

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 1

LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025 I. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES. LA ENTIDAD NACIONAL DE ACREDITACIÓN (ENAC). PROCEDIMIENTO DE ACREDITACIÓN.

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. ENAC

- 3.1. ¿QUÉ ES ENAC?
- 3.2. EQUIPO DE ENAC
- 3.3. PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO
- 3.4. ENAC EN EL MUNDO

4. ACREDITACIÓN

- 4.1. ¿QUÉ ES LA ACREDITACIÓN?
- 4.2. DOCUMENTACIÓN DE LA ACREDITACIÓN
- 4.3. PROCEDIMIENTO DE ACREDITACIÓN
 - 4.3.1. PROCESO DE ACREDITACIÓN
 - 4.3.2. MANTENIMIENTO DE LA ACREDITACIÓN
 - 4.3.3. AMPLIACIÓN Y REDUCCIÓN DEL ALCANCE DE ACREDITACIÓN

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 la operación de 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, de lo cual se hablará más adelante. 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. LA ENTIDAD NACIONAL DE ACREDITACIÓN (ENAC)

3.1. ¿QUÉ ES ENAC?

La Entidad Nacional de Acreditación, ENAC, es la entidad designada por el Gobierno, para operar en España como el único Organismo Nacional de Acreditación, en aplicación del Reglamento (CE) nº 765/2008 que regula el funcionamiento de la acreditación en Europa.

ENAC se asienta en cinco principios fundamentales: ausencia de ánimo de lucro, independencia, no competencia, evaluación internacional y reconocimiento mutuo. Su estructura y principios de funcionamiento garantizan que todas sus actuaciones se basan en los principios de imparcialidad, independencia y transparencia.

ENAC es el representante de España en las organizaciones internacionales que configuran la infraestructura global de la acreditación. Tiene como misión generar confianza en el mercado y en la sociedad en general en relación con la competencia técnica de los evaluadores de la conformidad acreditados, contribuyendo así a la seguridad y el bienestar de las personas, la calidad de los productos y servicios y la protección del medioambiente, y con ello al aumento de la competitividad de los productos y servicios españoles y a una disminución de los costes para la sociedad debidos a estas actividades.

3.2. EQUIPO DE ENAC

ENAC cuenta con un equipo altamente cualificado, responsable de la tramitación, gestión y realización de actividades de evaluación de los organismos solicitantes; elabora documentos técnicos; forma y cualifica auditores y expertos; representa a ENAC en los foros técnicos internacionales y es responsable de la divulgación de las actividades de la entidad.

Además colabora con más de 900 auditores y expertos provenientes de instituciones, centros de investigación, universidades, empresas u órganos de la Administración Pública que son referencia en la actividad a evaluar y disponen, por tanto, de la competencia requerida en cada campo. Así se aporta valor añadido al proceso de evaluación y se genera la máxima confianza al mercado, al ofrecerle evaluadores que han demostrado su competencia técnica al más alto nivel.

3.3. PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO

El activo principal de una entidad de acreditación es la confianza que inspire en sus actuaciones. Por ello debe operar en todo momento atendiendo a los más rigurosos principios éticos y profesionales de forma que garantice de manera incontestable su independencia, imparcialidad, transparencia y objetividad (todo ello incluido en su código ético). Por ello, existen los siguientes principios de funcionamiento:

- Vocación de servicio público dirigido a todos aquellos que tienen intereses en los distintos aspectos de la acreditación de evaluadores de la conformidad.
- Objetividad e imparcialidad, por ello, no pertenece a ningún grupo empresarial, ni propiedad de empresa o institución alguna. No existe vinculación técnica, financiera, comercial o de cualquier otra índole, con ninguna organización o empresa externa.
- Actuación de manera no discriminatoria, de forma que el acceso a la acreditación no esté condicionado al tamaño del organismo, ni a su pertenencia a una asociación o grupo, ni esté sometido a condicionamientos financieros indebidos.

- Decisiones basadas en criterios exclusivamente técnicos.
- Criterios de transparencia, siendo públicas todas las normas y procedimientos, así como la relación de entidades acreditadas y el alcance de sus acreditaciones.
- Organización abierta a la participación tanto en el plano técnico como en el de establecimiento de sus políticas, de todas las partes interesadas.
- Máximo reconocimiento internacional de la acreditación, para lo cual cooperan con el resto de organismos de acreditación en los diferentes foros internacionales.

3.4. ENAC EN EL MUNDO

Para ser totalmente efectivo, un organismo de acreditación debe de estar integrado en la infraestructura global de la acreditación. Dicha infraestructura mundial opera a través de dos organizaciones, International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) e International Accreditation Forum (IAF), que se apoyan a su vez en organizaciones regionales (América, Asia/Pacífico, etc).

Las decisiones de estas organizaciones determinan los criterios que deben aplicar tanto ENAC como el resto de organismos equivalentes en otros países, razón por la cual es esencial que exista una voz fuerte en nombre de España en cada una de esas organizaciones.

Dentro de estas organizaciones se han establecido acuerdos internacionales basados en el reconocimiento mutuo de certificados e informes emitidos por las entidades acreditadas que facilitan el comercio y crean un entorno que facilita la consecución del objetivo final: “acreditado una vez, aceptado en todas partes”.

ENAC es firmante de todos los acuerdos internacionales de EA (European Accreditation), ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) e IAF (International Accreditation Forum). Esto significa que un informe o certificado emitido bajo acreditación de ENAC será reconocido por el resto de firmantes de todo el mundo. El sistema de acreditación internacional fortalece el comercio global al conseguir que las declaraciones de cumplimiento con los requisitos técnicos especificados hechas en España sobre las exportaciones españolas sean aceptadas en todo el mundo del mismo modo que las importaciones sean a su vez aceptadas en España.

4. PROCEDIMIENTO DE ACREDITACIÓN

4.1. ¿QUÉ ES LA ACREDITACIÓN?

La acreditación es la herramienta establecida a escala internacional para generar confianza sobre la correcta ejecución de un determinado tipo de actividades denominadas Actividades de Evaluación de la Conformidad. En general cualquier actividad que tenga por objeto evaluar si un producto, servicio, sistema, instalación, etc. es conforme con ciertos requisitos puede estar sujeta a acreditación. Dichos requisitos pueden estar establecidos por ley y tener por tanto carácter reglamentario o estar especificados en normas, especificaciones u otros documentos de carácter voluntario.

El valor de las actividades de evaluación de la conformidad depende en gran medida de la credibilidad de los evaluadores que las realizan y de la confianza que se tenga en ellos.

4.2. DOCUMENTACIÓN DE LA ACREDITACIÓN

Para determinar la competencia técnica de los evaluadores de la conformidad ENAC utiliza como referencia los requisitos establecidos en normas internacionales que serán la base para la firma de los acuerdos de reconocimiento a nivel global. ENAC evalúa el cumplimiento de los requisitos establecidos en diferentes normas utilizadas para cada tipo de evaluador. En el caso de Laboratorios de Ensayo y Calibración sería la norma UNE-EN ISO/IEC 17025.

Adicionalmente ENAC y las organizaciones internacionales de acreditación elaboran documentos de criterios que aclaran o matizan las diferentes normas y, en ocasiones, las particularizan a sectores específicos.

De manera general los documentos aplicables a un proceso de acreditación se dividen atendiendo a su contenido en:

- Documentos que describen y regulan el proceso de acreditación.
- Documentos que establecen los criterios de acreditación usados por ENAC para evaluar el cumplimiento de los requisitos establecidos en la norma de acreditación, en este caso la UNE-EN ISO/IEC 17025.

Estos documentos pueden tener carácter obligatorio, o informativo. El solicitante debería tener en cuenta estos últimos ya que establecen buenas prácticas. Es el caso del documento de procedimiento de Acreditación y el de No Conformidades y Toma de decisión.

Atendiendo a su campo de aplicación en:

- Documentos de carácter transversal: aplicables a cualquier laboratorio independientemente de la actividad concreta que realice. Es el caso del documento de Criterios Generales para la acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración según Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 o el de Criterios para la utilización de la marca ENAC o referencia a la condición de acreditado entre otros.
- Documentos de carácter vertical: aplicables a laboratorios que ejecutan cierto tipo de ensayos o que operan en determinado sector o esquema específico. El que uno de estos documentos sea aplicable o no a un laboratorio específico, dependerá de su alcance de acreditación concreto. Por ejemplo, en el ámbito agroalimentario, se puede destacar el documento Criterios Específicos de Acreditación. Análisis microbiológico.

4.3. PROCEDIMIENTO DE ACREDITACIÓN

El documento PAC-ENAC de Procedimiento de Acreditación es un documento elaborado por ENAC que describe de forma general el sistema establecido para llevar a cabo la acreditación.

El sistema de acreditación es aplicable a distintos tipos de organismos de evaluación de la conformidad (en adelante, OEC), entre otros, Laboratorios de ensayo y calibración, cuyos requisitos a cumplir están establecidos en la NORMA UNE-EN ISO/IEC 17.025.

La acreditación es una declaración por parte de ENAC (con reconocimiento nacional e internacional) de que el acreditado ha sido capaz de demostrar que dispone de la suficiente competencia técnica para realizar las actividades incluidas en el alcance de acreditación, lo cual no exime al OEC de responsabilidad ante resultados erróneos.

Los criterios de acreditación son elaborados por ENAC de acuerdo, en su caso, con lo establecido por las organizaciones internacionales de acreditación (EA, ILAC o IAF) y se documentan en los correspondientes Criterios Generales de Acreditación (CGA).

Para solicitar la acreditación el solicitante debe conocer el procedimiento de acreditación, los requisitos y criterios aplicables, así como las tarifas aplicables a dicho proceso.

4.3.1 PROCESO DE ACREDITACIÓN

1. Cumplimentación del formulario “Solicitud de Acreditación” de ENAC.

2. Aceptación de la solicitud y notificación al peticionario. Una vez recibida la solicitud de acreditación, ENAC acusará recibo de la misma y revisará la documentación suministrada con objeto de comprobar que la actividad es susceptible de ser acreditada o si existe algún motivo legal, estatutario o de otra índole que lo impida, en cuyo caso se lo comunicará al solicitante.

3. Presupuesto estimado del coste de la acreditación. Cuando la información sea considerada completa para iniciar el proceso de evaluación, se enviará al solicitante para su aceptación, un presupuesto estimado del coste del proceso de acreditación. Su aceptación implica el abono del 50 % del importe.

4. Designación del equipo auditor. ENAC designará, de entre sus auditores y expertos cualificados, al equipo auditor que llevarán a cabo el proceso de evaluación. La composición del equipo se establece en función del alcance de acreditación solicitado, pero contará, con un auditor jefe, y tantos expertos como sean necesarios en función de las actividades para las que se solicita la acreditación. El solicitante conocerá con antelación su composición para evitar problemas de independencia e imparcialidad.

5. Proceso de evaluación. Confirmar la competencia y el cumplimiento de los requisitos de acreditación y facilitar a ENAC las evidencias necesarias para ello.

5.1. Estudio previo de la documentación facilitada a ENAC para preparar la evaluación.

5.2. Auditoría y visitas de acompañamiento

-Auditoría. En la fecha que se acuerde con el solicitante, el equipo auditor designado realizará una visita de auditoría, cuyo objeto es verificar el cumplimiento de los requisitos de acreditación. La cual se desarrolla en tres fases:

- 1) Reunión inicial: entre los representantes del solicitante y el equipo auditor, durante la cual se confirmará el plan de la auditoría, el alcance y la sistemática a seguir.
- 2) Desarrollo de la auditoría. Se procederá a la evaluación del cumplimiento de los requisitos de acreditación y la correcta aplicación de los procedimientos establecidos por la organización mediante la evaluación de registros, entrevistas con el personal y la observación del funcionamiento del solicitante en condiciones normales de trabajo.
- 3) Reunión final: del equipo auditor con los representantes del solicitante con objeto de presentar a los responsables un resumen de los resultados de la investigación.

-Visitas de Acompañamiento. Cuando la naturaleza de la actividad lo requiera se realizarán visitas de acompañamiento durante las cuales se presenciara la realización de las actividades de evaluación de la conformidad en condiciones reales.

5.3. Otras técnicas de evaluación. ENAC podrá, asimismo, hacer uso de otras técnicas de evaluación tales como evaluación documental (complementado o no con entrevistas presenciales o por medios electrónicos), informes de seguimiento, visitas no anunciadas, auditorías remotas, auditorías de contraste, cliente misterioso, etc.

5.4. Informe. El equipo auditor, en un plazo no superior a 15 días naturales desde la auditoría, elaborará un informe con los resultados e información recopilada. El informe tendrá un periodo de validez de 6 meses a partir de su fecha de emisión.

5.5. Respuesta del solicitante. Una vez recibido el informe, el solicitante deberá actuar, clasificando en función de su gravedad, las no conformidades detectadas.

5.6. Notificación de cambios significativos a ENAC.

6. Decisión de acreditación. Tomada por la Comisión de Acreditación para conceder o mantener la acreditación, indicando que se cumplen los requisitos de acreditación y en que las desviaciones detectadas en su caso han sido convenientemente tratadas.

7. Certificado de acreditación emitido por ENAC tras una decisión favorable. Incluye: el titular de la acreditación, referencia a la Unidad Técnica, número y norma de acreditación, fecha de entrada en vigor y la referencia al Anexo técnico.

8. Uso de la marca ENAC de manera que no pueda dar lugar a equívoco sobre las actividades que están cubiertas por la acreditación.

9. Vigencia de la acreditación. Siempre y cuando el acreditado continúe cumpliendo con las condiciones establecidas para la concesión de la acreditación y las obligaciones resultantes de la misma.

10. Retirada y suspensión temporal voluntaria. En cualquier momento puede ser solicitada.

4.3.2. MANTENIMIENTO DE LA ACREDITACIÓN

El mantenimiento de la acreditación se estructura en un primer ciclo de cuatro años a contar desde la fecha de acreditación, y ciclos posteriores de cinco años. A lo largo de un ciclo, se deberá evaluar la eficacia del sistema de gestión, el mantenimiento de su competencia

técnica y el cumplimiento de los requisitos de acreditación. Es decir, comprobar que se han cumplido los requisitos establecidos, que el sistema de gestión es eficaz y que se han respetado las obligaciones de acreditación.

El primer seguimiento se realizará en un plazo no superior a 12 meses desde la fecha inicial de acreditación, siempre y cuando no se superen 15 meses desde la fecha de realización de la auditoría de acreditación inicial. Los siguientes seguimientos se realizarán no más tarde de 18 meses desde el anterior seguimiento en el primer ciclo de acreditación y de 24 meses en los siguientes

El objetivo de la reevaluación es, adicionalmente a lo establecido para los seguimientos, el confirmar el cumplimiento con lo establecido en la norma de acreditación en su totalidad. La reevaluación debe ser realizada, en cualquier caso, antes de finalizar cada ciclo de acreditación.

ENAC podrá determinar la necesidad de realizar una visita de control en caso de cambios importantes, mal uso de la marca ENAC o si el análisis de una reclamación o de cualquier otra información pone en cuestión el cumplimiento por parte del acreditado de las exigencias establecidas en su acreditación.

La decisión sobre el mantenimiento de acreditación es similar a la decisión propia de acreditación, pudiendo ser favorable, con necesidad de aplazamiento hasta la realización de modificaciones, reducir el alcance o anulando la acreditación.

4.3.3. AMPLIACIÓN Y REDUCCIÓN DEL ALCANCE DE UNA ACREDITACIÓN

Cuando una entidad ya acreditada desee incorporar nuevas actividades de evaluación de la conformidad deberá solicitarlo utilizando para ello el formulario de solicitud correspondiente. Se aplicará el procedimiento descrito para la acreditación simplificado según proceda en función del volumen y carácter de dicha ampliación. ENAC puede comprometerse a gestionar la ampliación de manera conjunta con un seguimiento o reevaluación si la solicitud de ampliación se recibe al menos con cuatro meses de antelación a la fecha prevista para la auditoría.

Se entenderá por reducción, la eliminación de actividades o localizaciones del alcance de acreditación a solicitud del cliente, como resultado de un proceso de evaluación, de oficio por ENAC en el caso de actividades que hayan dejado de realizarse.

La acreditación por una entidad designada como es ENAC genera muchos beneficios para las entidades a nivel nacional e internacional. Al ser reconocida la competencia técnica, se genera una mayor confianza en los resultados obtenidos, obteniéndose así una mayor confianza externa por parte de los clientes y un mayor reconocimiento de la entidad.

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.
- <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

LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025 II. REQUISITOS RELATIVOS A LA ESTRUCTURA. REQUISITOS DE PROCESO. REQUISITOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN. PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO.

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.

2. REQUISITOS RELATIVOS A LA ESTRUCTURA

3. REQUISITOS DEL PROCESO

- 3.1. REVISIÓN DE SOLICITUDES, OFERTAS Y CONTRATOS
- 3.2. SELECCIÓN, VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS
- 3.3. MUESTREO
- 3.4. MANIPULACIÓN DE LOS ÍTEMS DE ENSAYO O CALIBRACIÓN
- 3.5. REGISTROS TÉCNICOS
- 3.6. EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN
- 3.7. ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS
- 3.8. INFORME DE RESULTADOS
- 3.9. QUEJAS
- 3.10. TRABAJO NO CONFORME
- 3.11. CONTROL DE LOS DATOS Y GESTIÓN DE LA INFORMACIÓN

4. REQUISITOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN

- 4.1. OPCIONES
- 4.2. DOCUMENTACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN
- 4.3. CONTROL DE DOCUMENTOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN
- 4.4. CONTROL DE REGISTROS
- 4.5. ACCIONES PARA ABORDAR RIESGOS Y OPORTUNIDADES
- 4.6. MEJORA
- 4.7. ACCIONES CORRECTIVAS
- 4.8. AUDITORÍAS INTERNAS
- 4.9. REVISIONES POR LA DIRECCIÓN

5. PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO

- 5.1. PRINCIPALES OBJETIVOS DE LOS PNTS
- 5.2. ESTRUCTURA DEL CONTENIDO

1. LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025

La norma 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.

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 EN ISO/IEC 17025 y 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. 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.

3. REQUISITOS DEL PROCESO

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

3.1. 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.

3.2. 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.

3.3. MUESTREO

En caso de que se realice el muestreo, se debe tener un plan y métodos de muestreo que debe tener en cuenta los factores a controlar, de tal forma que se asegure la validez de los resultados.

3.4. 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.

3.5. 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.

3.6. 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.

3.7. 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.

3.8. 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.

3.9. 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.

3.10. 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.

3.11. 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.

4. REQUISITOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN

4.1. 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.

4.2. 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.

4.3. 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 por el personal responsable. 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.

4.4. 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.

4.5. 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.

4.6. 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.

4.7. 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.

4.8. 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.

4.9. 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.

5. PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO

Los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) son documentos escritos que describen la secuencia específica de operaciones y métodos que deben aplicarse en el laboratorio para una finalidad determinada. Proporcionan una manera única según la cual deberá realizarse la operación cada vez que se repita en el laboratorio. Estos documentos son aplicables a las actividades contempladas en el manual de calidad y la normativa.

Lo que pretende indicar esta definición es que lo que no está escrito, no existe; cualquier actividad, operación, ya sea técnica o administrativa, que se realiza en el laboratorio, debe estar reflejada mediante un documento.

Los PNTs son un conjunto de instrucciones que deben estar perfectamente detalladas y deben seguirse en su totalidad.

El laboratorio debe disponer de un libro de Registro, habilitado al efecto, para anotar las referencias y datos correspondientes a cada PNT que se apruebe.

El departamento de Calidad es, normalmente, el responsable de establecer o fijar para cada PNT aprobado la cantidad de ejemplares necesarios, así como su distribución nominal según su contenido, objetivos y campo de aplicación. Asimismo, debe controlar la distribución y localización de ejemplares existentes de cada uno, mediante, por ejemplo una ficha de control, la cual además facilitará la actualización de los usuarios siempre que se produzca alguna modificación.

El contenido de los PNT debe ser revisado siempre que se considere necesario, pero en cualquier caso, deberá establecerse como norma general una periodicidad de revisión obligatoria, por ejemplo bianual.

5.1. PRINCIPALES OBJETIVOS DE LOS PNTS

La planificación, estructuración y desarrollo de las actividades de un laboratorio utilizando PNTs presenta numerosas ventajas:

- Mejora la organización y ejecución de las actividades
- Facilita el trabajo al personal, tanto de carácter técnico como administrativo
- Proporciona uniformidad en la utilización de los equipos de toma de muestras y de análisis, reduciendo posibilidades de error.
- Garantiza el registro de los datos primarios.
- Facilita el seguimiento y control de las operaciones realizadas.
- Proporciona datos comparativos entre sí a lo largo del tiempo.
- Ayuda a la formación del nuevo personal.

No obstante, también implica ciertos cambios en los hábitos y algunas exigencias como puede ser:

- Necesidad de disponer de tiempo para su redacción.
- Mayor labor burocrática.
- La no improvisación durante el desarrollo de una actividad, y por tanto, la no modificación de un PNT.
- Necesidad de documentar y aprobar las desviaciones del procedimiento normalizado que fueran necesarias introducir.
- Necesidad de controlar, revisar y actualizar los PNTs que estén en vigor.

5.2. ESTRUCTURA DEL CONTENIDO

La estructura y los apartados de los PNT dependen de la clase o tipo de procedimiento o actividad en cuestión.

Sin embargo, el modelo de índice o sumario del contenido, más estandarizado, es el que se indica a continuación.

- Identificación del Laboratorio.
- Título y código del procedimiento y su número de revisión.
- Fecha de emisión. A partir de cuándo entra en vigor.
- Copia de trabajo para llevar un control de la distribución.
- Indicación de quién lo ha elaborado, revisado y aprobado. Con las tres firmas, el PNT queda aprobado.
- Control de cambios producidos con respecto a la versión anterior.
- Introducción. Al inicio.
- Objeto. Debe describir claramente el propósito del PNT.
- Campo de aplicación. En referencia a actividades, procesos, tipos de muestras...
- Referencias. Se cita cualquier documento relacionado o utilizado en la preparación (normas, Manual de calidad, otros PNT, etc.)
- Definiciones. Conceptos necesarios para la correcta comprensión del PNT.
- Responsabilidades. Puede hacerse referencia al responsable de la implantación del PNT y a la persona o grupo de personas que deben realizar las actividades del procedimiento.
- Procedimiento. Se describen y detallan como tienen que llevarse a cabo las acciones necesarias para conseguir el objetivo del procedimiento.
- Fundamentos teóricos.
- Equipos, material y reactivos necesarios.
- Preparación de la muestra. Secuencia lógica sobre el tratamiento de las muestras.
- Cálculo y expresión de los resultados. Incluye las fórmulas empleadas y el número de cifras decimales en las que se expresa el resultado.
- Incertidumbre. Se indica la sistemática seguida en la estimación de la incertidumbre del método de ensayo.
- Control de calidad, que incluye aquellas actividades de control de calidad a realizar sobre el método de ensayo, y sus criterios de aceptación obtenidos en la validación del método.
- Precauciones y advertencias sobre algún aspecto del método de ensayo.
- Formatos y registros. Código y títulos de los impresos que aplican al PNT en cuestión.

-Anexos. En caso necesario, se incluyen tablas, esquemas, figuras, etc, que se consideren necesarias para usar, interpretar y evaluar la utilización del PNT.

Con la redacción y aprobación de los PNT programados se cubre una de las etapas fundamentales dentro del Sistema de Calidad del laboratorio. Sin embargo, van a ser las etapas posteriores, de implantación, seguimiento y control (el personal debe conocer, seguir y aplicar adecuadamente los PNT), las que resultarán determinantes para cumplir los objetivos propuestos, algunos de ellos, requisitos establecidos en la norma UNE-EN ISO/IEC 17025.

MATERIAL NO OFICIAL

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/>

-No conformidades y toma de decisión NO-11 Rev. 9. 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.

-Curso Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. 2021. GSC

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 3

AUDITORIAS. TIPOS DE AUDITORÍAS INTERNAS Y EXTERNAS. TRABAJOS NO CONFORMES. NO CONFORMIDADES. ACCIONES CORRECTIVAS, DE CONTENCIÓN Y REPARADORAS.

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

ACREDITACIÓN DE ENSAYOS. ALCANCES CERRADOS. ALCANCES FLEXIBLES: CATEGORÍAS DE ENSAYO. NOTAS TÉCNICAS DE ENAC (NT-18, NT-19)

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. ACREDITACIÓN DE ENSAYOS.
3. ALCANCES CERRADOS.
4. ALCANCES FLEXIBLES: CATEGORÍAS DE ENSAYO.
5. NOTAS TÉCNICAS DE ENAC (NT-18, NT-19)
 NT-18: LABORATORIOS DE ENSAYO: ACREDITACIÓN POR CATEGORÍAS DE ENSAYO
 NT-19: LABORATORIOS DE ENSAYO: ACREDITACIÓN DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE
 PLAGUICIDAS EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS
6. BIBLIOGRAFÍA

MATERIAL NO OFICIAL

1. INTRODUCCIÓN

La acreditación es una herramienta, establecida a nivel internacional para generar confianza sobre la actuación de ciertos tipos de organizaciones denominadas Organismos Evaluadores de la Conformidad (OEC). Dentro de estos OEC se encuentran los laboratorios de ensayo y calibración (ENAC, 2015).

La norma UNE EN ISO/IEC 17.025:2017 *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. El organismo que evalúa la competencia técnica en el caso de España es ENAC.

En el siguiente tema se expondrán cómo se acreditan los ensayos con alcance cerrado y alcance flexible, así como las notas técnicas de aplicación para categorías de ensayo y la acreditación en el campo de residuos de plaguicidas.

2. ACREDITACIÓN DE ENSAYOS.

Los criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 se recogen en un documento disponible en la web de ENAC denominado CGA-ENAC-LEC, cuya última revisión consta de marzo de 2021. Este documento mantiene la estructura de la norma y en él se detallan requisitos relativos a estructura, recursos y proceso.

ENAC solo aceptará solicitudes de acreditación para ensayos incluidos en el alcance de actividades de la organización (hay que tener en cuenta que el alcance de actividades y el alcance de acreditación no tienen por qué estar redactados de igual modo) (ENAC, 2021).

En cuanto a los ensayos en sí, en la selección del método los laboratorios deben tener en cuenta aspectos reglamentarios. En el caso de los laboratorios de control oficial es de aplicación el Reglamento 625/2017 *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*. Este reglamento establece, en su artículo 34, la cascada de métodos utilizados para muestreo, análisis, ensayo y diagnóstico. Aquí se indica que los métodos de ensayo usados durante los controles oficiales y otras actividades cumplirán la normativa de la Unión por la que se establezcan los métodos o sus criterios de funcionamiento. Si no existiese normativa, se utilizarán uno de los siguientes métodos (DOUE, 2017):

- Métodos disponibles que se ajusten a normas o protocolos internacionalmente reconocidos o desarrollados por laboratorios de referencia de la UE y validados conforme a protocolos científicos aceptados internacionalmente.
- Si no existieran los anteriores, métodos que cumplan las normas pertinentes a escala nacional o, en su defecto, métodos desarrollados o recomendados por laboratorios nacionales de referencia y validados.
- Si no existiera ninguno de los anteriores, y si fuese necesario con carácter de urgencia, el laboratorio nacional de referencia podrá emplear otros métodos hasta que se valide un método apropiado.

En cualquier caso, siempre que sea posible los métodos se caracterizaran por criterios de exactitud, aplicabilidad, límite de detección y cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad, selectividad, sensibilidad, linealidad, etc.

Los criterios para la selección de un método en el ámbito de la norma 17.025 están recogidos en el Anexo I del CGA-ENAC-LEC. La propia norma 17.025 ya indica en su punto 7.2.1.5 que el laboratorio ha de verificar que puede llevar a cabo correctamente los métodos antes de utilizarlos, y que 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 válido tanto para métodos internos como normalizados.

Según el CGA-ENAC-LEC, los métodos empleados por un laboratorio pueden ser:

- **Métodos normalizados:** son métodos en vigor publicados en normas internacionales, regionales o nacionales o por organizaciones técnicas reconocidas, o en textos o revistas científicas pertinentes, aceptados por el sector técnico o los especificados por los fabricantes de los equipos.
- **Métodos internos basado en métodos normalizados:** métodos descritos en un PNT que están claramente basados en uno normalizado y su validez, adecuación y uso se justifican por su referencia a ese método normalizado.
- **Métodos internos desarrollados por el laboratorio:** aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio y distinto a los casos anteriores.

En el caso de métodos internos desarrollados por el propio laboratorio se requiere una validación completa conforme a la cláusula 7.2.2 de la norma UNE-EN ISO/IEC 17.025. En este caso el laboratorio deberá disponer de evidencias de que se ha evaluado su idoneidad para el fin propuesto, empleando sistemáticas de validación reconocidas para este fin. 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. Dicha información deberá demostrar de manera indiscutible la validez del método. La

elección de un método desarrollado por el laboratorio cuando existe un método normalizado debe ser justificada técnicamente (ENAC, 2021).

La NT-86 *Laboratorios de ensayo y calibración: identificación de los métodos en los alcances de acreditación y acciones a tomar en caso de ser revisados*, aplica a laboratorios acreditados bajo la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 y establece cómo se identifican los métodos de ensayo en los alcances de acreditación, así como el proceso que deben seguir los laboratorios acreditados para emitir informes acreditados cuando se aprueba una revisión de los métodos para los que están acreditados, según sean métodos normalizados, basados en normalizados o desarrollados y validados por el propio laboratorio (ENAC, 2020) .

Para solicitar la acreditación de un ensayo hay que solicitarlo previamente a ENAC a través de su página web. Uno de los puntos que debe cubrir el solicitante es el de definir el alcance de acreditación para el que desea ser acreditado. La solicitud de acreditación para un alcance concreto es una declaración por parte del solicitante de su competencia técnica para todas las actividades incluidas en él y la evaluación de ENAC tiene por objetivo determinar que el laboratorio es capaz de demostrar la competencia técnica en la totalidad del alcance declarado. (ENAC, 2021).

Cuando una entidad ya acreditada quiere incorporar nuevas determinaciones a su alcance de acreditación o modificar información de carácter técnico ya incluido en el alcance, también deberá solicitarlo previamente a ENAC, siguiéndose el proceso de acreditación simplificado, y pudiendo realizarse una auditoría de ampliación a la vez que una de seguimiento, siempre que la solicitud de ampliación se reciba 4 meses antes de la fecha prevista de auditoría.

Tras la aceptación de la solicitud y notificación al peticionario por parte de ENAC y aceptación del presupuesto estimado del coste de la acreditación por parte del laboratorio, se designará al equipo auditor y se procederá a la evaluación, con un estudio previo de la documentación aportada con la solicitud, una auditoría de ampliación y la emisión de un informe en un plazo inferior a 15 días desde la realización de la auditoría. El laboratorio debe responder a ese informe según la Nota Operativa NO-11 *No conformidades y toma de decisión*, y finalmente la Comisión de Acreditación analiza la información generada durante el proceso de evaluación tomando una de las siguientes decisiones:

- Conceder la acreditación
- Si se han detectado desviaciones, determinar una serie de actividades de evaluación extraordinarias para asegurar su subsanación.
- Denegar la concesión de la acreditación.

Si la decisión es favorable, ENAC emite un Certificado de Acreditación.

3. ALCANCES CERRADOS.

Cuando un laboratorio está acreditado para realizar un ensayo específico en un producto concreto, analizando uno o varios analitos determinados se dice que ese laboratorio está acreditado con un **alcance cerrado** (ENAC, 2021). Esta acreditación constituye el nivel más simple y se acreditaría por matriz o por analito utilizando un método determinado (Centro Español de Metrología, 2014).

El alcance de acreditación debe describir de forma clara, precisa y sin dar lugar a error las actividades acreditadas. De esta forma se proporciona al cliente de los OEC y a otras partes interesadas información sobre la competencia técnica demostrada por el organismo. En el caso de un laboratorio de ensayo deberán indicarse los productos o materiales sometidos a ensayo, las características o parámetros analizados, los ensayos o tipos de ensayos desarrollados y, si es apropiado, las técnicas, métodos y/o equipos utilizados. (ENAC, 2021)

La identificación del método debe incluir el documento (procedimiento interno o método normalizado) incluido en el alcance de acreditación. Cuando el método sea normalizado o se haga referencia a un método normalizado se debe incluir el estado de revisión o año de aprobación del documento que identifica dicho método normalizado (ENAC, 2021).

