

Como en LC-DAD, el contenido en sustancia activa de los formulados se realiza por calibración indirecta con soluciones de estándares analíticos, tras su dilución en acetona, hexano, acetonitrilo, etc.

#### **4.3. Determinación de ditiocarbamatos (determinación yodométrica)**

Se descompone el ditiocarbamato a sulfuro de carbono, en medio ácido y caliente (a reflujo), y se recoge en potasa metanólica para formar un xantato que se valora con yodo.

#### **4.4. Análisis de Azufre**

Se realiza por reflujo y posterior valoración. El azufre es transformado a tiosulfato sódico mediante reflujo con sulfito sódico. Posteriormente el tiosulfato sódico obtenido se valora con una solución estándar de iodo.

#### **4.5. Análisis de Cobre**

- a) Método volumétrico: Valoración del iodo liberado por la acción del ión cúprico, sobre un ioduro en medio acético, con disolución de tiosulfato sódico de normalidad conocida.
- b) Método electrolítico (método de referencia): El Cu que está tanto en forma libre como formando compuestos, se convierte en sulfato de cobre y se determina electrolíticamente.

#### **4.6. Determinación de la humedad o contenido en agua (Método Karl-Fischer)**

Es un método volumétrico de aplicación general. Los productos fitosanitarios tienen un bajo contenido en agua. Este método es para determinar tanto el contenido en agua libre como unida químicamente.

Se basa en la reacción entre el  $I_2$  y el  $SO_2$ , reacción que consume una cantidad estequiométrica de agua. Este procedimiento implica el consumo de un mol de  $I_2$  y un mol de  $SO_2$  por cada mol de agua presente en el medio de reacción. En la práctica, se trabaja en exceso de dietanolamina, metanol y  $SO_2$ , de forma que es la cantidad de  $I_2$  añadida la que permite determinar la cantidad de agua. La detección del punto final puede realizarse amperométricamente.

#### **4.7. Determinación de Propiedades Físicas**

Existe un amplio número de métodos para determinar las características físicas de los distintos tipos de formulados existentes, redactadas y revisadas por CIPAC. Algunas de las determinaciones más habituales son:

- a) Acidez/alcalinidad: Están expresadas como los g/kg de  $H_2SO_4$  y  $NaOH$ , respectivamente, para neutralizar una cantidad de formulado determinada.
- b) pH del formulado o de una dilución al 1% p/v en agua
- c) Densidad relativa: Method A.3 Relative density. La densidad se puede determinar mediante picnómetro, densimetría electrónica, balanza hidrostática e hidrómetro.
- d) Estabilidad: Determina la estabilidad de la sustancia activa tras su almacenamiento a 54 °C durante 14 días. Las condiciones alternativas son: 6 semanas a  $45 \pm 2$  °C; 8 semanas a  $40 \pm 2$  °C; 12 semanas a  $35 \pm 2$  °C ó 18 semanas a  $30 \pm 2$  °C
- e) Humectabilidad: Se mide el tiempo necesario para que una cierta cantidad de muestra sea completamente mojada.
- f) Persistencia de la espuma: El experimento simula la cantidad de espuma que produce la preparación de un producto tras su dilución en agua. Se mide la espuma creada tras el transcurso de 1 y 12 min.
- g) Suspensibilidad: Se determina la cantidad de sustancia activa que se mantiene en suspensión tras su disolución en agua y transcurrido un tiempo determinado. Es necesario que los productos fitosanitarios preparados en caldos de tratamiento queden suspendidos en el agua y tarden en depositarse en el fondo de los tanques.
- h) Espontaneidad de la dispersión: e determina la cantidad de sustancia activa que se mantiene en suspensión tras su disolución en agua y transcurrido un tiempo determinado. Es necesario que los productos.
- i) Emulsionabilidad, reemulsionabilidad y estabilidad de la emulsión: El formulado se emulsiona al mezclar con agua y la emulsión debe ser estable transcurrido cierto tiempo sin separación de fases ni creación de espuma.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- “Manual sobre la elaboración y uso de las especificaciones de plaguicidas de la FAO y la OMS”, Tercera revisión de la primera edición, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD Y ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Roma, 2017
- Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios
- Reglamento (UE) n ° 283/2013 de la Comisión, de 1 de marzo de 2013 , que establece los requisitos sobre datos aplicables a las sustancias activas
- Reglamento (UE) nº 284/2013 de la Comisión, de 1 de marzo de 2013, que establece los requisitos sobre datos aplicables a los productos fitosanitarios

MATERIAL NO OFICIAL

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 42**

**RESIDUOS DE PLAGUICIDAS. LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS. SEGUIMIENTO Y CONTROL. MÉTODOS APLICADOS PARA SU DETERMINACIÓN**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

1. RESIDUOS DE PLAGUICIDAS .
2. LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS.  
LMR EN ALIMENTOS TRANSFORMADOS
3. SEGUIMIENTO Y CONTROL
4. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN  
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN  
ANÁLISIS INSTRUMENTAL  
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
5. BIBLIOGRAFÍA

MATERIAL NO OFICIAL

## 1. RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.

Se define *plaguicida* (o *pesticida*, del inglés *pesticide*) como aquella sustancia que se utiliza para eliminar o controlar plagas, incluidos organismos portadores de enfermedades, insectos, animales y plantas no deseables (EFSA, 2022).

A menudo, los términos *plaguicida* y *productos fitosanitario* se usan de manera indistinta aunque no son exactamente iguales. La forma más común de uso de un plaguicida es como producto fitosanitario pero su concepto abarca también otros posibles usos no relacionados con la protección de los cultivos vegetales (AESAN, 2022).

La utilización de los plaguicidas en las cosechas puede conllevar la presencia de **residuos**. Según el Reglamento 1107/2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, los **residuos** consisten en una o varias sustancias que se encuentran en o sobre vegetales o productos vegetales, productos animales comestibles, el agua potable u otros lugares del medio ambiente, y que sean resultado de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus **metabolitos** y los **productos** resultantes de su **descomposición o reacción**.

Un **metabolito** es un producto de degradación de una sustancia activa, protector o sinergista, formado en organismos o en el medio ambiente. Se considera que un metabolito es relevante cuando haya razones para suponer que posee propiedades comparables a las de la sustancia originaria en términos de su actividad biológica objetivo, o plantea un riesgo superior o comparable al de la sustancia originaria para los organismos, o presenta determinadas propiedades toxicológicas que se consideran inaceptables.

Con el fin de asegurar que la utilización de los productos fitosanitarios es segura para los consumidores se establecen los **Límites Máximos de Residuos (LMR)**. Los LMR pueden ser relativos a la sustancia activa o bien aplicar la definición de residuo. En ese caso no sólo se determina la sustancia activa, sino también los metabolitos o productos de degradación. El ejemplo típico es el del aldicarb, cuyo LMR es la suma de aldicarb, su sulfóxido y su sulfona, expresada como aldicarb.

## 2. LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS.

Con el fin de asegurar que la utilización de las sustancias activas contenidas en los productos fitosanitarios es segura para los consumidores se establecen los **Límites Máximos de Residuos (LMR)**: límite legal superior de concentración de un residuo de plaguicida en alimentos o piensos establecido de conformidad con el Reglamento 396/2005, basado en las buenas prácticas agrícolas y la menor exposición del consumidor necesaria para proteger a todos los consumidores, incluidos aquellos más vulnerables.

En él se definen residuos de plaguicidas como los residuos, incluidas las sustancias activas, los metabolitos y los productos de degradación o de reacción de sustancias activas utilizadas actualmente o con anterioridad en productos fitosanitarios, que estén presentes en los productos comprendidos en su anexo I, incluidos en particular aquellos cuya presencia pueda deberse a su uso en fitosanidad, en veterinaria y como biocidas.

Desde el momento en que se comercialicen como alimentos o piensos, los productos comprendidos en el anexo I no contendrán ningún residuo de plaguicida que supere los LMR relativos a esos productos y recogidos en los anexos II y III. Si un plaguicida no está incluido en ninguno de los anexos, se aplica por defecto un LMR general de 0,01 mg/kg.

Es importante destacar que estos LMRs no son límites toxicológicos, sino que son límites toxicológicamente aceptables, basados en una buena práctica agrícola y que representan la cantidad máxima de un residuo que es posible encontrar en un producto alimentario de origen vegetal como consecuencia del uso legal y racional de ese plaguicida evaluado (AESAN, 2015).

Los Límites Máximos de Residuos de productos fitosanitarios se establecen inicialmente sobre las conclusiones de un informe de **evaluación del riesgo** elaborado por un Estado miembro de la UE en base a la metodología de análisis del riesgo. Se identifican cuatro partes fundamentales (AESAN, 2015):

- a) **Identificación del factor de peligro:** Conlleva también la definición del residuo marcador que será analizado por los laboratorios.
- b) **Caracterización del factor de peligro:** ensayos toxicológicos para fijar la Ingesta diaria admisible (IDA) y la Dosis de referencia aguda (DRfA).
- c) **Determinación de la exposición.**
- d) **Caracterización del riesgo.**

A continuación, el informe de evaluación de riesgo al consumidor con la propuesta de LMR firmada por uno de los Estados Miembro (EEMM) es enviado a la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), la cual evaluará la documentación, recibiendo comentarios de los demás EEMM y emitirá un dictamen público motivado sobre los riesgos para el consumidor y, en su caso, para los animales, asociados a la fijación, modificación o supresión de un LMR. El dictamen favorable de la EFSA se convierte en aval de seguridad alimentaria para todos los consumidores de la UE (Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE), 2005).

Este nuevo LMR aparecerá publicado en un Reglamento europeo, y podrá consultarse en la base de datos que ha elaborado la Comisión Europea (AESAN, 2015):

[https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en)

En el caso de una solicitud de uso de un producto fitosanitario a base de esa sustancia activa en España, el último paso será la autorización y el registro del nuevo uso del plaguicida por la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria del MAPA. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/fitos.asp> (AESAN, 2015)

Si una sustancia no se autoriza en la UE por cualquier razón distintas a los residuos, (medioambientales o ecotoxicológicos) los LMRs deben ser igualmente evaluados, fijándose en unos valores totalmente seguros para el consumidor (Artículo 12.1 del Reglamento 396/2005). La evaluación de esta sustancia activa en otra región del planeta con sus particulares puede resultar en la autorización de su uso en esos países terceros. Los alimentos que cumplen dichos LMRs y que no presentan ningún riesgo para los consumidores, pueden ser legalmente comercializados en la UE. Este procedimiento es conocido como “tolerancia a la importación” (AESAN, 2015).

Esto sirve también para la incorporación inmediata de LMR fijados por la Comisión del Codex Alimentarius, organización conjunta FAO/OMS, al Reglamento 396/2005 con la excepción de los considerados no seguros para algún segmento de la población en la UE tras una evaluación de riesgo realizada siguiendo estándares europeos.

### **LMR EN ALIMENTOS TRANSFORMADOS**

En el Anexo I del Reglamento 396/2005, los límites máximos se fijan sobre materias primas sin transformar. Para conocer el LMR en productos transformados se hace necesario aplicar factores de transformación (concentración, dilución...etc.) sobre el LMR del producto inicial, según se establece en el artículo 20.1. Estos factores deberían recogerse en el Anexo VI, pero aún no se ha desarrollado. (AESAN, 2021).

Mientras no se publique el Anexo VI, los factores a considerar por parte de la autoridad competente en el dictamen deben tener en cuenta la información del procesamiento al que ha sido sometido el producto crudo que debe poder acreditar el operador sobre el que recae la responsabilidad de esa información (AESAN, 2021).

Las diferentes autoridades de control oficial pueden recurrir a los dictámenes razonados de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o los documentos del Codex Alimentarius para considerar el LMR a aplicar (AESAN, 2021).

### **3. SEGUIMIENTO Y CONTROL**

De acuerdo con el Reglamento 625/2017 de control y otras actividades oficiales, las autoridades competentes deberán realizar controles oficiales de todos los operadores con regularidad, en función del riesgo y con la frecuencia apropiada, teniendo en cuenta una serie de factores.

El **Plan Nacional de Control de la Cadena Alimentaria (PNCOCA)** es el instrumento a través del cual cada Estado Miembro vela porque los controles oficiales se efectúen de manera que se basen en el riesgo y sean eficientes en todo su territorio y en toda la cadena agroalimentaria de la Unión, de conformidad con el Reglamento 625/2017. Este Plan se subdivide en varios objetivos de alto nivel. Dentro del segundo objetivo, consistente en reducir los riesgos presentes en los alimentos para la salud de las personas, verificando el cumplimiento por parte de los operadores de la normativa aplicable en seguridad alimentaria, hay 16 Programas. El **Programa 14 es el relativo a Residuos de plaguicidas en alimentos** (AESAN, 2021).

Incluye, por un lado, las muestras recogidas y analizadas en el marco del **Plan de control coordinado de la UE**, y por otro lado y de forma adicional, aquellas muestras que, en **base al riesgo**, sean programadas por las autoridades competentes de las CCAA. Para establecer la frecuencia de los controles oficiales en función del riesgo, las autoridades competentes tendrán en cuenta los resultados de las actividades de seguimiento, incluidas las relativas a los residuos de plaguicidas (AESAN, 2020).

A nivel europeo, el **Plan de control coordinado de la UE** se programa a través de la publicación de una serie de actos legislativos (Reglamentos de ejecución). En estas normas se establecen las muestras concretas que cada Estado miembro debe tomar, como mínimo, y las diferentes combinaciones de plaguicida y alimento que se deben analizar, tanto de origen vegetal como animal. El Plan de control coordinado abarca un periodo de tres años, y anualmente se publica un nuevo Reglamento de ejecución que regula el Plan para los tres años siguientes. Con los resultados de éste se lleva a cabo una evaluación del grado de exposición de los consumidores a los residuos de plaguicidas (AESAN, 2020).