Puede servir como ejemplo la determinación de sulfatos en vinos y vinagres por cromatografía iónica. Bajo este alcance, un laboratorio acreditado solo podría emitir un informe de ensayo bajo acreditación para las matrices "vino o vinagre", el analito "sulfato" empleando el método de cromatografía iónica con los parámetros establecidos en su Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) y fijados durante el proceso de validación del método analítico.

En este caso, en el que hay un analito para dos matrices muy determinadas, es fácil determinar el alcance, pero la acreditación para alcance cerrado puede suponer una limitación para algunos laboratorios en el caso de tener que analizar analitos muy diversos en diferentes matrices, lo que le puede impedir emitir informes de ensayo acreditados y, por tanto, dar cumplimiento a lo exigido en el Reglamento 625/2017 sobre control oficial (Centro Español de Metrología, 2014)

4. ALCANCES FLEXIBLES: CATEGORÍAS DE ENSAYO.

El alcance flexible es un sistema por el que un laboratorio puede extender el alcance de su acreditación a nuevos ensayos dentro de una categoría de ensayos, ya que se ha evaluado su competencia técnica tanto para la realización de ensayos de la categoría, como para el desarrollo y validación de nuevos ensayos dentro de esa categoría (ENAC, 2021)

Se considera una **Categoría de ensayos** a un conjunto de ensayos realizados por una técnica o método de ensayo común para determinar un parámetro o familia de parámetros en un producto o familia de productos (ENAC, 2020)

Una **familia de productos** es una denominación genérica usada para identificar los productos incluidos en un alcance de acreditación flexible (ENAC, 2021).

Esta acreditación constituye una estrategia que puede resultar muy útil para los laboratorios que participan en el control oficial y que les permite realizar ensayos y emitir informes bajo alcance de acreditación en la mayoría de las circunstancias que se les puedan plantear. Los laboratorios nacionales y europeos de referencia necesitan poder dar respuesta tanto a los análisis programados como a las posibles alertas y crisis alimentarias que se produzcan y que no necesariamente se hayan producido por analitos habituales o en las matrices más frecuentes (Centro Español de Metrología, 2014).

Las Notas Técnicas (NT) de ENAC, NT-18, *Laboratorios de ensayo: acreditación para categorías de ensayo*, y NT-19, *Laboratorios de ensayo: acreditación de análisis de residuos de plaguicidas en productos agroalimentarios*, permiten que se pueda emplear un alcance flexible sobre la base de que se ha evaluado la competencia técnica del laboratorio. Esta estrategia se basa en la existencia de dos documentos denominados "Lista de ensayo bajo acreditación (LEBA)", si se aplica la NT 18 o "Lista pública de ensayos (LPE)" si se aplica la NT 19, dentro de una categoría de ensayo definida, para los que está acreditado el laboratorio. Dichos documentos se controlan y actualizan por el propio laboratorio de acuerdo a sus necesidades sin intervención previa de ENAC (Centro Español de Metrología, 2014).

La LEBA o la LPE son listas pormenorizadas de todos los ensayos que están incluidos en el alcance genérico de acreditación. Una LEBA o LPE incluirá todas las matrices y analitos para los que se ha realizado la validación, con sus respectivos rangos de trabajo y límites de cuantificación. A medida que el laboratorio va necesitando incorporar nuevas matrices o analitos lo realiza sin la intervención previa de ENAC (Centro Español de Metrología, 2014).

Para acreditarse bajo alcance abierto el laboratorio debe seguir una serie de pasos (Centro Español de Metrología, 2014):

1. Realizar una validación inicial completa y lo suficientemente representativa de la categoría de ensayo en diversas matrices y analitos para demostrar que se comportan de la misma manera. En función de la validación inicial efectuada se propondrá a ENAC una primera LEBA o LPE.
2. Una vez aprobada esta LEBA o LPE por ENAC, cuando un cliente solicite el análisis de una nueva matriz o de un nuevo analito dentro de la categoría de ensayo definida, el laboratorio deberá efectuar una validación adicional

complementaria o completa, dependiendo del caso, para asegurar que esa matriz o analito se comporta igual que el resto de los que ya están aprobados y, por tanto, los resultados y controles de calidad aplicados son válidos.

Si la validación complementaria es satisfactoria se actualizará la LEBA o LPE, que ha de quedar a disposición de los clientes. El laboratorio ha de comunicar a ENAC la LEBA o LPE vigente del laboratorio antes de la auditoria de seguimiento, señalando todas las modificaciones realizadas desde la auditoria anterior. De este modo, se pueden incorporar nuevas matrices y/o analitos a la categoría de ensayo, sin necesidad de auditoria previa por parte de ENAC (Centro Español de Metrología, 2014).

El laboratorio deberá valorar si, de acuerdo con su actividad de análisis dentro del control oficial de alimentos y piensos, va a necesitar tener un alcance flexible porque se prevea la inclusión de nuevos analitos o nuevas matrices en su alcance de acreditación. Si su necesidad de análisis está delimitado, es mejor la opción de mantener un alcance cerrado cuya validación incluya todo el rango posible de matrices indicándolas, ya que la gestión por parte del laboratorio de un alcance cerrado es más sencilla (Centro Español de Metrología, 2014).

5. NOTAS TÉCNICAS DE ENAC (NT-18, NT-19)

La acreditación de un laboratorio bajo alcance flexible requiere que el laboratorio cumpla los requisitos establecidos en la norma UNE-EN ISO/IEC 17.025, y que además demuestre dos capacidades adicionales a las ya exigidas para una acreditación para alcance cerrado (Centro Español de Metrología, 2014):

- Un nivel de competencia técnica añadida, debido a que es necesario demostrar que el laboratorio es capaz de desarrollar y validar procedimientos de ensayo concretos cuando sea necesario incluir una nueva matriz o analito.
- Una capacidad de gestión añadida que garantice en todo momento que cada ensayo ampliado se realiza cumpliendo todos los requisitos de la acreditación.

Los documentos que establecen estos requisitos específicos son las NT 18 y 19

NT-18: LABORATORIOS DE ENSAYO: ACREDITACIÓN POR CATEGORÍAS DE ENSAYO

Este documento de ENAC pretende dar respuesta a la necesidad de establecer mecanismos que permitan, en determinadas circunstancias, que los laboratorios puedan incluir nuevos ensayos en su alcance sobre la base de que se ha evaluado su competencia técnica, no solo para la realización de ensayos, sino también para desarrollar y validar procedimientos de acuerdo a un sistema preestablecido, haciendo posible la ampliación de los ensayos acreditados de un modo más ágil.

La norma establece un sistema basado en la existencia de un documento en el que se listan los ensayos concretos dentro de una categoría definida para los el laboratorio está

acreditado. Este documento es controlado y actualizado por el laboratorio sin intervención de ENAC. Una vez definida la lista se establece cómo se controlan los requisitos del sistema de gestión y cómo dejar evidencia adecuada de los ensayos que se van incluyendo en la lista, así como de qué manera ENAC evalúa a los laboratorios que siguen este tipo de esquema.

El documento controlado por el laboratorio en el que se incluyen los ensayos para los que el laboratorio está acreditado dentro de cada categoría es la **Lista de Ensayos Bajo Acreditación (LEBA)**. Esto significa que, aunque en el Anexo Técnico se indique una Categoría de Ensayos, realmente **solo están amparados por la acreditación los ensayos incluidos en ella**, por lo que solo estos pueden dar lugar a un informe acreditado. Se trata de un documento público en el que debe constar:

- La referencia al código y revisión del Anexo Técnico
- La familia de productos y/o la familia de parámetros y los productos o parámetros concretos que han sido autorizados por el laboratorio según su sistema de gestión
- El procedimiento de ensayo aplicable a la categoría
- Intervalos de medida o límites de detección

Los requisitos del sistema de gestión deben ser acordes al tamaño y complejidad de la/s categoría/s de ensayo para los que está acreditado el laboratorio, siempre cumpliendo lo establecido en la 17.025, y hacen referencia a las políticas, responsabilidades, cualificaciones del personal, equipos y estrategia de validación, adecuada a la extensión y naturaleza técnica de la categoría de ensayos. El laboratorio también ha de disponer de un procedimiento de ensayo aplicable a toda la categoría de ensayo.

El procedimiento para la gestión de solicitudes debe asegurar que, en los casos en los que no se tiene establecido en rutina el ensayo solicitado (no está en la LEBA), el laboratorio informará al cliente de que, dependiendo del resultado de la validación, es posible que no pueda emitirse un resultado acreditado, así como la implicación de su solicitud de ensayo en lo relativo a plazos.

La acreditación para categorías de ensayo implica el compromiso del laboratorio de ofrecer ensayos acreditados en toda la categoría, lo que significa que la emisión generalizada de informes de ensayo no acreditados dentro de una categoría puede poner en cuestión la acreditación para categorías de ensayo.

Solo pueden optar a acreditación por categorías de ensayo los laboratorios que cumplen una serie de condiciones:

- Dilatada experiencia en realización de un número de ensayos concretos representativos de la categoría.
- Experiencia en desarrollo y validación de métodos de ensayo

- Resultados satisfactorios en controles de calidad internos, externos y en auditorías de ENAC.
- Disponer de equipos de medida precisos para operar en esa categoría.

Para el **mantenimiento de la acreditación**, durante las auditorías de seguimiento se comprobará la implantación y eficacia del control establecido por el laboratorio para la gestión de la LEBA. El laboratorio debe evidenciar que mantiene su capacidad técnica y que utiliza el sistema de gestión definido.

NT-19: LABORATORIOS DE ENSAYO: ACREDITACIÓN DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

La NT-19 describe los criterios de ENAC para la evaluación de laboratorios de ensayo que solicitan la acreditación flexible para análisis de residuos de plaguicidas en productos agroalimentarios. Es de aplicación también para situaciones intermedias, ya que implica expresar de manera flexible sólo el producto de ensayo o bien sólo los plaguicidas a analizar.

El laboratorio debe disponer de dilatada experiencia en la realización de un número de ensayos concretos suficientemente representativos de la categoría para poder optar a este tipo de alcance flexible.

Para este documento se define **Residuo de plaguicida** 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. El límite legal superior de concentración de un residuo de plaguicida en un producto determinado es el llamado **Límite Máximo de Residuos (LMR)**.

En el Anexo Técnico se describe el alcance de acreditación para análisis de residuos de plaguicidas como categoría de ensayos. En él se indicará:

- Producto o familia de productos definida por el laboratorio
- Plaguicidas, especificando o referenciando la técnica de análisis empleada
- Método de ensayo
- Referencia a la Lista Pública de Ensayos (LPE)

La **LPE** es un documento público, elaborado, revisado y controlado por el laboratorio, en el que se concretan las matrices y plaguicidas para los que el laboratorio ha validado o comprobado el funcionamiento del método. Este documento deberá ser facilitado a los clientes que lo soliciten. El laboratorio debe establecer la sistemática de actualización de la LPE en función de las validaciones/comprobaciones realizadas. En él debe constar:

- Número de revisión y fecha de aprobación.
- La referencia al código y revisión del Anexo Técnico

- La familia de productos, grupos de productos establecidos por el laboratorio para cada familia, cubriendo la totalidad de la misma y dentro de cada grupo todas las matrices concretas que han sido validadas/comprobadas por el laboratorio.
- Los plaguicidas concretos validados por el laboratorio y el límite de cuantificación/detección
- El procedimiento de ensayo aplicable a la categoría

En la **validación inicial** del método de ensayo el laboratorio demuestra tanto que el método es válido para el uso previsto como su competencia técnica en la validación. Debe establecerse una estrategia sobre validaciones adecuada a la extensión y naturaleza técnica de la categoría de ensayo. Es recomendable que cuando el laboratorio seleccione las matrices representativas de la/s familia/s para realizar la validación inicial del método de ensayo, se realice sobre las matrices que se analizan con más frecuencia.

Los parámetros a evaluar deben incluir límite de cuantificación, estudio de linealidad, precisión y recuperación a distintos niveles (incluyendo el límite de cuantificación), así como la selectividad/especificidad. Se consideran orientativos los requisitos especificados en el documento SANTE (de la Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria de la Comisión Europea) en vigor u otro documento equivalente.

Las **actividades adicionales** derivadas del alcance flexible, difieren en el caso de que se trate de nuevas matrices o nuevos plaguicidas. Para las **matrices nuevas**, no incluidas en la LPE pero pertenecientes a un grupo de productos en el que se haya realizado la validación completa, el procedimiento de validación debe indicar los controles a realizar antes de la emisión del informe de resultados y de la inclusión de la matriz en la LPE, y deben incluir la comprobación de la recuperación en el límite de cuantificación y la confirmación de los plaguicidas incluidos en la LPE para esa familia de productos (por ejemplo vegetales con alto contenido en agua, con bajo contenido en agua o con alto contenido en grasa). Para los plaguicidas nuevos es necesaria una validación completa, igual que en un alcance cerrado, tanto si no está recogida en la LPE como si se solicita para una matriz de una agrupación en la que no se ha validado ese plaguicida.

La NT-19 establece también las actividades para la **evaluación de la calidad**, que son de tres tipos:

- Actividades de control rutinaria, incluida en cada secuencia de análisis, que incluirá control de la extracción, verificación de la respuesta del equipo con plaguicidas representativos que se irán rotando para cubrir todos los compuestos. También pueden realizarse control de blanco de reactivos, blancos de matriz, linealidad, etc.

- Actividades de control interno periódicas, como la inclusión de materiales de control (sobrantes de ejercicios de intercomparación), muestras ciegas o duplicados. Debe garantizarse la inclusión de muestras positivas a nivel de límite de cuantificación y de cumplimiento normativo (los LMR)
- Participación en ejercicios de intercomparación.

Para **mantener una acreditación** bajo alcance flexible durante las auditorías de seguimiento se comprobará la implantación y eficacia del control de la LPE establecido por el laboratorio de modo que se puede evidenciar que mantiene su capacidad técnica y que se utiliza la sistemática definida.

MATERIAL NO OFICIAL

6. BIBLIOGRAFÍA

- Centro Español de Metrología. (Diciembre de 2014). *e-medida*. Recuperado el 2022 de Abril de 2021, de Revista Española de Metrología: <https://www.e-medida.es/numero-7/como-optimizar-la-acreditacion-de-los-laboratorios-que-participan-en-el-control-oficial-de-alimentos-y-piensos/>
- 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>
- ENAC. (Enero de 2015). Guía para el uso de la acreditación en el ámbito reglamentario.
- ENAC. (Marzo de 2020). NT-18 Laboratorios de Ensayo: Acreditación por categorías de ensayo. *Rev. 2*.
- ENAC. (Noviembre de 2020). NT-86 Laboratorios de ensayo y calibración: identificación de los métodos en los alcances de acreditación y acciones a tomar en caso de ser revisados. *Rev. 5*.
- ENAC. (Marzo de 2021). CGA-ENAC-LEC Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. *Rev. 10*.
- ENAC. (Marzo de 2021). NT-19 Laboratorios de ensayo: acreditación de análisis de residuos de plaguicidas en productos agroalimentarios. *Rev.4*.
- ENAC. (Abril de 2021). PAC-ENAC Procedimiento de Acreditación *Rev.5*.
- UNE-EN ISO IEC 17025. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 6

MATERIALES DE REFERENCIA. TIPOS 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 α .
 - **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 7

GESTIÓN DE EQUIPOS. CALIBRACIÓN, VERIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE EQUIPOS. PLANES Y PROGRAMAS APLICABLES. TRAZABILIDAD DE LAS MEDIDAS

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. GESTIÓN DE EQUIPOS.
3. CALIBRACIÓN, VERIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE EQUIPOS.
CALIBRACIÓN
VERIFICACIÓN
MANTENIMIENTO DE EQUIPOS
4. PLANES Y PROGRAMAS APLICABLES.
PROGRAMA DE CALIBRACIÓN
5. TRAZABILIDAD DE LAS MEDIDAS.
6. Bibliografía

MATERIAL NO OFICIAL

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. El organismo que evalúa la competencia técnica en el caso de España es ENAC.

La norma establece, como parte de los requisitos relativos a los recursos (punto 6 de la norma), que un laboratorio acreditado ha de tener disponibles el personal, las instalaciones, el equipamiento, los sistemas y los servicios de apoyo necesarios para gestionar y realizar sus actividades. En el siguiente tema se expondrán los requisitos relativos a equipamiento.

2. GESTIÓN DE EQUIPOS.

La gestión del equipamiento de un laboratorio acreditado bajo la norma 17.025 debe realizarse según lo establecido en su punto 6.4. Según esto, el laboratorio debe tener acceso al equipamiento, incluyendo instrumentos de medición, software, patrones, materiales de referencia, reactivos, consumibles y aparatos para mediciones auxiliares (como la toma de datos de las condiciones ambientales) que se requiere para el correcto desempeño de su actividad y que puedan influir en los resultados.

Todo laboratorio acreditado tiene que contar con procedimientos de adquisición y gestión, manipulación, transporte, almacenamiento, uso y mantenimiento planificado de los equipos para asegurar su correcto funcionamiento. Si se utiliza equipamiento que está fuera del control del laboratorio, se debe asegurar que se cumplen los requisitos establecidos en sus procedimientos.

Las unidades de un laboratorio acreditado deben contar con el equipamiento, software y patrones físicos adecuados para la realización de los ensayos y deben permitir obtener la exactitud requerida y cumplir con los requisitos relativos a ensayo y calibración.

Tras adquirir un instrumento o aparato de medida, debe quedar definido quién realiza el transporte y traslado, generalmente el proveedor, para garantizar la integridad del equipo. Una vez instalado y realizada la puesta en marcha por parte del proveedor, un responsable debe verificar que el equipo cumple con los requisitos exigidos y se debe incluir ese instrumento en el inventario del laboratorio para su correcta gestión por la Unidad de Garantía de Calidad, siendo codificado de manera inequívoca. Es posible el traslado de equipos entre departamentos: en ese caso, un responsable comprobará también el funcionamiento del equipo una vez trasladado y se actualizará la información del inventario.

La inclusión en el inventario permite la correcta gestión del equipamiento, conociéndose así los medios disponibles en el laboratorio, y posibilitando su inclusión en el plan/programa de calibración, verificación y mantenimiento.

Cómo parte de la documentación asociada a los equipos se debe contar con un documento en el que se identifique el equipo con su código y se indique el software instalado, manteniéndose un control sobre esta información.

La adquisición de un nuevo equipo supone, además de su codificación para una fácil identificación, la redacción de un procedimiento de uso en caso necesario. Si los equipos han de ser calibrados de manera periódica se debe definir el período de validez, que debe quedar reflejado en el etiquetado. En caso de que tenga limitaciones de uso (rangos de pesada, por ejemplo) debe quedar también definido.

Todos los equipos empleados para realizar ensayos y sometidos a calibración/verificación/mantenimiento deben disponer de un cuaderno de equipo dónde se conserve registro histórico de su funcionamiento, las actuaciones de calibración/verificación/mantenimiento, informes de avería y otras anomalías... Si las actividades de calibración se asocian al método de análisis, los datos obtenidos quedarán en el registro de datos primarios del laboratorio.

3. CALIBRACIÓN, VERIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE EQUIPOS.

Todos los equipos utilizados para ensayos y/o calibraciones, incluyendo equipos para realizar mediciones secundarias (por ejemplo de las condiciones ambientales), que tengan un efecto significativo en la exactitud o validez de los resultados de los ensayos, calibraciones o muestreos deben calibrados antes de ponerse en funcionamiento y tras operaciones de mantenimiento correctivo.

CALIBRACIÓN

Se define **Calibración** como aquella operación que establece una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida y bajo unas condiciones especificadas. La información obtenida se utiliza para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación (Centro Español de Metrología, 2012)

El resultado de una calibración puede ser recogido en un documento denominado certificado de calibración o informe de calibración. A veces se expresa su resultado mediante un factor de calibración o de un conjunto de factores que puede tomar la forma de una curva de calibración.

La importancia de la calibración reside en darnos una fotografía instantánea de la situación de nuestro instrumento, sistema, etc.

De la definición de calibración se desprende que pueden existir dos tipos de calibraciones (Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC), 2015):

a) **Directa**

En la que el valor conocido se expresa en la misma magnitud que mide el equipo. (La magnitud del patrón es la misma que la magnitud medida)

El valor conocido de la magnitud, puede ser obtenido a partir de un patrón físico o un material de referencia certificado (MRC).

La **relación** entre el valor de la magnitud y el valor del equipo, en general se expresa como una diferencia denominada **corrección**.

$$\text{Corrección} = V_{\text{PATRÓN}} - V_{\text{EQUIPO}}$$

b) **Indirecta (Calibración instrumental)**

En ella el equipo mide una magnitud que no es en la que se expresa el patrón, utilizado como valor de magnitud materializada, es decir, la magnitud del patrón es diferente que la magnitud medida, como ocurre en la calibración de un equipo UV-visible dónde existe una relación entre la absorbancia y la concentración.

La **relación** entre el valor conocido de la magnitud y el valor obtenido del equipo, se expresa como una **función** magnitud/respuesta que puede variar en función de las características y estado de funcionamiento del equipo. La determinación de esta relación genera una incertidumbre. En la mayoría de las ocasiones esta relación es lineal, y por tanto se ajusta a una ecuación del tipo $y = a + bx$

Algunos de los requisitos para realizar una calibración instrumental son:

1. **Número de puntos:** es lógico deducir que el mínimo número de puntos es tres, ya que se necesitan 3 puntos para tener el menos dos grados de libertad, uno por variable (pendiente y ordenada en el origen) ya que por dos puntos siempre pasa una recta. Si no existe un tercer punto desconocemos cómo funciona la recta en el intervalo de resultados. A mayor número de puntos, mayor fiabilidad.
2. **Intervalo de puntos:** Es necesario definir el intervalo entre los valores de los puntos que van a formar parte del conjunto del que se va a obtener pendiente y ordenada en el origen, para no primar zonas particulares de la curva, de manera que tengan más peso a la hora de ajustar valores. Se aconseja una división en función de **factores multiplicativos** dependiendo del número de puntos y del intervalo cubierto, si bien se puede utilizar otros criterios si se quiere obtener una descripción de zonas particulares.
3. **Validación de Resultados:** Si deseamos conocer la fiabilidad del ajuste tendremos que buscar métodos que nos den una medida de significación de los parámetros que nos permitan tomar una decisión sobre la validación o no de los resultados.

Este tipo de calibraciones en el campo químico se ha denominado también estandarización.

Información obtenida en la calibración

Como consecuencia de la calibración, se obtiene una información sobre la capacidad de medida actual de nuestro equipo, y se garantiza la **comparabilidad** mediante:

1) Valor de la relación.

Corrección en el caso de medidas directas o función respuesta en el caso de medidas indirectas. En ambos casos nos indica uno o varios valores numéricos que tendremos que utilizar para obtener los valores verdaderos de nuestra medida.

2) Incertidumbre

El valor numérico corrección o la función respuesta obtenida tendrá una incertidumbre asociada debida al método utilizado, y al patrón y equipos utilizados. Esta incertidumbre se propaga a todos los resultados obtenidos.

3) Trazabilidad

Si la operación de calibración, tiene como objetivo asegurar que nuestros resultados son comparables con el resto de laboratorios, el certificado o los registros de la calibración deberían garantizarnos la trazabilidad de nuestros resultados a patrones apropiados. (Para asegurar la trazabilidad la calibración externa se tiene que realizar en laboratorios acreditados por ENAC).

4) Evaluación de los resultados de la calibración.

Como parte final de todo el proceso y objetivo fundamental de la Calibración es necesario realizar, por parte del personal que lo va a utilizar, un análisis de los resultados obtenidos. De él se debe desprender si el equipo puede ser utilizado para el uso previsto (incertidumbre adecuada) y como debe ser utilizado (cuál es la relación obtenida en el momento de la calibración). Dando lugar a tres posibles situaciones:

a) El equipo puede ser utilizado en cuyo caso se identifica como tal, y se prevé su próxima fecha de calibración.

b) El equipo puede ser utilizado con restricciones (realización de correcciones, utilización solo en una parte del rango, etc...)

c) El equipo no puede ser utilizado, en cuyo caso se deberá definir si se manda a reparar o se puede realizar un ajuste con los propios medios del laboratorio.

Esa evaluación debe realizarse en función de los requisitos solicitados a nuestros equipos en el proceso de medida y análisis.

VERIFICACIÓN

En algunos casos la operación de calibración que nos establece la relación existente con patrones no es suficiente para garantizar la comparabilidad de las medidas por sí sola. En algunos equipos es necesario garantizar que cumplen unos requisitos de construcción determinados indicados en la norma, o que determinadas magnitudes se mantienen bajo control en un intervalo de tolerancias.

En el campo químico es frecuente el uso de equipos que utilizan calibración indirecta y que pueden ser utilizados para medir diversas magnitudes. Es necesario la comprobación de otras magnitudes que están relacionadas, tanto con la sensibilidad de la respuesta, como con la identificación y selectividad de la sustancia medida (por ejemplo longitud de onda, caudal de gas, temperatura del horno, respuesta del detector...)

En estos casos las magnitudes asociadas tienen unas tolerancias definidas para un uso correcto del equipo ya que influyen en la respuesta de nuestro equipo y por tanto en la incertidumbre con la que determinamos la magnitud de interés. Hay que tener en cuenta que no existe una relación matemática simple que relacione unas con otras.

A las operaciones de comprobación de este tipo se las denomina operaciones de **Verificación**. La Verificación se define como la confirmación por examen y recogida de evidencias de que los requisitos especificados se han alcanzado (Guía ISO 25).

En conexión con la gestión de equipos de medida, la verificación proporciona un medio para comprobar si las desviaciones entre los valores indicados por un instrumento y los valores conocidos de una magnitud de medida son consistentemente más pequeños que el máximo error definido en una norma, reglamento o especificación particular para la gestión de los equipos de medida.

Los resultados de las verificaciones conllevan una decisión sobre el estado del equipo. En todos los casos se requiere que se conserven entre los requisitos individuales del instrumento de medida un registro escrito de la verificación realizada.

Como en el caso de la calibración, deben ser realizadas periódicamente con patrones trazables y de incertidumbre conocida y de acuerdo a procedimientos. Previamente deben haberse establecido unos criterios de evaluación.

Se diferencian de la calibración en que el resultado indica simplemente si se cumple una tolerancia, y por tanto la incertidumbre debida a la verificación no afectará en general al resultado del ensayo o análisis. Además no es obligatoria para todos los instrumentos de medida.

Verificación directa

En algunos casos, se realiza periódicamente una operación de comprobación del equipo. Por ejemplo, realización de comprobación de balanza con una pesa.

Su objetivo es comprobar que se mantiene el estado de calibración y se realiza debido a que el período de calibración es largo y se desea comprobar que no ha habido variaciones respecto a referencias estables que no deben variar más de una cierta tolerancia. Se refieren siempre a magnitudes de medida.

En definitiva, la calibración sirve para ver que los equipos son aptos para el fin previsto y la verificación para demostrar que la calibración se mantiene en el tiempo.

MANTENIMIENTO DE EQUIPOS

Según la ISO/IEC GUÍA 25,3.8:1990, se define **Mantenimiento de equipos** como el conjunto de actividades programadas, encaminadas a evitar o descubrir fallos en sistemas y equipos en fase de servicio, antes de que tengan impacto en la seguridad u operatividad de los mismos.

El objetivo de las operaciones de mantenimiento es asegurar que los equipos estén disponibles para su uso, se garantice su correcto funcionamiento y prolongar de este modo su vida útil.

El mantenimiento de los equipos puede ser correctivo (corregir fallos, averías) o preventivo (prevenir fallos, deterioros, averías o un mal funcionamiento) (Martí Veciana, 2001) y en ambos casos pueden ser operaciones de tipo interno o externo.

La norma 17.025 establece que se deben conservar registros de todos los equipos que puedan influir en las actividades del laboratorio. Dentro de esos registros se incluyen, entre otros, el plan de mantenimiento y el mantenimiento llevado a cabo hasta la fecha, cuando sea pertinente para el desempeño del equipo.

4. PLANES Y PROGRAMAS APLICABLES.

La norma UNE EN ISO/IEC 17.025:2017 establece que un laboratorio acreditado ha de tener implantado un "*Plan de mantenimiento y calibración o verificación*" de sus equipos como parte fundamental del sistema de calidad. Las operaciones a realizar con los equipos pueden ser de mantenimiento preventivo y/o de calibración o verificación.

Se entiende por **Plan de Calibración** la organización del conjunto de patrones, equipos o instrumentos y elementos accesorios existentes en un laboratorio para efectuar la calibración de los mismos metódicamente de forma que se pueda asegurar en todo momento la incertidumbre de las medidas que se realicen. Afecta a todos los instrumentos destinados a hacer un análisis, solos o en conjunto con otros equipos, su objetivo es la calibración sistemática, organizada y debidamente documentada y el

resultado obtenido nos garantiza que se asegura la trazabilidad y se garantiza la incertidumbre de las medidas que se realizan (Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC), 2015).

Para realizar un correcto plan de calibración es necesario:

1. Conocer los equipos que deben ser calibrados

Esta actividad puede ser realizada a partir del sistema de control ya implantado, identificando dentro de todos los equipos inventariados cuáles de ellos deben ser calibrados.

2. Definir el sistema de calibración de cada uno de ellos.

Esto supone establecer un **Procedimiento de calibración** que nos asegure que comprobamos la correcta medición de los equipos en el rango de utilización de éstos mediante su comparación con patrones trazables, así como otras medidas complementarias que nos pueden ayudar a definir la incertidumbre asociada a este equipo.

3. Establecimiento de una periodicidad para cada una de estas calibraciones.

4. Análisis de los resultados de estas calibraciones para poder realizar una correcta identificación del estado de calibración de cada uno de los equipos.

5. Documentación de estas calibraciones en manera de que podamos tener registros trazables que nos aseguren y garanticen frente a terceros que nuestros equipos están en las condiciones correctas, o nos permitan en caso de anomalías comprobar el historial del equipo.

Dentro de la primera fase una vez que se ha definido qué equipos deben ser calibrados, es necesario verificar si el laboratorio dispone de patrones adecuados para realizar esta calibración o considera que debe ser realizada por laboratorios externos.

En el primer caso, el laboratorio deberá establecer un procedimiento que asegure que la calibración se realiza de una manera correcta y repetitiva en todos los casos y establecer una cierta periodicidad para realizar esta operación así como un sistema de control de que estos periodos se cumplen.

En el segundo caso deberá establecer los requisitos de trazabilidad exigibles a dichos laboratorios.

Registros y certificados de calibración

Los registros y certificados de calibración son documentos que se utilizan en el caso de las calibraciones para recoger los resultados de la calibración, definir la situación en que queda el equipo, y comprobar que se han tomado todas las disposiciones oportunas para realizar una correcta calibración.

Pueden provenir de dos fuentes: internas (calibraciones realizadas por el propio laboratorio), externas (calibraciones realizadas por otros laboratorios).

En el caso de calibraciones externas los requisitos a solicitar a un certificado son:

- Nombre y dirección del laboratorio, así como el lugar de realización de las calibraciones cuando sea diferente de la dirección del laboratorio.
- Identificación única del certificado y de cada una de sus páginas, así como el número total de páginas.
- Nombre y dirección del cliente.
- Descripción e identificación adecuada del elemento calibrado, medido o comprobado.
- Fecha de recepción del objeto a calibrar, y la fecha o fechas de realización de la calibración.
- Identificación del procedimiento de calibración empleado.
- Descripción del procedimiento de muestreo, cuando proceda.
- Cualquier desviación, adición o exclusión del procedimiento de calibración y cualquier otra información relativa a la calibración específica que se realiza.
- Valores de las condiciones ambientales en que se realiza.
- Medidas, exámenes y resultados derivados, apoyados, cuando proceda, con tablas, gráficos, dibujos y fotografías, así como los posibles fallos detectados.
- Incertidumbre asociada a los resultados y/o una declaración de conformidad con una especificación metrológica identificable.
- Firma y cargo de la persona o de las personas que aceptan la responsabilidad técnica del certificado de calibración y la fecha de emisión del mismo.
- Si aplica, declaración de que el certificado de calibración sólo afecta a los objetos calibrados.
- Indicación de que el certificado no deberá reproducirse parcialmente sin la aprobación por escrito del laboratorio.
- Declaración genérica de trazabilidad.

Deberá existir además un registro de evaluación de los resultados de la calibración, en el que el laboratorio decida el estado del equipo, teniendo en cuenta el uso previsto.

Para las calibraciones internas, deberán conservarse los registros suficientes para permitir la reproducción de todas las actividades y decisiones tomadas sin ser necesario la emisión de un certificado. Si deberá quedar claramente establecido:

- Equipo calibrado
- Personal que realizó la calibración
- Método de calibración
- Equipos y patrones utilizados

- Medidas y valores de los patrones utilizados obtenidos
- Fecha o fechas de realización
- Valores de la relación obtenidos y su incertidumbre
- Decisiones adoptadas sobre el estado del equipo en función de los valores obtenidos
- Condiciones ambientales, que influyan en la calibración y las correcciones utilizadas en función de éstas.

El **plan de mantenimiento** debe cubrir todos los equipos y definir las actividades a realizar y su periodicidad. Las actividades u operaciones a realizar deben ir encaminadas a prevenir, o en su caso corregir, fallos, deterioros, averías o un mal funcionamiento de los equipos. Este plan debe incluir tanto el mantenimiento interno del propio laboratorio, como el externo (servicio externo de mantenimiento preventivo, en los casos que sea necesario o posible). Las operaciones de mantenimiento que se efectúen de un equipo, tales como, por ejemplo: limpieza, revisiones, comprobaciones, sustituciones, reposiciones de material fungible, etc. deben anotarse en un diario o ficha/registro de mantenimiento diseñado para esta finalidad (Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC), 2015).

PROGRAMA DE CALIBRACIÓN

El **Programa de calibración** es el documento donde se identifican las fechas de calibración y próxima calibración de los instrumentos de medida, por tanto es un registro cambiante en el tiempo y que tiene muchas posibilidades de ser tratado informáticamente, favoreciendo la efectividad del control de las distintas calibraciones por parte de los responsables del laboratorio.

Dentro del programa de calibración se deben incluir no solo las calibraciones internas sino también las externas o contemplarlas en un documento similar aparte, de tal manera que se pueda planificar el seguimiento de todas estas actividades.

Periodos de calibración y verificación

Una de las actividades más controvertida es la fijación de los períodos de calibración/verificación debido a:

- Desconocimiento de las características de estabilidad de los equipos por parte de los usuarios.
- Falta de criterios para la selección.
- Diferencias entre los distintos tipos de equipos.
- Coste de la calibración, en tiempo de personal y parada del equipo, así como económico cuando se seleccionan laboratorios externos.

El requisito fundamental a tener en cuenta para fijar los períodos es garantizar la estabilidad de nuestro equipo, o dicho de otro modo que la deriva entre calibraciones no nos impida tener seguridad en nuestras medidas.

La deriva puede venir influenciada por varios factores: la estabilidad del equipo, las condiciones ambientales de uso, la cualificación del personal que lo emplea, el número de usos o los requisitos de precisión solicitada. Por ello, para definir los periodos de calibración o verificación se pueden seguir diferentes sistemas basados en períodos fijos, períodos basados en función del número de usos o incrementados escalonadamente en función de la deriva.

De cualquier modo, es evidente que el responsable de fijar el período, es aquel que conoce el uso del equipo y su comportamiento, y que éste debe estar basado en evidencias objetivas. Por ello los organismos de acreditación solicitan de los laboratorios de calibración que no indiquen períodos de re-calibración en los certificados que emiten para evitar dejaciones de responsabilidades por parte del usuario (Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC), 2015).

5. TRAZABILIDAD DE LAS MEDIDAS.

La norma 17.025:2017 recoge en un punto 6.5 los criterios relativos a la trazabilidad metrológica. Según esto un laboratorio acreditado tiene que establecer y mantener la trazabilidad metrológica de los resultados de sus mediciones por una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medición, vinculándolos con la referencia adecuada.

Este hecho se pone también de manifiesto en la Nota Técnica NT-74 sobre Política de trazabilidad metrológica de ENAC. Así, los laboratorios acreditados deben asegurar la trazabilidad metrológica aplicando:

1. Desarrollando la parte de la cadena de trazabilidad que se encuentra bajo su responsabilidad, mediante calibración interna, alineándose con lo establecido en la norma UNE EN ISO/IEC 17.025:2017 y entendiéndose calibración interna como la que se realiza dentro de la entidad legal acreditada.
2. Disponer de certificados de calibración externa para patrones y equipos no calibrados internamente que cumplan con alguno de los criterios recogidos en la NT-74.

Un laboratorio acreditado tiene que asegurar que los resultados de una medición sean trazables al sistema internacional. El modo de asegurar esa trazabilidad es mediante la calibración proporcionada por un laboratorio competente, el uso de materiales de referencia certificados proporcionados por productores competentes o siempre que la comparación, directa o indirecta, se realice con patrones nacionales o internacionales.

6. Bibliografía

Centro Español de Metrología. (2012). Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales y términos asociados. *3ª Edición*.

ENAC. (Julio de 2021). NT-74 Rev.4 Política de trazabilidad metrológica de ENAC.

Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC). (2015). Validación, Calibración e Incertidumbre en Laboratorios. San Fernando de Henares.

Martí Veciana, A. (2001). NTP 582: Gestión de los equipos de medición en un laboratorio de higiene industrial.

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 8

ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN. ENSAYOS COLABORATIVOS, DE APTITUD Y DE CERTIFICACIÓN. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO. GUÍA ENAC-14 Y NOTA TÉCNICA NT-03 DE ENAC.

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 resultado.

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.

σ_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 (σ_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.

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

-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)
 σ_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 9

VALIDACIÓN DE UN ENSAYO. CRITERIOS FUNDAMENTALES DE VALIDACIÓN. 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.

Coficiente 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 10

Laboratorios Comunitarios de Referencia y Laboratorios Nacionales de Referencia en el ámbito de los productos 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. INTRODUCCIÓN

2. LABORATORIOS COMUNITARIOS DE REFERENCIA.

2.1. DESIGNACIÓN DE LABORATORIOS DE REFERENCIA DE LA UNIÓN EUROPEA

2.2. RESPONSABILIDADES Y TAREAS DE LOS LABORATORIOS DE REFERENCIA DE LA UNIÓN EUROPEA

2.3. OBLIGACIONES DE LA COMISIÓN

3. LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA.

3.1. DESIGNACIÓN DE LOS LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA

3.2. RESPONSABILIDADES Y TAREAS DE LOS LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA

4. LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

1. INTRODUCCIÓN

El papel de los laboratorios de referencia en el sector agroalimentario es crucial para garantizar un adecuado funcionamiento, desde el punto de vista técnico, de los ensayos realizados por los laboratorios oficiales. Tal y como indica el Reglamento (UE) 2017/625, estos laboratorios deben contribuir a armonizar y mejorar los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio y su utilización.

Estos objetivos pueden alcanzarse, entre otros medios, aplicando métodos de análisis validados, asegurando la disponibilidad de materiales de referencia, organizando ejercicios de intercomparación y formando adecuadamente al personal de los laboratorios.

Por ello, ENAC considerará adecuadas las decisiones, prácticas y procedimientos de ensayo utilizados por los laboratorios que operan en el control oficial que sigan las instrucciones, directrices, recomendaciones o documentos publicados por el correspondiente Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de cualquier estado miembro o el Laboratorio de Referencia de la UE (EU-RL) respectivo. Además, ENAC considerará suficiente prueba de validación de un procedimiento de ensayo la publicación de éste por el correspondiente Laboratorio Nacional de Referencia de cualquier estado miembro o por el Laboratorio de Referencia de la UE respectivo, por lo que los laboratorios que soliciten la acreditación para dichos procedimientos de ensayo solo deberán realizar las tareas de verificación exigidas por la norma ISO 17025.

2. LABORATORIOS COMUNITARIOS DE REFERENCIA.

Según el 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, se establecerá un laboratorio de referencia de la Unión Europea cuando:

- a)** la eficacia de los controles oficiales dependa de la calidad, uniformidad y fiabilidad de:
- los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico empleados por los laboratorios oficiales designados
 - los resultados de los análisis, ensayos y diagnósticos efectuados por dichos laboratorios oficiales.
- b)** cuando haya una reconocida necesidad de promover prácticas uniformes en relación con la elaboración o utilización de los métodos.

La Comisión examinará de forma periódica el mandato y funcionamiento de los laboratorios de referencia de la Unión Europea.

2.1. DESIGNACIÓN DE LOS LABORATORIOS DE REFERENCIA DE LA UNIÓN EUROPEA.

La Comisión, mediante actos de ejecución, designará laboratorios de referencia de la Unión Europea en los casos en que se haya adoptado la decisión de establecer dichos laboratorios.

Las designaciones deberán ir precedidas de un proceso público de selección y tener una duración limitada y por un período mínimo de cinco años o revisarse periódicamente.

Los laboratorios de referencia de la Unión Europea:

- a)** funcionarán de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 y serán acreditados de acuerdo con dicha norma por un organismo nacional de acreditación. No obstante, en el ámbito regulado por las normas de protección contra las plagas de los vegetales, la Comisión podrá designar laboratorios oficiales como laboratorios de referencia de la Unión Europea, independientemente de que cumplan las condiciones de acreditación EN ISO/IEC 17025. BEI alcance de dicha acreditación:
- incluirá todos los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio exigidos para ser utilizados por el laboratorio cuando funcione como un laboratorio de referencia de la Unión Europea
 - podrá comprender uno o más métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio o grupos de métodos
 - se podrá definir de manera flexible, de modo que el alcance de la acreditación pueda incluir las versiones modificadas de los métodos utilizados por el laboratorio de referencia de la Unión Europea cuando se le concedió la acreditación o bien nuevos métodos, sobre la base de las propias validaciones del laboratorio sin una evaluación específica antes del uso de dichos métodos modificados o nuevos por parte del organismo nacional de acreditación del Estado miembro en que esté localizado el laboratorio de referencia de la Unión Europea.
- b)** serán imparciales, no tendrán conflicto de intereses en lo que respecta al ejercicio de sus tareas como laboratorios de referencia de la Unión Europea.
- c)** contarán con personal debidamente cualificado y adecuadamente formado en las técnicas de análisis, ensayo y diagnóstico aplicadas en su ámbito de competencia, y con personal de apoyo según proceda, o podrán contratar a dicho personal.
- d)** poseerán o tendrán acceso a la infraestructura, el equipamiento y los productos necesarios para realizar las tareas que se les asignen.
- e)** garantizarán que su personal y cualquier otro personal contratado tenga un buen conocimiento de las normas y prácticas internacionales y que en su trabajo se tengan en cuenta los últimos avances en materia de investigación a escala nacional, de la Unión e internacional.
- f)** estarán equipados o tendrán acceso al equipo necesario para realizar sus tareas en situaciones de emergencia, y cuando proceda, estarán equipados para cumplir las normas de bioseguridad pertinentes.

A pesar de lo anterior, los laboratorios de referencia relacionados con alimentos y piensos modificados genéticamente y los relacionados con los aditivos en la alimentación animal

serán los laboratorios de referencia de la Unión Europea que tengan las responsabilidades y ejerzan las tareas propias del laboratorio de referencia, respectivamente, en los ámbitos de:

- a)** los OMG y los alimentos y piensos modificados genéticamente
- b)** los aditivos para piensos.

Las obligaciones de confidencialidad del personal de los laboratorios de referencia de la Unión Europea incluyen que no se divulgue a terceros la información obtenida en el desempeño de sus funciones.

2.2. RESPONSABILIDADES Y TAREAS DE LOS LABORATORIOS DE REFERENCIA DE LA UNIÓN EUROPEA

Los laboratorios de referencia de la Unión Europea:

- a)** publicarán la lista de los laboratorios nacionales de referencia designados por los Estados miembros.
- b)** contribuirán a la mejora y armonización de los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico que deban utilizar los laboratorios oficiales, y de los datos de análisis, ensayo y diagnóstico generados por dichos métodos.
- c)** serán responsables de las siguientes tareas en la medida en que estén incluidas en los programas de trabajo anuales o plurianuales de los laboratorios de referencia que se hayan establecido de conformidad con los objetivos y prioridades de los correspondientes programas de trabajo adoptados por la Comisión:
 - proporcionar a los laboratorios nacionales de referencia la descripción y orientación de los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio, incluidos los métodos de referencia
 - proporcionar materiales de referencia a los laboratorios nacionales de referencia
 - coordinar la aplicación, por parte de los laboratorios nacionales de referencia y, en caso necesario, por parte de otros laboratorios oficiales, de los métodos, organizando periódicamente ensayos interlaboratorios o ensayos de aptitud
 - coordinar las disposiciones prácticas necesarias para aplicar nuevos métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio, e informar a los laboratorios nacionales de referencia de los avances en este campo
 - impartir cursos de formación para el personal de los laboratorios nacionales de referencia y, en caso necesario, de otros laboratorios oficiales, así como para expertos de terceros países
 - proporcionar asistencia científica y técnica a la Comisión en el ámbito de su misión
 - informar a los laboratorios nacionales de referencia sobre las actividades pertinentes de investigación realizadas a escala nacional, de la Unión e internacional
 - colaborar con los laboratorios situados en terceros países y con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC)

- contribuir activamente al diagnóstico de los brotes en los Estados miembros de enfermedades de origen alimentario, zoonosis o enfermedades de los animales, o plagas de vegetales, mediante la realización de estudios de diagnóstico de confirmación, de caracterización y epizooticos o taxonómicos con cepas de patógenos aislados o ejemplares de plagas
- coordinar o realizar ensayos para comprobar la calidad de los reactivos y lotes de reactivos utilizados para el diagnóstico de las enfermedades de origen alimentario, zoonosis o enfermedades de los animales y de las plagas de los vegetales
- cuando sea pertinente en su ámbito de competencia, establecer y mantener:
 - colecciones de referencia de plagas de los vegetales y/o cepas de referencia de agentes patógenos. El laboratorio de referencia de la Unión Europea podrá establecer y mantener dichas colecciones de referencia y cepas de referencia mediante contratación externa de otros laboratorios oficiales y organizaciones científicas.
 - colecciones de referencia de materiales destinados a entrar en contacto con los alimentos, utilizados para calibrar los equipos analíticos y aportar muestras de ellos a los laboratorios nacionales de referencia,
 - listas actualizadas de sustancias y reactivos de referencia disponibles y de fabricantes y proveedores de dichas sustancias y reactivos
- cuando sea pertinente en su ámbito de competencia, cooperar entre sí y con la Comisión, según corresponda, para desarrollar métodos de análisis, ensayo o diagnóstico que cumplan normas exigentes.

2.3. OBLIGACIONES DE LA COMISIÓN

- a) La Comisión publicará y actualizará, siempre que sea necesario, la lista de los laboratorios de referencia de la Unión Europea.
- b) La Comisión estará facultada para adoptar actos delegados a fin de completar el Reglamento (UE) 2017/625 por lo que respecta al establecimiento de requisitos, responsabilidades y tareas de los laboratorios de referencia de la Unión Europea, los centros de referencia de la Unión Europea para el bienestar de los animales y los centros de referencia de la Unión Europea para la autenticidad y la integridad de la cadena agroalimentaria. Dichos actos delegados se limitarán a las situaciones de riesgos nuevos o emergentes, de enfermedades de los animales o plagas de los vegetales nuevas o emergentes o a situaciones que exijan nuevos requisitos jurídicos.
- c) Los laboratorios de referencia de la Unión Europea y los centros de referencia de la Unión Europea estarán sujetos a controles de la Comisión.
- d) En caso de que los controles de la Comisión pongan de manifiesto el incumplimiento de los requisitos establecidos en relación a la acreditación ISO 17025, a las responsabilidades y tareas de los laboratorios de referencia, después de haber recibido las observaciones del laboratorio de referencia de la Unión Europea o del centro de referencia de la Unión Europea la Comisión retirará la designación del laboratorio correspondiente o adoptará cualquier otra medida oportuna.

3. LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA.

3.1. DESIGNACIÓN DE LOS LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA

Los Estados miembros designarán uno o varios laboratorios nacionales de referencia (LNR) por cada laboratorio de referencia de la Unión Europea designado. Aquellos Estados miembros que tengan más de un laboratorio nacional de referencia por un mismo laboratorio de referencia de la Unión Europea garantizarán que dichos laboratorios cooperan estrechamente para establecer una coordinación eficaz entre sí, con los demás laboratorios nacionales y con el laboratorio de referencia de la Unión Europea.

Además, podrán designar un laboratorio nacional de referencia cuando no exista el correspondiente laboratorio de referencia de la Unión Europea, e incluso podrán designar un laboratorio situado en otro Estado miembro o en un tercer país que sea parte en el Acuerdo sobre el Espacio Económico Europeo. Así, un mismo laboratorio podrá ser designado como laboratorio nacional de referencia para más de un Estado miembro.

Los Estados miembros comunicarán el nombre y la dirección de cada laboratorio nacional de referencia a la Comisión, al correspondiente laboratorio de referencia de la Unión Europea y a los demás Estados miembros, poniendo esta información a disposición del público y la actualizarán siempre que sea necesario.

Entre los requisitos que se aplicarán a los LNR se encuentra que funcione de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 y esté acreditado de acuerdo con dicha norma por un organismo nacional de acreditación

Los laboratorios nacionales de referencia:

- a)** serán imparciales y no tendrán conflicto de intereses
- b)** contarán con personal debidamente cualificado y adecuadamente formado en las técnicas de análisis, ensayo y diagnóstico de su ámbito de competencia, y con personal de apoyo según proceda, o podrán contratar a dicho personal.
- c)** poseerán o tendrán acceso a la infraestructura, el equipamiento y los productos necesarios para realizar las tareas que se les asignen.
- d)** garantizarán que su personal tenga un buen conocimiento de las normas y prácticas internacionales y que en su trabajo se tengan en cuenta los últimos avances en materia de investigación a escala nacional, de la Unión e internacional.
- e)** estarán equipados o tendrán acceso al equipamiento necesario para realizar sus tareas en situaciones de emergencia.
- f)** cuando proceda, estarán equipados para cumplir las correspondientes normas de bioseguridad.

3.2. RESPONSABILIDADES Y TAREAS DE LOS LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA

Los laboratorios nacionales de referencia, en su ámbito de competencia:

- a)** colaborarán con los laboratorios de referencia de la Unión Europea, y participarán en los cursos de formación y en los ensayos interlaboratorios comparados que organicen estos laboratorios.
- b)** coordinarán las actividades de los laboratorios oficiales a fin de armonizar y mejorar los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio y su utilización.
- c)** organizarán ensayos interlaboratorios o ensayos de aptitud entre los laboratorios oficiales, garantizarán un seguimiento apropiado de dichos ensayos e informarán a las autoridades competentes de los resultados de dichos controles y seguimiento.
- d)** velarán por que se difunda a las autoridades competentes y a los laboratorios oficiales la información que aporte el laboratorio de referencia de la Unión Europea.
- e)** proporcionarán, dentro del ámbito de su misión, asistencia científica y técnica a las autoridades competentes para la aplicación de los planes nacionales de control plurianual (PNCPA) y de los programas coordinados de control que se adopten.
- f)** cuando sea pertinente, validarán los reactivos y lotes de reactivos, establecerán y mantendrán actualizadas listas de sustancias y reactivos de referencia disponibles y de fabricantes y proveedores de dichas sustancias y reactivos.
- g)** cuando sea necesario, impartirán cursos de formación para el personal de los laboratorios oficiales designados.
- h)** asistirán activamente al Estado miembro que los haya designado en el diagnóstico de los brotes de enfermedades de origen alimentario, zoonosis o enfermedades de los animales, o de plagas de vegetales, y en caso de partidas no conformes, mediante la realización de diagnósticos de confirmación y estudios de caracterización y epizoóticos o taxonómicos con cepas patógenas aisladas o muestras de plagas.

4. LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

Existen dos Laboratorios Agroalimentarios dependientes del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), el Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Madrid y el Laboratorio Agroalimentario de Santander, que además actúan como Laboratorios Nacionales de Referencia en diversas áreas.

El Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA) está adscrito a la Subdirección General de Control de la Calidad Alimentaria y Laboratorios Agroalimentarios de la Dirección General de la Industria Alimentaria. El LAA es LNR para metales pesados en alimentos y piensos, para el control de la presencia de restos o productos de animales (incluidas harinas de carne y huesos) en sustancias destinadas a la alimentación de animales de producción, productos fitosanitarios y sus residuos, autorización de aditivos en piensos, OGM, contenido de agua en carne de aves de corral, fertilizantes, sustratos y medios de cultivo.

Por su parte, el Laboratorio Agroalimentario de Santander (LAS) está designado como LNR para Leche y productos lácteos (Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo).

- Las determinaciones en leche cruda de vaca de: punto crioscópico, grasa, proteína, extracto seco magro, células somáticas, colonias de gérmenes a 30°C y presencia de residuos de antibióticos (Real Decreto 1728/2007, de 21 de diciembre de 2007).
- Las determinaciones en leche cruda de oveja y cabra: punto crioscópico, grasa, proteína, extracto seco magro, células somáticas, colonias de gérmenes a 30°C y presencia de residuos de antibióticos (Real Decreto 752/2011, de 27 de mayo de 2011).

BIBLIOGRAFÍA

NT-55 Rev. 2, Marzo 2018. Laboratorios de referencia en el sector agroalimentario: Política sobre participación en el sistema de acreditación.

<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/laboratorios-agroalimentarios/>

<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/laboratorios-agroalimentarios/laa/>

<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/laboratorios-agroalimentarios/las/>

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=LEGISSUM:4300993>

Reglamento (UE) 2017/625 Del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2017 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, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n. o 999/2001, (CE) n. o 396/2005, (CE) n. o 1069/2009, (CE) n. o 1107/2009, (UE) n. o 1151/2012, (UE) n. o 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n. o 1/2005 y (CE) n. o 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n. o 854/2004 y (CE) n. o 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales).

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 11

LABORATORIOS DE CONTROL OFICIAL. DESIGNACIÓN, OBLIGACIONES, AUDITORÍAS Y EXCEPCIONES A LA CONDICIÓN DE ACREDITACIÓN

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. CONTROL OFICIAL

2. LABORATORIOS DE CONTROL OFICIAL

2.1. DESIGNACIÓN

2.2. OBLIGACIONES

2.3. AUDITORÍAS

2.4. EXCEPCIONES A LA CONDICIÓN DE ACREDITACIÓN

2.4.1. Poderes para adoptar excepciones a la condición de acreditación obligatoria de los métodos de análisis utilizados por los laboratorios oficiales

2.4.2. Excepciones temporales a la condiciones de acreditación

3. RED DE LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

1. CONTROL OFICIAL

El *Reglamento (UE) 2017/625* establece las normas comunes para los controles oficiales de la Unión Europea con el fin de garantizar que la legislación relativa a la cadena agroalimentaria para proteger la salud humana, la salud y el bienestar animal, así como la sanidad vegetal, se aplica y se cumple correctamente.

Dicho reglamento introduce un sistema más armonizado y coherente de los controles oficiales y las medidas de ejecución a lo largo de la cadena agroalimentaria y refuerza el principio de los controles basados en el riesgo.

El Reglamento incluye normas sobre los controles oficiales llevados a cabo en todas las empresas alimentarias y de piensos, desde productores primarios hasta minoristas y proveedores, incluidos obtentores y criadores de animales, cultivadores y comerciantes.

Se entenderá por **controles oficiales**, de acuerdo con el *Reglamento (UE) 2017/625*, las actividades realizadas por las autoridades competentes, los organismos delegados o las personas físicas en las que se hayan delegado funciones de control oficial para comprobar el cumplimiento de las normas, independientemente de que hayan sido establecidas a nivel de la Unión o bien por los Estados miembros para aplicar la legislación de la Unión, en los siguientes ámbitos:

- a) los alimentos y la seguridad alimentaria, la integridad y la salubridad a lo largo de la producción, transformación y distribución
- b) la utilización de organismos modificados genéticamente para producir alimentos y piensos
- c) los piensos y la seguridad de los piensos a lo largo de la producción, la transformación, la distribución y el uso
- d) la sanidad y el bienestar de los animales
- e) la producción y el etiquetado de productos ecológicos.

El Reglamento abarca también las importaciones de determinados animales y alimentos de fuera de la UE que estén sujetos a controles en los puestos de control fronterizos de la UE y los productos vendidos a través de internet.

De este modo, el objetivo de los controles oficiales consiste en comprobar el cumplimiento por parte de los operadores de las normas indicadas previamente y comprobar que los animales y mercancías cumplen los requisitos establecidos en dichas normas, en particular para la expedición de certificados o atestaciones oficiales.

Los Estados miembros designarán la autoridad o autoridades competentes a las que atribuyan la responsabilidad de organizar o realizar los controles oficiales. Los Estados miembros se asegurarán de que la Comisión sea informada de los datos de contacto, y de cualquier cambio por lo que respecta a las autoridades competentes designadas.

Las autoridades competentes realizarán los controles oficiales con regularidad, con una frecuencia adecuada determinada en función del riesgo, para identificar posibles infracciones intencionadas de las normas mediante prácticas fraudulentas o engañosas.

Los controles oficiales se efectuarán sin notificación previa, salvo en los casos en que dicha notificación sea necesaria y esté debidamente justificada. Los controles oficiales con previo aviso no excluirán los controles oficiales sin previo aviso.

Las autoridades competentes realizarán los controles oficiales con un elevado nivel de transparencia y, al menos una vez al año, pondrán a disposición del público información

Las autoridades competentes elaborarán registros escritos de los controles oficiales que lleven a cabo, en papel o en versión electrónica. Dichos registros contendrán:

- a)** una descripción de la finalidad de los controles oficiales.
- b)** los métodos de control aplicados
- c)** el resultado de los controles oficiales
- d)** las medidas que las autoridades competentes exijan que adopte el operador de que se trate como resultado de sus controles oficiales.

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.
- Repetibilidad y reproducibilidad.
- Recuperación.
- Selectividad.
- Sensibilidad.
- Linealidad.
- Incertidumbre de medición.
- Otros criterios que puedan adoptarse según las necesidades.

Los métodos y técnicas para los controles oficiales comprenderán, según proceda:

- 1)** el examen de los controles establecidos por los operadores y los resultados obtenidos
- 2)** la inspección del equipo, los medios de transporte, las instalaciones y otros lugares bajo su control y sus inmediaciones, animales y mercancías, otros productos utilizados en la preparación y la fabricación de mercancías, o bien en la alimentación o el tratamiento de animales, los productos y los procesos de limpieza y mantenimiento, trazabilidad, etiquetado, presentación, publicidad y materiales de envase pertinentes incluidos los destinados a entrar en contacto con los alimentos
- 3)** los controles de las condiciones de higiene de los locales de los operadores
- 4)** la evaluación de los procedimientos de buenas prácticas de fabricación, prácticas correctas de higiene, buenas prácticas agrícolas, y de los procedimientos basados en los principios de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC)
- 5)** un examen de documentos, registros de trazabilidad y otros registros que puedan ser pertinentes para evaluar el cumplimiento de las normas
- 6)** las entrevistas con los operadores y con su personal
- 7)** comprobación de mediciones realizadas por el operador y otros resultados de ensayos
- 8)** el muestreo, el análisis, el diagnóstico y los ensayos
- 9)** las auditorías de operadores.

El personal que realice los controles oficiales:

- a)** recibirá la formación adecuada para su ámbito que le permita ser competente en el desempeño de su cometido y realizar los controles oficiales de manera coherente
- b)** estará al día en su ámbito de competencia y recibirá la formación adicional necesaria
- c)** recibirá formación sobre las siguientes cuestiones:
 - métodos y técnicas de control, tales como inspección, verificación, monitorización y monitorización selectiva, muestreo, y análisis, ensayo y diagnóstico de laboratorio
 - Procedimientos de control
 - Normas y Evaluación de los incumplimientos de las normas
 - Peligros de la producción, transformación y distribución de animales y mercancías
 - Diferentes fases de la producción, transformación y distribución, así como posibles riesgos para la salud humana y, en su caso, para la salud de animales y vegetales, para el bienestar de los animales, para el medio ambiente.
 - Evaluación de la aplicación de los procedimientos basados en los principios de APPCC y de las buenas prácticas agrícolas

- Sistemas de gestión tales como programas de garantía de la calidad
- Sistemas de certificación oficial
- Mecanismos de contingencia para casos de emergencia, incluida la comunicación entre los Estados miembros y la Comisión.
- Procedimientos e implicaciones legales de los controles oficiales
- Examen de la documentación escrita y otros registros, incluidos los relacionados con los ensayos interlaboratorios
- Procedimientos de control y requisitos para la entrada en la Unión de los animales y mercancías procedentes de terceros países.

2. LABORATORIOS DE CONTROL OFICIAL

2.1. DESIGNACIÓN

Las autoridades competentes designarán laboratorios oficiales para realizar los análisis, ensayos y diagnósticos de laboratorio de las muestras tomadas durante los controles oficiales en el Estado miembro en cuyo territorio operan dichas autoridades competentes, o en otro Estado miembro o en un país tercero que sea parte en el Acuerdo sobre el Espacio Económico Europeo.

Las autoridades competentes podrán designar como laboratorio oficial un laboratorio situado en otro Estado miembro o en un país tercero que sea parte en el Acuerdo sobre el Espacio Económico Europeo, siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

- a) se han establecido las disposiciones adecuadas en virtud de las cuales las autoridades competentes están facultadas para realizar las auditorías y las inspecciones o para delegar su realización en las autoridades competentes del Estado miembro o país tercero que sea parte en el Acuerdo sobre el Espacio Económico Europeo donde esté situado el laboratorio, y
- b) dicho laboratorio ya ha sido designado como laboratorio oficial por las autoridades competentes del Estado miembro en cuyo territorio está situado.

La designación de un laboratorio oficial se hará por escrito e incluirá una descripción detallada de:

- 1) las tareas que el laboratorio lleva a cabo como laboratorio oficial
- 2) las condiciones en que lleva a cabo dichas tareas
- 3) las disposiciones necesarias para garantizar una coordinación eficiente y eficaz y la colaboración entre el laboratorio y las autoridades competentes.

Un laboratorio podrá ser designado como laboratorio oficial cuando cumpla una serie de requisitos:

- a) disponer de la experiencia, el equipamiento y la infraestructura necesarios para la realización de análisis o ensayos o diagnósticos de las muestras
- b) contar con personal suficiente con la cualificación, formación y experiencia adecuadas

- c) garantizar que las tareas que tiene encomendadas se realizan de manera imparcial y sin conflictos de intereses
- d) pueda entregar en tiempo oportuno los resultados del análisis, ensayo o diagnóstico efectuado con las muestras tomadas durante los controles oficiales
- e) funcionar de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 y esté acreditado de acuerdo con dicha norma por un organismo nacional de acreditación. La acreditación del laboratorio oficial tendrá el siguiente alcance:
 - incluirá los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio que se exigen para que el laboratorio efectúe análisis, ensayos o diagnósticos cuando funcione como un laboratorio oficial
 - podrá comprender uno o más métodos o grupos de métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio
 - podrá definirse de manera flexible, de modo que el alcance de la acreditación incluya versiones modificadas de los métodos utilizados por el laboratorio oficial cuando se le concedió la acreditación o bien nuevos métodos además de aquellos, sobre la base de las propias validaciones del laboratorio sin una evaluación específica por parte del organismo nacional de acreditación antes del uso de dichos métodos modificados o nuevos.

Cuando ningún laboratorio oficial disponga de la experiencia, el equipamiento, la infraestructura y el personal necesarios para efectuar análisis, ensayos o diagnósticos de laboratorio nuevos o especialmente poco habituales, las autoridades competentes podrán solicitar a un laboratorio o centro de diagnóstico que no cumpla uno o varios de los requisitos que efectúe dichos análisis, ensayos y diagnósticos.