Atendiendo a la programación comunitaria, deben muestrearse y analizarse los alimentos y plaguicidas que se especifican en los anexos del Reglamento de ejecución específico para cada año, incluyendo el muestreo de alimentos ecológicos y alimentos infantiles en las frecuencias que en el Reglamento se establezcan. Posteriormente, las muestras asignadas a España, se distribuyen por las CCAA en función del censo de población de cada una de ellas. Para alimentos infantiles se especifica el tipo y número de muestras del alimento infantil que se determine para cada año en el Anexo II del Reglamento de ejecución, siendo generalmente un mínimo de diez muestras por Estado miembro y año. Y en el caso de las muestras de productos procedentes de la agricultura ecológica, en la norma se especifica que se tomarán solamente si están disponibles y en proporción a la cuota de mercado de dichas mercancías en cada Estado miembro, con un mínimo de una muestra (AESAN, 2020).

El último Reglamento de Ejecución publicado es el Reglamento 2020/585 de la Comisión relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2021, 2022 y

2023 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal y a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos.

Como se ha mencionado antes, además del Plan de control coordinado de residuos de plaguicidas establecido a nivel europeo en cada Estado miembro se deben programar otros controles adicionales en base al riesgo. En España se ha diseñado el Programa de Vigilancia y Control de Residuos de Plaguicidas en alimentos.

Una vez ejecutados los planes y tomadas las muestras, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN) es la encargada de recopilar los datos recogidos por las comunidades autónomas y por Sanidad Exterior, así como de elaborar un informe anual de los datos obtenidos, para su posterior remisión a la Comisión Europea y la EFSA.

Finalmente, el comité de expertos de EFSA, elabora un resumen de todos los datos recogidos por los EEMM, y analiza los resultados, realizando una exposición de los posibles motivos por los que se pudieron superar los LMR, un análisis de riesgos, y la evaluación de la exposición de los consumidores a dichos residuos.

Además de los controles programados en base al riesgo, las autoridades competentes realizan controles no programados, que suelen estar asociados a la sospecha de incumplimiento, debido, por ejemplo, a alertas alimentarias, denuncias, etc.,

Por último, tener en cuenta la relación con otros programas, como el Programa Nacional de Control Oficial de higiene de la producción primaria agrícola y del uso de productos fitosanitarios.

#### **4. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**

La determinación de residuos de plaguicidas es un proceso analítico complejo que implica un conjunto de etapas que van desde la toma de muestra hasta la interpretación de los resultados obtenidos (Fuentes López, García Martínez, & Fernández Segovia, 2015).

Las partes del producto que deben ser analizadas están estipuladas en el anexo I del Reglamento (CE) N° 396/2005.

Una vez recibidas en el laboratorio, las muestras que no sean analizadas inmediatamente deben ser conservadas bajo condiciones que minimicen las pérdidas. Los productos frescos deben conservarse en nevera no más de 5 días, mientras que los productos secos deben almacenarse a temperatura ambiente. Si el tiempo hasta su análisis es mayor a dos semanas deben hacerse submuestras y almacenarlas en nevera (DG SANTE, 2021).

## **MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

Los métodos de extracción multirresiduo (MRMs) son los más usados puesto que permiten extraer, con relativa facilidad, gran cantidad de plaguicidas simultáneamente de un amplio rango de polaridades. El principal inconveniente es la presencia de componentes de la matriz junto con los analitos extraídos, que pueden generar interferencias. Estas interferencias afectan a los límites de detección. Para solucionar en parte este problema y así aumentar la selectividad y la sensibilidad, se han desarrollado diversos métodos extracción, concentración y purificación (Simó Pereiró, 2018):

### **Extracción con disolventes orgánicos**

Es la técnica más empleada por su facilidad. Su aplicación varía dependiendo de que la muestra sea sólida o líquida. Las muestras sólidas tras su homogeneización, se agitan con un disolvente orgánico o una mezcla de ellos. Se podrá tomar una alícuota de la fase orgánica para concentrarla, o bien se le añadirá a la fase orgánica una porción de NaCl o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para aumentar la fuerza iónica e incrementar la cantidad de analitos extraídos, separando mejor las fases.

Los MRMs permiten determinar un elevado número de compuestos de diferentes características físico-químicas de una forma selectiva, rápida y eficaz. Los MRMs más empleados por los laboratorios oficiales de la Unión Europea son el método QuEChERS (basado en la extracción con acetonitrilo), mini-Luke (basado en acetona) y método del acetato de etilo.

- **Extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS)**

Es uno de los procedimientos más rápidos y sencillos. Este método combina dos etapas: En la primera etapa, se realiza una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo, en presencia de diferentes sales. La función de cada una de estas sales en la etapa de extracción es diferente (Fuentes López, García Martínez, & Fernández Segovia, 2015):

- **Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>)** mejora la recuperación del analito al facilitar la partición de los pesticidas en la fase orgánica (acetonitrilo) gracias a que retiene agua.
- **Cloruro sódico (NaCl)** ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación de fases entre el contenido de agua y la orgánica.
- **Acetato de sodio** ayudan a la regulación del pH.
- **Sales de citrato** se emplean para ajustar del pH a valores de 5,5 donde se extraen la mayoría de los componentes ácidos y básicos de la muestra.

La segunda etapa del procedimiento es la limpieza o “clean-up” del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva. Las sales y sorbentes empleados en esta fase son (Fuentes López, García Martínez, & Fernández Segovia, 2015):

- **Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>):** elimina el exceso de agua residual.
- **Amina primaria/secundaria (PSA):** elimina ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares y pigmentos de antocianina.
- **Sorbente C18:** elimina grasas, esteroides y otras interferencias no polares de la muestra.
- **Carbón negro grafitado (GCB):** elimina pigmentos de la muestra como clorofilas y carotenoides, sin afectar a los compuestos planares.

La selección de la fase sólida dispersiva va a depender del tipo de alimento que es analizado, ya que existen diferentes protocolos de “clean-up”.

A continuación, tras la extracción y concentración de los analitos, puede realizarse la identificación y cuantificación de los compuestos de interés por análisis cromatográfico (Fuentes López, García Martínez, & Fernández Segovia, 2015).

- **Método Luke**

Es un método convencional cuyo objetivo es la determinación de residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados mediante el empleo de cromatografía de gases (GC) acoplada a un detector tradicional. En la primera etapa se usa una mezcla de disolventes orgánicos de diferentes polaridades con el fin de llevar a la fase orgánica el mayor número de residuos de plaguicidas que puedan existir en la matriz. Posteriormente se centrifuga para obtener un extracto orgánico que se concentra en rotavapor y se redissuelve con ciclohexano/acetato de etilo (Simó Pereiró, 2018).

Es adecuado para pesticidas no iónicos, polares y no polares presentes en una amplia gama de matrices no grasas. En extractos muy sucios o para detectores poco selectivos es posible que se necesite una purificación adicional con GPC (cromatografía de permeación en gel) (Gamón). Aplicable, por ejemplo, a matrices con alto contenido en grasa.

Actualmente este método se emplea en algunos laboratorios con algunas diferencias, pesando menos cantidad de muestra y corrigiendo las cantidades de disolvente empleadas. Se puede añadir una sal (sulfato sódico) durante la extracción para favorecer la separación de las fases. Una vez extraída la muestra, se realiza la concentración de una alícuota de extracto en un evaporador con corriente de nitrógeno a menos de 40°C (para evitar la pérdida de plaguicidas que sean muy volátiles o sensibles a la temperatura). El residuo resultante se resuspende en un disolvente adecuado. Esta

variación del método, denominada **mini-Luke**, reduce disolventes y tiempo de extracción de la muestra (Simó Pereiró, 2018).

- **Método Acetato de etilo**

Los residuos de plaguicidas se extraen de la muestra con acetato de etilo anhidro por homogeneización de la mezcla. Una alícuota del extracto filtrado se concentra y se determina su contenido por cromatografía de gases. En ocasiones hay que purificar el extracto para eliminar sustancias coextraídas. Es un método sencillo y rápido capaz de extraer compuestos más polares y con recuperaciones de alrededor del 80% (Gamón).

- **Método de Mills**

Se emplea en la determinación de residuos de plaguicidas que van a ser analizados por GC con detectores específicos, es decir, organoclorados, organofosforados, etc, siendo muy útil en matrices grasas. La extracción se realiza con éter de petróleo, éter etílico y etanol (Simó Pereiró, 2018).

### **Extracción en fase sólida (SPE)**

La extracción en fase sólida (SPE) se basa en la partición selectiva o distribución de uno o más compuestos entre dos fases. La primera es un sólido adsorbente; la segunda fase suele ser un líquido. El objetivo principal de la SPE es separar selectivamente los analitos de interés de una muestra y la eliminación de la matriz interferente.

### **ANÁLISIS INSTRUMENTAL**

Los extractos obtenidos son analizados empleando técnicas cromatográficas. En la actualidad, los detectores específicos tanto para gases como para HPLC se emplean mucho menos debido a que su uso no proporciona una identificación inequívoca.

La cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) son las técnicas más usadas para la identificación y cuantificación de plaguicidas en muestras de alimentos y piensos. Se pueden emplear diversos métodos de detección de MS. Las técnicas de ionización también son variadas. Los modos de adquisición empleados pueden ser full-scan, selected ion monitoring (SIM), selected reaction monitoring (SRM) y multiple reaction monitoring (MRM). (DG SANTE, 2021).

Además de los métodos multiresiduo, en el análisis de plaguicidas se emplean los métodos denominados “single” o de residuo simple, capaces de detectar y cuantificar un número reducido de residuos de plaguicidas. Se realiza molécula por molécula y suelen emplearse en aquellos casos en que un residuo no se puede detectar por métodos multiresiduo debido a sus propiedades fisicoquímicas. Para algunos residuos,

especialmente en alimentos infantiles, la legislación requiere emplear métodos de residuo simple.

### **Cromatografía de gases**

Es la técnica más ampliamente utilizada para la identificación y cuantificación de pesticidas. Las mejoras continuas en el diseño de las columnas y los avances en el desarrollo instrumental han convertido a esta técnica en la más utilizada para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas de compuestos orgánicos de volatilidad media y alta (Simó Pereiró, 2018).

En la actualidad, los detectores específicos para GC se emplean mucho menos debido a sus limitaciones (DG SANTE, 2021). Los más habituales son los siguientes:

- **Detectores termoiónicos o de nitrógeno-fosforo (NPD):** son muy sensibles a los compuestos nitrogenados o fosforados.
- **Detectores de captura electrónica (ECD):** altamente selectivos para derivados halogenados. Se emplean para organoclorados.
- **Fotométrico de llama (FPD):** sensible a los compuestos azufrados o fosforados.

El acoplamiento de la cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas (GC-MS) o de espectrometría de masas en tándem (GC-MS-MS) es actualmente la opción analítica más utilizada para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos, dado que presenta una gran sensibilidad y proporciona información estructural de la molécula. Esto hace de ella una técnica adecuada para la correcta identificación y cuantificación simultánea de un amplio espectro de pesticidas.

### **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Su campo de aplicación cubre parte del ámbito de la cromatografía de gases, más el análisis de compuestos termosensibles o aquellos con masas moleculares muy grandes e incluso polares, por lo que su uso cada vez está más generalizado. En estos casos, la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas (HPLC-MS), y especialmente la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).

### **Espectrometría de masas (MS)**

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos los iones, se separan de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ) y se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

La espectrometría de masas acoplada a técnicas cromatográficas es una combinación muy potente para la identificación de analitos en las muestras, ya que proporciona de

modo simultáneo el tiempo de retención, la relación masa/carga (ratios m/z) y la abundancia relativa de los iones (DG SANTE, 2021).

Diferentes tipos y modos de analizadores de masas proporcionan diferentes grados de selectividad, que está relacionado con la confianza en la identificación. El documento SANTE proporciona una serie de criterios de identificación que sirven como guía para comprobar la ausencia o presencia de un analito. Así, para un single MS o un triple cuadrupolo la relación señal/ruido debe ser mayor a 3, los picos de los iones deben solapar completamente y el ratio iónico de las muestras no debe exceder del 30% de la media de los ratios iónicos de los patrones empleados en esa secuencia.

### **Efecto matriz**

A pesar de los enormes avances realizados en la instrumentación analítica, siguen persistiendo problemas de cuantificación derivados de la complejidad de las muestras, lo que se denomina de **efecto matriz**. Es la influencia de los componentes de la muestra distintos al analito en su señal analítica. Este efecto puede traducirse en un aumento o supresión de la respuesta del analito en la muestra respecto a su respuesta en disolvente, y su intensidad va a depender de varios factores (Peruga Minguez, 2015).

Cuando existe efecto matriz, la cuantificación de los analitos resulta problemática y pueden informarse datos de concentraciones erróneos si se utilizan disoluciones patrón en disolvente para la cuantificación. Para tratar de corregirlo, minimizarlo o eliminarlo existen diversas estrategias (Peruga Minguez, 2015). La Guía SANTE propone varias de ellas:

- Calibrado en matriz
- Adición estándar
- Patrón interno

### **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

La interpretación de los resultados obtenidos tras el análisis de una muestra constituye un punto crítico en la toma de decisiones de gestión del riesgo. Los aspectos principales a tener en cuenta son: la incertidumbre, la recuperación de la medición y los factores de transformación.