2.2. OBLIGACIONES

Cuando los resultados de un análisis, ensayo o diagnóstico efectuado con las muestras tomadas durante controles oficiales indiquen un riesgo para la salud humana, la salud animal, la sanidad vegetal o, por lo que respecta a los OMG y los productos fitosanitarios, también para el medio ambiente, o indiquen la probabilidad de un incumplimiento, los laboratorios oficiales informarán de inmediato a las autoridades competentes que los hayan designado para ese análisis, ensayo o diagnóstico y, en su caso, a los organismos delegados o a las personas físicas en quienes se hayan delegado tareas.

A petición del laboratorio de referencia de la Unión Europea o del laboratorio nacional de referencia, los laboratorios oficiales participarán en ensayos interlaboratorios comparados o en ensayos de aptitud organizados para los análisis, ensayos o diagnósticos que realicen en su calidad de laboratorios oficiales.

A petición de las autoridades competentes, los laboratorios oficiales pondrán a disposición del público los nombres de los métodos utilizados para los análisis, ensayos o diagnósticos en el contexto de los controles oficiales y otras actividades oficiales.

A petición de las autoridades competentes, los laboratorios oficiales indicarán junto con los resultados el método utilizado para cada análisis, ensayo o diagnóstico realizado en el contexto de los controles oficiales y otras actividades oficiales.

2.3. AUDITORÍAS

Se define auditoría como un examen sistemático e independiente para determinar si las actividades y sus correspondientes resultados cumplen las disposiciones previstas, y si dichas disposiciones se aplican eficazmente y son adecuadas para lograr los objetivos.

Las autoridades competentes organizarán auditorías de los laboratorios oficiales con regularidad y en cualquier momento en que consideren que es necesaria una auditoría, salvo en caso de que consideren superfluas dichas auditorías teniendo en cuenta la evaluación de la acreditación.

Las autoridades competentes retirarán inmediatamente la designación de un laboratorio oficial, bien por completo o bien para determinadas tareas, si este no adopta medidas correctoras adecuadas y en tiempo oportuno a raíz de los resultados de una auditoría que ponga de manifiesto cualquiera de los hechos siguientes:

- a)** que ha dejado de cumplir los requisitos necesarios para ser designado como laboratorio oficial (establecidas en el apartado 2.1. DESIGNACIÓN)
- b)** que no cumple las obligaciones establecidas para los laboratorios oficiales
- c)** que está por debajo del nivel requerido en los ensayos interlaboratorios.

2.4. EXCEPCIONES A LA CONDICIÓN DE ACREDITACIÓN

Las autoridades competentes podrán designar como laboratorios oficiales, independientemente de que funcionen de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 y estén acreditados de acuerdo con dicha norma:

- a)** a los laboratorios:
 - cuya única actividad consista en la detección de triquinas en la carne
 - que solo utilicen para la detección de triquinas el método de detección de referencia que es la norma ISO 18743:2015 o los métodos equivalentes establecidos en el Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375
 - que efectúen la detección de triquinas bajo la supervisión de las autoridades competentes o de un laboratorio oficial acreditado de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 para la utilización de los métodos contemplados en el apartado anterior
 - que participen regularmente y con resultados satisfactorios en los ensayos interlaboratorios comparados o en los ensayos de aptitud organizados por los laboratorios nacionales de referencia para los métodos que los laboratorios oficiales utilicen para la detección de triquinas.
- b)** a los laboratorios que solo realicen análisis, ensayos o diagnósticos en el contexto de otras actividades oficiales, a condición de que:

- utilicen solamente los métodos de análisis, ensayo y diagnóstico de laboratorio a que se refiere el Reglamento (UE) 2017/625
- efectúen los análisis, ensayos o diagnósticos bajo la supervisión de las autoridades competentes o de los laboratorios nacionales de referencia respecto a los métodos que utilizan
- participen regularmente y con resultados satisfactorios en los ensayos interlaboratorios comparados o los ensayos de aptitud organizados por los laboratorios nacionales de referencia respecto a los métodos que utilizan, y
- dispongan de un sistema de garantía de la calidad para garantizar unos resultados sólidos y fiables de los métodos utilizados.
- En caso de que los métodos utilizados requieran confirmación del resultado del análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio, el análisis, el ensayo o el diagnóstico de laboratorio de confirmación serán realizados por un laboratorio oficial.

2.4.1. Poderes para adoptar excepciones a la condición de acreditación obligatoria de los métodos de análisis utilizados por los laboratorios oficiales

La Comisión adoptará actos delegados a fin de completar lo relativo a supuestos y condiciones en que las autoridades competentes pueden designar como laboratorios oficiales a laboratorios que no cumplan las condiciones de acreditación de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 en relación con todos los métodos que utilicen para realizar los controles oficiales, siempre que dichos laboratorios cumplan las siguientes condiciones:

- a) que operen y estén acreditados de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 para el uso de uno o varios métodos que sean similares a los demás métodos que utilicen y sean representativos de estos
- b) que hagan un uso regular y significativo de los métodos para los que hayan obtenido la acreditación salvo en caso de que no exista un método validado para la detección de determinadas plagas de los vegetales.

2.4.2. Excepciones temporales a la condiciones de acreditación

A pesar de que la acreditación del laboratorio oficial incluirá los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio que se exigen para que el laboratorio efectúe análisis, ensayos o diagnósticos cuando funcione como un laboratorio oficial, las autoridades competentes podrán designar temporalmente un laboratorio oficial existente como laboratorio oficial para el uso de un método de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio para el que no haya obtenido la acreditación EN ISO/IEC 17025:

- a) cuando normas recientes de la Unión exijan el uso de dicho método
- b) cuando los cambios de un método que se esté utilizando requieran una nueva acreditación o la ampliación del alcance de la acreditación obtenida por el laboratorio
- c) en los casos en que la necesidad de utilizar el método derive de una situación de emergencia o de un riesgo emergente para la salud humana, la salud animal, la sanidad

vegetal, el bienestar de los animales o, por lo que respecta a los OMG y los productos fitosanitarios, también para el medio ambiente.

La designación temporal estará sujeta a las siguientes condiciones:

- a) que el laboratorio oficial esté ya acreditado según la norma EN ISO/IEC 17025 para el uso de un método que sea similar al que no está incluido en el alcance de su acreditación
- b) que el laboratorio oficial disponga de un sistema de garantía de la calidad para garantizar resultados sólidos y fiables al utilizar un método que no está incluido en el alcance de la acreditación vigente
- c) que los análisis, ensayos o diagnósticos se efectúen bajo la supervisión de las autoridades competentes o del laboratorio nacional de referencia para ese método.

La designación temporal no será superior a un período de un año y podrá renovarse una vez por un período adicional de un año.

Los laboratorios oficiales designados de conformidad con el apartado 1 estarán situados en los Estados miembros en cuyo territorio estén situadas las autoridades competentes que los hayan designado.

3. RED DE LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS

Existen dos Laboratorios Agroalimentarios dependientes del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), el Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Madrid y el Laboratorio Agroalimentario de Santander, que además actúan como Laboratorios Nacionales de Referencia en diversas áreas. Tienen encomendadas, entre otras funciones, colaborar con las comunidades autónomas en materia de análisis de productos agroalimentarios y medios de la producción, mediante la realización de análisis físico-químicos, sensoriales y biológicos de estos productos, así como desarrollar las actividades orientadas al estudio y elaboración de la metodología analítica y efectuar la propuesta de métodos oficiales de análisis.

Para dar cumplimiento a las obligaciones del Reglamento (UE) 2017/625 y a las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, se ha creado la **Red de Laboratorios Agroalimentarios**, integrada por los laboratorios designados por las autoridades competentes de las Comunidades Autónomas para realizar el control oficial de productos agroalimentarios y medios de la producción agraria, y por los laboratorios agroalimentarios del MAPA.

Con la creación de esta Red, se pretende lograr una coordinación más eficaz del control analítico oficial, así como facilitar la coordinación de las actuaciones en materia de análisis de productos agroalimentarios y medios de la producción agraria.

Dada la importancia y trascendencia de esta iniciativa, el MAPA decidió dotar a la Red de Laboratorios Agroalimentarios de un entorno colaborativo que facilitase, tanto a los laboratorios del sector agroalimentario y medios de la producción agraria como a otros sectores de la Administración pública, la consecución de los objetivos anteriormente mencionados.

Actualmente en La Red de Laboratorios Agroalimentarios figura un total de 46 laboratorios, de los cuales 44 han sido designados por las Comunidades Autónomas como laboratorios que pueden realizar el análisis de las muestras tomadas en los controles oficiales.

Asimismo, está previsto que puedan interactuar con la Red de Laboratorios Agroalimentarios:

- a) Los responsables de la organización y ejecución de los programas de control oficial de productos agroalimentarios a nivel autonómico y estatal.
- b) Personal de los servicios de inspección ubicados en los Puestos de Inspección Fronterizos
- c) Otros laboratorios de las Comunidades Autónomas que, sin tener la condición de laboratorio miembro, pueden participar en la Red en calidad de laboratorio asociado.

BIBLIOGRAFÍA

<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/laboratorios-agroalimentarios/red-laboratorios/>

<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/laboratorios-agroalimentarios/>

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=LEGISSUM:4300993>

Reglamento (UE) 2017/625 Del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2017 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, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n.º 1/2005 y (CE) n.º 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n.º 854/2004 y (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales).

Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375, por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquininas en la carne.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 12

Clasificación de métodos de análisis. Tipos de Organizaciones implicadas en la Normalización. Trasposición a la legislación comunitaria y nacional. Métodos criterio

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.

3. MÉTODOS CRITERIO.

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.

3. MÉTODOS CRITERIO.

Cuando no se haya prescrito a nivel de la UE ningún método específico para la determinación de la presencia de un analito determinado en productos alimenticios, los laboratorios podrán escoger cualquier método de análisis validado para la matriz correspondiente, siempre que el método seleccionado cumpla una serie de criterios de funcionamiento específicos. Hablamos en este caso de los métodos criterio.

Así, el Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos define los **criterios de funcionamiento** como aquellos requisitos aplicables a una característica de funcionamiento en función de los cuales se puede determinar que un método analítico es adecuado para el uso previsto y ofrece resultados fiables.

El Reglamento (CE) 401/2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, recomienda la utilización de métodos de confirmación plenamente validados (es decir, validados por ensayos colectivos para las matrices correspondientes) cuando resulte oportuno y posible. También pueden utilizarse métodos validados internamente con las matrices correspondientes del grupo de productos pertinente, siempre que cumplan los criterios de funcionamiento (recuperación en %, reproducibilidad) establecidos.

RSD_R = Desviación estándar relativa en condiciones de reproducibilidad

RSD_r = Desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad

Cuando sea posible, la validación de métodos validados internamente incluirá material de referencia certificado.

De acuerdo con el Reglamento (CE) 401/2006, para los métodos validados internamente puede utilizarse como alternativa el **enfoque de la adecuación a los objetivos**, a fin de evaluar su adecuación al control oficial. Los métodos adecuados para el control oficial deben arrojar resultados con una incertidumbre estándar de medida (U) inferior a la incertidumbre estándar máxima de medida calculada con la siguiente fórmula:

$$U_f = \sqrt{(\text{LOD}/2)^2 + (\alpha C)^2}$$

- U_f es la incertidumbre estándar máxima de medida (µg/kg).
- LOD es el límite de detección del método (µg/kg).
- C es la concentración de interés (µg/kg).
- α es un factor numérico que debe utilizarse según el valor de C.

Si el método analítico proporciona resultados con mediciones de la incertidumbre inferiores a la incertidumbre estándar máxima, el método se considerará igual de adecuado que uno que se ajuste a los criterios de funcionamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Web oficial de la Unión Europea. 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 13

LA SISTEMA DE GESTIÓN AMBIENTAL. NORMA INTERNACIONAL ISO-14001. PRINCIPIOS Y ESTRUCTURA

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.

LA SISTEMA DE GESTIÓN AMBIENTAL. NORMA INTERNACIONAL ISO-14001. PRINCIPIOS Y ESTRUCTURA

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 FUNCIONAMIENTO)

9. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO

10. MEJORA

3. 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 CO₂, 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”

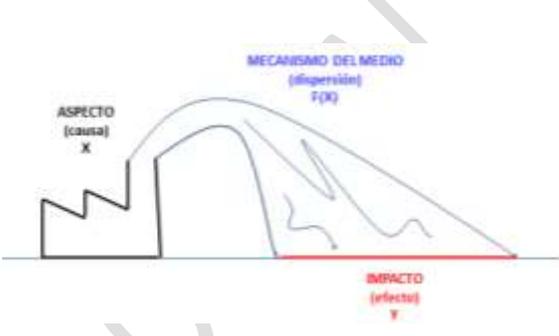
1.1. ASPECTOS AMBIENTALES Y SUS ASOCIADOS IMPACTOS AMBIENTALES

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.

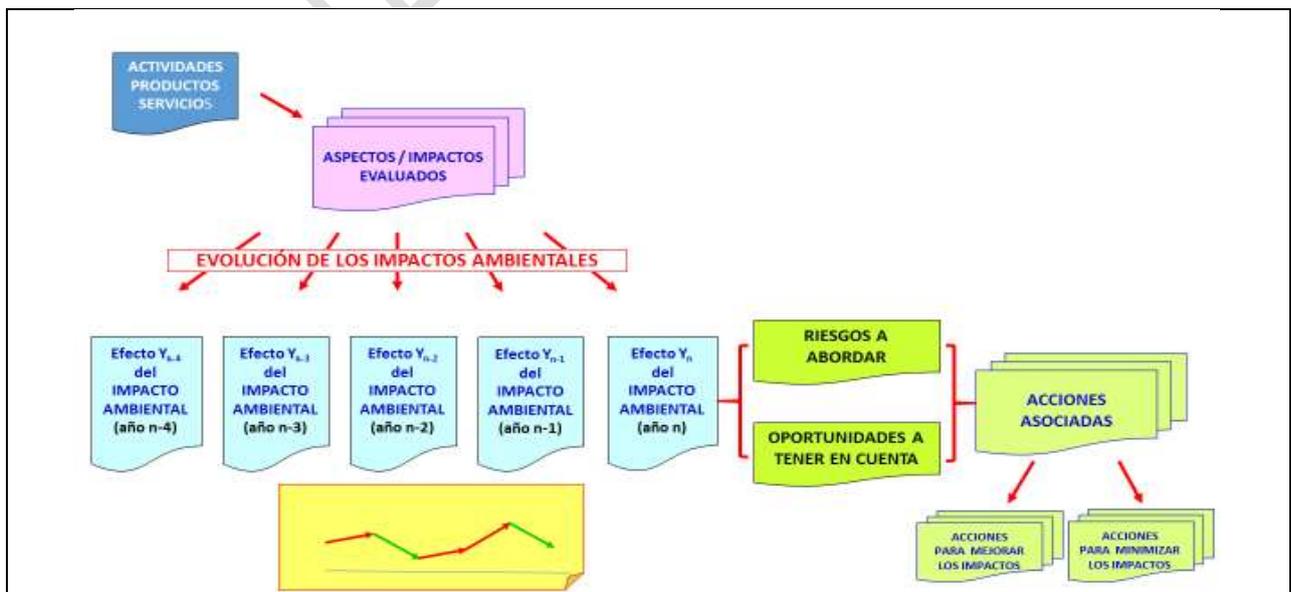
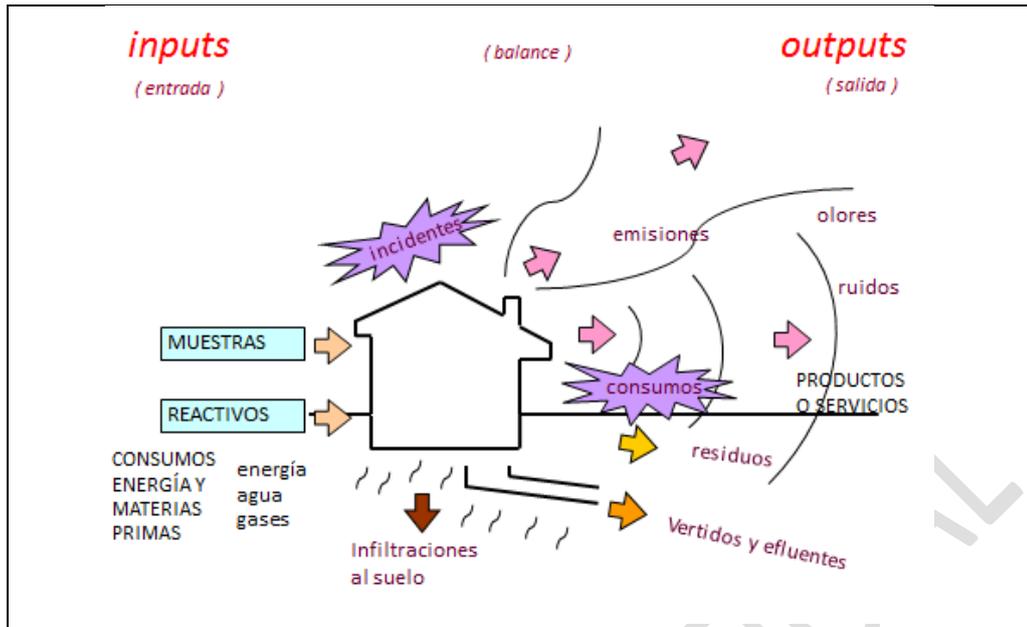
<p>A modo de ejemplo</p> <p>Puede considerarse que en una chimenea que emiten gases procedentes de una combustión:</p>	 <p>El diagrama ilustra el proceso de contaminación ambiental. A la izquierda, una chimenea emite gases, etiquetado como 'ASPECTO (causa) X'. Estos gases se dispersan en la atmósfera, etiquetado como 'MECANISMO DEL MEDIO (dispersión) F(X)'. Finalmente, el penacho de gases alcanza el suelo, etiquetado como 'IMPACTO (efecto) Y'.</p>
<p>→ El ASPECTO (X) es la emisión de esos gases</p> <p>→ El efecto se produce cuando LOS MECANISMOS F(X) del medio natural (difusión de esos gases en la atmósfera) posibilitan que el penacho alcance el suelo alterando sus parámetros físicos y</p> <p>→ El IMPACTO (Y) es la categorización de la alteración producida en dichos parámetros</p>	

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 (vectores ambientales)	CAUSA (aspecto ambiental)		EFECTO (impacto ambiental)
RESIDUOS	Residuos peligrosos Residuos inertes o inertizados Residuos urbanos o municipales		+ CONTAMINACIÓN DEL SUELO + CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS + DETRIENTO DE LA BIODIVERSIDAD + BIOTA CUMULADOS + RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA
ATMÓSFERA	Emisiones Inmisiones	Focos fijos Focos móviles	+ DESTRUCCIÓN DE LA CAPA DE OZONO + EFECTO INVERNADERO + LUBVA ACIDA + SMOG + RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA
AGUA	Captación de agua Vertido de aguas residuales	Manantial, pozo o río Río, mar o red de saneamiento	+ EUTROFIZACIÓN + DISMINUCIÓN DE LA BIODIVERSIDAD + MUERTE DE ESPECIES ACUÁTICAS + RIESGO PARA LA SALUD HUMANA
AMBIENTE EXTERIOR	Ruido y vibraciones Olores		EFECTOS LOCALES: + GENERACIÓN RUIDOS/ VIBRACIONES / OLORES / HUMOS + RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA
SUSTANCIAS PELIGROSAS	Almacenamiento Transporte		+ CONTAMINACIÓN DEL SUELO + CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS + CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA + RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA
RECURSOS NATURALES	Consumo de agua Consumo de energía Consumo de combustibles Consumo de papel y cartón		AGOTAMIENTO DE RECURSOS NATURALES: + ENERGÍA + AGUA + MATERIAS PRIMAS
SUELOS	Contaminación del suelo		+ CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS + CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUPERFICIALES + PÉRDIDA DE BIODIVERSIDAD + RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA

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 aumente 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)

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

- **01:** Comprobar que existe un compromiso de toda la organización 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.

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 (Internacional 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

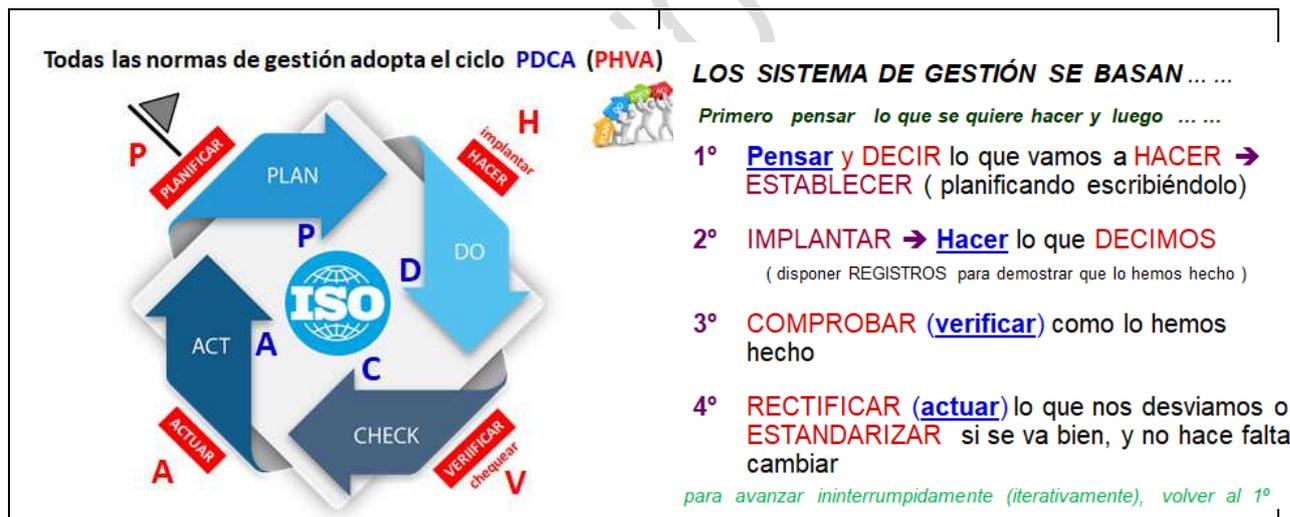
La norma ISO-14001:2015 se ajusta a los requisitos de ISO para todas las normas de los sistemas de gestión. Tiene una “Estructura de Alto Nivel” (en inglés, **HLS = High Level Structure**).

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.

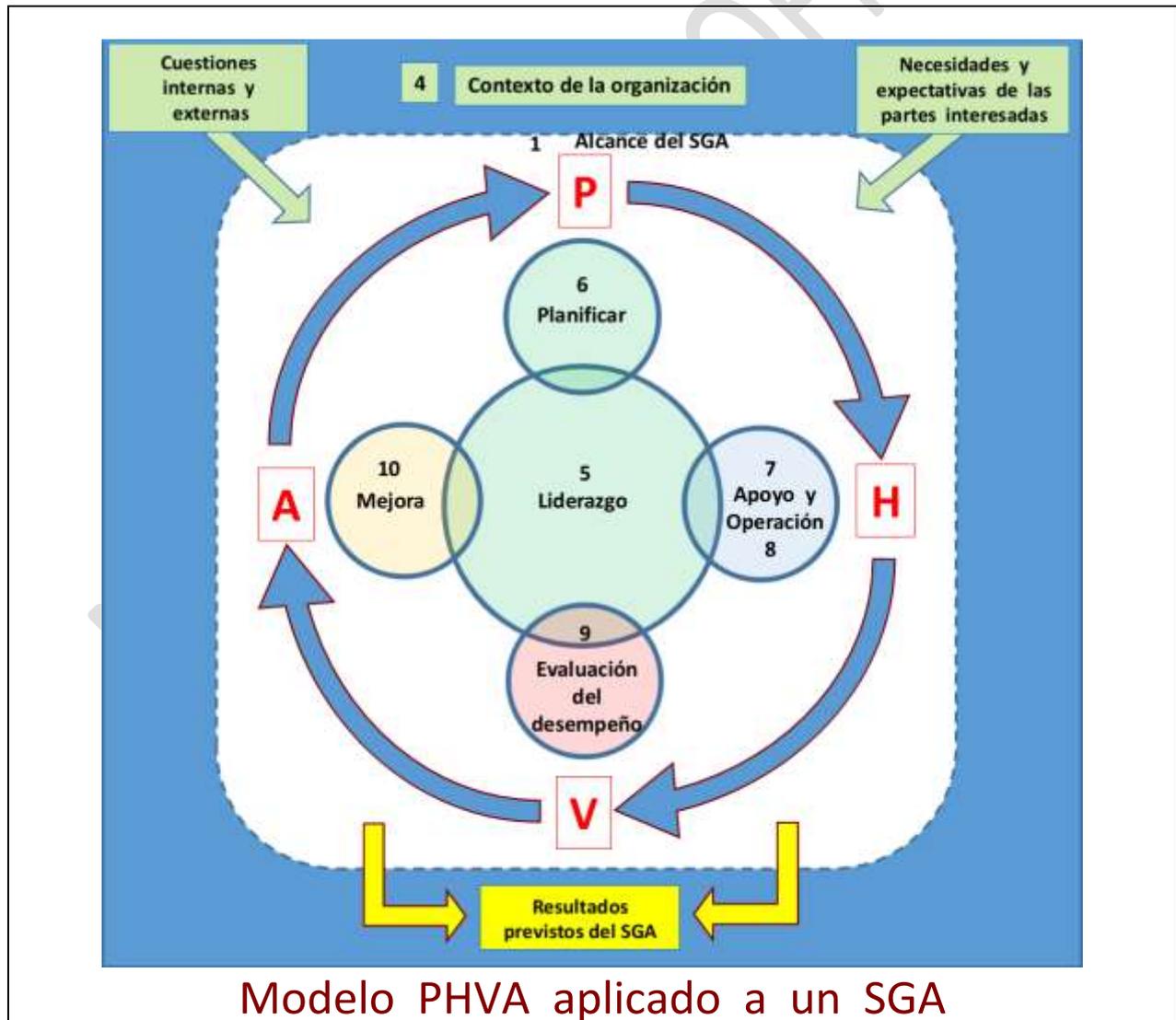
También se le conoce como el **método PHVA (Planificar-Hacer-Verificar-Actuar)** proporciona un proceso continuado e iterativo que conduce a la mejora continua del proceso. Se trata de una metodología probada que permite a la organización establecer compromisos en sus políticas y actuar de manera sistemática 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:

Genéricos	0. INTRODUCCIÓN
	1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN
	2. REFERENCIAS NORMATIVAS
	3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Requisitos	4. CONTEXTO DE LA ORGANIZACIÓN	→	PLANIFICAR
	5. LIDERAZGO	→	HACER (o IMPLANTAR)
	6. PLANIFICACIÓN	→	VERIFICAR (o CONTROLAR)
	7. APOYO (o SOPORTE)	→	ACTUAR
	8. OPERACIÓN (o FUNCIONAMIENTO)	→	
	9. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO	→	
	10. MEJORA	→	

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

COMPONENTES CLAVES DE LA NORMA ISO-14001 : 2015

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

COMPONENTES CLAVES DE LA NORMA ISO-14001 : 2015

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

COMPONENTES CLAVES DE LA NORMA ISO-14001 : 2015

ACTUAR	10	Realizar mejoras mediante la toma de medidas para lograr los resultados previstos en el SGA
		Adoptar medidas para abordar las no conformidades y evitar su repetición
		Actuar para la mejora continua de la conveniencia, adecuación y eficacia del SGA, concentrándose en elementos que mejores 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)	}	MEJORA del Desempeño Ambiental;
			CUMPLIMIENTO de los Requisitos Legales y Otros Requisitos;
			LOGRO de los Objetivos Ambientales.
CAMPO DE APLICACIÓN	}	}	a cualquier tipo de organización;
			a sus aspectos ambientales e impactos ambientales considerando su ciclo de vida
			mejorar la gestión ambiental.

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.

7. APOYO (o SOPORTE)	
7.1.	Recursos;
7.2.	Competencia;
7.3.	Toma de conciencia;
7.4.	Comunicación;
7.5.	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.

8. OPERACIÓN	
8.1.	Planificación y del control operacional;
8.2.	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.

9. EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO	
9.1.	Seguimiento, medición, análisis y evaluación;
9.2.	Auditoría interna;
9.3.	Revisión por la dirección.

- ▶ **El SGA implantado se debe revisar periódicamente su eficacia y cumplimiento**, a través de:
 - **Seguimiento, medición, análisis y evacuación** 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

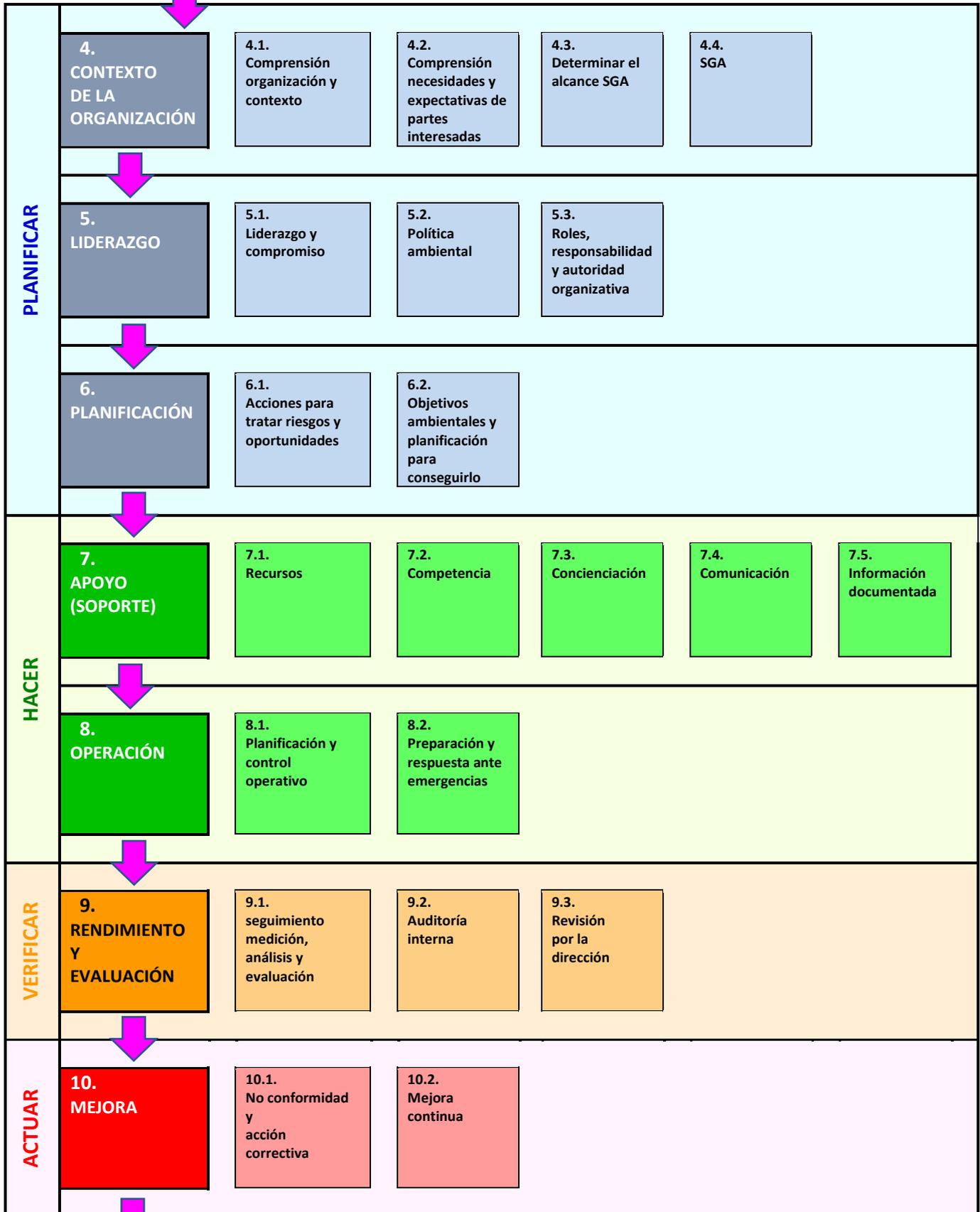
La última cláusula (10) de la norma está relacionado con la **mejora del propio sistema** y del comportamiento ambiental. En base a los resultados de verificación y al desempeño de los procesos se deberán emprender **las no conformidades y acciones correctivas** oportunas.