Los laboratorios de control oficial están obligados a participar en ensayos de aptitud, especialmente los organizados por los Laboratorios Europeos de Referencia (EURLs). En caso de informar de falsos positivos o negativos o bien si la z-score obtenida da como resultado cuestionable o no satisfactorio, el problema debe ser investigado y resuelto antes de volver a analizar la combinación matriz/analito implicada.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- AESAN. (01 de Septiembre de 2015). ¿Cómo se fijan los LMR? . Obtenido de [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/contenido\\_extra\\_2\\_como\\_se\\_fijan\\_los\\_LMR.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/contenido_extra_2_como_se_fijan_los_LMR.pdf)
- AESAN. (1 de Septiembre de 2015). ¿Qué son los LMR? Obtenido de [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/contenido\\_extra\\_1\\_que\\_son\\_los\\_LMR.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/contenido_extra_1_que_son_los_LMR.pdf)
- AESAN. (2020). *Programa 14 Residuos de plaguicidas en alimentos*. Obtenido de [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/pncoca/2021-2025/DOC\\_22\\_Programa\\_14\\_Plaguicidas.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/pncoca/2021-2025/DOC_22_Programa_14_Plaguicidas.pdf)
- AESAN. (19 de Octubre de 2021). LMR en alimentos transformados. Obtenido de [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/LMR\\_en\\_alimentos\\_transformados.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/LMR_en_alimentos_transformados.pdf)
- AESAN. (2021). *Seguridad Alimentaria/Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PNCOCA)*. Obtenido de [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/seccion/pncoca.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/seccion/pncoca.htm)
- AESAN. (28 de Marzo de 2022). Residuos de productos fitosanitarios. Obtenido de [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/detalle/residuos\\_productos\\_fitosanitarios.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/residuos_productos_fitosanitarios.htm)
- DG SANTE. (2021). *Analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed SANTE 11312/2021*. Obtenido de [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE\\_11312\\_2021.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf)
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (23 de Febrero de 2005). Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R0396:20080410:ES:PDF>
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (21 de Octubre de 2009). Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a la comercialización de productos fitosanitarios. Obtenido de <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2009-82202>
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (15 de Marzo de 2017). Reglamento 625/2017 del Parlamento Europeo y del Consejo. *relativo a los controles y otras actividades*

*oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.* Obtenido de <https://www.boe.es/doue/2017/095/L00001-00142.pdf>

Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (s.f.). Reglamento de Ejecución (UE) 2020/585 relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2021, 2022 y 2023 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/es/TXT/?uri=CELEX%3A32020R0585>

EFSA. (2022). Plaguicidas. Obtenido de <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/pesticides>

Fuentes López, A., García Martínez, E., & Fernández Segovia, I. (2015). *Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas.*

Gamón, M. (s.f.). *Plan Nacional de Vigilancia de Residuos de Plaguicidas: diseño y metodología.* Obtenido de [chrome-extension://efaidnbmhttps://www.dipalme.org/Servicios/Anexos/anexosiea.nsf/VAnexos/IEA-RP96-c1/\\$File/RP96-c1.pdf](https://www.dipalme.org/Servicios/Anexos/anexosiea.nsf/VAnexos/IEA-RP96-c1/$File/RP96-c1.pdf)

Peruga Minguez, A. (Noviembre de 2015). Determinación de residuos de plaguicidas problemáticos en productos vegetales y suelos mediante cromatografía-espectrometría de masas en tándem. Obtenido de <https://www.tesisenred.net/handle/10803/353615#page=1>

Simó Pereiró, J. (Septiembre de 2018). *Metodos de extracción y determinación de plaguicidas por cromatografía de gases masas (GC-MS/MS) en muestras de origen vegetal.* Obtenido de [http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Jsimo/Simo\\_Peiro\\_Jorge\\_TFM.pdf](http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Jsimo/Simo_Peiro_Jorge_TFM.pdf)

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 43**

### **CONTAMINANTES AGRÍCOLAS E INDUSTRIALES. CLASIFICACIÓN. MARCO LEGAL. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. CONTAMINANTES Y CLASIFICACIÓN**

### **2. MARCO LEGAL**

### **3. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**

3.1. MICOTOXINAS

3.2. NITRATOS

3.3. TOXINAS DE PLANTAS

3.4. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

3.5. METALES PESADOS

3.6. MELAMINA

3.7. ACRILAMIDA

3.8. CARBAMATO DE ETILO

3.9. 3-MCPD

MATERIAL NO OFICIAL

## **1. CONTAMINANTES Y CLASIFICACIÓN**

Los contaminantes son sustancias que no han sido añadidas intencionadamente a los alimentos, pero que se encuentran en los mismos como resultado de las distintas etapas que siguen a lo largo de toda la cadena alimentaria: producción, fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, envasado, transporte y almacenamiento, o como consecuencia de la contaminación ambiental.

La contaminación tiene normalmente un impacto negativo sobre la calidad de los alimentos y puede implicar un riesgo para la salud humana, por lo que en interés de la salud pública, los contenidos en estos contaminantes deben mantenerse en niveles aceptables desde el punto de vista toxicológico y que sean compatibles con las prácticas profesionales correctas (principio ALARA-As Low As Reasonably Achievable). Por otro lado, es necesario que estos niveles se regulen a nivel de la Unión Europea garantizándose así el funcionamiento del mercado interior.

Los contaminantes agrícolas son los que proceden de residuos ambientales que las actividades mineras o industriales generan y se esparcen por tierra, aire y agua contaminando los alimentos (metales pesados, nitratos y dioxinas) y las toxinas naturales que producen los hongos en los alimentos (micotoxinas).

Los contaminantes de proceso o industriales son los que proceden de residuos de productos sanitarios que se dan a los cultivos o a los animales para prevenir enfermedades (pesticidas y residuos medicamentosos) y, las sustancias que se producen en el procesado o manipulación industrial de los alimentos (acrilamida, metales pesados, PAHs, Melamina o carbamato de etilo).

La mayoría de las sustancias químicas que hoy consideramos contaminantes existen en la tierra desde siempre o se generan por procesos naturales, aunque en la era de la industrialización se ha incrementado su nivel basal en el medioambiente por la actividad humana, como son los metales pesados, los hidrocarburos aromáticos policíclicos o las dioxinas. Algunos compuestos, como los plaguicidas se usan para mejorar las cosechas, o los medicamentos en la producción ganadera. Otras sustancias se producen desde que surgió el cocinado de los alimentos, porque son intrínsecas a ciertos procesos de cocinado (fritura, tostado) como la acrilamida. Hay un grupo de contaminantes de origen sintético (PCBs, entre otros) que fueron utilizados ampliamente durante la segunda mitad del siglo XX hasta que se descubrió su toxicidad y persistencia, de modo que hoy en día están prohibidos. No obstante, debido a su amplio uso en diversidad de materiales o dispositivos comunes (material aislante en equipos, cables, transformadores eléctricos, espumas antiincendios, etc.), aún hoy son liberados al medioambiente.

La mayoría de estos contaminantes tienen un efecto toxicológico a largo plazo, es decir, por acumulación a lo largo del tiempo. Muy pocos presentan un efecto inmediato.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es el organismo científico independiente de la UE que evalúa los riesgos presentes en los alimentos. Mediante la recopilación de evidencias científicas, deduce un valor de referencia toxicológico. Suele

tratarse de la máxima cantidad de contaminante a la que puede estar expuesta la población a través del consumo de alimentos y del resto de fuentes posibles durante toda la vida de una forma segura, es decir, sin presentar los efectos toxicológicos del contaminante. Para los contaminantes con efecto agudo, este valor que establece EFSA es la máxima cantidad del contaminante que puede ser ingerida de una sola vez en un alimento para evitar que aparezcan esos efectos adversos inmediatos.

En sus evaluaciones, también lleva a cabo cálculos para ponderar el riesgo de exposición a un determinado contaminante a través de la dieta, identificando los alimentos que más riesgo suponen al haber una exposición al contaminante para la población general, así como para determinados grupos específicos de la población, denominados grupos vulnerables (bebés a los nitratos, Plomo en el consumo de carne de caza o Cadmio en consumidores extremos de marisco).

La medida más eficaz para reducir la exposición a los contaminantes es la fijación de límites máximos en la legislación y su posterior revisión por parte de la EFSA y Comités expertos de los estados miembros. El hecho de que no exista un contenido máximo establecido de un contaminante en un alimento concreto no quiere decir que sea “cero”, sino que las cantidades encontradas no suponen un problema para la salud pública.

Además de los límites máximos, existen otras medidas en marcha para reducir la presencia de los contaminantes al nivel más bajo posible y son los códigos de buenas prácticas en las distintas fases de la cadena de los alimentos, la fijación de niveles indicativos en los alimentos, o la buena manipulación y procesamiento de los alimentos en casa para reducir al mínimo posible los niveles de estos contaminantes.

## **2. MARCO LEGAL**

El Reglamento (CEE) nº 315/93 del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios, constituye el marco legislativo actual en esta materia, determinando tres líneas principales de actuación:

Salud pública. Se prohíbe la comercialización de productos alimenticios que contengan contaminantes en proporciones inaceptables respecto de la salud pública y en particular desde el punto de vista toxicológico.

Buenas prácticas de fabricación. Los contaminantes deberán mantenerse al mínimo nivel posible mediante prácticas correctas en todas las fases de la cadena alimentaria, desde la producción hasta el consumo.

Salud pública y Mercado interior. A fin de proteger la salud pública, se establecerán los límites máximos cuya tolerancia pudiese resultar necesaria por lo que respecta a determinados contaminantes.

Es importante señalar que el Reglamento 315/93 no se aplica a los contaminantes que son objeto de unas normas más específicas, como: materiales en contacto con alimentos, residuos de plaguicidas o residuos de medicamentos veterinarios.

Los límites máximos se encuentran establecidos en el Reglamento 1881/2006, de 19 de Diciembre de 2006, de la Comisión, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, y constituyen una lista comunitaria no exhaustiva, ya que no se regulan todos los contaminantes en todos los alimentos, sino solo aquellos puedan suponer un problema para la salud pública.

En dicho reglamento y sus posteriores modificaciones, se establecen los valores máximos permitidos en los diferentes grupos de productos alimenticios, dividiéndolos en diferentes secciones como son Nitratos, Micotoxinas, Metales, 3-MCPD, Dioxinas y PCBs, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs), Melamina, Toxinas Inherentes a las plantas y Percloratos.

Mencionar también la Directiva 2002/32/CE sobre sustancias indeseables en alimentación animal, que establece qué sustancias y qué valores máximos se pueden encontrar de dichas sustancias en alimentación animal, expresadas sobre un 12 % de humedad. Entre otros analitos, incluye algunos metales, nitritos, micotoxinas, o dioxinas.

En el reglamento (UE) 2017/2158 se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos.

### **3. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**

#### **3.1 MICOTOXINAS**

Las toxinas fúngicas son sustancias producidas por varios centenares de especies de mohos que pueden crecer sobre los alimentos en determinadas condiciones de humedad y temperatura. Representan un riesgo serio para la salud humana y animal.

Son compuestos químicos producidos de forma natural (no antropogénicos) en el metabolismo secundario de algunos géneros de hongos. Son compuestos estables que no se destruyen mediante los procedimientos de cocinado habituales.

Existe una variedad muy amplia de micotoxinas que puede afectar a la salud humana y a los animales, destacando las siguientes: Aflatoxinas, toxinas de fusarium, Ocratoxina A y Patulina, entre otros.

Desde la propia Comisión Europea se reconoce, a través de la reglamentación aprobada, la problemática que suscitan las micotoxinas para la salud humana. Son sustancias, en algunos casos, para las que no existe ningún umbral por debajo del cual no se hayan observado efectos nocivos. Y reconoce que no es posible, en el caso de las aflatoxinas -por ejemplo- fijar una dosis diaria tolerable, puesto que no es posible eliminarlos completamente con el estado actual de los conocimientos científicos y técnicos, ni con las mejoras en las prácticas de producción y almacenamiento.

La única solución legal al problema que suscitan no ha sido otra que fijar los límites en el nivel más bajo posible, para seguidamente solicitar un esfuerzo por parte de todos los intervinientes en la cadena alimentaria, mejorando las condiciones de producción, cosecha y almacenamiento, especialmente, con la finalidad de reducir el desarrollo de los mohos.

Para las micotoxinas que han demostrado ser genotóxicas y cancerígenas para el ser humano, como las aflatoxinas, se ha adoptado el enfoque del margen de exposición. Para otras micotoxinas menos conocidas, no ha sido posible caracterizar el peligro por falta de datos.

Las micotoxinas aparecen a lo largo de toda la cadena alimentaria, siendo algunos alimentos sin procesar los más susceptibles de contaminación como: cereales, semillas oleaginosas, frutas, verduras, frutos secos,...

En cuanto a los alimentos procesados, debido a que no se destruyen durante esta etapa, son importantes fuentes de exposición los productos a base de cereales (pan, pasta, cereales de desayuno), bebidas (vino, cerveza, café, zumo), cacao, alimentos de origen animal (leche y queso) y alimentos infantiles.

### Determinación

Mencionar previamente, que un factor clave en la determinación de micotoxinas es la heterogeneidad en la que se distribuyen dichos analitos en la muestra, siendo de vital importancia la homogeneización de ésta, estableciéndose criterios en el muestreo y análisis de estos analitos en el Reglamento 401/2006.

Los criterios de funcionamiento hacen referencia a la recuperación, precisión y blancos.

Existen diversas formas de extracción de estos analitos, destacando los sistemas inmunoquímicos. En las columnas de inmunofinidad los anticuerpos monoclonales para una micotoxina, se inmovilizan formando un gel, que se empaca en una columna. Si el extracto de un insumo o de un alimento determinado se hace pasar por dicha columna, la micotoxina se unirá con los anticuerpos monoclonales de la columna de inmunoafinidad, mientras que el resto de componentes del extracto se eliminará mediante un líquido de lavado, y posteriormente con un proceso de elución la micotoxina se recuperara para seguir realizando un análisis a través de un sistema por cromatografía de líquidos.

Otras formas de extracción de las micotoxinas se basan en las tradicionales extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida, de tal forma, que la extracción no es tan selectiva ni limpia como en el caso anterior.

La determinación de estos analitos se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas acopladas a diferentes detectores, destacando entre otros la determinación por fluorescencia como es el caso de la determinación de Aflatoxina B1 o la suma de Aflatoxinas, o la determinación de Ocratoxina A a una longitud de onda característica, consiguiéndose llegar a niveles muy bajos en la determinación.

Para llevar a cabo la determinación multiresiduo, hay que acudir a técnicas de HPLC-MS/MS, ya que monitorizando las transiciones características de cada micotoxina, se puede llevar a cabo la determinación simultánea.

## **3.2. NITRATOS**

Los nitratos se encuentran en distintos tipos de alimentos. Se presentan en el medio de manera natural ya que forman parte del ciclo del nitrógeno. Son compuestos muy empleados

en agricultura como fertilizantes y, junto con los nitritos, se usan como aditivos en la elaboración de alimentos como productos cárnicos, especialmente en los crudo-curados. Su uso como aditivo está justificado por el potencial que tienen para inhibir el crecimiento de patógenos, tales como el *Clostridium botulinum*.

El uso de fertilizantes es un riesgo para el medio ambiente. La contaminación más común es la generada por el nitrato que llega a las aguas por filtración o escorrentía. Otra fuente agraria de nitratos es la oxidación de amoníaco procedente de residuos animales. Algunas especies de vegetales acumulan los nitratos en sus partes verdes. Debido a esto, el Reglamento 1881/2006 fija los valores de contenidos máximos en espinacas y lechugas.

Los nitratos tienen poco potencial tóxico, pero el problema que plantean es que se pueden transformar fácilmente por reducción bacteriana a nitritos que presentan una toxicidad considerable. Los dos principales efectos tóxicos de los nitritos son: el efecto metahemoglobinizante y que favorecen la formación de nitrosaminas y nitrosamidas que tienen efecto cancerígeno.

El Reglamento 1882/2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de nitratos en ciertos productos alimenticios, establece criterios generales a los que debe ajustarse cada método de análisis para poder garantizar la eficacia de los laboratorios de control.

Dicho reglamento hace referencia al método de muestreo, a la preparación de la muestra, y al método de análisis, estableciendo especial hincapié en el procedimiento de extracción y estableciendo criterios de referencia de recuperación y de precisión.

Muchos de los métodos están basados en cromatografía iónica, aunque existen varios métodos enfocados a la cromatografía líquida o a la electroforesis capilar. Varios métodos analíticos están basados en la reducción de nitratos a nitritos con detección colorimétrica posterior. Se han utilizado varios agentes reductores como zinc, cadmio o cadmio cuperizado que se han acoplado como columnas reductoras a configuraciones de flujo continuo no segmentado para la cuantificación simultánea de nitratos y nitritos.

Los métodos de cromatografía de líquidos con detector de DAD se basan en una extracción de la muestra con agua caliente, y posterior determinación por cromatografía y utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo, agua y tampón.

### 3.3. TOXINAS DE PLANTAS

Las toxinas naturales son compuestos tóxicos producidos de forma natural por organismos vivos, por tanto, no son perjudiciales para los organismos en sí que las producen, pero pueden ser tóxicas para los animales y las personas cuando las ingerimos a través de los alimentos.

Destacan los alcaloides tropánicos, alcaloides del opio, alcaloides pirrolizidínicos, el ácido cianhídrico, el tetrahidrocannabinol o el ácido erúxico.

**-Ácido erúxico.**

El ácido erúxico es un ácido graso monoinsaturado que se encuentra en las semillas comestibles de plantas de la familia Cruciferae (Brassicaceae), como la colza y la mostaza. Es una toxina vegetal natural que se considera un contaminante, ya que la presencia de ácido erúxico en los alimentos es el resultado de la producción agrícola, en particular para la elección de la variedad.

El Reglamento (UE) 2019/1870 modifica y corrige el Reglamento (CE) núm. 1881/2006 en cuanto a su contenido máximo de ácido erúxico y ácido cianhídrico en determinados productos alimenticios.

Su determinación se lleva a cabo por separación de los ésteres por cromatografía en capa fina y posteriormente su determinación por cromatografía gaseosa.

#### **-Alcaloides tropánicos**

Los Alcaloides tropánicos son metabolitos secundarios que se producen naturalmente en las plantas de varias familias, especialmente del género Datura. La especie Datura stramonium (estramonio) tiene amplia difusión en las regiones templadas y tropicales, por lo que se han encontrado semillas de esta especie como impurezas entre las semillas de lino, soja, sorgo, mijo, girasol y alforfón y sus productos derivados.

En el Reglamento 1881/2006 se han establecido niveles máximos para la Atropina y Escopolamina en alimentos basados en cereales para alimentos infantiles que contengan sorgo, mijo y alforfón, y se extenderá a cereales procesados y alimentos infantiles que contengan maíz.

Su determinación se lleva a cabo mediante cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas en tándem y patrón interno.

#### **-Ácido cianhídrico**

Los glucósidos cianogénicos están ampliamente distribuidos en las plantas, ya que cumplen funciones de defensa contra predadores. Los glucósidos no son tóxicos por sí mismos, pero sí el ácido cianhídrico (HCN) que se libera cuando el material biológico es dañado mecánicamente o comido, en un proceso llamado cianogénesis. Algunas plantas pueden acumular un alto contenido de estos compuestos, como es el caso de las almendras amargas, que suelen tener una alta concentración de amigdalina (primer glucósido cianogénico descubierto).

Se han establecido niveles máximos para este analito en huesos de albaricoque y su determinación se lleva a cabo mediante una hidrólisis previa y posterior determinación mediante cromatografía de gases.

#### **-Alcaloides del opio**

La adormidera o amapola (*Papaver somniferum*) es una planta que produce alcaloides del opio, incluidas ciertas sustancias como la morfina y la codeína, que han sido utilizadas por el hombre en medicina durante generaciones. Los principales alcaloides son la morfina, la

codeína, la tebaína, la papaverina y la noscapina. La morfina es el alcaloide que generalmente predomina.

En el año 2018 la UE se estableció un nivel de referencia (no límite máximo) de 10 mg/kg de morfina en semillas de adormidera para consumo humano directo fruto de un acuerdo alcanzado entre los EEMM de la UE. El 6 de diciembre de 2021 se publica el Reglamento (UE) 2021/2142 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2021, por el que se modifica el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 en lo que respecta al contenido máximo de alcaloides opiáceos en determinados productos alimenticios. Actualmente, los límites están bajo discusión y posible modificación.

Su determinación se lleva a cabo mediante extracción con metanol y detección con HPLC-MS/MS –patrón interno.

#### **-Alcaloides de la pirrolicidina**

Los alcaloides de la pirrolicidina (PAs) son toxinas naturales, producto del metabolismo secundario de las plantas que producen como mecanismo de defensa frente a herbívoros. La estructura química de estos alcaloides está basada en un anillo de pirrolicidina, que consiste en dos anillos fusionados con un átomo de nitrógeno como puente. Los PAs tiene un perfil común de toxicidad, comprendiendo, los principales signos, diversos grados de daño hepático (necrosis hepatocelular centrolobular) y enfermedad veno-oclusiva. Además, el Centro de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado los PAs como “posiblemente carcinógenos para el ser humano” (grupo 2B).

En julio de 2022 entran en vigor los límites establecidos para los alcaloides pirrolizidínicos en diferentes compuestos como pueden ser el té. Su determinación se lleva a cabo mediante HPLC-MS/MS.

#### **-Tetrahidrocannabinol (THC)**

El Tetrahidrocannabinol o delta-9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ - THC), es un compuesto psicoactivo natural derivado de la planta de cáñamo Cannabis sativa, cultivada con fines industriales. Hay cuatro estereoisómeros pero sólo uno se encuentra naturalmente y es el compuesto psicoactivo primario derivado de C. sativa.

En la Unión Europea (UE), las variedades de cáñamo que se cultivan y utilizan para alimentación deben figurar en el "Catálogo Común de Variedades de Especies de Plantas Agrícolas" de la UE. Según el Reglamento (UE) Nº 1307/2013, el contenido máximo de THC en estas variedades está limitado al 0.2% (p/ p).

La determinación de este compuesto se lleva a cabo con técnicas de separación de cromatografía de gases y detección FID o MS o incluso MS/MS.

### **3.4. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes que se forman principalmente durante la combustión incompleta de materia orgánica como el carbón, petróleo, gasolina y basuras, así como otras sustancias

orgánicas (tabaco, carne preparada en la parrilla, etc.). Los HAPs se encuentran generalmente como una mezcla de dos o más de estos compuestos.

Los HAPs presentes en los alimentos pueden proceder de la contaminación medioambiental (actividades industriales, calefacciones, incendios forestales, etc.) y de procedimientos que incluyan el ahumado, secado o incluso el calentamiento de los alimentos. De forma general, los HAPs pueden provocar efectos irritantes por contacto de la piel y los ojos, fallos respiratorios cuando se inhalan y afectación del sistema nervioso. A largo plazo, por ingestión pueden causar problemas de coagulación y del sistema inmunitario por disminución de las plaquetas y los leucocitos respectivamente.

Existen límites máximos de HAPs en distintas categorías de alimentos recogidos en el Reglamento 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios. La fijación de límites máximos en la legislación constituye la medida de gestión del riesgo más eficaz para proteger a la población general de los riesgos alimentarios. Se ha fijado el límite máximo para el Benzo(a)pireno y para la suma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno.

La determinación se lleva a cabo mediante una extracción líquido-líquido de la muestra y posterior purificación por SPE y determinación por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.

### 3.5. METALES PESADOS

Son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad relativamente alta y cierta toxicidad para el ser humano. No todos, pero existe una serie de elementos que en alguna de sus formas pueden representar un serio problema medioambiental y es común referirse a ellos con el término genérico de "metales pesados". Son emitidos principalmente debido a la actividad industrial y minera. Pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años, contaminando el suelo y acumulándose en las plantas y los tejidos orgánicos. Su concentración en los seres vivos aumenta a lo largo de la cadena alimentaria, ya que no son ni química ni biológicamente degradables.

Los metales pesados tóxicos más conocidos son: Hg, Pb, Cd y As.

#### Determinación

Se realiza una previa digestión de la muestra, ya sea por vía seca o vía húmeda y se lleva a cabo una posterior determinación mediante técnicas espectroscópicas. Se pueden emplear técnicas monoelementales como la absorción atómica de llama (no tiene demasiada sensibilidad para cumplir con los límites legales establecidos para los metales pesados), cámara de grafito (mayor sensibilidad que la llama pero muy tediosa), vapor frío o amalgama (para el mercurio que es el único metal que es líquido a temperatura ambiente) o mediante la técnica del ICP-MS que permite una determinación multianalito alcanzando los límites establecidos en la legislación.

### 3.6. MELAMINA

La melamina es un producto químico que puede estar presente en los alimentos como resultado de su uso en los materiales en contacto con alimentos, (artículos de plástico, revestimientos de latas, papel, cartón y adhesivos), como un producto resultante de la degradación de cionazina utilizada como fitosanitario, medicamento veterinario, y retardante de llama o como consecuencia de la adulteración ilegal de alimentos y piensos.

En 2008, a raíz de los altos niveles de melamina encontrados en leche y otros productos lácteos destinados a la alimentación especial de lactantes y niños pequeños procedentes de China, se introdujo una medida de emergencia comunitaria prohibiendo la importación en la UE de productos lácteos originarios de China.

A efectos de protección de la salud pública en la Unión Europea se ha incluido en el Reglamento (CE) 1831/2003 una nueva Sección en la que se fija el contenido máximo de melamina en los productos alimenticios.

#### Determinación

-HPLC-MS/MS. Es el método más seguro para la cuantificación de melamina en diferentes matrices en el orden de las partes por billón (ppb) por su alta sensibilidad y selectividad en una amplia variedad de productos

-GC-MS. Se extraen muestras con una mezcla de acetonitrilo agua dietilamina y requieren de una mayor purificación para su posterior derivatización con TMS ante de aplicar la misma.

-HPLC-UV. Las muestras son extraídas con una mezcla de acetonitrilo y agua empleando un sistema de par iónico en sus análisis. No se alcanzan niveles muy bajos.

-ELISA. Se tratan de métodos de alta especificidad por su principio de reacción antígeno anticuerpo. Hablamos de ensayos cuantitativos y se emplean fundamentalmente en las matrices de leche fluida y en polvo, gluten de trigo y comida de mascota.

### 3.7. ACRILAMIDA

La acrilamida es una sustancia química que se crea de forma natural en productos alimenticios que contienen almidón durante procesos de cocinado cotidianos a altas temperaturas (fritura, cocción, asado y también durante procesos industriales a 120 °C y a baja humedad).

Se forma principalmente gracias a los azúcares y aminoácidos (sobre todo, la asparagina) que están presentes de forma natural en muchos alimentos. El proceso químico que causa esto se conoce como la reacción de Maillard, que también oscurece los alimentos y afecta al sabor.

La acrilamida y su metabolito, la glicidamida, son genotóxicas y carcinógenas. Puesto que cualquier nivel de exposición a una sustancia genotóxica podría dañar de forma potencial el ADN y conllevar la aparición de cáncer, los científicos de la EFSA concluyen que no pueden establecer una ingesta diaria tolerable (TDI) de acrilamida en alimentos.

En el 2017 se publicó el Reglamento (UE) 2017/2158 de la Comisión, por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos.