10. MEJORA	
10.1.	No Conformidades y acciones correctivas;
10.2.	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. 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 14

SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO EN LOS 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.

SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO EN LOS LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS.

ÍNDICE

- 1. INTRODUCCIÓN A LA PRL (o a la SST)**
 - 1.1. PREVENCIÓN VERSUS PROTECCIÓN**
- 2. PELIGRO Y RIESGO**
- 3. PREVENCIÓN (o SST) EN EL LABORATORIO**
 - 3.1. FACTORES DE RIESGO**
 - 3.2. TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE PRL (o DE SST)**
 - 3.3. PRINCIPIOS DE LA ACCIÓN PREVENTIVA**
 - 3.4. PILARES BÁSICOS DE LA GESTIÓN PREVENTIVA EN LA ORGANIZACIÓN (LABORATORIO)**
- 4. SISTEMA DE GESTIÓN DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES (SG-PRL)**
 - 4.1. ELEMENTOS DEL SG-PRL (o SG-SST)**
 - 4.2. ESTRUCTURA DE UN SISTEMA DE GESTIÓN PRL (o SST)**
- 5. RESPONSABILIDADES DE LA DIRECCIÓN DE UN LABORATORIO REFERENTE A SST**
- 6. FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES DE LOS TRABAJADORES (EMPLEADOS PÚBLICOS, BECARIOS, Y PERSONAL EN FORMACIÓN)**
- 7. BIBLIOGRAFÍA**

1. INTRODUCCIÓN A LA PRL (o a la SST)

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**) 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”**.

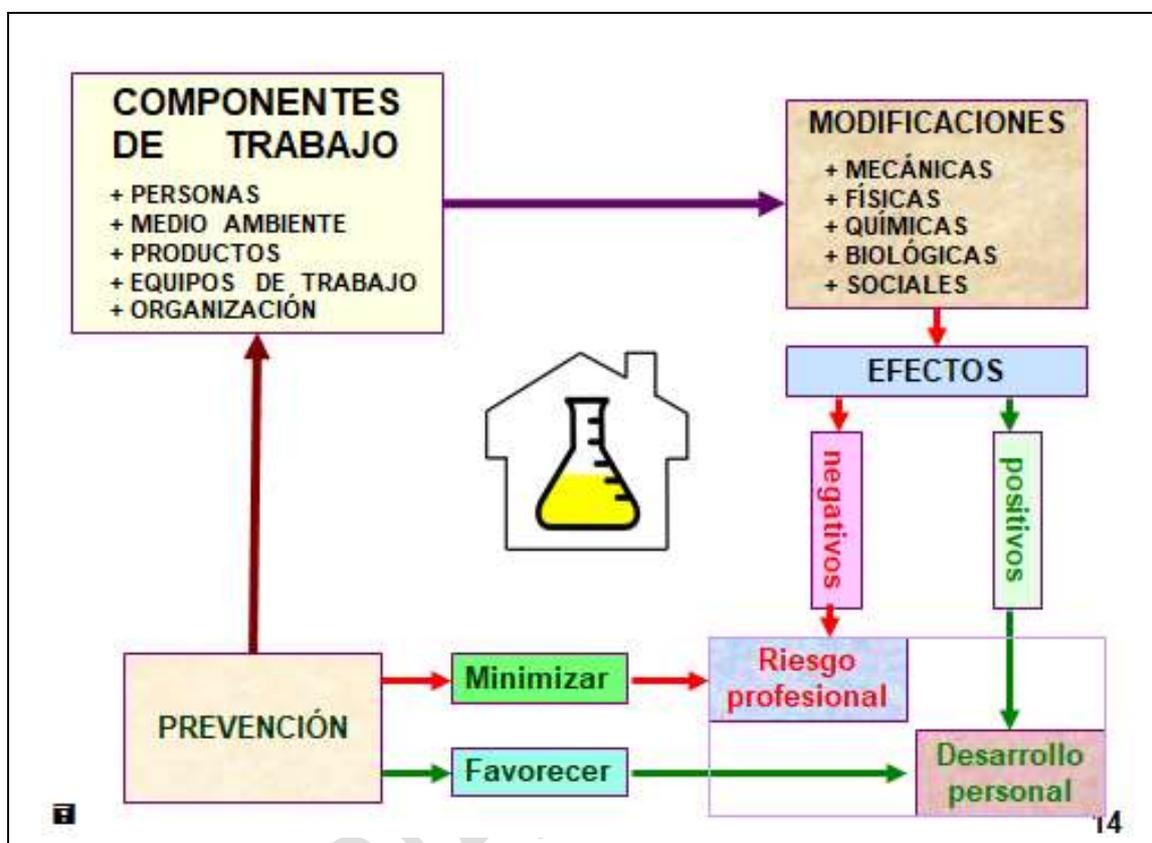
La prevención debe planificarse con antelación y evaluarse cíclicamente en un proceso de mejora continuada.

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. 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 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 mascatrilla con filtro, gafas protectoras, ...)

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



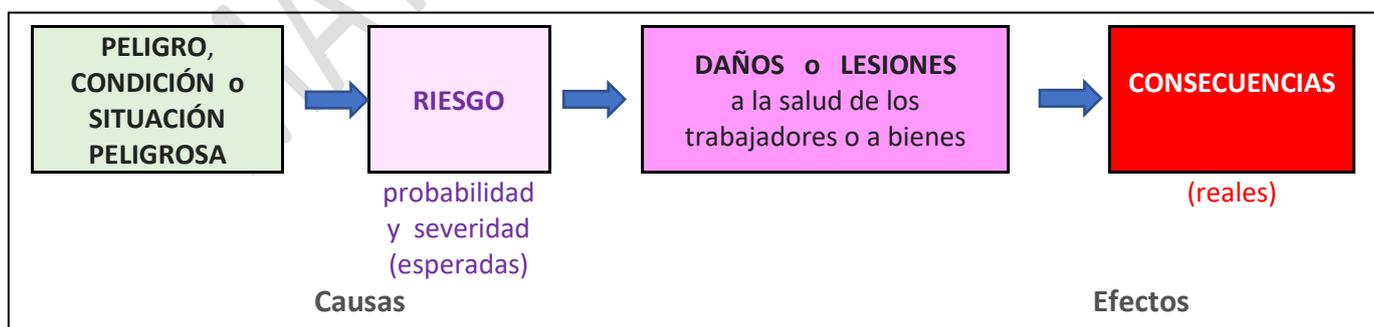
La actividad laboral va a suponer ciertos riesgos

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.

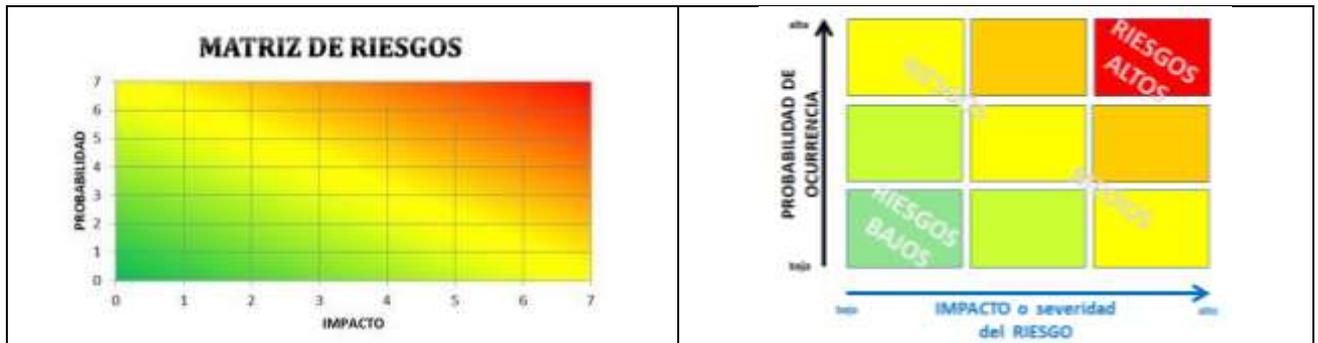
Se dice que existe peligro si se dan una o varias condiciones peligrosas.



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.

Para calificar un riesgo desde el punto de vista de su gravedad, se valorarán conjuntamente la probabilidad de que se produzca el daño y la severidad del mismo.



riesgos y oportunidades *Salen 9 tipos de escenarios (confusos)*

CRITERIOS DE CALIFICACIÓN PARA LA MATRIZ DE EVALUACIÓN DE RIESGOS

Casi Certeza	5	Soportable 5	Moderado Alto 10	Importante Bajo 15	Importante Alto 20	Intolerable 25
	4	Tolerable 4	Moderado Bajo 8	Apreciable 12	Importante Alto 16	Importante Alto 20
	3	Tolerable Bajo 3	Tolerable Alto 6	Moderado 9	Apreciable 12	Importante Bajo 15
	2	Muy Bajo 2	Tolerable 4	Tolerable Alto 6	Moderado Bajo 8	Moderado Alto 10
	1	Trivial 1	Muy Bajo 2	Tolerable Bajo 3	Tolerable 4	Soportable 5
	PROBABILIDAD	1	2	3	4	5
		Insignifi- cantes	Menores	Moderadas	Mayores	Catastro- ficas

GRAVEDAD / SEVERIDAD

Utilizando la MULTIPLICACIÓN → **MATRIZ NO SIMÉTRICA,**
 peor comprensión 91

riesgos y oportunidades *Salen 9 tipos de escenarios (claros)*

CRITERIOS DE CALIFICACIÓN PARA LA MATRIZ DE EVALUACIÓN DE RIESGOS

Casi Certeza	5	Moderado 6	Importante Bajo 7	Importante 8	Importante Alto 9	Intolerable 10
	4	Tolerado Alto 5	Moderado 6	Importante Bajo 7	Importante 8	Importante Alto 9
	3	Tolerable 4	Tolerado Alto 5	Moderado 6	Importante Bajo 7	Importante 8
	2	Tolerable Bajo 3	Tolerable 4	Tolerado Alto 5	Moderado 6	Importante Bajo 7
	1	Trivial 2	Tolerable Bajo 3	Tolerable 4	Tolerado Alto 5	Moderado 6
	PROBABILIDAD	1	2	3	4	5
		Insignifi- cantes	Menores	Moderadas	Mayores	Catastro- ficas

GRAVEDAD / SEVERIDAD

Utilizando la SUMA → **MATRIZ SIMÉTRICA,**
 mejor comprensión 90

El Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (antes INSHT) utiliza la matriz donde se multiplican Probabilidad y Severidad, pero sale una matriz cuyas o escenarios son muy raros a la hora de cuantificar el riesgo. Es mejor utilizar la matriz donde se suman, dando una matriz simétrica en la diagonal y se cuantifica mejor para su análisis posterior. Véase esto en la gradación de riesgo representada en color.

3. PREVENCIÓN EN LABORATORIO (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 el riesgo la situación de peligro de inhalación de vapores de éter o la explosión por formación de peróxidos, pero a cambio se generaría un nuevo riesgo 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.

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».

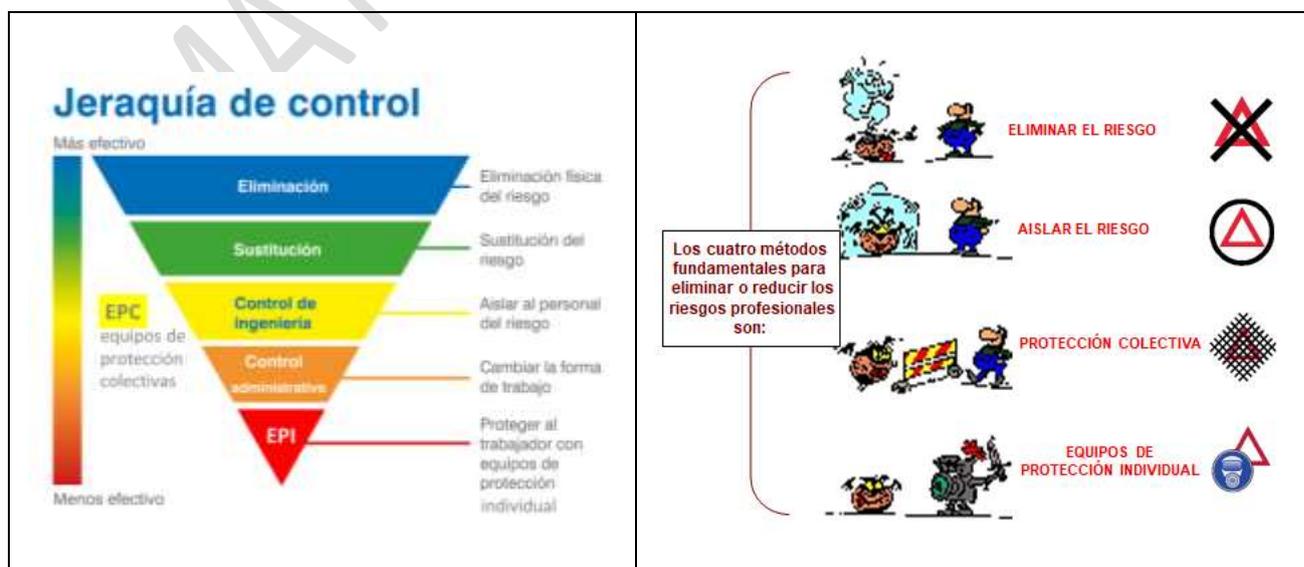
3.2. TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE LA PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES (o DE LA SST):

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.

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** (las 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.

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 elevada 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 de trabajo seguros y saludables.
- 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.

4. EL SISTEMA DE GESTIÓN DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES

Por **Sistema de gestión** se entiende el conjunto de medios humanos, materiales y económicos que interactúan en la organización para conseguir dar cumplimiento a las políticas y objetivos de la misma.

La Ley de PRL obliga a la integración de la PRL en el sistema de gestión general de una organización (y por tanto, de un laboratorio) de forma planificada y sistemática, por lo que debe considerarse como parte de aquel. El subsistema dentro del sistema general de gestión de la organización en el que se han incorporado

los aspectos relacionados con la prevención recibe la denominación de “**Sistema de Gestión de Prevención de Riesgos Laborales**” (SG-PRL)

Los objetivos o propósitos del SG-PRL son:

- Garantizar la seguridad y salud de los trabajadores (SSyT);
- Cumplir con la obligaciones vigentes en esta materia.

Un aspecto fundamental en cualquier Sistema de Gestión es la MEJORA CONTINUA, como una acción permanente de mejora, concepto que tiene su origen en el SG Calidad, que puede aplicarse también a la gestión de la prevención (ISO-45001: 2018) o a la protección del medio ambiente (ISO-14001:2015).

Etapas de un SG-PRL: Un SG-PRL incluye varias etapas:

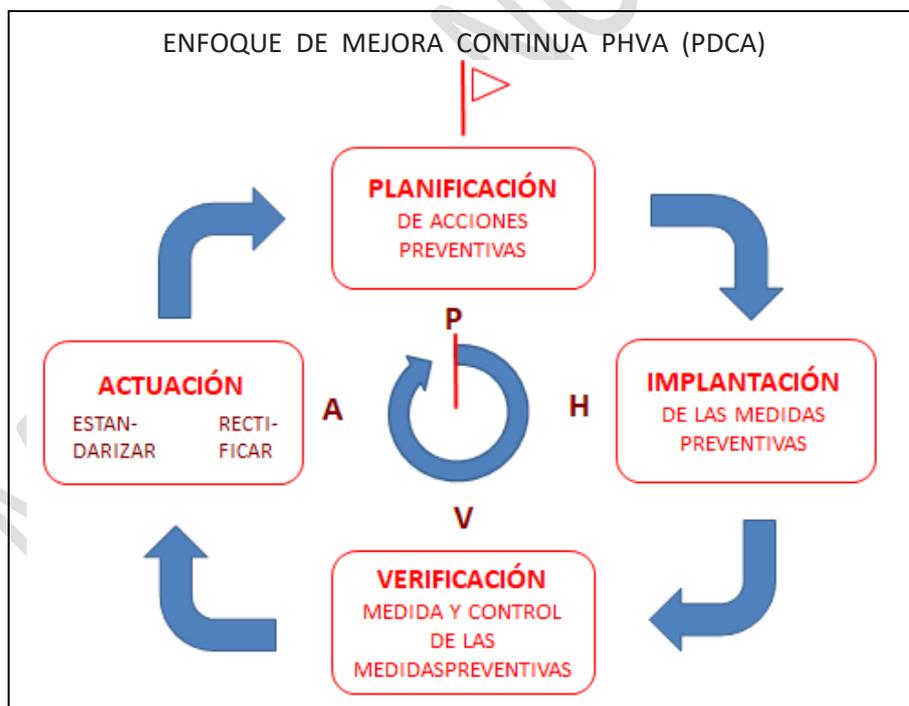
1ª etapa: **Planificación** de acciones preventivas, con la Evaluación de la situación de partida **PLAN**

2ª etapa: **Implantación** de medidas (o ejecución de las acciones planificadas); **DO**

3ª etapa: **Medición y Control** de las medidas implantadas; **CHECK**

4ª etapa: **Actuar** en consecuencia con la anterior etapa, **ACT**

Con el cierre del ciclo o mejora que permitirá iterativamente planificar nuevas acciones (volviendo a la 1ª etapa).



Los procedimientos de las actividades preventivas tienen un valor esencial en la consolidación del sistema de gestión de PRL. Permiten disponer del mecanismo necesario para facilitar el aprendizaje por parte de quienes están implicados en la acción preventiva y, no menos importante, facilitan el proceso de seguimiento y evaluación, que es determinante en toda acción de mejora permanente.

El objetivo o propósito del procedimiento cíclico de la PRL (de Deming) es que se alcancen de forma continua cada vez mayores de seguridad y salud (en cada proceso iterativo del ciclo).

4.1. ELEMENTOS DEL SG-PRL

Siguiendo lo señalado como mejora continuada y permanente particularizada al SG-PRL que debe incluir:

- La Planificación de las acciones preventivas, con la evaluación inicial y periódica de riesgos laborales;
- La implantación de las medidas preventivas planificadas previstas;
- La verificación a través de la medición y seguimiento controlando las medidas implantadas;
- La actuación conforme a la verificación chequeada de forma que lo que va bien, se estandariza, y lo que se desvía (va mal) se rectifica.

4.2. ESTRUCTURA DEL SISTEMA DE GESTIÓN SG-PRL (o SG-SST)

► 1ª Etapa: PLANIFICAR (PLAN)

04. CONTEXTO DE LA ORGANIZACIÓN

Los resultados de SST se ven afectados por diversos factores internos y externos (que pueden ser de carácter positivo, negativo o ambos).

4.1. COMPRENSIÓN DE LA ORGANIZACIÓN Y DE SU CONTEXTO

Aclarar los objetivos estratégicos de la organización y determinar cualquier problema que puedan afectar la consecución de estos objetivos. Analizar los problemas internos y externos.

4.2. COMPRENSIÓN DE LAS NECESIDADES DE LOS TRABAJADORES Y DE OTRAS PARTES INTERESADAS

Considerar las partes interesadas, incluidos los trabajadores y cómo pueden afectar al funcionamiento de la organización.

4.3. DETERMINACIÓN DEL ALCANCE DEL SG-PRL

Establecer el alcance del SG-PRL a partir de la información de los requisitos 4.1. y 4.2. anteriores.

4.4. SISTEMA DE GESTIÓN SG-PRL

Elaborar un diseño para el SG-PRL y su planificación de alto nivel.

05. LIDERAZGO Y PARTICIPACIÓN DE LOS TRABAJADORES

Se destaca como aspectos claves el liderazgo de la dirección de la organización y la participación de los trabajadores.

5.1. LIDERAZGO Y COMPROMISO

El liderazgo y el compromiso de la gerencia de la organización es vital para el SG-PRL, participando activamente en el SG-PRL y generar una cultura positiva de la sst dentro de la organización.

5.2. DECLARACIÓN DE PRINCIPIOS (O POLÍTICA) DEL SG-PRL

El titular de la Subsecretaría del Departamento y Organismos que pertenezca el laboratorio **deberá realizar por escrito una declaración de principios en materia de PRL**, la cual contendrá los principios y objetivos fundamentales respecto de los cuales el Departamento y Organismos expresa su compromiso.

5.3. ROLES (FUNCIONES), RESPONSABILIDADES Y AUTORIDADES DE LA ORGANIZACIÓN

La organización debe definir roles, responsabilidades y autoridades claras en toda la organización.

5.4. CONSULTA Y PARTICIPACIÓN DE LOS TRABAJADORES

La Ley de PRL impone a las organizaciones deberes de consulta, participación y representación en materia preventivas. Es un factor clave para el logro eficaz y eficiente del SG-PRL.

06. PLANIFICACIÓN

Comprende las acciones previstas para abordar riesgos y oportunidades (R&O). Entrándose en las relativas a la SST y el propio SG-PRL.

PLAN DE PREVENCIÓN

Plan de PRL es el documento a través del cual las organizaciones (y por tanto, el laboratorio) van a integrar la prevención y las políticas en su sistema general de gestión, tanto en todos los niveles jerárquicos, como en las actividades que se desarrollen.

Plan de PRL es una herramienta de gestión de la prevención y las políticas, por lo que ha de ser un documento práctico o las características de la organización que, reuniendo los documentos mínimos (alcance, estructura organizativa, la política, recursos, etc.) el sistema sea operativo y fácil de aplicar por la organización. Así mismo, el alcance del mismo se ha de extender a todas las personas que trabajan para la organización (persona trabajadora, contratados exteriores, proveedores, clientes, etc.).

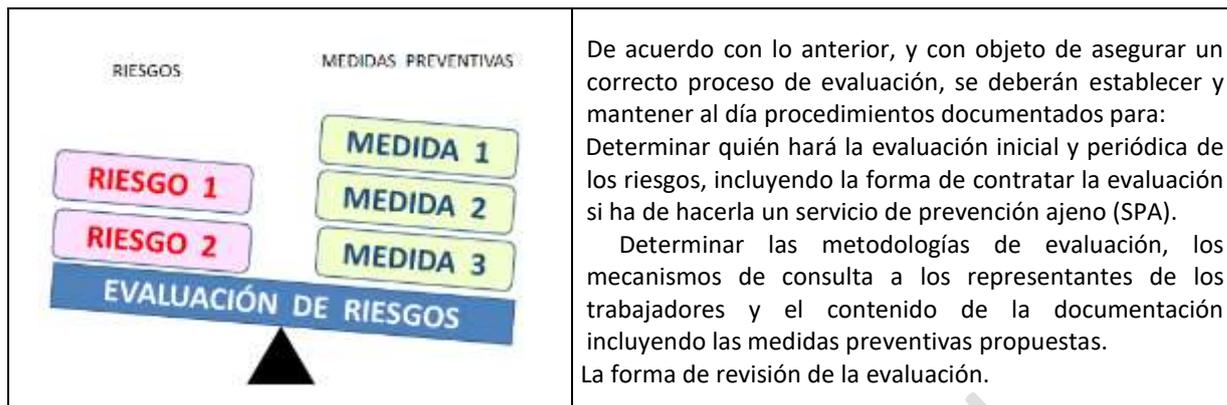
IDENTIFICACIÓN DE PELIGROS Y ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN DE RIESGOS

Para la planificación de acciones preventivas a proyectar es importantísimo realizarlo a partir de la **EVALUACIÓN DE RIESGOS (ER)**, el empresario (en caso del laboratorio, la dirección del mismo) establecerá las medidas preventivas para reducir o controlar los riesgos detectados y evaluados, según un orden de prioridades (según su significancia e importancia) y de los trabajadores expuestos.

Las medidas aplicadas serán objeto de control para comprobar su eficacia. El control puede dar lugar a oportunidades de mejora. Además puede ser necesario controlar la salud de los trabajadores e investigar posibles incidentes o accidentes para detectar fallos en las acciones preventivas llevadas cabo.

La dirección del laboratorio puede establecer el sistema de PRL que considere mejor, siempre que se cumplan los preceptos legales.

La evaluación de riesgos laborales no es un fin en sí misma, sino un medio para asesorar al laboratorio a prevenir los riesgos que puedan afectar a la seguridad y la salud de sus trabajadores.



DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS LEGALES Y OTROS REQUISITOS

Es importante identificar y conocer los requisitos legales aplicables

PLANIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PREVENTIVA

Una vez realizada la evaluación de riesgos, si ésta pone de manifiesto situaciones de riesgo o entorno a que no garanticen la SS del T, se debe elaborar un nuevo documento, LA PLANIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PREVENTIVA, que ayude a planificar (concebir) la realización de las medidas que se hayan propuesto para poder eliminar, controlar y reducir dichos riesgos.

Se deberán establecer y mantener al día procedimientos documentados para diseñar e implantar las medidas preventivas y correctoras derivadas de las evaluaciones de riesgos, investigaciones de incidentes, daños a la salud y cualquier otra actividad preventiva.

OBJETIVOS DEL SG-PRL Y PLANIFICACIÓN PARA LOGRARLOS

La planificación ha de incluir, al menos: qué hay que hacer, quien debe hacerlo, cuando debe hacerse y como se controlará lo que se ha hecho. Cuando las medidas correctoras a implantar afecten a otras unidades distintas al Servicio de Prevención, se deberá asignar a una persona la función de coordinación de la planificación y el control de su consecución.

En la planificación se incluirán las medidas que se hayan establecido para los riesgos detectados en las evaluaciones o revisiones efectuada, definiendo un plan de controles para implantarlas y evaluar su eficacia. En el plan se indicará, así mismo, las prioridades de actuación, los medios y recursos dispuestos, y los plazos de consecución, previendo mediciones intermedias con el fin de evaluar el grado de cumplimiento y su eficacia.

Al establecer estos controles (o considerar cambios en los existentes, se tendrá en cuenta que, para reducir los riesgos, se debe seguir el siguiente orden de preferencia:

- 1º** Eliminar;
- 2º** Sustituir;
- 3º** Diseñar controles de ingeniería;
- 4º** Utilizar protección colectiva y señalización, y
- 5º** Utilizar equipos de protección individuales

Teniendo esto en cuenta y en función de los tipos de riesgos, se llevará a cabo una programación o Plan de acción.

07. SOPORTE (APOYO)

Se establece la necesidad de determinar los medios necesarios para conseguir la planificación mediante recursos, competencia, toma de conciencia y comunicación.

7.1. RECURSOS

Se necesitan recursos o medios para cumplir con los requisitos identificados durante la etapa de planificación del SG-PRL para mantener la mejora continua.

La asignación de recursos debe contar con el apoyo de la gerencia, que es quién los suministra.

7.2. COMPETENCIA (NECESIDADES DE FORMACIÓN)

Para que en una organización su SG-PRL sea efectiva y eficiente debe tener trabajadores competentes y por tanto, formados.

El laboratorio como organización debe garantizar que cada persona trabajadora reciba una adecuada formación teórica y práctica, suficiente y adecuada, en materia preventiva, tanto en el momento de su ingreso cualquiera que sea la modalidad o duración de ésta, como cuando se produzcan cambios en las funciones que desempeñe o se introduzca nuevas tecnologías o cambios en los equipos de trabajo.

Asimismo, el laboratorio asegurará de que cualquier persona que trabaje para la organización (personal propio, contratado exterior, encomienda, etc.) y que realice tareas que puedan causar daños a terceros o en las instalaciones, p.ej.: trabajos externos de soldadura en las instalaciones de la organización (en el laboratorio), sea competente. A tal efecto, el laboratorio se asegurará que los trabajadores disponen de una adecuada educación, formación o experiencia, en función de las actividades realizadas y los riesgos presentes a los que se encuentran expuestos, debiendo quedar acreditados estos requisitos mediante registros adecuados.

7.3. TOMA DE CONCIENCIA (MOTIVACIÓN)

La concienciación sobre requisitos del SG-PRL es fundamental para los trabajadores internos y externos. Debe haber una comprensión clara de la política o declaración de principios de PRL.

7.4. COMUNICACIÓN INTERNA Y COMUNICACIÓN EXTERNA

Se debe establecer, implementar y mantener uno o varios procedimientos que ayuden a gestionar, en relación con los riesgos para la SS del T bajo el control de la organización (propia y subcontratada), es requisito del SG-PRL.

- La comunicación interna este en diversos niveles y funciones del laboratorio;
- La comunicación con los contratistas y otros visitantes de las instalaciones de la organización (laboratorio);
- La recepción, documentación y respuesta a los comunicados pertinentes de las partes interesadas externas.

INFORMACIÓN

Después de las actividades de formación, los relativos a la información se configuran como uno de los factores claves para garantizar el desempeño del trabajo en condiciones aceptables de seguridad.

Estas actividades tendrán la finalidad de dar a conocer a los trabajadores y hacerlos conscientes acerca de las circunstancias del trabajo y el estado en que éste se desarrolla, focalizando en los riesgos, medidas preventivas y de protección y de emergencias asociadas.

COORDINACIÓN EMPRESARIAL

En este elemento es necesario una información y una comunicación entre la organización del centro de trabajo y la organización externa que presta el trabajo en el centro del primero.

7.5. INFORMACIÓN DOCUMENTACIÓN DEL SG-PRL

Para asegurar la trazabilidad y la adecuación del sistema de Gestión en el tiempo, es importante que el mismo se encuentre documentado. Con documentos y registros.

Se necesitará procedimientos para

- La elaboración, revisión y aprobación de procedimientos, de instrucciones operativas del PRL.
- La organización de las actividades preventivas.
- La integración de la PRL en los proyectos o anteproyectos de construcción y modificación de edificios e instalaciones.
- La integración de la PRL en la contratación para adquisición de bienes.
- La integración de la PRL en la contratación de servicios.
- La integración de la PRL en la gestión de personal y en el resto de las actividades.
- La coordinación de actividades empresariales.

Y otros muchos

CUMPLIMIENTO LEGAL

Toda organización debe disponer de procesos que la aseguren que han identificado todos los requisitos tanto legales como otros requisitos de no obligado cumplimiento y adhesión voluntaria, que le aplican en materia de PRL y que vigile que los mismos se cumplen de forma adecuada.

► 2ª Etapa: ► HACER (DO)

08. OPERACIONES (FUNCIONAMIENTO)

En función de lo planificado, se ejecutarán las medidas previstas, para lo cual se deberá adoptar una visión proactiva, en las que entre otros, se tendrá en cuenta la gestión del cambio (modificaciones de los procesos, novedades,) y otros factores como el recurso a contratistas externos, compras.

8.1. PLANIFICACIÓN Y CONTROL DE LAS OPERACIONES

Se debe identificar todas aquellas situaciones, entornos y actividades del laboratorio en los que, en base a los riesgos presentes, a la complejidad de las actividades o a las características de los trabajadores, ser necesario el establecimiento de controles para asegurar de que los mismos se desarrollan sin riesgo no asumibles.



Como ejemplos más representativos de estas actividades de control de las operaciones, serían:

- Normas de seguridad y salud;
- Vigilancia de la salud;
- Cambios e incorporación de trabajadores;
- Coordinación empresarial;
- Controles;
- Diseño de los lugares de trabajo.

ELIMINAR PELIGROS Y REDUCIR LOS RIESGOS PARA LA SST

Una vez identificados los peligros, diseñar las medidas para reducir los riesgos analizados.

GESTIÓN DEL CAMBIO

Como gestionar y establecer las acciones preventivas necesarias cuando se produzcan variaciones en las condiciones de trabajo:

- Incorporaciones de nuevos empleados (modificaciones en la plantilla);
- Incorporaciones de empleados a otros puestos de trabajo existente, cambios de ubicaciones;
- Modificaciones de locales, adecuaciones;
- Cambios de procedimientos de trabajo, o en los procesos de trabajo o nuevos equipos;
- Introducción de nuevas tecnologías;
- Cambios en la estructura organizativa.

COMPRAS (CONTRATACIÓN DE ADQUISICIONES DE BIENES, CONTRATACIÓN DE SERVICIOS)

Integrarla en el sistema de gestión para poder controlar

8.2. PREPARACIÓN ANTE EMERGENCIAS (EMERGENCIAS Y PRIMEROS AUXILIOS)

Toda organización (por tanto, el laboratorio), teniendo en cuenta su tamaño y actividad, así como la posible presencia de personas ajenas a la misma, deberá analizar las posibles **situaciones de emergencias** (planes de autoprotección, planes de emergencia) y adoptar las medidas necesarias en materia de **primeros auxilios**, lucha contra incendios y adecuación de los trabajadores, designado para ello al personal encargado de poner en marcha estas medidas y comprobando periódicamente, en su caso, su correcto funcionamiento.

▶ 3ª Etapa: ▶ VERIFICAR (CHECK)

09. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO

Verificar la implantación del SG-PRL. Para ello, requiere auditorías internas y revisión por la dirección, entre otros.

9.1. SEGUIMIENTO, MEDICIÓN, ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL SG-PRL

Las actividades de seguimiento y medición son todas aquellas que permiten tener información periódica de la correcta aplicación y funcionamiento del sistema de gestión (SG-PRL), mediante el seguimiento y medición se sabe si se está cumpliendo los objetivos o propósitos.

9.2. AUDITORIAS

La auditoría es un instrumento de gestión que persigue reflejar una imagen fiel del sistema de gestión (SG-PRL) de la organización (laboratorio), valorando su eficacia y detectando las deficiencias

o desviaciones que puedan dar lugar a incumplimientos de la legislación vigente, para permitir la adopción de decisiones dirigidas a su perfeccionamiento y mejora.

Se harán **auditorías internas**, pero es necesario realizar **auditorías externas** periódicas.

9.3. REVISIÓN POR LA DIRECCIÓN

Todo sistema de gestión (SG-PRL) debe incluir periódica, a intervalos planificados, por la dirección de la organización (laboratorio) no más que anualmente, para asegurar en conveniencia, adecuación, eficacia y mejora continua.

Esta revisión por la dirección para rendir cuentas, que se podrá llevar a cabo mediante la preparación y presentación de un informe o balance de lo ejecutado hasta el momento dado, y de lo que se pretende realizar en adelante.

La revisión por la dirección es un elemento esencial del SG-PRL. El objetivo o propósito de la revisión por la dirección es que la gerencia evalúe el rendimiento del SG-PRL para garantizar que haya sido eficaz, evitando en última instancia lesiones o daños a los trabajadores.

▶ 4ª Etapa: ▶ ACTUAR (ACT)

10. MEJORA

Su consecución iterativa es el objetivo o propósito final del SG-PRL y el funcionamiento del ciclo PDCA (denominado ciclo de mejora).

10.2. INCIDENTES, NO CONFORMIDADES (NC) Y ACCIONES CORRECTIVAS

Una No Conformidad, en el marco de un sistema de gestión, es un incumplimiento de uno o varios de los requisitos del mismo.

Como pauta de las mismas de mejora continua del SG-PRL se ha de establecer, implementar y mantener un procedimiento para la gestión de las no conformidades que puedan presentarse.

INCIDENTES / ACCIDENTES

Un incidente es cualquier suceso relacionado con el trabajo en el cual ocurre o podría haber ocurrido un daño o deterioro de la salud o una fatalidad.

Es importante tener en cuenta el matiz de que no es necesario que se materialice el efecto del incidente para considerarlo como tal

Un accidente de trabajo es un tipo de incidente, que legalmente (Ley Gral. de Seguridad social) se puede definir como:

Toda lesión corporal que se sufra con ocasión o por consecuencia del trabajo que se ejecuta por cuenta ajena.

Es recomendable establecer, implementar y mantener un procedimiento para registrar, investigar, analizar y notificar (interna y externamente para accidentes y enfermedades profesionales).

INVESTIGACIÓN DE DAÑOS PARA LA SALUD

Se establecerán la forma de información y notificación a los Servicios de PRL y a la Mutua de Accidentes de Trabajo que se hayan producido.

Igualmente se establecerán la forma de investigar la situaciones que han dado para ocasionar los daños para la la salud.

10.3. MEJORA CONTINUA

Una vez chequeado y verificado como se lleva el sistema de gestión SG-PRL, se trata de estudiar lo que ha fallado para rectificar, y de mantener lo que se hecho bien despuesdel análisis.

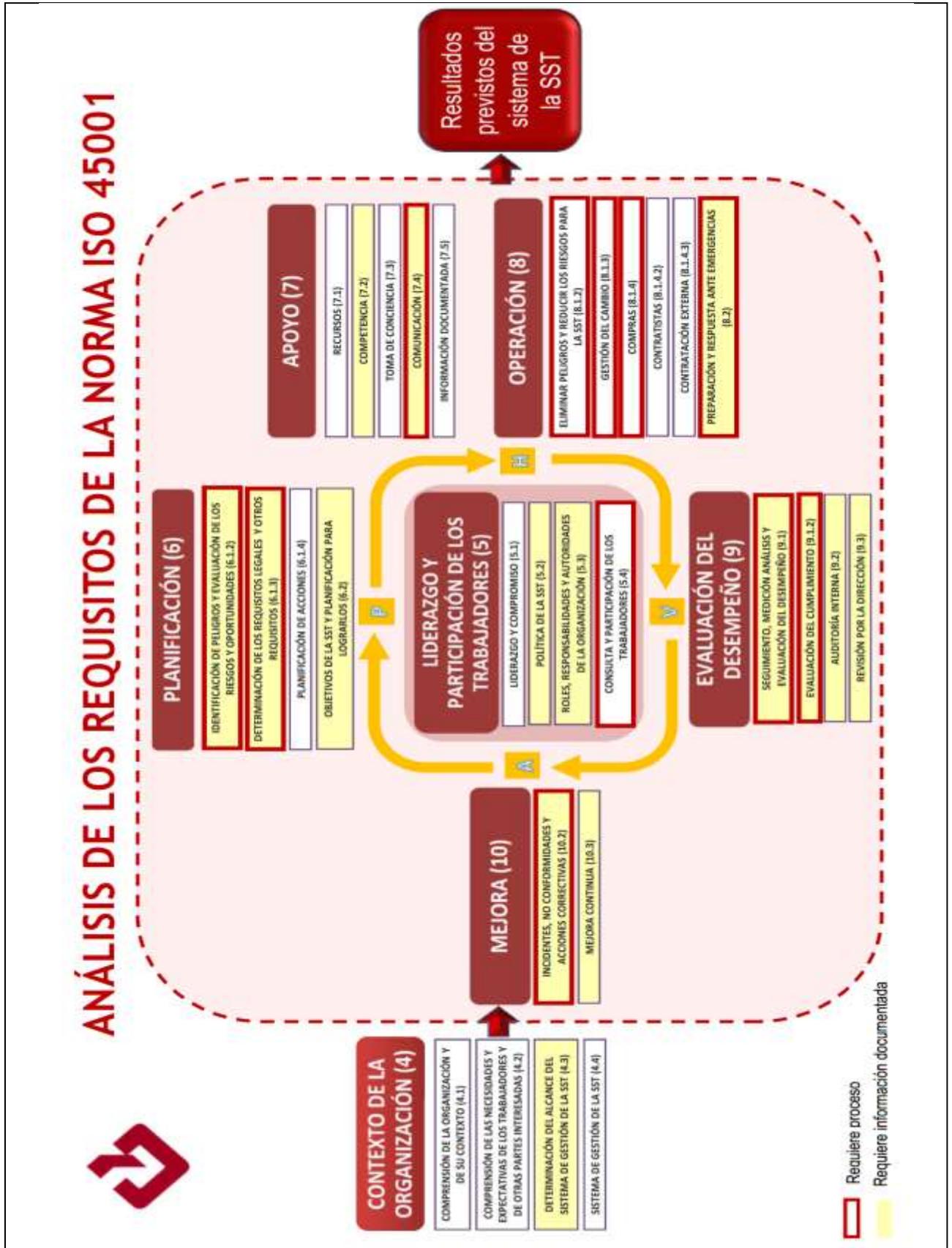
Los sistemas de gestión y por tanto, el SG-PRL establecen un conjunto de trenzado de controles planificados, y al hacer seguimiento (monitorización) de la medición, análisis y evaluación comprobando que se actúa adecuadamente o no, pudiendo corregir, revisar y replantearse lo planificado para hacerlo más eficaz (el SG-PRL).

Aplicando iterativamente para perfección del sistema.

VIGILANCIA DE LA SALUD

La vigilancia de la salud en función de los riesgos inherentes al trabajo es un derecho de todo trabajador, establecido por la Ley de Prevención de Riesgos Laborales (artículo 22). Esta vigilancia de la salud se llevará a cabo mediante la realización de reconocimientos médicos específicos y adaptados a cada puesto de trabajo. Por lo general tendrán carácter voluntario, salvo ciertas excepciones debidamente reguladas, y podrán realizarse tras la incorporación al trabajo o después de la asignación de tareas específicas con nuevos riesgos para la salud, tras una ausencia prolongada por motivos de salud o a intervalos periódicos.

ESTRUCTURA DE LA NORMA ISO-45001:2018 según FREMAP



5 RESPONSABILIDADES DE LA DIRECCIÓN DE UN LABORATORIO REFERENTE A PRL (o SST)

Aunque el laboratorio disponga del Comité de Salud y Seguridad, de un servicio de prevención, etc., es responsabilidad del director del mismo el desarrollo de la gestión de prevención de riesgos, debiendo tenerse en cuenta lo dispuesto al respecto por la Ley 31/1995 de Prevención de Riesgos Laborales y el Reglamento de los Servicios de Prevención (RD 39/1997), tanto en lo que afecta a los trabajadores de plantilla del laboratorio, como para aquellos externos que desarrollen sus actividades en el mismo de manera esporádica, temporal o fija.

Responsabilidades de la dirección de laboratorio y cualquier mando intermedio (jefe de un departamento de análisis) en temas de prevención de riesgos laborales con sus analistas, en general:

- Ofrecer un laboratorio con un ambiente seguro.
- Programa de prácticas de laboratorio seguras
- Brindarles el entrenamiento de seguridad y riesgos necesario

FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES COMUNES EN S.S.T. A LOS TITULARES DEL LABORATORIO

- Conocer el contenido de la **evaluación de riesgos laborales** del Laboratorio e informar al Servicio de Prevención ante cualquier cambio en los puestos de trabajo y/o actividades reflejadas en la misma.
- Conocer el contenido de la **planificación de la actividad preventiva** derivada de la evaluación de riesgos laborales del Laboratorio y velar por el cumplimiento y ejecución efectiva de las medidas preventivas previstas en ella, informando periódicamente al Servicio de Prevención acerca de su estado de ejecución.
- Trasladar a los trabajadores a su cargo la **información específica** sobre los riesgos existentes en sus puestos de trabajo y las medidas previstas para prevenirlos, así como formarlos sobre los procedimientos de trabajo seguro previstos en el desarrollo de su actividad.
- Promover y asegurar la **formación** en materia preventiva de los trabajadores a su cargo, así como dar traslado al Servicio de Prevención de las necesidades detectadas en su ámbito.
- Prevaler los **equipos de protección colectivos (EPC)** y luchar prioritariamente contra el foco.
- Cuidar por el **buen mantenimiento de las instalaciones** electromecánicas (Alta tensión, Grupos electrógenos, Baja tensión, Protección pararrayos, Protecciones de tierras, Protección contra incendios, Fontanería, Saneamiento,
- Asegurar el buen funcionamiento de **las extracciones localizadas** (vitrinas de extracción de gases y humos, campanas de aspiración de gases y humos), así como de **las renovaciones hora** necesarias en las salas de análisis.
- Velar porque los trabajadores a su cargo dispongan de todos los **equipos de protección individual (EPI)** necesarios para el desarrollo de su actividad cuando proceda, de acuerdo con lo dispuesto en la evaluación de riesgos laborales.
- Notificar al Servicio de Prevención los **accidentes de trabajo** o **incidentes** sufridos por sus trabajadores, así como la sospecha de cualquier daño para su salud o **situación de especial sensibilidad** a las condiciones de trabajo.
- Promover la participación de los trabajadores a su cargo en las campañas periódicas de **vigilancia de la salud** e informar a estos de los supuestos de excepción al criterio de voluntariedad cuando proceda.

- Incentivar la colaboración de los trabajadores a su cargo en las actividades que se prevean para la implantación de las **medidas de emergencia** en el centro de trabajo.
- Asistir a las reuniones del **Comité de Seguridad y Salud** cuando así se requiera, ya sea en calidad de representante o de asesor, así como cumplir con el deber de **consulta a los representantes de los trabajadores** sobre las cuestiones de su actividad que puedan tener efectos sustanciales sobre la seguridad y la salud de los trabajadores a través de los mecanismos de comunicación que se establezcan al efecto.
- Solicitar asesoramiento al Servicio de Prevención sobre la **adquisición de bienes y/o la contratación de servicios** cuando estos puedan tener efectos sustanciales sobre la seguridad y la salud de los trabajadores, así como informar del **inicio de actividades contratadas** cuando trabajadores de empresas externas realicen su trabajo en dependencias del Laboratorio o con medios puestos a disposición por éste o empleados públicos del Departamento u Organismo ejerzan sus funciones en centros de trabajo ajenos.
- Informar al Servicio de Prevención ante la **incorporación de becarios y/o personal en formación**, así como ante **cambios en la ubicación o traslados** de los puestos de trabajo y en los **procedimientos de trabajo**.
- **Conocer, cumplir y hacer cumplir** en el Laboratorio **todas las normas e instrucciones en materia de PRL**, corrigiendo las anomalías detectadas, así como el resto de normativa específica de seguridad que sea de aplicación a las instalaciones o equipos de trabajo que se utilicen.
- **Cualquier otra** que le corresponda de acuerdo **con la normativa vigente**.

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.

6. FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES DE LOS TRABAJADORES (EMPLEADOS PUBLICOS, BECARIOS, Y PERSONAL EN FORMACIÓN)

La Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales establece en su artículo 29 las obligaciones de los trabajadores en materia de PRL, cuya omisión tendrá la consideración de incumplimiento laboral a los efectos previstos en la normativa vigente. A tal fin, corresponderá a cada trabajador velar, según sus posibilidades y mediante el cumplimiento de las medidas de prevención que en cada caso sean adoptadas, por su propia seguridad y salud en el trabajo y por la de aquellas otras personas a las que pueda afectar su actividad profesional, a causa de sus actos y omisiones en el trabajo, de conformidad con su formación y las instrucciones del empresario.

FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES EN SST DE LOS TRABAJADORES:

- **Cooperar** con el laboratorio para que éste pueda garantizar unas condiciones de trabajo que sean seguras y no entrañen riesgos para la seguridad y la salud de los trabajadores.
- **Adoptar las medidas de prevención y protección** definidas en las evaluaciones de riesgos para el control o la eliminación de los mismos.
- **Seguir las instrucciones y los procedimientos de trabajo establecidos** por el Servicio de Prevención y el laboratorio para la realización de los trabajos en condiciones de seguridad.
- **Usar adecuadamente**, de acuerdo con su naturaleza y los riesgos previsibles, las máquinas, aparatos, herramientas, sustancias peligrosas, equipos de transporte y, en general, cualesquiera otros medios con los que desarrollen su actividad.
- **Utilizar correctamente los medios y equipos de protección facilitados por el laboratorio**, de acuerdo con las instrucciones recibidas de éste.
- **No poner fuera de funcionamiento y utilizar correctamente los dispositivos de seguridad** existentes o que se instalen en los medios relacionados con su actividad o en los lugares de trabajo en los que ésta tenga lugar.
- **Informar de inmediato** a su superior jerárquico directo, y al Servicio de Prevención o Empleado Público Designado al efecto, acerca de cualquier situación que pueda entrañar un riesgo para la seguridad y la salud de los trabajadores.
- **Realizar los cursos de formación** que se organicen por el Servicio de Prevención en materia preventiva y que esté centrada específicamente en la prevención de los riesgos de su puesto de trabajo.
- **Participar en las campañas periódicas de vigilancia de la salud** en función del criterio de voluntariedad establecido para su puesto de trabajo.
- **Colaborar en las actividades** que se prevean para la implantación de las medidas de emergencia en el laboratorio como centro de trabajo.
- **Contribuir al cumplimiento de las obligaciones establecidas por la autoridad competente** con el fin de proteger la seguridad y la salud de los trabajadores en el trabajo.
- **Cualquier otra** que le corresponda en materia de PRL de acuerdo con la normativa vigente.

7. BIBLIOGRAFIA

- ⇒ **Ley de PRL** y todo su desarrollo en RRDD
- ⇒ “**Documentación del SG-PRL del MAPA** (declaración de principios, manual de la PRL, Procedimientos, Instrucciones)”
- ⇒ “**Manual de PRL en la Administración Pública**” INAP (2012)
- ⇒
- ⇒ **Norma ISO-45001 : 2018** “Sistemas de gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo . Requisitos para su uso”.
- ⇒ “**Guía para la aplicación de UNE-EN ISO-45001:2018**” AENOR (2019)
- ⇒ **ISO/DIS-45002 :2022** “Sistemas de gestión de Seguridad y Salud en el Trabajo . Directrices generales para la implementación de la norma ISO-45001:2018”

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 15

PRODUCTOS QUÍMICOS. CLASIFICACIÓN POR SU RIESGO. INFORMACIÓN: ETIQUETADO Y FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO. ACTUACIONES EN INCIDENTES/ACCIDENTES POR PRODUCTOS QUÍMICOS

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.

PRODUCTOS QUÍMICOS. CLASIFICACIÓN POR SU RIESGO. INFORMACIÓN: ETIQUETADO Y FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO. ACTUACIONES EN INCIDENTES/ACCIDENTES POR PRODUCTOS QUÍMICOS

ÍNDICE

1. PRODUCTOS QUIMICOS (PPQQ) INTRODUCCIÓN

2. CLASIFICACIÓN DE PQ POR SU RIESGO

3. CONTROL DE LA EXPOSICIÓN A LOS PPQQ

4. INFORMACIÓN DE PPQQ

4.1. ETIQUETADO DE PPQQ

4.2. FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD (FDS) DE PPQ Q

5. MANIPULACIÓN DE PPQQ

6. ALMACENAMIENTO DE PPQQ (APQ)

6.1. CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL ALMACENAMIENTO DE PPQQ

6.2. MEDIDAS PARA REDUCIR EL RIESGO DE ALMACENAMIENTO PPQQ

6.3. OBLIGACIONES DE LOS TITULARES AL ALMACENAMIENTO PQ EN PROTECCIÓN DE DERRAMES

6.4. OTRAS INDICACIONES/RECOMENDACIONES

7. ACTUACIONES EN INCIDENTES/ACCIDENTES POR PPQQ

8. BIBLIOGRAFIA

1. PRODUCTOS QUÍMICOS (PPQQ) INTRODUCCIÓN

La exposición excesiva y prolongada a las sustancias peligrosas en el medio ambiente laboral, conduce a enfermedades que pueden incapacitar el trabajo e incluso producir la muerte.

El control de los efectos sobre la salud de los trabajadores en el medio ambiente laboral, ha dado lugar al nacimiento y creación de la HIGIENE INDUSTRIAL.

La Higiene Industrial es la técnica no médica de prevención de las enfermedades profesionales, que actúa sobre el ambiente y las condiciones de trabajo.

En líneas generales, **la higiene industrial abarca los siguientes aspectos:**

- Identificación de los factores ambientales unidos al trabajo, así como el estudio de sus efectos sobre el hombre.
- Evaluación de la magnitud de estos factores.
- Recomendación de métodos para controlar o reducir los efectos nocivos.

Seguendo los preceptos de la actividad preventiva, la mejor manera de evitar los efectos y eliminar el riesgo químico es reemplazar los productos peligrosos por otros que sean menos peligrosos, siendo deseable que estos fuesen inocuos, aunque lamentablemente esto no siempre es posible.

Un agente químico es peligroso, no solo por sus propiedades, sino también:

- Por la forma en que se utiliza (polvo, aerosol, líquido, ...).
- Por la forma en que está presente en el lugar de trabajo (por ejemplo: utilizar agua a temperatura ambiente puede no ser un riesgo, pero si se calienta a más de 100°C resulta peligroso el contacto con líquido o vapor, o esa misma agua inofensiva, en laboratorio sería dañina si se pusiera en contacto con ciertas sustancias. que reaccionan violentamente con ella.

LOS EFECTOS de los agentes químicos sobre el cuerpo humano son:

- Corrosivos:** provocan la destrucción de los tejidos (piel);
- Irritantes:** irritación de la piel o las mucosas en contacto con el tóxico;
- Neumoconióticos:** alteración pulmonar por partículas sólidas;
- Asfixiantes:** desplazamiento del oxígeno del aire o alteración de los mecanismos oxidativos biológicos;
- Anestésicos y narcóticos:** depresión del sistema nervioso central. Generalmente el efecto desaparece cuando desaparece el agente químico;
- Sensibilizantes:** efecto alérgico del contaminante ante la presencia del tóxico, aunque sea en pequeñas cantidades (asma, dermatitis)
- Cancerígenos, mutágenos, y tóxicos para la reproducción:** aumento de la probabilidad de producir cáncer, alteraciones genéticas hereditarias, y alteraciones de la capacidad reproductora o malformaciones en la descendencia respectivamente;
- Sistémicos:** alteraciones de órganos o sistemas específicos (hematopoyético, hepático, renal, etc.).

VÍAS DE ENTRADA de los agentes químicos sobre el cuerpo humano:

1. **Vía respiratoria (inhalatoria)** A través de la nariz, y la boca, los pulmones,
2. **Vía dérmica** A través de la piel.
3. **Vía digestiva** A través de la boca, estómago,
4. **Vía parenteral** A través de heridas. Llagas,

EFECTOS DE LOS PRODUCTOS TÓXICOS SOBRE EL CUERPO HUMANO		
CORROSIVOS	Dstrucción de los tejidos sobre los que actúa el tóxico	
IRRITANTES	Irritación de la piel o las mucosas en contacto con el tóxico	
NEUMOCOÑÓTICOS	Alteración pulmonar por partículas sólidas	
ASFOANTES	Desplazamiento del oxígeno del aire o alteración de los mecanismos oxidativos biológicos	
ANESTÉSICOS Y NARCÓTICOS	Depresión del sistema nervioso central. Generalmente el efecto desaparece cuando desaparece el contaminante	
SENSIBILIZANTES	Efecto alérgico del contaminante ante la presencia del tóxico, aunque sea en pequeñas cantidades (Asma, Dermatitis)	
CANCERÍGENOS MUTÁGENOS Y TERATÓGENOS	Producción de cáncer, modificaciones hereditarias y malformaciones en la descendencia respectivamente	
SISTÉMICOS	Alteraciones de órganos o sistemas específicos (hígado, riñón, etc.)	

VÍAS DE ENTRADA DE LOS CONTAMINANTES QUÍMICOS		
VÍA RESPIRATORIA A través de la nariz y la boca, los pulmones, etc.		Es la vía de penetración de sustancias tóxicas más importante en el medio ambiente de trabajo, ya que con el aire que respiramos pueden penetrar en nuestro organismo polvos, humos, aerosoles, gases, vapores de productos volátiles, etc.
VÍA DÉRMICA A través de la piel		Es la vía de penetración de muchas sustancias que son capaces de atravesar la piel, sin causar erosiones o alteraciones notables, e incorporarse a lo sangre, para posteriormente ser distribuidas por todo el cuerpo. La superficie total de piel expuesta a la posible penetración es muy importante, así como su estado de integridad, que en ocasiones puede estar debilitada por lesiones o por la acción de los disolventes capaces de eliminar las grasas que protegen su superficie.
VÍA DIGESTIVA A través de la boca, el estómago, los intestinos, etc.		Es la vía de penetración a través de la boca, el estómago, el intestino y los intestinos. También tienen de considerar aquí la posible ingestión de contaminantes disueltos en las mucosidades del sistema respiratorio.
VÍA PARENTERAL A través de heridas, llagas, etc.		Es la vía de penetración directa del contaminante en el cuerpo a través de llagas, heridas, etc.



Los modelos actuales se encaminan a considerar la exposición a sustancias químicas peligrosas por vía inhalatoria y vía dérmica. Es decir: partiendo de la toxicología y considerando los factores relacionados con la exposición por ambas vías, se establece un nivel de riesgo que se asocia a una estrategia de control, como se observa en la figura siguiente:



Un **producto químico** o **agente químico**, es un conjunto de compuestos químicos (aunque en ocasiones sea uno solo) destinado a cumplir una función. Generalmente el que cumple la función principal es un solo componente, llamado componente activo. Los compuestos restantes o excipientes, son para llevar a las condiciones óptimas al componente activo (concentración, pH, densidad, viscosidad, etc.), darle mejor aspecto y aroma, cargas (para abaratar costos), etc.).

Por "**producto químico**" o agente químico se entiende toda *sustancia, sola o en forma de mezcla o preparación, ya sea fabricada u obtenida de la naturaleza, excluidos los organismos vivos.*

Ello comprende las siguientes categorías plaguicida, (incluidas las formulaciones plaguicidas extremadamente peligrosas) y productos de la industria química.

Un **agente químico** es *todo elemento o compuesto químico, por sí solo o mezclado, tal como se presenta en estado natural o es producido, utilizado o vertido, incluido el vertido como residuo, en una actividad laboral, se haya elaborado o no de modo intencional y se haya comercializado o no.*

Exposición a un agente químico: *es la presencia de un agente químico en el lugar de trabajo que implica el contacto de éste con el trabajador, normalmente, por inhalación o por vía dérmica.*

Riesgo químico es *la posibilidad de que un trabajador sufra un determinado daño derivado de la exposición a agentes químicos.* Esta exposición viene determinada por el contacto de éste con el trabajador, normalmente por inhalación o por vía inhalatoria o por vía dérmica. *Para calificar un riesgo químico desde el punto de vista de su gravedad, se deben valorar conjuntamente la probabilidad de que se produzca el daño y la severidad del mismo.*

Peligro es la capacidad intrínseca de un agente químico para causar daño.

La gravedad del riesgo depende no solo de la naturaleza del agente químico en cuestión, sino también de las condiciones individuales del trabajador expuesto y de las características de la exposición, la cual está determinada por factores propios del puesto de trabajo (tiempo de exposición, generación del agente químico, ventilación, etc.) y de las condiciones ambientales que puedan favorecer la absorción del tóxico, como la temperatura ambiente o el esfuerzo físico que requiere el trabajo.

De acuerdo con las anteriores definiciones, las sustancias o mezclas capaces de producir efectos indeseables, porque presentan una característica especial que suponga un peligro para la seguridad y salud de las personas o para el medio ambiente son consideradas como **peligrosas**, y se dice que son **agentes químicos peligrosos**. Más detalladamente la siguiente definición de la legislación vigente.

Agente químico peligroso: es aquel agente químico que puede representar un riesgo para la SST debido a sus propiedades físico-químicas, químicas o toxicológicas y a la forma en que se utiliza o se halla presente en el lugar de trabajo.

Los productos químicos pueden ser sustancias o mezclas, pero en cualquier caso siempre serán un agente químico:

- ♦ **Sustancia:** un elemento químico y sus compuestos naturales o los obtenidos por algún proceso industrial, incluidos los aditivos necesarios para conservar su estabilidad y las impurezas que inevitablemente produzca el proceso.
- ♦ **Preparado** (políticamente incorrecto) o **Mezcla** (políticamente correcto): mezcla o solución compuesta por dos o más sustancias.
- ♦ **Artículo:** objeto que, durante su fabricación, recibe una forma, superficie o diseño especiales que determinan su función en mayor medida que su composición química.
- ♦ **Sustancia intermedia:** sustancia que se fabrica y consume o usa para procesos químicos de transformación en otra sustancia (síntesis).
- ♦ **Uso:** es toda transformación, formulación, consumo, almacenamiento, conservación, tratamiento, envasado, trasvasado, mezcla, producción de un artículo, o cualquier otra utilización.

Los productos químicos también pueden clasificarse:

- **Sólidos:** incluyendo polvos, fibras, humos y humos metálicos;
- **Líquidos:** incluyendo aerosoles;
- **Gases licuados**

PICTOGRAMAS DE PELIGRO

Elemento gráfico destinado a transmitir información inmediata sobre el peligro en cuestión.

Los pictogramas de peligro simbolizan cada uno de los posibles riesgos que pueden tener los productos químicos.

Estos pictogramas, tienen la forma de cuadrado apoyado sobre uno de sus vértice (no es un rombo, un rombo con iguales diagonales no es un rombo es un cuadrado).

El cuadrado tiene los bordes o contorno grueso en rojo, el fondo es blanco y el símbolo o icono correspondiente al peligro en color negro.

Se trata de 9 pictogramas diferentes que se asignan individualmente o combinados a un determinado producto químico para otorgarle una clasificación de riesgo única y fácilmente reconocible en cualquier lugar del mundo.



Es esperable que se subsane alguna deficiencia, como es la mala elección de símbolos o iconos,

por ejemplo:

- del signo de admiración que está en la conciencia general de peligro indefinido
- de no haber desglosado el antiguo símbolo de corrosivo, que era indistintamente para indicar corrosivo a metales (de la parte izquierda), y corrosivo cutáneo (de la parte derecha). Ahora que se ha separado podrían haberlo separado

2. CLASIFICACIÓN DE LOS PPQQ POR SU RIESGO

La clasificación de las sustancias y mezclas químicas implica una evaluación de la peligrosidad de las mismas en función de sus propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas, con el fin de prevenir los riesgos para la salud y el medio ambiente.

La clasificación de peligros es un proceso mediante el cual se identifican los peligros físicos, para la salud humana y el medio ambiente de una sustancia o mezcla, y se comparan estos peligros detectados (incluso la gravedad del peligro) con unos criterios definidos, para establecer una clasificación de los productos químicos (PQ).

Peligros físicos (17 clases)	BOMBA EXPLOTANDO Productos químicos explosivos, auto reactivos o peróxidos orgánicos		Peligros para la salud (10 clases)
	LLAMA Productos químicos inflamables (gases, líquidos y sólidos), autoreactivos, pirofóricos o productos que experimentan calentamiento espontáneo		
	LLAMA SOBRE CÍRCULO Productos químicos comburentes, ya sean gases, líquidos o sólidos		
	BOTELLA DE GAS Productos químicos que sean gases comprimidos o gases licuados		
	CORROSIÓN Productos químicos corrosivos para metales.		
	CORROSIÓN productos químicos corrosivos cutáneos o que producen lesiones oculares graves		
	CALAVERA Y TIBIAS CRUZADAS Productos químicos que sean tóxicos (toxicidad aguda y crónica)		
	SIGNO DE EXCLAMACIÓN Productos químicos irritantes cutáneos u oculares, sensibilizantes cutáneos, que irritan el tracto respiratorio o producen efectos narcóticos, Posibles tóxicos agudos o peligrosos para la capa de ozono		
	PELIGRO PARA LA SALUD Productos químicos cancerígenos, sensibilizantes respiratorios, tóxicos para la reproducción, tóxicos para órganos diana o mutágenos en células germinales		
	MEDIO AMBIENTE Se utiliza para productos químicos peligrosos para el medio ambiente acuático (toxicidad acuática aguda y crónica)		Peligros para el ambiente (2 clases)

Los agentes químicos se clasifican en función de los peligros físicos y los que entrañan para la salud y para el medio ambiente, conforme se describe en los siguientes cuadros:

Peligros FÍSICOS

GHS-01 Bomba explotando	
GHS-02 Llama	
GHS-03 Llama con círculo	
GHS-04 Bombona de gas	
GHS-05 Corrosión metales	

Peligros SALUD

GHS-05 Corrosión cutánea	
GHS-06 Calavera y tibias cruzadas	
GHS-07 Signo de exclamación	
GHS-08 Peligro para la salud	

Peligros MEDIO AMBIENTE

GHS-09 Medio ambiente	
GHS-10 Signo de exclamación	

PELIGROS FÍSICOS	PICTOGRAMA
Explosivos: sustancias o mezclas que pueden reaccionar espontáneamente desprendiendo gases a una temperatura, presión y velocidad, tales que pueden causar daños a su entorno.	
Inflamables: sustancias o mezclas, generalmente con punto de inflamación bajo, que pueden provocar incendios o contribuir a provocarlos.	
Comburentes: sustancias o mezclas que generalmente liberan oxígeno y provocan o facilitan la combustión de otras sustancias en mayor medida que el aire.	
Gases a presión: comprenden los gases que se encuentran en un recipiente a presión que pueden explotar si se calientan, provocar quemaduras o lesiones criogénicas (por contacto con materias frías).	
Corrosivos para los metales: sustancias o mezclas que por su acción química pueden dañar o destruir los metales.	
Pirofóricos: sustancias o mezclas que, presentes en pequeñas cantidades, pueden inflamarse al cabo de 5 minutos de entrar en contacto con el aire.	
Sustancias que experimentan calentamiento espontáneo: sustancias o mezclas que pueden calentarse espontáneamente en contacto con el aire sin aporte de energía.	
Sustancias que en contacto con el agua desprenden gases inflamables: sustancias o mezclas que por interacción con el agua tienden a volverse espontáneamente inflamables o a desprender gases inflamables en cantidades peligrosas.	
Peróxidos orgánicos: sustancias o mezclas que pueden experimentar una descomposición explosiva, arder rápidamente, ser sensibles a los choques o a la fricción y reaccionar peligrosamente con otras sustancias.	
Sustancias y mezclas que reaccionan espontáneamente (autorreactivas): sustancias o mezclas térmicamente inestables que pueden experimentar una descomposición exotérmica intensa, incluso en ausencia de oxígeno.	