### Determinación

La acrilamida se extrae de la muestra con agua, posteriormente se favorece la precipitación de las proteínas y almidón, y el extracto se purifica mediante extracción en fase sólida. Su determinación se lleva a cabo mediante HPLC-MS/MS. Destacar que las masas que se monitorizan son muy pequeñas, y por ello, las interferencias que puedan existir son elevadas.

### 3.8. CARBAMATO DE ETILO

El etilcarbamato es un compuesto que se produce de manera natural en alimentos y bebidas fermentadas, principalmente en las bebidas alcohólicas. Este se forma por una reacción del etanol y ciertos precursores de la fruta por influencia de la luz durante el proceso de destilación, así como en algunos productos fermentados.

Es una sustancia clasificada como genotóxica y probable carcinógeno en humanos. La presencia de etilcarbamato en bebidas alcohólicas plantea un problema de salud, en especial en lo que se refiere a los brandies de frutas de hueso, y recomienda la adopción de medidas preventivas para reducir los niveles de etilcarbamato en estas bebidas.

La determinación se lleva a cabo mediante extracción con éter y posterior determinación por GC-MS.

### 3.9. 3-MCPD

El 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) es un compuesto químico que se forma durante el procesado de los alimentos. Se detectó por primera vez en salsas de soja y posteriormente en algunos aceites vegetales refinados, como el aceite de palma, utilizado ampliamente como ingrediente alimentario.

Cuando se aplican elevadas temperaturas (> 200 °C) sobre alimentos ricos en grasas, por ejemplo en el refinado de aceites, aparecen compuestos químicos como el 3-MCPD, el glicidol, los ésteres glicidílicos y el 2-MCPD.

Actualmente, en la UE hay establecido un contenido máximo permitido de 20 µg/kg de alimento para el 3-MCPD en proteína vegetal hidrolizada y salsa de soja, incluido en el Reglamento 1881/2006.

Recientemente se han debatido, en el seno de la Comisión Europea, los niveles máximos de la suma de 3-MCPD y sus ésteres y del glicidol y sus ésteres lo más bajos como sea razonablemente posible con el fin de conseguir un nivel adecuado de protección de la salud de todos los consumidores, especialmente de los grupos de población vulnerable.

### Determinación

La determinación del MCPD se lleva a cabo en primer lugar produciendo una extracción líq-líq de la muestra y posterior limpieza. El analito de interés se encuentra en la fase acuosa así que, se desecha la fase orgánica. Posteriormente el MCPD se derivatiza y su determinación se lleva a cabo por GC-MS.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/detalle/contaminantes.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/contaminantes.htm)
- <https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/proteccion-nitratos-pesticidas/impacto-calidad-agua/>
- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/Toxinas\\_Fusarium\\_ficha\\_JUL15.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Toxinas_Fusarium_ficha_JUL15.pdf)
- <https://acsa.gencat.cat/es/detall/article/Acido-erucico>
- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/HCN.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/HCN.pdf)
- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/THCpdf.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/THCpdf.pdf)
- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/THCpdf.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/THCpdf.pdf)
- <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/haps/>
- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/metales\\_pesados.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/metales_pesados.htm)
- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/ampliacion/melamina.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/melamina.htm)
- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/acrilamida.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/acrilamida.htm)
- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/3\\_MCPD.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/3_MCPD.htm)
- [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/ampliacion/etilcarbamato.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/etilcarbamato.htm)

## **MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 44**

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ANIMALES EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES VEGETALES EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS. MÉTODOS ANALÍTICOS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ANIMALES EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS**

#### **1.1. INTRODUCCIÓN**

#### **1.2. CAMPAÑAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ANIMALES EN LA UE**

##### **1.2.1. Crisis de la Carne de Caballo**

##### **1.2.2. Plan Coordinado de Control de Sustitución de Especies de Pescado**

##### **1.2.3. Operación Opson VII de Lucha contra Prácticas Fraudulentas**

### **2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES VEGETALES EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS**

#### **2.1. PLAN NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE LA CADENA ALIMENTARIA (PNCOCA)**

### **3. MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.1. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

##### **3.1.1. Técnicas Electroforéticas**

##### **3.1.2. Técnicas Cromatográficas**

##### **3.1.3. Técnicas Inmunológicas**

#### **3.2. TÉCNICAS GENÉTICAS**

##### **3.2.1. PCR- Secuenciación**

##### **3.2.2. Análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción de Regiones Amplificadas por PCR (RFLP-PCR)**

##### **3.2.3. PCR especie específica**

##### **3.2.4. PCR a Tiempo Real (Rt-PCR) o PCR Cuantitativa (qPCR)**

##### **3.2.5. PCR Digital**

##### **3.2.6. Secuenciación de Nueva Generación (NGS)**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 1. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ANIMALES EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La Identificación de especies animales tiene el objetivo principal de evitar el fraude económico en los alimentos y productos agroalimentarios que se ponen en el mercado evitando el engaño al comprador que muchas veces es el consumidor final.

Este fraude intenta sacar ventaja del hecho de declarar el producto con unos componentes o ingredientes animales de determinada calidad, dando un valor económico de venta por este hecho mientras que uno o más de ellos son sustituidos por otra materia prima de menor valor económico, generalmente por tanto de menor calidad.

El fraude en los alimentos que se comercializan se lleva haciendo desde tiempos inmemoriales, y también diversas maneras de luchar contra éste.

Sin embargo, en tiempos más recientes desde el último tercio del siglo pasado, con la mejora tecnológica en instrumentos y en metodologías y normativas más estrictas para proteger el derecho de los consumidores y aumentar la confianza en la Administración Pública que es la encargada de velar por dicho derecho, se establecieron más y mejores métodos que ayudan a los servicios de inspección en la labor del control de la calidad de las producciones y de los productos agroalimentarios, especialmente aquellos que sufren algún tipo de transformación industrial.

Las características comunes de estos métodos mejorados es que son:

- Más específicos: permiten detectar con precisión el analito de interés en una mezcla compleja de componentes como puede ser un producto agroalimentario transformado.
- Más sensibles: se puede detectar con seguridad el analito a niveles muy bajos, ppm o incluso menos.
- Más rápidos: se puede dar respuesta en menos tiempo, sobre todo en situaciones de alertas alimentarias como fue hace unos años el fraude de la carne de caballo.

Como técnica genética puntera en este campo está la secuenciación de nueva generación (NGS) o secuenciación masiva.

Los métodos en los que se aplica la secuenciación masiva permiten luchar eficazmente contra el fraude sobre todo en los derivados cárnicos y en los preparados a base de pescado.

En el caso de los derivados cárnicos, por ejemplo en hamburguesas, se pueden identificar las diferentes especies que están presentes, principalmente animales (vacuno, porcino, aviar, ovino, equino, etc) pero también vegetal que sirva para hacer el preparado culinario (especias, hierbas aromáticas, adobados, etc).

En el caso de los platos preparados a base de pescado en los que por el tratamiento de transformación hace que no se puedan identificar macroscópicamente las especies presentes, permite detectar si ha habido sustitución por especies de menor valor.

Esto es particularmente importante debido al valor económico del fraude en el caso de sustitución de especies de túnidos (atún rojo), merlúcidos (merluza europea), gádidos (bacalao del Atlántico) y peces planos (lenguado, rodaballo).

## **1.2. CAMPAÑAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ANIMALES DE LA UNION EUROPEA**

### **1.2.1. Crisis de la carne de caballo**

A raíz de la crisis económica del 2008 en algunas zonas de Europa los animales de la especie equina que debían ir a matadero y para aprovechamiento de subproductos cárnicos en piensos se desviaron fraudulentamente a alimentación humana para darle más valor. En los años 2014 y 2015 se realizó a nivel de la Unión Europea una campaña de control de dicho fraude, tanto en inspección como en análisis de muestras. El control de laboratorio se realizó mediante análisis por PCR para detectar la presencia de ADN de caballo en muestras de carne sin transformar o en derivados cárnicos. El Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA) participó en el análisis de parte de las muestras que España debía realizar (300 en total)

### **1.2.2. Plan coordinado de control de sustitución de especie de pescado**

Siguiendo con la lucha contra el fraude en la UE, en el año 2015 la campaña que se realizó fue sobre sustitución de especies de pescado. También el LAA fue uno de los laboratorios encargados del control analítico. La técnica que se utilizó en el LAA fue la PCR-Secuenciación. Mediante PCR se amplifica un gen universal (los más usados son el Citocromo B, CitB y la Citocromo C Oxidasa I, COI) y a continuación se secuencia para saber el orden de bases del fragmento amplificado del gen de la especie que se encuentra en la muestra. La secuencia obtenida se confronta con una base de datos de genomas que contenga especies de pescado y se compara si coincide la especie detectada con la declarada (nombre científico o nombre comercial) para comprobar si hay fraude por sustitución o no. A nivel nacional se analizaron al menos 280 muestras.

### **1.2.3. Operación Opson VII de lucha contra prácticas fraudulentas en la industria del atún**

Coordinada entre la *Red UE de fraude en alimentos* y Europol, en el año 2018 en el LAA se analizaron 89 muestras de carne de túnidos, en fresco o congelado. Al igual que el plan para el pescado se empleó la PCR-secuenciación para determinar la especie de túnido que correspondía la muestra.

## **1.3. IDENTIFICACION DE ESPECIES ANIMALES EN PROTEÍNAS ANIMALES TRANSFORMADAS**

A raíz de la crisis de las vacas locas (encefalopatías espongiformes transmisibles, EET) en Europa a finales del siglo pasado, se prohibió el uso de subproductos de origen animal (principalmente de mataderos) como fuente de proteína en piensos para ganado. Una vez que la incidencia de dicha enfermedad en el ganado vacuno descendió a unos niveles aceptables, se permitió el uso de algunos de estos subproductos (de origen porcino y aviar) en algunos tipos de animales tras tratamiento térmico intenso para destruir los priones. Estos productos se denominan en conjunto *proteínas animales transformadas* (PATs o también PAPs).

Desde el 2021, se permite el uso de PATs en acuicultura, porcino y aviar pero evitando el canibalismo, esto es, dar una proteína animal de una determinada especie en ganado de esa misma especie. Se hace necesario conocer la especie animal origen de la PAT para ver si se emplea de manera correcta.

Para comprobar el cumplimiento de la normativa comunitaria, se han desarrollado métodos que *detectan* e *identifican* estas PATs en los piensos y sus materias primas. La técnica principal de *detección* (obligatoria por normativa europea) es la microscopía óptica que permite detectar fragmentos de músculo esquelético y huesos de animales terrestres y la técnica de *elección* (también obligatoria) para la *identificación* de la especie animal a la que pertenecen esos músculos o huesos es la PCR en tiempo real (RTPCR).

## 2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES VEGETALES EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

La verificación (desde su composición, origen definido y patogenicidad) de las especies vegetales presentes en productos alimenticios mediante métodos analíticos es una necesidad creciente para la industria alimentaria y los organismos de control oficiales.

La detección de sustituciones de especies de alto valor por otras de precio inferior en productos alimenticios, la verificación de los porcentajes de cada especie declarados en el etiquetado y la detección de especies no autorizadas son, entre otros, algunas de las aplicaciones de los métodos moleculares de identificación y cuantificación de especies vegetales en alimentos.

En lo que concierne a las especies vegetales presentes en un producto para alimentación, puede ser necesario conocer tanto su presencia como ausencia o, en su caso, la cantidad, a efectos de verificación de los valores declarados en el etiquetado. Diversos estudios han demostrado que el etiquetado incorrecto, bien sea fortuito o intencionado, es práctica más frecuente de lo deseado, tanto en productos elaborados como frescos.

De una manera indirecta, también es necesario identificar las especies vegetales presentes en un alimento, un pienso o una materia prima en el caso del control de OMGs en alimentos o piensos pues dependiendo de dicha composición se realizará la búsqueda de los posibles omgs presentes en la muestra sometida a análisis.

### 2.1. PLAN NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE LA CADENA ALIMENTARIA (PNCOCA)

Es importante reseñar que a nivel nacional la lucha contra el fraude se realiza de manera coordinada entre la administración central y las administraciones regionales. Para ello y en base a un análisis y categorización de riesgos se elabora el plan plurianual PNCOCA. El que se está aplicando en la actualidad es el 2021-2025.

Como indica en sus Objetivos de Alto Nivel:

Objetivo 3: Garantizar la consecución de un elevado nivel de calidad alimentaria intensificando la lucha contra el fraude alimentario a lo largo de toda la cadena alimentaria

Objetivo 4: Reducir el riesgo para la salud de las personas ... intensificando además la lucha contra las prácticas fraudulentas o engañosas en animales, plantas y alimentos introducidos o importados a través de las fronteras españolas.

A nivel analítico y entre otros ensayos, se pueden destacar los siguientes programas de control de la calidad desarrollados por el Laboratorio Arbitral Agroalimentario en los que se realiza identificación de especies, bien de manera directa o bien de algún componente que permita dilucidar la especie de origen del producto:

- Análisis físico-químico, isotópico y melisopolinográfico para caracterización de mieles españolas.
- Plan Coordinado de Control sobre prácticas fraudulentas en la comercialización de especias (COM-EU).

### **3. MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.1. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

Este tipo de métodos se basan en la detección de proteínas específicas de especie, o de patrones/perfiles proteicos específicos. Algunos de estos métodos se utilizan rutinariamente para la detección de especies en alimentos, sobre todo para las especies cárnicas. El uso de marcadores proteicos permite obtener los primeros conocimientos de la estructura y heterogeneidad genética entre las diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico.