PELIGROS PARA LA SALUD	PICTOGRAMA
Tóxicos: sustancias o mezclas que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, producen efectos adversos sobre el individuo.	
Tóxicos específicos para determinados órganos: sustancias o mezclas que producen una toxicidad no letal en determinados órganos tras una exposición única o repetida.	
Tóxicos para la reproducción: sustancias o mezclas que pueden producir efectos adversos sobre la función sexual y la fertilidad, así como sobre el desarrollo de los descendientes.	
Peligrosas por aspiración: sustancias o mezclas sólidas o líquidas que en caso de llegar a los pulmones (por la boca, nariz o al vomitarlos) pueden dañar gravemente e incluso llegar a ser mortales.	
Carcinogénicas: sustancias o mezclas que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, inducen el cáncer o aumentan su incidencia.	
Mutagénicas: sustancias o mezclas de sustancias que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, pueden producir alteraciones genéticas hereditarias o aumentar su frecuencia en el ser humano.	
Sensibilizantes: sustancias o mezclas cuya inhalación puede inducir hipersensibilidad de las vías respiratorias, o que mediante contacto con la piel pueden inducir una respuesta alérgica.	
Corrosivos o irritante para la piel y los ojos: sustancias o mezclas que en contacto con el tejido vivo pueden ejercer una acción destructiva (corrosivo) o una lesión reversible (irritante) del mismo.	

PELIGROS PARA EL MEDIO AMBIENTE	PICTOGRAMA
Sustancias peligrosas para el medio ambiente: son aquellas que pueden provocar efectos nocivos en los organismos acuáticos o a la capa de ozono (persistentes en suelo y agua, y bioacumulativos).	

3. CONTROL DE LA EXPOSICIÓN A LOS PPQQ (AAQQ)

El control de la exposición a productos químicos (PPQQ) o agentes químicos (AAQQ)

Con objeto de evitar o disminuir la exposición de los trabajadores a agentes químicos el empresario (laboratorio) ha de aplicar un conjunto de técnicas y procedimientos para prevenir riesgos y mantener esta situación a lo largo del tiempo y en cualquier circunstancia. Estas acciones pueden clasificarse atendiendo al elemento sobre el que actúan, cada una de ellas tiene un objetivo distinto:

- ◆ **Acciones sobre el agente químico:** sobre EL FOCO su objetivo es evitar su presencia.
- ◆ **Acciones en el proceso o instalación:** su objetivo es eliminar o reducir la emisión al ambiente.
- ◆ **Acciones en el local (zona o ambiente de trabajo):** su objetivo es mantener la concentración ambiental del agente químico en un valor seguro.
- ◆ **Acciones en el método de trabajo:** su objetivo es evitar el contacto directo entre el agente químico y el trabajador.

MÉTODOS DE CONTROL		
foco	medio	trabajador

MÉTODOS DE CONTROL:

SOBRE EL FOCO:
Sustituirlo por otro menos peligroso
Aislarlo en una sala confinada

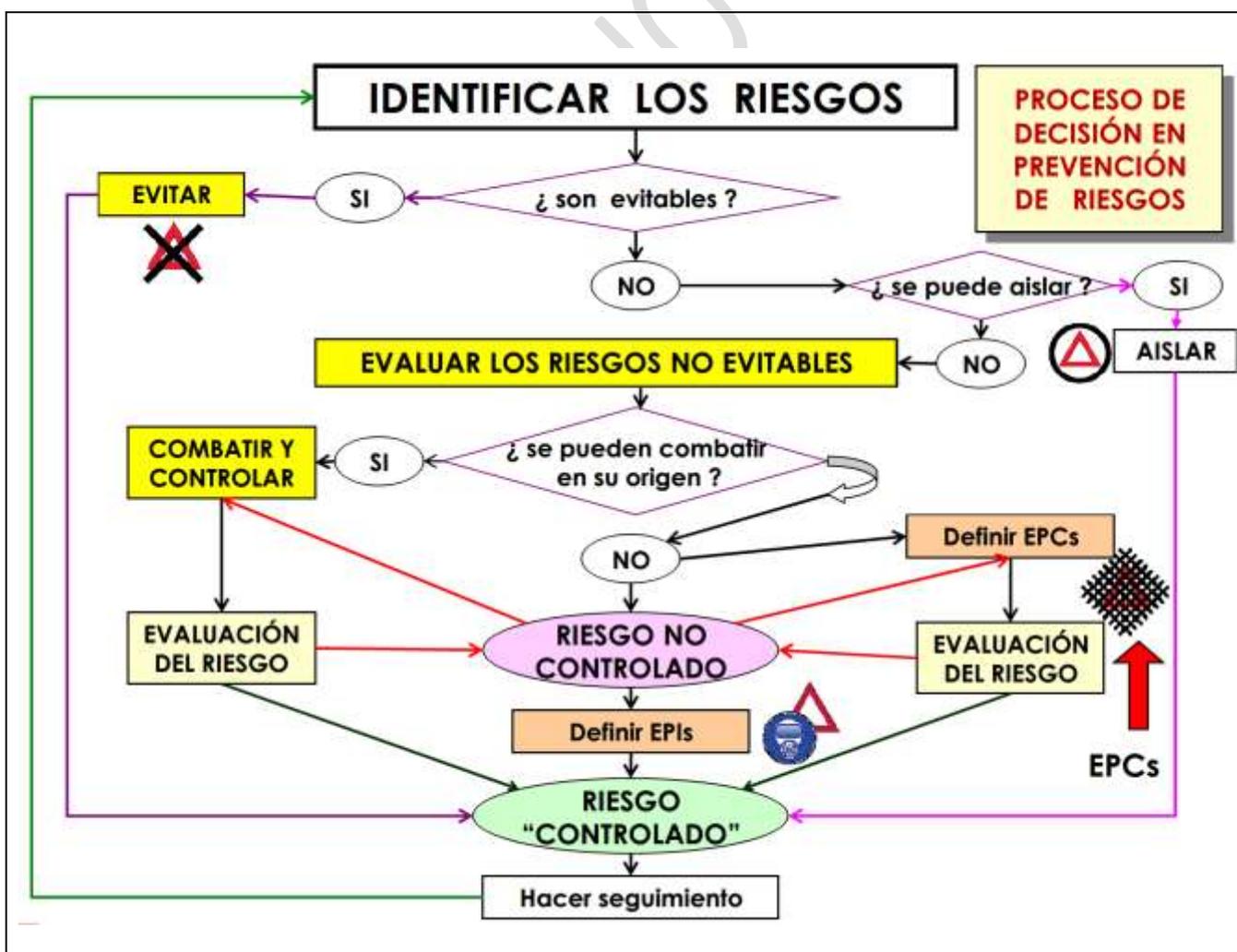
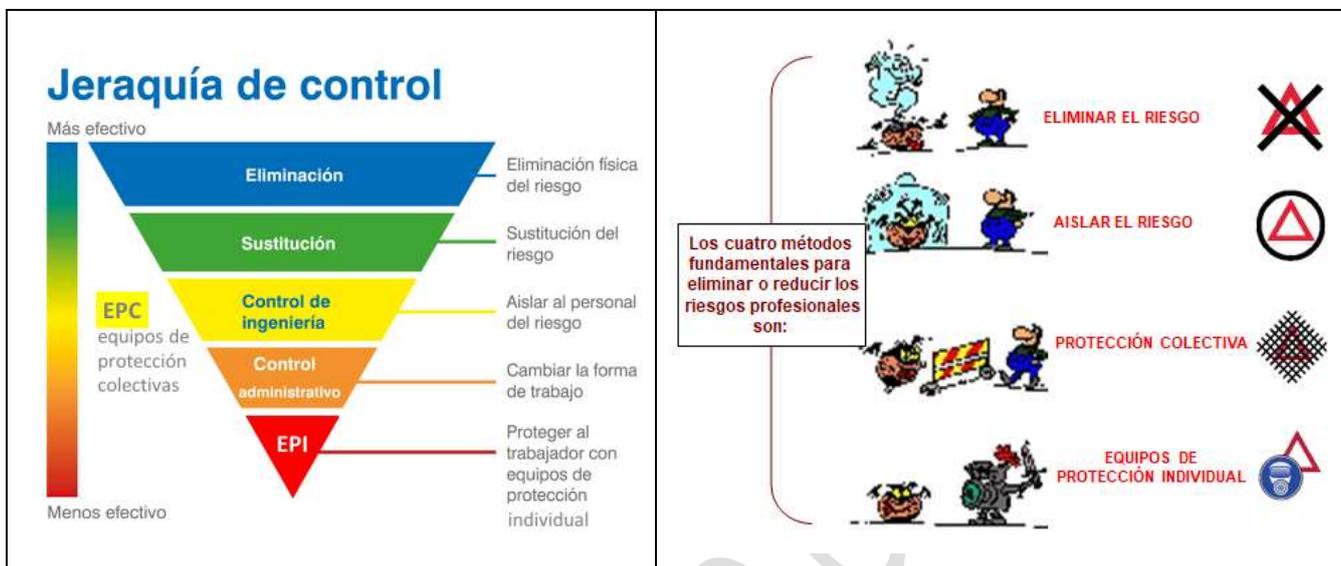
SOBRE EL MEDIO:
Aislarlo en campana de espiración cerrada
Manipularlo con vitrina de extracción de gases
Renovaciones hora en la sala de análisis

SOBRE EL TRABAJADOR:
Protegerlo con EPIs

Todas estas técnicas de control o medidas preventivas pueden agruparse en los siguientes grandes grupos:

	Eliminación: Para ello, deberá (preferentemente) evitar el uso de dicho agente, sustituyéndolo por otro o por un proceso químico que no sea peligroso o que lo sea en menor grado.
	Reducción del riesgo al mínimo: Cuando no se pueda eliminar el riesgo, se reducirá al mínimo aplicando medidas de prevención y protección. evitando o reduciendo al mínimo cualquier escape, difusión al ambiente o contacto directo con el trabajador.
	Sistemas de protección colectiva (EPCs): aplicadas preferentemente en el origen del riesgo y medidas adecuadas de organización del trabajo (medidas técnicas y medidas organizativas). Su objetivo es reducir el nivel del agente químico en aire renovando globalmente el aire del local. general: su objetivo es renovar de la sala de análisis, por aire exterior tratado en buenas condiciones. localizada: Su objetivo es captar el agente químico en la zona inmediata del punto donde se ha generado (el foco), evitando así que se difunda al ambiente general del local. Estos sistemas constan de 4 elementos: campana, conductos, depurador y ventilador.

Equipos de protección individual (EPIs): Los equipos de protección individual deberán utilizarse únicamente cuando los riesgos no se puedan evitar o no puedan limitarse suficientemente a través de medidas de protección colectiva o mediante métodos o procedimientos de organización del trabajo.



04. INFORMACIÓN DE PPQQ

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 (**Reglam. 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 (**Reglam 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).

4.1. 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. Sustituyen 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. Sustituyen 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.



4.2. 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 :

La extensa información de las FDS debe estar estructurada en estas 16 secciones según indica el Reglamento REACH	
Estructura de la FDS	
<p>Sección 01: IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O LA MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA</p> <p>01.1. Identificación del producto 01.2. Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados 01.3. Datos del proveedor de la FDS 01.4. Teléfono de emergencia</p>	<p>Sección 09: PROPIEDAD FÍSICAS Y QUÍMICAS</p> <p>09.1. Información sobre propiedades físicas y químicas básicas 09.2. Información adicional L-133/22 DOUE 31.05.2010</p>
<p>Sección 02: IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS</p> <p>02.1. Clasificación de la sustancia o de la mezcla 02.2. Elementos de la etiqueta 02.3. Otros peligros</p>	<p>Sección 10: ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD</p> <p>10.1. Reactividad 10.2. Estabilidad química 10.3. Posibilidad de reacciones peligrosas 10.4. Condiciones que deben evitarse 10.5. Materiales incompatibles 10.6. Productos de descomposición peligrosos</p>
<p>Sección 03: COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES</p> <p>03.1. Sustancias 03.2. Mezclas</p>	<p>Sección 11: INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA</p> <p>11.1. Información sobre los efectos toxicológicos</p>
<p>Sección 04: PRIMEROS AUXILIOS</p> <p>04.1. Descripción de los primeros auxilios 04.2. Principales síntomas y efectos, agudos y de retardados 04.3. indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente</p>	<p>Sección 12: INFORMACIÓN ECOLÓGICA</p> <p>12.1. Toxicidad 12.2. Persistencia y degradabilidad 12.3. Potencia de bioacumulación 12.4. Movilidad en el suelo 12.5. Resultados de la valoración PBT y mPmB 12.6. Otros efectos adversos</p>
<p>Sección 05: MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS</p> <p>05.1. Medios de extinción 05.2. Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla 05.3. Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios</p>	<p>Sección 13: CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN</p> <p>13.1. Métodos para el tratamiento de residuos</p>
<p>Sección 06: MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL</p> <p>06.1. Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de urgencia 06.2. Precauciones relativas al medio ambiente 06.3. Métodos y material de contención y de limpieza 06.4. referencia a otras secciones</p>	<p>Sección 14: INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE</p> <p>14.1. Número ONU 14.2. Designación oficial de transporte de las UN 14.3. Clase(s) de peligro para el transporte 14.4. Grupo de embalaje 14.5. Peligros para el medio ambiente 14.6. Precauciones particulares para los usuarios 14.7. transporte a granel con arreglo al anexo II del Convenio Marpol 73/78 y del Código IBC</p>
<p>Sección 07: MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO</p> <p>07.1. Precauciones para una manipulación segura 07.2. Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades 07.3. Usos específicos finales</p>	<p>Sección 15: INFORMACIÓN REGLAMENTARIA</p> <p>15.1. reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla 15.2. Designación oficial de transporte de las UN</p>
<p>Sección 08: CONTROLES DE EXPOSICIÓN / PROTECCIÓN INDIVIDUAL</p> <p>08.1. Parámetros de control 08.2. Controles de la exposición</p>	<p>Sección 16: OTRA INFORMACIÓN</p>
ANEXOS: Escenarios de exposición cuando proceda	

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.

5. MANIPULACIÓN DE PPQQ

La manipulación de productos químicos conlleva un riesgo. Hay que estar informado de cómo manipularlos para evitar que dichos riesgos se materialicen en accidentes.

Las sustancias peligrosas son aquellas que pueden producir un daño a la salud de las personas o un perjuicio al medio ambiente

Recomendaciones en la manipulación

- Antes de manipular un producto nuevo o no habitual **lea la información de su Ficha de Datos de Seguridad (FDS)** y actúe conforme a sus indicaciones.
- Utilice **vitrinas de extracción** de gases y humos, si tiene que seguir manipulando durante el proceso, bajando la ventanilla a media altura para protegerse y siempre que así lo indique la Ficha de Datos de Seguridad (FDS) del producto que manipulemos.
- Utilice **campana de aspiración** con ventana cerrada, si durante el proceso no es necesario manipular (p.e.: funcionamiento de rotavapor, estufa, ..etc. que solo se pone en marcha y se aísla dicho proceso, y cuando acaba se abre la ventana y se concluye).
- **Mantenga los recipientes** que contienen sustancias químicas **cerrados** cuando no trabaje con ellos así evitamos emanaciones de vapores.
- **Si está embarazada o en periodo de lactancia**, comuníquelo al director de centro y/o a la Unidad de SST, para que se inicie el **protocolo** al respecto.
- **No coma, beba, fume, aplique cosméticos o manipule lentes de contacto** en la zona de trabajo en las que manipule o almacene agentes químicos.
- **No caliente alimentos o bebida en hornos o microondas** destinados para uso de trabajo con agentes químicos, ni almacene alimentos ni bebidas para consumo humano en armarios, cajones, frigoríficos destinados para almacenar agentes químicos ni en la zona de trabajo del laboratorio y cámara frigorífica.
- **Lávese las manos antes de abandonar** las zonas de trabajo del laboratorio en las que a manipulado agentes químicos.
- Mantengan la **ropa de trabajo limpia** y sin manchas de productos químicos.
- **No utilizar la bata fuera de la zona de trabajo** en las que se manipulen o almacenen agentes químicos, por ejemplo en comedores, oficinas, biblioteca, salas de reunión...
- **Guardar la bata utilizada** durante su trabajo con agentes químicos **en taquillas o percheros distintos** a los que guarda la ropa de calle y siga el protocolo establecido para lavarla. No la lleve a lavar a su casa y consulte el procedimiento de limpieza.
- **En caso de rotura de un guante de protección, cámbielo inmediatamente**, lávese y séquese las manos con el papel destinado para ello, antes de ponerse otro nuevo.
- **En caso de accidente** con productos químicos siga las indicaciones de su Ficha de Datos de Seguridad (FDS).
- Mantenga su **puesto de trabajo limpio, ordenado y libre de materiales** no relacionados con el trabajo.
- Cuando termine el producto químico contenido en un envase, deje éste en el lugar habitual para que sea recogido y gestionado como residuo.
- **No reutilice envases vacíos contaminados** con agentes químicos.
- **Etiquetar** tanto el recipiente al que se ha trasvasado el producto como el recipiente del que se ha trasvasado.
- **Evitar en la sala de laboratorio el trasvase desde recipientes grandes.** El trasvase corriente en sala de análisis de un recipiente de 1 litro a una probeta, con mayor capacidad es peligroso.

- Efectuar el llenado de recipientes de boca estrecha con un **embudo** o elementos dosificadores, y manteniendo a corta distancia los recipientes de lo que se está trasvasando, para evitar derrames y salpicaduras, y siempre con recipientes de pequeña capacidad.
- **Disponer de un sistema de visualización para comprobar el nivel de la carga del recipiente** con el fin de evitar derrames por rebosado.
- Realice el **transvase de agentes químicos** de un recipiente a otro con ayuda de un embudo • Pipetee las soluciones que contengan agentes químicos con **dispositivos de pipeteo**. Nunca pipetee con la boca.
- Utilizar los **equipos de protección individual** indicados para el trabajo a realizar (ver FDS).
- **Delimitar los derrames peligrosos**. Para eliminar los derrames, emplear sistemas de absorción seguros, que a ser posible ejerzan una acción neutralizante. Disponer de sustancias neutralizadoras para cada caso y agua abundante para limpieza. Hay que tener en cuenta que el serrín es un polvo combustible que en ningún caso debe utilizarse para absorber líquidos inflamables, ya que acrecentaría aún más la inflamabilidad.
- Situar **duchas de emergencia y fuentes lavaojos** en las proximidades.
- **Comunique** al responsable del laboratorio **todos los derrames, accidentes y exposiciones** reales o potenciales a agentes químicos.
- **Limpie la superficie de trabajo cuando se produzca un derrame y al final de cada jornada** de trabajo.
- **Evite trabajar solo en el laboratorio** o zona donde manipule agentes químicos.



Antes de comenzar con la recopilación de la información es importante **hacerse unas cuantas preguntas en relación con las tareas que realizamos habitualmente en el trabajo y por qué.**



6. ALMACENAMIENTO DE PPQQ (APQ)

Disponer en el área de trabajo solamente de los productos que se vayan a utilizar y mantener el resto de los productos en el área de almacenamiento separado. Por tanto, en la sala de análisis no se debe almacenar productos químicos, tan solo se dispondrá las cantidades de utilización diaria, en armarios de 90 minutos de resistencia al fuego (90 RF) y en su interior separados por compatibilidades.

Será necesario que la organización del laboratorio disponga de una unidad logística para ir suministrado los productos necesitados de los almacenes centrales a la sala de análisis, y nunca acumular y convertirla en un serio peligro.

6.1. CONSIDERACIONES GENERALES ALMACENAMIENTO DE PRODUCTOS QUÍMICOS

Por un lado, el almacenamiento de productos químicos presenta unas características de peligrosidad que pueden materializarse en accidentes importantes si no se han tomado las medidas técnicas u organizativas necesarias.

Estos riesgos están relacionados con

- la peligrosidad intrínseca de los productos,
- la cantidad almacenada,
- el tipo y tamaño del envase,
- la ubicación del almacén,
- la distribución dentro del mismo,
- su gestión,
- el mantenimiento de las condiciones de seguridad y
- el nivel de formación e información de los trabajadores usuarios del mismo.

Otra característica del almacén de productos químicos del laboratorio es la diversidad de productos con unas características fisicoquímicas y propiedades toxicológicas diversas, algunos de ellos clasificados como muy tóxicos. Las cantidades suelen ser pequeñas y en recipientes que la mayoría de 1 litro (excepcionalmente 2,5 L), lo que muchas veces implica que el almacenamiento de productos químicos de laboratorio este exento de la normativa reglamentaria vigente considerándose la aplicación de recomendaciones técnicas que se basan en ella.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que el almacenamiento prolongado de los productos químicos representa en sí mismo un peligro, ya que dada la propia reactividad intrínseca de los productos químicos pueden ocurrir distintas transformaciones:

- Formación de peróxidos inestables con el consiguiente peligro de explosión al destilar la sustancia o por contacto.
- Polimerización de la sustancia que, aunque se trata en principio de una reacción lenta, puede en ciertos casos llegar a ser rápida y explosiva.
- El recipiente que contiene el producto puede atacarse y romperse por sí sólo, envejece volviéndose más frágil y romperse.
- Descomposición lenta de la sustancia produciendo un gas cuya acumulación puede hacer estallar el recipiente.
- Con acumulación de gas por descomposición lenta de la sustancia que llegue a romper el recipiente,

6.2. MEDIDAS PARA REDUCIR EL RIESGO DE ALMACENAMIENTO PPQQ (APQ)

Primeramente el lugar de almacenamiento se debe diseñarse adecuadamente al tipo de laboratorio. no es recomendable los almacenamiento en sistema de península, ya que el personal puede quedar parcialmente encerrado entre estanterías y en caso de accidente puede verse dificultado en su intento de retirada de la zona.

No es bueno diseñar un gran almacén, es mejor diseñar muchos pequeños boxes de 2,50m x 2,50m, con estanterías a derecha e izquierda con baldas de poca profundidad unos 30 cm (para no acumular y dejar envases en su fondo que caduquen), preferentemente ventilación natural e iluminación también natural (para evitar chispas).

Son normas generales para la reducción del riesgo en el almacenamiento de los productos químicos:

- Mantener el stock al mínimo operativo, lo que redundará en aumento de la seguridad y reducción de costes, y disponer de un lugar específico (almacén, preferiblemente externo al laboratorio) convenientemente señalizado, guardando en el laboratorio solamente los productos imprescindibles de uso diario.
- Considerar las características de peligrosidad de los productos y sus incompatibilidades,
 - + agrupando los de características similares,
 - + separando los incompatibles y
 - + aislando o confinando los de características especiales: muy tóxicos, cancerígenos, explosivos, pestilentes, etc.
- Comprobar que todos los productos están adecuadamente etiquetados, llevando un registro actualizado de productos almacenados. Se debe indicar la fecha de recepción o preparación, nombre del técnico responsable y de la última manipulación.
- Disponer de la Ficha de Datos de Seguridad (FDS), de todas las sustancias químicas almacenadas.
- Disponer de un listado actualizado de las sustancias químicas presentes en el almacén, así como de las cantidades almacenadas.
- Mantener un control de fechas, tanto de adquisición como de la fecha de apertura del envase, para realizar un control de caducidad y sobre todo de los productos peroxidables (éter etílico, éter isopropílico, dioxano, etc.).
- Implantar procedimientos de orden y limpieza, y comprobar que son seguidos por los trabajadores.
- Planificar las emergencias tales como la actuación en caso de una salpicadura, un derrame o rotura de un envase, un incendio y otras.
- Formar e informar a los trabajadores sobre los riesgos de almacenamiento de productos, como prevenirlos y como protegerse.
- No se deben almacenar productos químicos en pasillos ni lugares de paso, en huecos de escalera, en vestíbulos.
- Emplear armarios de seguridad de RF-30 como mínimo, lo que reduce el riesgo del almacenamiento reducido en el propio laboratorio y permite técnicamente (ICT-MIE-APQ-001) guardar mayores cantidades de productos inflamables. Emplear armarios específicos para corrosivos, especialmente si existe la posibilidad de la generación de vapores.
- Emplear frigoríficos antideflagrantes o de seguridad aumentada para guardar productos inflamables muy volátiles imprescindibles.

PARA LA SEPARACIÓN SE REALIZARÁ de la siguiente forma:

- Por islas o estanterías, en función del tamaño del almacén.
 - El sistema de separación de islas consiste en dedicar una serie de estanterías a una familia determinada, situándolas agrupadas de modo que a su alrededor queden pasillos.
 - El sistema de estanterías consiste en separar las distintas sustancias incompatibles, intercalando entre ellas sustancias inertes.

Además de lo anterior, se tendrán en cuenta **las siguientes recomendaciones:**

- Los envases pesados se colocarán en baldas o estantes inferiores.
- Los ácidos y bases fuertes irán ocupando situaciones a más bajo nivel cuanto mayor sea su agresividad.
- Distanciar los reactivos sensibles al agua de posibles tomas o conducciones de ésta.

Aislamiento/Confinamiento, de aquellos productos que por su actividad biológica o sus características físico-químicas lo precisen, como son:

- cancerígenos o de alta toxicidad: Se deben almacenar en un recinto o armario específico, convenientemente rotulado y bajo llave. El control de stock debe ser riguroso en lo referente a entradas de material y consumos, y atender a las condiciones de salida y retorno de los envases, con el fin de actuar prontamente cuando éstos presenten defectos.
- sustancias pestilentes: Se recomienda su confinamiento en pequeños recintos o armarios equipados con un sistema de ventilación adecuado.
- sustancias inflamables: Estos tipos de sustancias deberán de ser almacenadas en los correspondientes Armarios Protegidos (RF-15, resistencia al fuego) o bien, para aquellas sustancias inflamables muy volátiles, en armarios frigoríficos especialmente diseñados para ello (antideflagrantes o de seguridad aumentada).

6.3. OBLIGACIONES DE LOS TITULARES DE ALMACENAMIENTO PQ EN PROTECCIÓN DE DERRAMES

Los establecimientos que produzcan, usen, manipulen y almacenen productos químicos susceptibles de poder verter al medio aguas contaminadas, en situaciones normales o en situaciones de emergencia, deberán estudiar y proyectar un sistema de contención y retención, adecuado.

En este sistema se deberá prever la contención y retención de los episodios accidentales que se puedan ocasionar, tales como

- grandes derrames,
- aguas de extinción de incendios contaminadas,
- limpiezas o aguas de inundación o lluvia contaminadas.

Se deben realizar proyectos de estanqueidad de las instalaciones, donde se utilicen diferentes técnicas, como barreras mecánicas, barreras móviles, sobre elevaciones, obturadores superficiales y subterráneos, obra civil, etc....con sistemas de actuación manuales, automáticos o a distancia.

Para ello se pueden realizar:

- Redes de drenaje que conducen el derrame o vertido a una balsa de retención denominada "calamity tank".
- Instalación de vados o sobreelevaciones para contener derrames.
- Redes de drenaje con sistemas de obturación a final de línea y retención en superficie.
- Barreras mecánicas para la sectorización de las zonas con posibles derrames: puertas peatonales, puertas de acceso o muelles de carga.
- Barreras de contención para proteger la salida o entrada de grandes volúmenes en superficie.

6.4. OTRAS INDICACIONES/RECOMENDACIONES DE APQ

- Los almacenes de productos químicos se deben **revisar periódicamente y retirar productos caducados o no utilizados**. Al mismo tiempo actualizar la lista de reactivos (por lo menos una vez al año).
- **Es obligatorio leer** y seguir las indicaciones del fabricante (ver FDS).
- **No es recomendable el trasvase de productos**. Todo envase que se vuelva a utilizar se deberá etiquetar correctamente. La etiqueta deberá contener el nombre concreto de la sustancia o preparado que contiene, la fecha de preparación y el nombre de la persona que la preparó. Cuando se considere conveniente se harán además advertencias sobre precauciones en el almacenamiento, manipulación y otros aspectos.
- Toda **sustancia almacenada en nevera** debe estar en un recipiente con tapa correctamente sellada.
- No utilizar las neveras de reactivos **para almacenar comida**.
- Las vitrinas de extracción no se deben utilizar para almacenar productos. Alteran el correcto flujo de aire y eliminan espacio de trabajo. **No se debe trabajar en una vitrina compartiendo otros productos químicos**.
- No se deben usar frascos de más de 2,5 litros de capacidad para almacenar reactivos (recomendable trabajar con recipientes máximo de 1 litro son infinitamente menos peligrosos).
- Los frascos pequeños se deben **transportar en cajas o envases estancos** y nunca cogiéndolos por el cuello o abrazándolos. Cuando se deberán transportar varios envases se harán en carros o carretillas especiales.
- El responsable del laboratorio deberá **nombrar a una o más personas encargadas de la gestión del almacén de productos químicos**.
- **Comprobar que los productos están adecuadamente etiquetados**. En la etiqueta es donde está la primera información sobre los riesgos de los productos químicos en los pictogramas de riesgo y las frases H, lo cual es una primera información útil para saber cómo hay que almacenar los productos.
- Disponer de su **Ficha de Datos de Seguridad (FDS)**. Llevar un registro actualizado de la recepción de los productos que permita evitar su envejecimiento.
- **Agrupar y clasificar los productos por su riesgo** respetando las restricciones de almacenamientos, así como las cantidades máximas recomendadas. Las separaciones podrán efectuarse, en función del tamaño del almacén, bien por el sistema de islas, bien por el de estanterías.
- **Ciertos productos tales como, cancerígenos e inflamables** requieren el aislamiento del resto debido a los riesgos que pueden producir.
- El **“almacenamiento” de productos inflamables en el interior del laboratorio** se realizará en armarios protegidos de RF mayor de 15 minutos, que deberán llevar un cartel visible con la indicación de inflamable y, no se podrán instalar más de 3 armarios en la misma dependencia
- **En el caso de uso de estanterías**, estrados, soportes de madera estas serán macizas y de un espesor mínimo de 25 mm.
- **Limitar el stock de productos** y almacenar sistemáticamente la mínima cantidad posible.
- **Disponer en el área de trabajo solamente de los productos que se vayan a utilizar** y mantener el resto de los productos en un área de almacenamiento.
- **Los almacenes de productos tóxicos** en laboratorios estarán dotados de ventilación forzada, que tengan salida al exterior.
- **Implantar procedimientos de orden y limpieza** y comprobar que son seguidos por los trabajadores.
- **Planificar las emergencias** tales como la actuación en caso de una salpicadura, un derrame o rotura de un envase, un incendio, etc.
- **Formar e informar a los trabajadores** sobre los riesgos del almacenamiento de productos, como prevenirlos y como protegerse.
- **Prohibido fumar**.
- **Prohibido utilizar llamas abiertas o fuentes de ignición**.

7. ACTUACIONES EN INCIDENTES/ACCIDENTES POR PPQQ

ACCIDENTES

El laboratorio debe disponer de una organización de primeros auxilios adecuada al número de trabajadores y riesgo existente, según el RD 486/97 sobre lugares de trabajo. Todo el personal debe recibir formación sobre la conducta a seguir en caso de accidente, siendo recomendable la presencia de personas con conocimientos de socorrismo.