Los métodos basados en proteínas se utilizan especialmente en productos frescos o poco procesados ya que su eficiencia disminuye cuando se trata de productos con un alto grado de calentamiento, como un proceso de esterilización, en el que se ve afectada la integridad estructural de las proteínas y en consecuencia sus propiedades bioquímicas. Del mismo modo, la eficiencia de las técnicas de análisis de proteínas disminuye cuando se pretende la diferenciación de productos elaborados a partir de especies filogenéticamente cercanas.

##### **3.1.1. Técnicas electroforéticas**

Los métodos electroforéticos están basados en la identificación de patrones de proteína específicos tras la separación por diferencias de movilidad de las proteínas bajo la acción de un campo eléctrico. El movimiento de las proteínas, dependerá de su tamaño y de la carga neta que presenten en el pH del tampón seleccionado para el análisis.

La identificación de especies se realiza comparando el perfil electroforético obtenido a partir de las proteínas musculares de las muestras problema, con los patrones de bandas de muestras de referencia. La comparación puede ser visual, o bien utilizando un densitómetro o un analizador de imágenes. Habitualmente, para comparar los patrones de bandas es necesario analizar las muestras de referencia en el mismo gel que las desconocidas, ya que pequeños cambios en las condiciones experimentales pueden alterar los perfiles proteicos obtenidos.

Para la identificación de especies animales en carne y productos cárnicos se pueden utilizar diversas técnicas electroforéticas, dependiendo del grado de resolución que se desee obtener, así como del tipo de tratamiento que haya experimentado el producto durante el procesado. Las más utilizadas son

- la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDSPAGE). Es posible su aplicación en productos que hayan sufrido un proceso de condiciones desnaturalizantes.
- el isoelectroenfogue (IEF).
- la electroforesis capilar (CE). Permite detectar y cuantificar simultáneamente diferentes moléculas realizando un análisis completamente automatizado de proteínas sin necesidad de operarios especializados.

**Limitantes:** los principales inconvenientes de la técnica de SDS-PAGE y el IEF derivan de la complejidad de los perfiles proteicos obtenidos y de la necesidad de disponer de personal entrenado e instrumental especializado para realizar los análisis. La principal limitación de la CE reside en la necesidad de poner a punto sistemas de detección adecuados para cada compuesto que, además, han de ser muy sensibles debido a los pequeños volúmenes que se utilizan.

### 3.1.2. Técnicas cromatográficas

Los métodos electroforéticos son relativamente lentos y requieren varios pasos previos a la visualización del gel, por lo que una alternativa a la electroforesis son las técnicas cromatográficas.

Dentro de éstas, los métodos más habituales en la separación de proteínas y péptidos son los que utilizan cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). Empleada inicialmente en la identificación de especies filogenéticamente alejadas (órdenes y/o clases distintas), sigue sin ser aplicable a muestras que hayan sufrido un tratamiento térmico.

### 3.1.3. Técnicas inmunológicas

La aplicación de las técnicas inmunológicas a la identificación de especies presenta importantes ventajas con respecto a las electroforéticas y de HPLC: reducción del tiempo y coste del análisis, disminución de la cantidad de muestra necesaria, utilización de instrumental poco complejo y posibilidad de semi-automatización y aplicación en pruebas de campo y kits miniaturizados. Además, su adecuada sensibilidad y especificidad las hacen especialmente útiles para el análisis rutinario de los alimentos.

**El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)** es el método de identificación proteico de especies más utilizados y adecuados para aplicaciones de laboratorios de análisis y control de calidad. Este método se basa en el uso de un anticuerpo preparado frente a una región antigénica característica de la especie, lo que permite su detección mediante un anticuerpo secundario conjugado. De esta manera, posibilita la identificación visual o mediante técnicas analíticas convencionales como la espectrometría o fluorimetría.

Los análisis se pueden utilizar como herramienta de detección y, en algunos casos, permiten también la cuantificación de proteína comparando con patrones con cantidades conocidas de la proteína diana.

Las técnicas inmunoenzimáticas se han desarrollado en diversos formatos atendiendo al componente de la reacción que se fija en primer lugar, la fase sólida utilizada y si se emplean o no concentraciones limitantes de antígeno y anticuerpo. En la identificación de especies, los más utilizados son: el ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA sándwich.

### 3.2. TÉCNICAS GENÉTICAS

Las técnicas genéticas de identificación están basadas en la detección de secuencias de DNA únicas para cada especie. La molécula de DNA ofrece una serie de ventajas cuando se compara con los marcadores proteicos:

- La información genética que contienen los tipos celulares de un individuo es idéntica y por tanto la identificación es independiente del tejido. En cambio, las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta según diversos factores.
- El que un determinado aminoácido pueda estar codificado por más de un triplete, otorga al DNA un carácter más informativo debido a su mayor variabilidad.
- En la identificación molecular de especies es importante tener en cuenta que las regiones de DNA seleccionadas deben acumular mutaciones a una velocidad suficiente como para que especies estrechamente relacionadas presenten secuencias de nucleótidos diferentes, permitiendo su diferenciación, pero a su vez, que esta velocidad sea lo suficientemente lenta como para que tales diferencias no aparezcan dentro de la misma especie.
- Otra de las características del DNA es su estabilidad a altas temperaturas, lo que hace que sea más fácil analizar alimentos que han pasado por procesos de degradación.

#### 3.2.1. PCR- secuenciación

Los métodos basados en amplificación mediante PCR y secuenciación de regiones variables constituyen la forma más directa y de obtener información de los productos de PCR ya que se obtiene la secuencia completa de la región amplificada.

Este método de identificación de especies consiste en la amplificación de un determinado fragmento de un gen por PCR y su posterior secuenciación. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas se pueden identificar diferencias interespecíficas que permiten diferenciar las especies estudiadas.

Actualmente, los métodos de secuenciación más utilizados son

- El método de Sanger se basa en la utilización de isótopos radioactivos y autorradiografías de gel para la secuenciación del ADN.
- La secuenciación automática se realiza mediante el empleo de compuestos fluorescentes, uno para cada una de los 4 nucleótidos que forman el ADN.

No obstante, la secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR sigue siendo una herramienta analítica relativamente costosa como técnica de análisis rutinaria.

#### ➤ **DNA barcoding**

Recientemente, la técnica de secuenciación denominada *DNA barcoding* o “código de barras del ADN”, está suscitando un enorme interés en el campo de la identificación de especies. Esta tecnología se basa en la amplificación por PCR y secuenciación de un fragmento de aproximadamente 650 pb del gen mitocondrial que codifica la subunidad 1 de la enzima citocromo c oxidasa (COI), con objeto de generar secuencias de ADN diagnóstico o de referencia que actúen como etiquetas de identificación molecular de las especies objeto de análisis.

Así, mediante el estudio y comparación de cada secuencia de ADN diagnóstica con muestras de referencia, es posible la categorización de las secuencias y la consiguiente identificación del origen de las muestras analizadas.

Otra característica innovadora del DNA *barcoding* es que se utiliza la información de una misma región génica, en todos los taxones y con condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas, destacando la necesidad de relacionar esta información con muestras de referencia depositadas en museos. De este modo, se pretende que el código de barras tenga una aplicación a gran escala.

### **3.2.2. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (RFLP-PCR)**

La técnica de PCR-RFLP ha sido ampliamente utilizada para la identificación de especies en carne y productos cárnicos. Se basa en la amplificación de fragmentos de ADN específicos mediante PCR y su posterior tratamiento con enzimas de restricción, que los cortan en fragmentos más pequeños.

Las diferencias existentes en la secuencia nucleotídica entre las distintas especies estudiadas, dan lugar a fragmentos de diferentes tamaños que se examinan mediante electroforesis.

En contrapartida, esta técnica puede dar lugar a errores de identificación si existe una variabilidad intraespecífica elevada, ya que sería posible localizar variaciones en la secuencia de las dianas de las enzimas que originasen un patrón que no se corresponde con el esperado.

De igual manera, su aplicación en productos con un alto grado de procesamiento podría verse limitada a utilizar únicamente productos de PCR pequeños y por lo tanto disminuir su capacidad resolutive. Por otro lado, si en el producto analizado están presentes dos o más especies distintas, los patrones electroforéticos obtenidos pueden ser difíciles de interpretar.

### **3.2.3. PCR especie específica**

Esta técnica consiste en el diseño de cebadores específicos que permitan amplificar únicamente el ADN de la especie objetivo, es decir, especie para la cual han sido diseñados los cebadores, de manera que al realizar una PCR con dichos cebadores, únicamente existirá amplificación si está presente ADN de dicha especie.

Para tal fin es necesario conocer la secuencia diana en la que se van a diseñar los cebadores, tanto en la especie de interés como en otras especies filogenéticamente cercanas y que existan diferencias en la secuencia correspondiente a la unión de los cebadores entre la especie objeto y el resto de las especies. Esta técnica permite la posibilidad de realizar una PCR múltiple, permitiendo así la identificación de varias especies a la vez.

Se trata de una técnica de relativo bajo coste, que necesita poco equipamiento, pero con el requerimiento de contar con una base de datos de secuencias nucleotídicas a partir de las cuales se pueda realizar el diseño de los cebadores.

### 3.2.4. PCR a tiempo real (RTPCR) o PCR cuantitativa (qPCR)

Actualmente, los ensayos de PCR que se desarrollan en varios pasos están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo. Sendos avances se basan en la utilización de equipos con un sistema de detección espectrofluorimétrica, que permiten identificar en tiempo real el producto de amplificación generado, siendo esta la diferencia principal con respecto a la PCR convencional.

En los últimos años, se han descrito varios tipos de ensayos de PCR en tiempo real, que se pueden dividir en dos grandes grupos:

- ✓ Sistemas no específicos. Detectan la presencia o ausencia de amplicones, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados.
- ✓ Sistemas específicos. Se emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (*TaqMan*<sup>®</sup>, *FRET*, *Molecular Beacons* y *Scorpions*), que hibridan específicamente en la secuencia del ADN diana.

La técnica de PCR en tiempo real presenta numerosas ventajas en el análisis rutinario de los alimentos.

- A) El tiempo necesario para obtener los resultados se reduce, al no requerir el análisis electroforético posterior de los productos de PCR.
- B) Al realizarse todo el proceso en el mismo tubo, se minimizan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno y se facilita la automatización.

No obstante, el mayor inconveniente de estos sistemas es su elevado coste en comparación con otros métodos de PCR como la técnica de PCR-RFLP o la técnica de PCR convencional con cebadores específicos así como el personal especializado para la puesta a punto de los métodos.

### 3.2.5. PCR digital (dPCR)

Es la técnica de PCR más recientemente desarrollada (unos 15 años). En resumen, se intenta que las moléculas del ADN a amplificar se lleven a una dilución límite en la que en la reacción de PCR hubiera idealmente una sola molécula del ADN diana (resultado positivo) o ninguna (resultado negativo). Para ello es necesario disponer de equipos que puedan realizar de manera simultánea una miríada de reacciones de PCR independientes y que dichos equipos también puedan realizar de manera individual las lecturas finales de la señal de amplificación para determinar su resultado como positivo o negativo.

En la actualidad hay dos sistemas de uso, los chips y los cartuchos.

En los chips, se deposita la reacción completa (reactivos de PCR y muestra) y en estos dispositivos se va a dividir el volumen de la reacción completa en el número de particiones que tiene el chip. Este se somete posteriormente a un programa de amplificación mediante PCR que puede ser a tiempo final o a tiempo real.

La metodología de los cartuchos se aplica en la llamada **PCR digital de gotitas (droplet digital PCR, ddPCR)**. Los cartuchos son estructuras con microcanales que se emplean para preparar las reacciones individuales contenidas en gotas de emulsión de aceite en agua

en número de hasta 20.000 por reacción completa. Las gotas de emulsión, que llevan todos los reactivos de amplificación y la muestra, se depositan en un pocillo de una placa de reacción. Esta placa se sitúa en un termociclador de tiempo final y se somete al programa de amplificación.

Posteriormente la placa se lleva a un lector de gotas que por succión las va a ir recogiendo de cada pocillo y trasportando a la cabeza lectora que porta un microconducto de un diámetro tal que las gotas de emulsión van a ir pasando una a una. En esta cabeza hay un sistema parecido a un espectrofotómetro que va a detectar el paso de cada gota y recoger la cantidad de luz en el espectro fluorescente que se emite de ella.

En los equipos actuales la cabeza lectora puede leer intensidades a dos longitudes de onda lo que permite aplicar métodos de PCR duplex.

Para ambos sistemas se va a tener una lectura de intensidad de fluorescencia por unidad básica o partición (celda del microchip, gota de emulsión en la PCR de gotas)

El programa de manejo de cada sistema nos va a representar una gráfica de unidades de lectura (celdas o gotas) frente a intensidad relativa de fluorescencia. En el caso más simple e ideal se van a tener dos nubes separadas de puntos, una inferior que corresponde a los valores bajos de fluorescencia de las unidades sin amplificación (negativos) y una nube superior de valores altos de fluorescencia de las unidades en las que hay presencia de moléculas de ADN diana y se ha producido amplificación (positivos).

El propio programa calculará los valores del número de particiones positivas, particiones negativas y el total de particiones leídas. Aplicando el estadístico de Poisson el programa nos va a dar el número de copias del ADN diana por unidad de volumen de la reacción.

En la puesta a punto de un método que emplee la técnica de dPCR, se determinara el límite de detección (en este caso absoluto) que permitirá decidir si en una muestra se detecta o no se detecta el analito al que corresponde el ADN diana en cuestión.

También se tiene una cuantificación absoluta del analito, expresada en copias de genoma por unidad de volumen.

### **3.2.6. Secuenciación de nueva generación (NGS)**

También denominada secuenciación masiva, sirve tanto para especies animales terrestres, marinas (pescado y marisco) como vegetales y también microorganismos.

La secuenciación clásica o Sanger permite identificar la especie de ser vivo presente en un producto alimenticio cuando sólo exista una única especie o esta esté muy por encima de otras especies, de lo contrario no se puede obtener una secuencia de bases correcta de la muestra para poderla confrontar a una base de genomas e identificar por homología de secuencias.

La técnica reciente de secuenciación de nueva generación o secuenciación masiva, permite realizar millones de secuenciaci3nes iguales o diferentes en una sola muestra (e incluso en varias a la vez). Tras ensamblaje de los fragmentos secuenciados empleando programas bioinformáticas muy potentes, se pueden identificar múltiples especies e incluso

adaptando la metodología se pueden hacer estimas de la cantidad de cada especie detectada respecto del total de las especies.

Al ser una técnica que tiene pocos años de aplicación práctica y todavía no está muy difundida tiene el inconveniente de que los aparatos, el material y los reactivos son bastante caros, aunque poniendo a punto métodos que permitan el análisis de varias muestras a la vez permite disminuir el coste por análisis considerablemente. También requiere de personal altamente especializado en dicha técnica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. López Andreo, M. (2013). *Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real*. [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid].
2. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (s.f.). *Trazabilidad animal*. Gobierno de España. Disponible en <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/trazabilidad-animal/>
3. Rodríguez Ramos, MA. (2004). Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (ELISA), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en foie gras. [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid].
4. Rojas Diéguez, M. (2011). *Identificación de carnes y productos cárnicos procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa mediante técnicas genéticas de PCR*. [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid].
5. Sánchez Díaz, AC. (2012). *Identificación y Cuantificación de Especies del Género Merluccius Mediante la Utilización de PCR a Tiempo Real*. [Tesis doctoral, Universidad de Vigo].
6. Sforza, S. (2013). Food Authentication using Bioorganic Molecules, Volumen X. Pennsylvania, 2013.

**MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 45**

**ALÉRGENOS. LEGISLACIÓN. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN EN ALIMENTOS.**

*Este material no tiene carácter oficial, por lo que en ningún caso vinculará al Tribunal Calificador. Constituye, únicamente, un instrumento complementario que servirá de apoyo al opositor para enfocar cada uno de los epígrafes, pero nunca de forma exclusiva ni excluyente. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación no se hace responsable del contenido del mismo.*

*Los materiales no serán objeto de actualización constante.*

## **ÍNDICE**

### **1. ALÉRGENOS**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. LISTA OFICIAL DE ALÉRGENOS ALIMENTARIOS

### **2. LEGISLACIÓN**

### **3. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN EN ALIMENTOS**

3.1. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

3.1.1. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)

3.1.2. Inmunoensayo de Flujo Lateral (LFIA)

3.2. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

3.2.1. Electroforesis Desnaturalizante en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

3.2.2. Inmunolectroforesis (Western blot)

3.3. BIOSENSORES

3.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

3.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### **BIBLIOGRAFIA**

## 1. ALÉRGENOS.

### 1.1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Código de prácticas sobre la gestión de los alérgenos alimentarios por parte de los operadores de empresas de alimentos (**CXC 80-2020**), alérgeno se refiere a una sustancia, por lo demás inocua, capaz de provocar una respuesta que se inicia en el sistema inmunológico y da lugar a una reacción alérgica en determinadas personas. En el caso de los alimentos, se trata de una proteína que se encuentra en ellos y que puede provocar una respuesta en las personas sensibilizadas a dicha proteína.

Las alergias alimentarias, una hipersensibilidad a los alimentos mediada por el sistema inmunológico, son una cuestión cada vez más preocupante en relación con la inocuidad de los alimentos a escala mundial y se han convertido en una pesada carga para la salud pública e individual. Una mala gestión de los alérgenos puede dar lugar a la presencia de niveles variables de alérgenos no declarados o involuntarios en los alimentos, lo que podría suponer un riesgo si los consume una persona con una alergia al alimento.

El contacto cruzado con alérgenos puede deberse a una serie de factores en la elaboración, la preparación y la manipulación de los alimentos, algunos de los cuales implican una mayor posibilidad de contacto cruzado con alérgenos que otros. Las medidas de control aplicadas para evitar o reducir al mínimo la probabilidad del contacto cruzado con alérgenos deberían basarse en *la evaluación de riesgos* realizada por los operadores de empresas de alimentos. Es importante que los operadores de empresas de alimentos sean capaces de identificar el carácter alérgico de los alimentos, incluidos los ingredientes y los coadyuvantes de elaboración que manipulan, y tomen medidas para gestionar cualquier posible presencia de alérgenos no declarados.

### 1.2. LISTA OFICIAL DE ALÉRGENOS ALIMENTARIOS

- Sustancias o productos que causan alergias o intolerancias, recogidas en el Anexo II del **Reglamento (UE) 1169/2011** del parlamento europeo y del consejo de 25 de octubre de 2011 y la posterior comunicación de la Comisión Europea (**2017/C 428/01**).

Dicha lista ha sido elaborada sobre la base de dictámenes científicos adoptados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

En el anexo II se enumeran no solo las sustancias y productos que se mencionan como tales, sino también sus productos derivados. En caso de que los microorganismos hayan sido alimentados con un sustrato que sea un ingrediente alimentario incluido en el anexo II, tales microorganismos no deben considerarse productos derivados de dichos sustratos.

|     |   |
|-----|---|
| 1.  | <p><u>Cereales que contengan gluten</u>, a saber: trigo (como espelta y trigo khorasan, centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas y productos derivados, salvo:</p> <p>a) jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa;</p> <p>b) maltodextrinas a base de trigo;</p> <p>c) jarabes de glucosa a base de cebada;</p> <p>d) cereales utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola</p>   |
| 2.  | Crustáceos y productos a base de crustáceos.  |
| 3.  | Huevos y productos a base de huevo (huevos de todas las aves de cría).  |
| 4.  | <p><u>Pescado y productos a base de pescado</u>, salvo:</p> <p>a) gelatina de pescado usada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides;</p> <p>b) gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino</p>   |
| 5.  | Cacahuets y productos a base de cacahuets.  |
| 6.  | <p><u>Soja y productos a base de soja</u>, salvo:</p> <p>a) aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados;</p> <p>b) tocoferoles naturales mezclados (E306), d-alfa tocoferol natural, acetato de d-alfa tocoferol natural y succinato de d-alfa tocoferol natural derivados de la soja;</p> <p>c) fitosteroles y ésteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja;</p> <p>d) ésteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja</p>   |
| 7.  | <p>Leche (procedente de la glándula mamaria de animales de granja) y sus derivados (incluida la lactosa), salvo:</p> <p>a) lactosuero usado para hacer destilados alcohólicos, incluido alcohol etílico agrícola;</p> <p>b) lactitol</p>  |
| 8.  | <p><u>Frutos de cáscara</u>, es decir: almendras (<i>Amygdalus communis L.</i>), avellanas (<i>Corylus avellana</i>), nueces (<i>Juglans regia</i>), anacardos (<i>Anacardium occidentale</i>), pacanas [<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch], nueces de Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>), alfóncigos (<i>Pistacia vera</i>), nueces macadamia o nueces de Australia (<i>Macadamia ternifolia</i>) y productos derivados, salvo:</p> <p>los frutos de cáscara utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.</p> |
| 9.  | Apio y productos derivados.   |
| 10. | Mostaza y productos derivados.  |
| 11. | Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo.  |
| 12. | Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro en términos de SO <sub>2</sub> total, para los productos listos para el consumo o reconstituidos conforme a las instrucciones del fabricante.   |
| 13. | Altramuces y productos a base de altramuces.  |
| 14. | Moluscos y productos a base de moluscos.  |



Figura 1. Símbolos utilizados en la declaración de alérgenos actualizados a 2022

## 2. LEGISLACIÓN

1. REAL DECRETO 2220/2004, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio.
2. REGLAMENTO (UE) nº 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.

Es importante que se facilite información sobre la presencia de aditivos alimentarios, coadyuvantes tecnológicos y otras sustancias o productos con efectos alérgicos o de intolerancia demostrados científicamente para que los consumidores, especialmente aquellos que sufran una alergia o intolerancia alimentaria, elijan con conocimiento de causa las opciones que sean seguras para ellos.

En el artículo 44 se especifica que aunque los estados miembros deben seguir teniendo derecho, dependiendo de las condiciones y las circunstancias prácticas locales, a establecer normas respecto a la información sobre alimentos no envasados, debe facilitarse al consumidor la información sobre los alérgenos potenciales.

Será obligatorio mencionar en el etiquetado todo ingrediente o coadyuvante tecnológico que figure en el anexo II o derive de una sustancia o producto que figure en dicho anexo que cause alergias o intolerancias y se utilice en la fabricación o la elaboración de un alimento y siga estando presente en el producto acabado, aunque sea en una forma modificada. Para ello debe destacarse

Si hay lista de ingredientes: mediante una composición tipográfica que la diferencie claramente del resto, por ejemplo mediante el tipo de letra, el estilo o el color de fondo.

Si no hay lista de ingredientes: incluirá la palabra «contiene» seguida del nombre de la sustancia o el producto según figura en el anexo II (1169/2011).

Todos los productores deben poner en el etiquetado “puede contener (alérgeno)”, en el caso de que por circunstancias de la cadena de producción pueda existir accidentalmente por contaminación cruzada algún alérgeno de los indicados en la lista. A este aviso se le denomina etiquetado precautorio. No es declaración obligatoria en el etiquetado, pero sí recomendable.

De esta manera, se actualizaban las directrices vigentes sobre el etiquetado de alérgenos recogidas en la Directiva 2000/13/CE.

3. REGLAMENTO (UE) nº 609/2013, relativo a los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad, los alimentos para usos médicos especiales y los sustitutivos de la dieta completa para el control de peso.
4. REGLAMENTO DELEGADO (UE) nº 1155/2013 por el que se modifica el Reglamento (UE) nº 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, en lo referente a la información sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos.
5. REGLAMENTO DELEGADO (UE) nº 78/2014 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, por lo que se refiere a determinados cereales que causan alergias o intolerancias y alimentos con fitosteroles, ésteres de fitosterol, fitostanoles o ésteres de fitoestanol añadidos.
6. REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) No 828/2014 relativo a los requisitos para la transmisión de información a los consumidores sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos. Se establecen los criterios que permiten el empleo en los alimentos de las menciones “sin gluten” y “muy bajo en gluten”. Tales declaraciones podrán adicionalmente acompañarse de las menciones “adecuado para las personas con intolerancia al gluten” o “adecuado para celíacos”.
7. REAL DECRETO 126/2015 por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al menor.

En el mismo se aclara que la información sobre las sustancias y productos susceptibles de causar alergias e intolerancias estará disponible en establecimientos donde se venda y deberá facilitarse siempre que la soliciten los consumidores o las autoridades de control.

8. COMUNICACIÓN DE LA COMISIÓN (2017/C 428/01) de 13 de julio de 2017 relativa a la información alimentaria facilitada acerca de las sustancias o productos que causan alergias o intolerancias, según figuran en el anexo II del Reglamento (UE) nº

1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. La presente comunicación tiene por objeto la actualización de las disposiciones en materia de información sobre alérgenos en el caso de alimentos y sus derivados tanto envasados como no envasados.

9. **REGLAMENTO (UE) 2021/382** por el que se modifican de los anexos del Reglamento 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios, en lo que respecta a la gestión de los alérgenos alimentarios, la redistribución de alimentos y la cultura de seguridad alimentaria.

Con objeto de evitar la contaminación cruzada de alérgenos, el equipo, medios de transporte o recipientes utilizados para la recolección, el transporte o el almacenamiento de alguna de las sustancias o productos que causan alergias o intolerancias no se utilizarán para la recolección, el transporte ni el almacenamiento de alimentos que no contengan dicha sustancia o producto, a menos que se hayan limpiado el equipo, los medios de transporte o los recipientes y se haya comprobado al menos la ausencia en ellos de cualquier resto visible de dicha sustancia o producto.

### 3. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN EN ALIMENTOS

Para poder cumplir con los requisitos exigidos en las normativas y declarar correctamente los alérgenos en el etiquetado, las industrias alimentarias han tenido que analizar sus productos para garantizar la ausencia de alérgenos alimentarios o por el contrario declararlos en el etiquetado. Los métodos utilizados para la detección de alérgenos en alimentos se dividen en dos grupos:

- ✓ **Métodos directos:** detectan la proteína alergénica siendo métodos inmunológicos o no inmunológicos, mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas, inmunoquímicas y espectrométricas.
- ✓ **Métodos indirectos:** detectan indicadores de la presencia de alérgenos, mediante técnicas genéticas que reconocen fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifican para proteínas alergénicas.

Actualmente, no existe un método ideal que incluya las principales ventajas de rapidez, sensibilidad, especificidad, fiabilidad, facilidad etc. requeridas para esas analíticas, sino que todas contienen algunas limitaciones. Aun así, hay métodos más idóneos respecto al tipo de alérgeno a analizar, a la matriz en la que se encuentra y al grado de procesamiento sufrido.

#### 3.1. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Las técnicas inmunológicas se basan en la detección del complejo antígeno-anticuerpo. En estas técnicas se detectan las proteínas de los alérgenos alimentarios (antígenos) mediante

la interacción con anticuerpos específicos frente a ellos. Las principales ventajas de estas técnicas son

- capacidad de detectar pequeñas cantidades de una sustancia en una muestra
- alta sensibilidad
- especificidad

### 3.1.1. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)

Esta técnica es un método inmunológico basado en la reacción colorimétrica producida por el reconocimiento de antígenos, por medio de anticuerpos específicos marcados con una enzima, e inmovilizados sobre un soporte inmuoabsorbente. Existen diferentes técnicas de ELISA, siendo el ELISA tipo sándwich y el ELISA competitivo indirecto los más empleados para detectar alérgenos.

Actualmente, es el sistema más empleado para detectar alérgenos alimentarios de todas las técnicas inmunológicas existentes y es la más habitual en las industrias alimentarias. Debido a su alta sensibilidad, permite detectar bajas concentraciones de la proteína alergénica, por lo que resulta ser un buen método para la detección de ingredientes traza, es decir, contenidos de alérgenos en bajas cantidades presentes en el alimento, producidas por contaminaciones cruzadas no intencionadas durante el proceso de producción.

Se utiliza como método cualitativo para detectar la ausencia o presencia de proteínas alergénicas en alimentos; aunque también permite la cuantificación de alérgenos utilizando estándares de concentración conocida, con los que se puede comparar la absorbancia obtenida y establecer la cantidad presente en la muestra problema.

- **Ventajas:** su alta especificidad, su bajo coste respecto al equipo necesario en el análisis y los reactivos utilizados en su realización, además de su rapidez y sencillez en el manejo de la técnica.
- **Limitaciones:** los efectos del procesado térmico de los alimentos en la detección de alérgenos, los tratamientos de extracción proteica, las interferencias de la matriz y las reacciones cruzadas por la variabilidad de los anticuerpos. Debido a esto, se pueden dar resultados de falsos positivos y falsos negativos. Para evitar esto, se recomienda emplear anticuerpos monoclonales así como el uso de pruebas de confirmación no inmunológicas de los resultados positivos.

### 3.1.2. Inmunoensayo de Flujo Lateral (LFIA)

Esta técnica es una versión más sencilla del análisis ELISA. Tiene las ventajas de rapidez y facilidad para ser utilizadas en las industrias alimentarias, además de tener la posibilidad de ser transportadas más fácilmente.

Este análisis consiste en unas tiras que están constituidas por unas membranas de nitrocelulosa, nylon o polivinil fluoruro en las que se inmovilizan los anticuerpos específicos marcados con enzimas o con fluorocromos.

La muestra se aplica sobre la tira y si la muestra contiene la proteína alergénica, se produce la interacción con el anticuerpo formando el complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo asciende por capilaridad hasta la zona de la membrana que contiene otro anticuerpo fijado, que retendrá el complejo antígeno-anticuerpo.

- ✓ En caso positivo se visualizará una línea de color, siendo la intensidad directamente proporcional a la concentración del alérgeno en la muestra.
- ✗ En ausencia de alérgenos no se observa la línea coloreada.

Es una técnica muy sencilla y barata pero solo sirve de manera cualitativa puesto que la interpretación de los resultados se realiza de manera visual, aunque existe la posibilidad de detecciones cuantitativas utilizando lectores específicos.

### 3.2. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

Se basan en la separación electroforética de las proteínas, es decir, en la migración de las proteínas al aplicar un campo eléctrico en geles electroforéticos.

#### 3.2.1. Electroforesis Desnaturalizante en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

La técnica electroforética más utilizada en el análisis de alérgenos, la cual permite principalmente la detección cualitativa de alérgenos alimentarios y se emplea como método de cribado (*screening*).

Este método permite analizar los compuestos en una mezcla compleja, siempre que se encuentren en cantidades lo suficientemente grandes para poder detectarlas. Tiene la limitación de no poder detectar las proteínas alergénicas a nivel de trazas.

Sin embargo, ofrece las ventajas de alto poder de resolución, gran versatilidad por la composición del gel de acrilamida, consiguiendo la retención de las moléculas, obteniendo un mapeo de las bandas. Por ello, normalmente se utiliza como técnica de preparación para la extracción de las proteínas para ser analizadas por otras técnicas más sensibles como la espectrometría de masas.

### 3.2.2. Inmunolectroforesis (*Western blot*)

Esta técnica se basa en la detección de proteínas alergénicas mediante la interacción específica antígeno-anticuerpo. En total se dan tres etapas:

- 1) Electroforesis. Se usa la técnica SDS-PAGE para separar proteínas desnaturalizadas en función de su masa.
- 2) Transferencia (*blotting*). Para hacer accesibles las proteínas para su detección, son transferidas desde el gel hacia membranas sintéticas.
- 3) Inmunoensayo enzimático. Se examinan utilizando anticuerpos específicos con las proteínas, detectadas gracias a la enzima unida a ellos.

El *Western blot* tiene mayor sensibilidad que el SDS-PAGE debido a la especificidad en la interacción, por lo que se suele utilizar como método de confirmación en muestras negativas SDS-PAGE. No obstante, la sensibilidad es menor que el ELISA, siendo recomendable su empleo combinado como método para la cuantificación proteica.

### 3.3. BIOSENSORES

Los biosensores son dispositivos analíticos que están constituidos por un sistema de bioreconocimiento (receptor bioquímico) que puede ser una enzima, anticuerpo o ácido nucleico, un sistema de transducción de la señal biológica en señales físico-químicas cuantificables y un mecanismo encargado de procesar y amplificar las señales, cuando interacciona la muestra con el elemento de reconocimiento biológico, permitiendo la obtención y el registro de datos. Las señales que se producen cuando se produce la interacción, consisten en cambios en el color, carga, pH, masa, transferencia de electrones o variación en las propiedades ópticas.

Estudios recientes están analizando la aplicación de nanomateriales en el uso de nanosensores, consiguiendo límites de detección bajos. Les ha otorgado mayores ventajas respecto a las técnicas convencionales como el ELISA, la espectrometría de masas y la PCR. Ventajas: menor tiempo de análisis, bajo coste, alta sensibilidad y selectividad, menor límite de detección, alto rendimiento y la posibilidad de múltiples análisis en muestras complejas.

Los biosensores más comunes utilizados en la detección de alérgenos son los constituidos por anticuerpos como sistema de bioreconocimiento, se denominan *inmunosensores* y el método de transducción más utilizado es la resonancia de plasmones de superficie (SPR).

Uno de los biosensores que está empezando a sustituir a los inmunosensores, son los que utilizan aptámeros. Son biosensores en los que se inmoviliza una molécula de ADN de cadena sencilla o de ARN que por su secuencia y su estructura tridimensional única permiten

unirse de forma específica a una proteína diana lo que a su vez origina cambios eléctricos u ópticos en el medio que pueden ser detectados.

Estos *aptasensores* debido a su alta especificidad espacial y afinidad permiten resolver los problemas anteriores de reacciones inespecíficas cruzadas discerniendo proteínas diferentes pero similares en su estructura. Se les define también como *anticuerpos químicos*.

### 3.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica no inmunológica, utilizada para la identificación de compuestos de manera cualitativa por sí sola o en combinación con otras técnicas analíticas. Esta técnica es muy utilizada en la detección de proteínas, permitiendo obtener una huella peptídica del compuesto analizado. En este campo, presenta gran cantidad de aplicaciones, como el análisis de muestras que contienen mezclas de sustancias con la ventaja de procesar e interpretar los resultados fácilmente.

Esta técnica se fundamenta en la conversión de compuestos orgánicos gaseosos en iones que serán separados según su masa/carga y registrados por un detector. Como resultado, se obtiene un perfil proteico (espectro de masas) en el que se representa la abundancia de los iones separados en función de su relación masa/carga. Los resultados obtenidos en el espectro van a depender de la estructura química de la muestra problema. Con esta técnica se consigue detectar la masa concreta de un compuesto, así como la estructura y composición de las moléculas.

En la espectrometría de masas se pueden seguir dos métodos de análisis:

1. Quando se desconoce la proteína alergénica. Se realiza un estudio general para obtener todos los péptidos característicos como una huella identificativa y posteriormente el espectro de masas se compara en unas bases de datos para identificar los péptidos y utilizarlos en la metodología dirigida. En esta técnica es fundamental el procesado de la muestra.
2. Quando se conocen las péptidos alergénicos de estudio y se hace una investigación dirigida en la muestra problema. En este método se obtienen resultados específicos y sensibles puesto que se consigue identificar y cuantificar gran cantidad de alérgenos en un mismo análisis. En la realización de este método se aplica la **espectrometría de masas en *tándem* (MS/MS)**.

Dentro de las técnicas de espectrometría de masas, el método que más se utiliza actualmente es la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), debido a la utilización de equipos más sofisticados se consigue mayor exactitud y precisión en la determinación de la masa del compuesto a analizar, como los analizadores de tiempo de vuelo y los *orbitrap*.

**Ventajas:** capaz de solventar los problemas presentes en las técnicas inmunológicas. Puede identificar alérgenos alimentarios en muestras que han sufrido altos tratamientos térmicos y en consecuencia se han modificado la estructura de las proteínas.

**Limitaciones:** necesidad de personal con conocimientos suficientes para manejar los equipos, el coste de éstos y la preparación laboriosa de las muestras.

### 3.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Este método consiste en la amplificación de una cadena de ADN para después ser detectado y cuantificado. Su desarrollo consiste en extraer la secuencia de ADN de la matriz alimentaria y someterla a varios ciclos de amplificación generalmente alrededor de 40 ciclos, aplicando etapas de calentamiento y enfriamiento, consiguiendo finalmente la amplificación de un fragmento específico de ADN.

La PCR que se utiliza normalmente en la detección de alérgenos para obtener resultados cualitativos, es la denominada **PCR de punto final o convencional**. En esta técnica los fragmentos amplificados obtenidos se someten a electroforesis para determinar el tamaño de las secuencias obtenidas y poder determinar la presencia o ausencia de los alérgenos en las muestras, en comparación con fragmentos conocidos de las proteínas.

Sin embargo, por su mayor sensibilidad, la técnica PCR que más se utiliza en la detección alérgica es la **PCR en tiempo real (RT-PCR)** que también puede ser **PCR cuantitativa (qPCR)**, obteniéndose resultados cuantitativos o semicuantitativos. La técnica tiene el mismo fundamento que la PCR convencional, sin embargo, se utiliza un termociclador especial que permite la excitación de fluorocromos y la detección de la luz emitida.

#### **Limitaciones**

- El principal problema de la detección de ADN para el análisis de alérgenos alimentarios es que la presencia de las secuencias de ADN específicas de las proteínas causantes de la alergia en los pacientes no implica que la muestra contenga la proteína alérgica, no siendo este ADN perjudicial en estas personas.
- Las proteínas alérgicas pueden estar presentes en la muestra sin detectarse la secuencia de ADN en la PCR, por lo que la prueba no detectaría la presencia del alérgeno y sin embargo, podría generar una alergia alimentaria en las personas susceptibles.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Comunicación de la Comisión, de 13 de julio de 2017, relativa a la información alimentaria facilitada acerca de las sustancias o productos que causan alergias o intolerancias, según figuran en el anexo II del Reglamento (UE) n.º 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. *Diario Oficial de la Unión Europea*, C428, 13 de diciembre de 2017.
2. FAO/OMS, 2020. Código de prácticas sobre la gestión de los alérgenos alimentarios por parte de los operadores de empresas de alimentos. Comisión del Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Comité del Codex sobre higiene de los alimentos. CXC 80-2020. Disponible en <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/es/>
3. García Campillo, Lara. (2021). *Alérgenos en alimentos: métodos analíticos* [Trabajo Final de Máster, Universidad Nacional de Educación a Distancia]. <http://e-spacio.uned.es/fez/view/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Lgarcia>
4. Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio. *Boletín Oficial del Estado*, 286, de 27 de noviembre de 2004. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2004/11/26/2220>
5. Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) no 1924/2006 y (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) no 608/2004 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L304, de 22 de noviembre de 2011. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/2018-01-01>
6. Reglamento (UE) nº 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de junio de 2013, relativo a los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad, los alimentos para usos médicos especiales y los sustitutivos de la dieta completa para el control de peso y por el que se derogan la Directiva 92/52/CEE del Consejo, las Directivas 96/8/CE, 1999/21/CE, 2006/125/CE y 2006/141/CE de la Comisión, la Directiva 2009/39/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y los Reglamentos (CE) no 41/2009 y (CE) no 953/2009 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L181, 29 de junio de 2013. <http://data.europa.eu/eli/reg/2013/609/2021-04-28>

7. Reglamento Delegado (UE) nº 1155/2013 de la Comisión, de 21 de agosto de 2013, por el que se modifica el Reglamento (UE) no 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, en lo referente a la información sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L306, de 16 de noviembre de 2013. [http://data.europa.eu/eli/reg\\_del/2013/1155/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_del/2013/1155/oj)
8. Reglamento Delegado (UE) nº 78/2014 de la Comisión, de 22 de noviembre de 2013, que modifica los anexos II y III del Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, por lo que se refiere a determinados cereales que causan alergias o intolerancias y alimentos con fitosteroles, ésteres de fitosterol, fitostanoles o ésteres de fitostanol añadidos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L27, de 30 de enero de 2014. [http://data.europa.eu/eli/reg\\_del/2014/78/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_del/2014/78/oj).
9. Reglamento de Ejecución (UE) nº 828/2014 de la Comisión, de 30 de julio de 2014, relativo a los requisitos para la transmisión de información a los consumidores sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L228, de 31 de julio de 2014. [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2014/828/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2014/828/oj)
10. Real Decreto 126/2015, de 27 de febrero, por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor. *Boletín Oficial del Estado*, 54, de 5 de marzo de 2015. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2015/02/27/126/con>
11. Reglamento (UE) 2021/382 de la Comisión de 3 de marzo de 2021 por el que se modifican los anexos del Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la higiene de los productos alimenticios, en lo que respecta a la gestión de los alérgenos alimentarios, la redistribución de alimentos y la cultura de seguridad alimentaria. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L74, de 4 de marzo de 2021. <http://data.europa.eu/eli/reg/2021/382/oj>