El **botiquín** no es un elemento demasiado importante en la organización de los primeros auxilios en el laboratorio, a pesar de que así es considerado por muchos profesionales. Aparte del contenido reglamentado (RD 486/97), debe contener el material relacionado con la actuación en caso de pequeños accidentes (pequeñas contusiones, cortes y quemaduras) y los medicamentos autorizados por el médico del trabajo del laboratorio.

NORMA GENERAL

En un lugar bien visible del laboratorio debe colocarse toda la información necesaria para la actuación en caso de accidente: que hacer, a quien avisar, números de teléfono, tanto interiores como exteriores (emergencia, servicio de prevención, mantenimiento, ambulancias, bomberos, mutua, director del laboratorio), direcciones y otros datos que puedan ser interés en caso de accidente, especialmente los referentes a las normas de actuación.

En caso de accidente debe **activarse el sistema de emergencia (PAS: Proteger, Avisar, Socorrer)**. Al comunicarse, se debe dar un mensaje preciso sobre:

- Lugar donde ha ocurrido el accidente.
- Tipo de accidente (intoxicación, quemadura térmica o química, herida, etc.).
- Número de víctimas.
- Estado aparente de las víctimas (consciencia, sangran, respiran, etc.).
- No colgar antes de que el interlocutor lo haya autorizado, ya que puede necesitar otras informaciones complementarias.
- Disponer de una persona del laboratorio que reciba y acompañe a los servicios de socorro con el fin de guiarlos rápidamente hasta el lugar del accidente.

Salpicaduras en los ojos y sobre la piel

Sin perder un instante lavarse con agua durante 10 o 15 minutos, empleando si es necesario la ducha de seguridad; quitarse la ropa y objetos previsiblemente mojados por el producto. Si la salpicadura es en los ojos, emplear el lavaojos durante 15-20 minutos, sobre todo si el producto es corrosivo o irritante. No intentar neutralizar y acudir al médico lo más rápidamente posible con la etiqueta o ficha de seguridad del producto.

Mareos o pérdida de conocimiento debido a una fuga tóxica que persista

Hay que protegerse del medio con un aparato respiratorio antes de aproximarse a la víctima. Trasladar al accidentado a un lugar seguro y dejarlo recostado sobre el lado izquierdo. Aflojarle la ropa o todo aquello que pueda oprimirlo, verificando si ha perdido el sentido y si respira; tomarle el pulso. Activar el PAS y, practicar, si es necesario, la reanimación cardio-respiratoria. No suministrar alimentos, bebidas ni productos para activar la respiración.

Electrocución

La electrocución o choque eléctrico tiene lugar cuando, por un contacto eléctrico directo o indirecto, una persona pasa a formar parte de un circuito eléctrico, transcurriendo por su organismo una determinada

intensidad eléctrica durante un tiempo. La intensidad depende del voltaje y de la resistencia del organismo, que a su vez, depende del camino recorrido y de factores fisiológicos. Las acciones a llevar a cabo cuando alguien queda "atrapado" por la corriente son las siguientes:

- Cortar la alimentación eléctrica del aparato causante del accidente antes de acercarse a la víctima para evitar otro accidente y retirar al accidentado.
- Activar el PAS y, practicar, si es necesario, la reanimación cardio-respiratoria.
- No suministrar alimentos, bebidas ni productos para activar la respiración.

Quemaduras térmicas

Las instrucciones básicas para el tratamiento de quemaduras térmicas son: lavar abundantemente con agua fría para enfriar la zona quemada, no quitar la ropa pegada a la piel, tapar la parte quemada con ropa limpia. Debe acudir siempre al médico, aunque la superficie afectada y la profundidad sean pequeñas. Son recomendaciones específicas en estos casos:

- No aplicar nada a la piel (ni pomada, ni grasa, ni desinfectantes).
- No enfriar demasiado al accidentado.
- No dar bebidas ni alimentos.
- No romper las ampollas.
- No dejar solo al accidentado.

Intoxicación digestiva

Debe tratarse en función del tóxico ingerido, para lo cual se debe disponer de información a partir de la etiqueta y de la ficha de datos de seguridad. La actuación inicial está encaminada a evitar la acción directa del tóxico mediante su neutralización o evitar su absorción por el organismo. Posteriormente, o en paralelo, se tratan los síntomas causados por el tóxico. Es muy importante la atención médica rápida, lo que normalmente requerirá el traslado del accidentado, que debe llevarse a cabo en condiciones adecuadas. No debe provocarse el vómito cuando el accidentado presenta convulsiones o está inconsciente, o bien se trata de un producto corrosivo o volátil. Para evitar la absorción del tóxico se emplea carbón activo o agua albuminosa. Existe una lista de antídotos recomendada por la UE (Anexo III de la Resolución 90/329/03). En caso de pequeñas ingestiones de ácidos, beber solución de bicarbonato, mientras que se recomienda tomar bebidas ácidas (refrescos de cola) en el caso de álcalis.

EL SERVICIO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA (24 H):

 <p>Emergencias y consultas toxicológicas</p> <p>915 620 420</p>	 <p>El Servicio de Información Toxicológica (SIT) del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF), dependiente del Ministerio de Justicia,</p>
---	--

8. BIBLIOGRAFIA

- **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 (**Reglam. REACH**, acrónimo del inglés *Registration Evaluation Authorisation and Restriction of CHemicals*).
- **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 (**Reglam. CLP**, acrónimo del inglés *Classification, Labelling and Packaging*).
- **Real Decreto 656/2017**, de 23 de junio, por el que se aprueba el Reglamento de Almacenamiento de Productos Químicos y sus Instrucciones Técnicas Complementarias MIE APQ 0 a 10. (Reglam. APQ)
- **Guía técnica RAPQ (2021)**

REAL DECRETO 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.

- **REAL DECRETO 396/2006**, de 31 de marzo, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud aplicables a los trabajos con riesgo de exposición al amianto.
- **REAL DECRETO 665/1997**, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo.
- **Guía técnica (INSST)** para la evaluación y prevención de los riesgos para la utilización por los trabajadores en el trabajo de equipos de protección individual.
- **Guía técnica (INSST)** para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición durante el trabajo a agentes cancerígenos o mutágenos.
- Buenas Prácticas en PRL “**Manual de Seguridad en el laboratorio**” Xunta de Galicia (2017).
- **NTP-166 (1986)**: Dermatitis por agentes químicos: prevención.
- **NTP-672 (2004)**: Extracción localizada en el laboratorio.
- **NTP-673 (2004)**: La sustitución de agentes químicos peligrosos: aspectos generales.
- **NTP 725 (2006)**: Almacenamiento de productos químicos.
- **NTP- 726 (2006)**: Clasificación y etiquetado de productos químicos: sistema mundialmente armonizado (GHS)
- **NTP-727 (2006)**: Clasificación y etiquetado de productos químicos: comparación entre el GHS y la reglamentación europea
- **NTP-750 (2006)**: Evaluación del riesgo por exposición inhalatoria de agentes químicos. Metodología simplificada.
- **NTP-935 (2012)**: Agentes químicos: evaluación cualitativa y simplificada del riesgo por inhalación (I). Aspectos generales.
- **NTP 936 (2012)**: Agentes químicos: evaluación cualitativa y simplificada del riesgo por inhalación (II). Modelo COSHH Essentials.
- **NTP-937 (2012)**: Agentes químicos: evaluación cualitativa y simplificada del riesgo por inhalación (III). Método basado en el INRS.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 16

RESIDUOS PELIGROSOS GENERADOS EN LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS. CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS. GESTIÓN (INTERNA Y EXTERNA) DE LOS MISMOS.

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.

**RESIDUOS PELIGROSOS GENERADOS EN LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS.
CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS. GESTIÓN (INTERNA Y EXTERNA) DE LOS MISMOS.**

ÍNDICE

- 1. RESIDUOS PELIGROSOS GENERADOS EN LABORATORIOS AGROALIMENTARIOS**
- 2. CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS**
- 3. GESTIÓN INTERNA DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS**
- 4. GESTIÓN EXTERNA DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS**
 - 4. a Entrega de los residuos peligrosos a un transportista / gestor autorizado.**
 - 4. b Alcance y descripción de los trabajos y servicios realizados por el gestor autorizado**
- 5. BIBLIOGRAFIA**

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	(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).



DE UNA ECONOMÍA LINEAL PASEMOS HACIA UNA **ECONOMÍA CIRCULAR**



LA JERARQUIA DE LA GESTIÓN DE RESIDUOS



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.

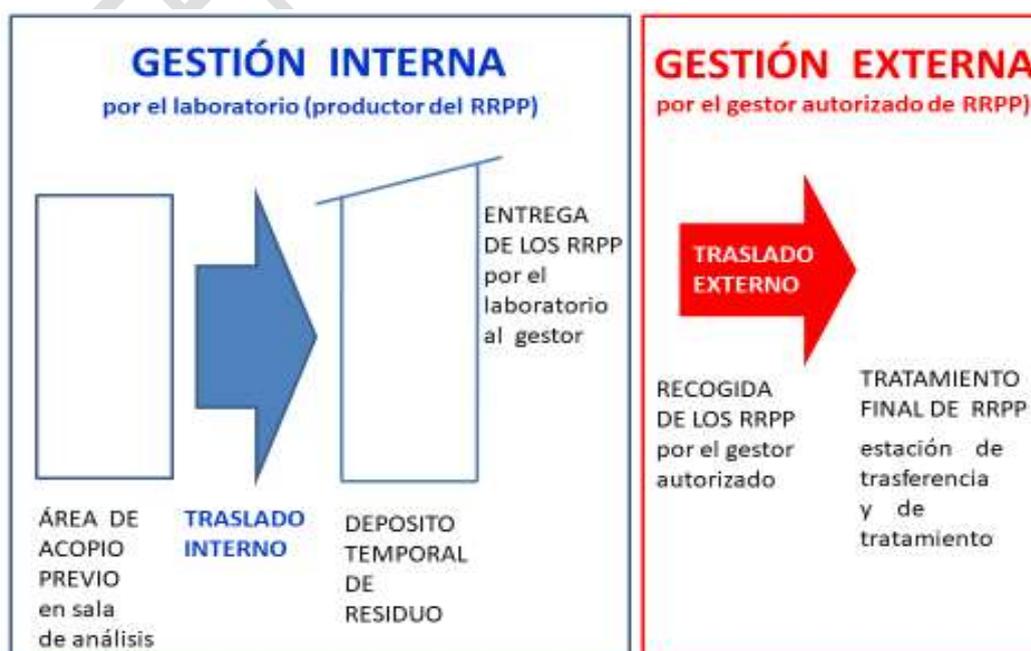
GESTIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS (RRPP) EN EL LABORATORIO

→ **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.

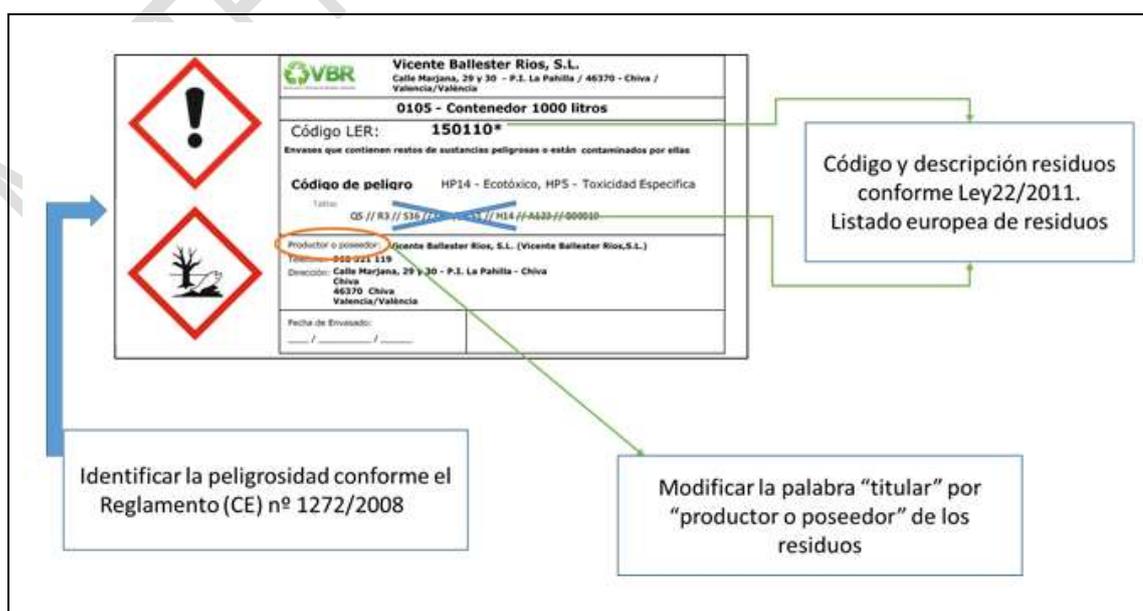
ETIQUETADO de RRPP:

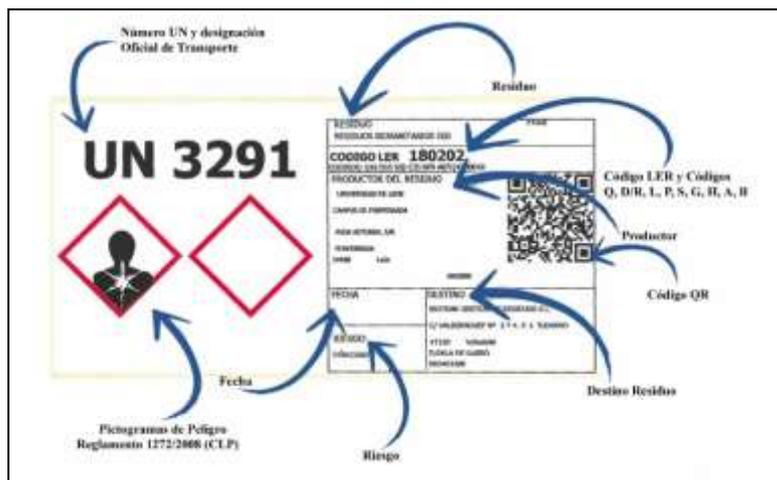
Se etiquetarán los envases de forma clara y legible, con etiquetas que contengan la información precisa para identificar el residuo, su procedencia y su gestión posterior.

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.

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.

CARACTERÍSTICAS DE PELIGROSIDAD DE RESIDUOS		PICTOGRAMA
HP 1	“Explosivo” : corresponde a los residuos que, por reacción química, pueden desprender gases a una temperatura, presión y velocidad que pueden ocasionar daños a su entorno.	
HP 2	“Comburente” : corresponde a los residuos que, generalmente liberando oxígeno, pueden provocar o facilitar la combustión de otras sustancias.	
HP 3	“Inflamable” : corresponde a los residuos sólidos, líquidos o gaseosos que en contacto con el aire o con el agua inflaman con facilidad.	
HP 4	“Irritante” : corresponde a los residuos que pueden provocar irritaciones cutáneas o lesiones oculares	
HP 5	“Toxicidad por aspiración” : corresponde a los residuos que pueden provocar efectos una toxicidad específica en determinados órganos, bien por una exposición única o bien que pueden provocar efectos tóxicos agudos por aspiración.	
HP 6	“Toxicidad aguda” : corresponde a los residuos que pueden provocar efectos tóxicos agudos tras la administración por vía oral o cutánea o como consecuencia de una exposición por inhalación.	
HP 7	“Carcinógenos” : corresponde a los residuos que inducen cáncer o aumentan su incidencia.	
HP 8	“Corrosivos” : corresponde a los residuos que, cuando se aplican, pueden provocar corrosión cutánea.	
HP 9	“Infeccioso” : corresponde a los residuos que contienen microorganismos viables o sus toxinas de los que se sabe o existen razones fundadas para creer que causan enfermedades en el ser humano o en otros organismos vivos.	SIN PICT
HP 10	“Tóxico para la reproducción” : corresponde a los residuos que tienen efectos adversos sobre la función sexual y la fertilidad de hombres y mujeres adultos, así como sobre el desarrollo de los descendientes.	
HP 11	“Mutágeno” : corresponde a los residuos que pueden provocar una mutación, es decir, un cambio permanente en la cantidad o en la estructura del material genético de una célula.	
HP 12	“Liberación de un gas con toxicidad aguda” : corresponde a los residuos que emiten gases de toxicidad aguda en contacto con agua o con un ácido.	SIN PICT
HP 13	“Sensibilizante” : corresponde a los residuos que contienen una o varias sustancias que se sabe tienen efectos sensibilizantes para la piel o los órganos respiratorios.	
HP 14	“Ecotóxico” : corresponde a los residuos que presentan o pueden presentar riesgos inmediatos o diferidos para uno o más compartimentado del medio ambiente.	
HP 15	“Residuos que pueden presentar una de las características de peligrosidad antes mencionadas que el residuo original no presentaba directamente” .	SIN PICT

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 I 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. GESTIÓN INTERNA DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS

Clasificación y recogida selectiva de los residuos peligrosos (RRPP)
y traslado a los depósitos temporales de residuos (DTR)



- La **RECOGIDA** de residuos peligrosos (RRPP)
- IDENTIFICACIÓN y CARACTERIZACIÓN** (clasificación y segregación) de los RRPP generados.
- ACOPIO y ENVASADO** de los RRPP
- ETIQUETADO** de los RRPP.
- TRASLADO INTERIOR** de los residuos desde las zonas de acopio previos a los almacenes de los RRPP (depósitos temporales de residuos - DTR)
- Control del almacenamiento de los RRPP**

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 productos recién llegados 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 emplea 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.

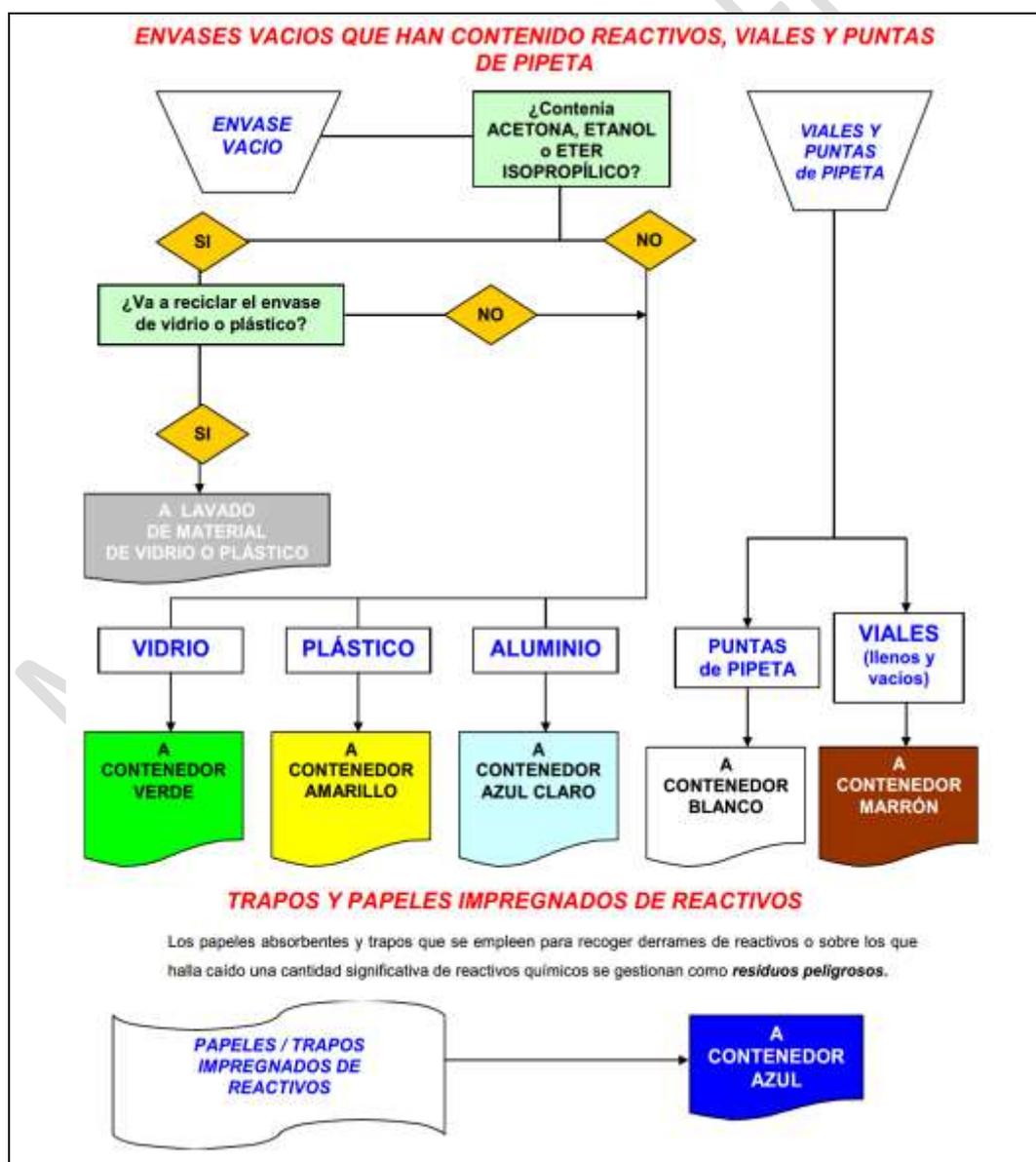
Residuos específicos por departamentos

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.



Para el acopio y envasados de los residuos peligrosos (RRPP) generados en los departamentos de análisis, cada **Jefe de departamento de análisis**

- + **comprueba** que el número de envases y su estado físico es adecuado para las necesidades del personal a su cargo, igualmente
- + **comprueba** que los envases están identificados de acuerdo al tipo y características de RP que contienen, de modo que no se puedan mezclar distintos residuos peligrosos entre sí (analizando incompatibilidades).

En la sala de análisis, por prevención **NO SE DEBERÍA PERMITIR GRANDES TRASVASES**. únicamente la extracción del envase (máx de 2,5 litros) al uso, incluso debería bajarse a 1 litro. **POR PELIGROSO EN LABORATORIO.**

Requisitos de los ENVASES O CONTENEDORES para depositar residuos:

- + **Material apropiado** al residuo a transportar;
- + **Tamaño adecuado** al residuo a transportar. (En laboratorio muy limitado);
- + **Cerrados herméticamente**;
- + Poseer **etiqueta e identificación** que informe del tipo de residuo y su peligrosidad.



Se deberá

ESTUDIAR EL RECORRIDO DE CIRCULACIÓN de los residuos, controlando contaminaciones cruzadas con el resto del laboratorio.

El resto de residuos peligrosos que generan en el Laboratorio, como consecuencia de las **actividades de mantenimiento** y el **trabajo de oficina**, se depositan en los contenedores habilitados e identificados para cada tipo de residuos por el Responsable del SGA o en su caso el responsable de residuos.

4º. Etiquetado de los residuos peligrosos (RRPP).

Mientras los envases que contienen residuos peligrosos permanecen en los puntos de generación (zonas de acopio previo), se identifican **mediante los rótulos de "RETIRAR"** (nunca usar el término "tirar").

Los envases se acopian y permanecen previamente en cada departamento de laboratorio hasta que se llenan (se considera que un envase está lleno cuando alcanza el 80 % de su capacidad). Es bueno remarcarlo con una línea con rotulador indeleble para recordarlo.

Si se tarda en llenarlos, habrá que retirarlos en caso de degradación (por peroxidación por ejemplo)

El propio personal (formado e informado) de cada laboratorio se encarga de **cerrar los envases llenos**.



5º. Traslado de los residuos desde las zonas de acopio previos

Los envases de residuos peligrosos, que se han llenado y cerrado de acuerdo con la sistemática establecida, son **trasladados** por el personal designado hasta los almacenes de residuos peligrosos del Laboratorio (**Depósitos Temporales de Residuos**).

Este traslado desde el los áreas de acopio previo, se realiza durante la jornada en la que dicho envase se ha cerrado, evitando de este modo acumular residuos peligrosos en las zonas de trabajo.



Retirada de residuos de los departamentos

- ▶ Los envases de residuos peligrosos, que se han llenado y cerrado de acuerdo con la sistemática, son trasladados por el personal designado hasta el almacén de residuos peligrosos del Laboratorio (ó Depósitos Temporales de Residuos). La persona encargada en el departamento de supervisar la retirada de los residuos cumplimentará la ficha "Solicitud de Retirada de Residuos" utilizando el formato del sistema.
- ▶ Este traslado se realiza durante la jornada en la que dicho envase se ha cerrado, evitando de este modo acumular residuos peligrosos en las zonas de trabajo.
- ▶ Los aparatos eléctricos y electrónicos que se dejen de utilizar en los departamentos serán retirados, por el personal designado, hasta el almacén de aparatos eléctricos y electrónicos. La persona encargada en el departamento de supervisar la retirada del aparato cumplimentará la ficha "Solicitud de retirada de aparatos eléctricos y electrónicos" utilizando el formato del sistema.
- ▶ El traslado se realizará en el momento en que el responsable del departamento considere el aparato como fuera de uso en ese departamento para evitar su acumulación en las zonas de trabajo y lo dé de baja según lo estipulado en el Sistema de Gestión de la Calidad del Laboratorio.

6º. Control del almacenamiento de los residuos peligrosos

El Responsable de los residuos se asegura que el tiempo de almacenamiento de los RRPP no supera los seis meses (establecido en la Ley de Residuos); y en caso contrario solicita una autorización justificativa de prórroga de almacenamiento a la autoridad competente de la Comunidad Autónoma para que sea concedida.

El **etiquetado de los envases** finales de los RP se realiza cuando se procede a su entrada en el almacén de residuos peligrosos del Laboratorio (Depósito Temporal de Residuos), con las particularidades que se detallan a continuación:

- a. El almacén de RRPP dispondrá de una serie de estantería en la que se depositan los RRPP, los envases que contienen reactivos usados (en el envase de origen) no se etiquetan, en este caso son las baldas de la estantería las que se etiquetan, de tal modo que cada balda sólo contienen envases correspondientes a un tipo de RP (un número de aceptación del gestor de residuos peligrosos del Laboratorio).
- b. El responsable de la gestión de RRPP, lleva al día el registro de los residuos peligrosos producidos en el Laboratorio, para este fin emplea el "Registro de Residuos Peligrosos". En este registro se consignan los siguientes datos para cada partida de RP entregados a gestor autorizado:
 - Origen.
 - Frecuencia de recogida.
 - Medio de transporte.
 - Fecha de inicio del almacenamiento.
 - Fecha de cesión del residuo.
 - Naturaleza del residuo.
 - Código del residuo según el Anexo I del RD 833/1988.
 - Código LER del residuo.
 - Cantidad (Kg).
 - Identificación del Documento de Control y Seguimiento (DCS) de la recogida del residuo.
- c. En el caso de los aparatos eléctricos y electrónicos (AEE) serán marcados de manera visible, legible e indeleble tal y como establece la legislación vigente, igualmente serán etiquetados por la persona responsable de clasificar estos residuos en el almacén del modo siguiente:

Residuo de aparato eléctrico y electrónico que no contienen elementos peligroso	RP AEE
Residuo de aparato eléctrico y electrónico que contienen elementos peligrosos	RP AEE
Residuo de aparato eléctrico y electrónico que contienen elementos especialmente peligroso	RP AEE

4. GESTIÓN EXTERNA DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS

4. a Entrega de los residuos peligrosos a un transportista / gestor autorizado.

El Laboratorio deberá disponer, y mantener un procedimiento (o parte de otro) que describa las operaciones a realizar desde el momento que depositan en sus zonas de almacenamiento (Depósito Temporal de Residuos) y hasta que son recogidos por un gestor autorizado.

El laboratorio con la inscripción preceptiva de productor de residuos, previa toda actuación al respecto. El Laboratorio entrega todos los residuos peligrosos que genera a un transportista / gestor autorizado de residuos peligrosos. La entrega se realiza con una periodicidad tal que garantiza que estos residuos nunca permanecen en el almacén de residuos peligrosos del Laboratorio durante más de seis meses (que fija la Ley de residuos).

El responsable de la gestión de residuos peligrosos, comprueba, antes de realizar la entrega de los residuos peligrosos, que el vehículo del gestor o transportista que acude al centro se encuentra incluido en la correspondiente autorización de gestor o de transportista. Si este requisito no se cumple no se permite la salida de los residuos peligrosos del centro.

En el caso de aparatos eléctricos y electrónicos que vayan a ser sustituidos serán retirados por el distribuidor en el momento de la entrega del nuevo aparato. Si en algún caso, esto no fuera posible se realizará a través de gestor autorizado.

Los residuos generados como consecuencia de las actividades de mantenimiento son gestionados por las empresas contratadas por el Laboratorio.

1º. Contrato de Tratamiento (documento de aceptación) de residuos peligrosos.

Antes de la primera entrega a un transportista / gestor autorizado el Responsable de la gestión de residuos peligrosos del Laboratorio, remite al gestor elegido una solicitud de admisión por cada tipo de residuo que el laboratorio pretende entregarle.

El Responsable de la gestión de residuos peligrosos del Laboratorio facilita al gestor la información complementaria que este solicite o una muestra del residuo a gestionar, si fuera necesario.

Si la contestación del gestor resulta afirmativa, (en el sentido que se hará cargo de la recogida del residuo), se firmará con dicho gestor un “Contrato de Tratamiento de los residuos” (Artículo 5 del RD 180/2015, BOE 07/04/2015), dicho contrato (que se firmará para cada residuo) contempla los siguientes datos:

- ♦ El número de aceptación del residuo;
- ♦ Datos del Operador;
- ♦ El Origen del Traslado;
- ♦ El Destino del Traslado, que incluye el número de inscripción en el registro del gestor;
- ♦ Las características del residuo que se traslada;
- ♦ Las Obligaciones de las Partes en caso de rechazo del residuo.

2º. Documento de control y seguimiento de residuos peligrosos (ahora “Documento de Identificación de RP”).

El Gestor de Residuos Peligrosos cumplimenta el modelo oficial de “Documento de Control y Seguimiento” (DCS) de los residuos peligrosos, según el modelo oficial de la Comunidad Autónoma, para todos los residuos peligrosos que vayan a ser gestionados y los cuelga en la aplicación Sistema de Información Ambiental de la Comunidad Autónoma.

3º. Notificación de traslado de residuos peligrosos.

El responsable de la gestión de residuos peligrosos, acuerda con el gestor autorizado cuando debe retirar un envío de residuos peligrosos. El gestor autorizado que presta el servicio es el encargado de enviar al órgano competente la “Notificación de traslado” con la antelación que marca la legislación aplicable. El gestor autorizado cuelga este documento de cada RRPP a retirar en la Comunidad Autónoma.

4º. Prórroga del almacenamiento temporal de residuos peligrosos.

Si en alguna circunstancia excepcional se prevé superar los seis meses de almacenamiento de algún residuo peligroso el Director del Laboratorio (a través del responsable de residuos), solicita al órgano competente de la Comunidad Autónoma, una prórroga del almacenamiento con la justificación de la misma para que sea concedida.

Si la prórroga de almacenamiento fuera denegada el Laboratorio se realiza las acciones precisas para gestionar los residuos peligrosos antes de que transcurran los seis meses de plazo.

5º. Notificación de Cambio en los Residuos Peligrosos Producidos

El Director del Laboratorio, notifica, tal como requiere la legislación de la Comunidad Autónoma, cualquier cambio respecto a las condiciones en que el Laboratorio se inscribió en el Registro de Pequeños Productores de Residuos Peligrosos de la Comunidad Autónoma al órgano competente de la Comunidad Autónoma.

6º. Registros a controlar como información documentada.

Para mantener un control de las actividades de gestión de los residuos del Laboratorio, el Responsable del SGA mantiene un archivo de los siguientes registros:

- ♦ Contratos de Tratamiento (documento de aceptación) de residuos peligrosos no peligrosos;
- ♦ Documentos de control y seguimiento (DCS) de residuos peligrosos (ahora “Documento de Identificación de RP”);
- ♦ Concesión de prórroga de almacenamiento de residuos peligrosos, en su caso;
- ♦ Copia de la autorización del gestor de residuos peligrosos;
- ♦ Notificación de los traslados de los residuos peligrosos;
- ♦ Notificación de cambio en la producción de Residuos Peligrosos, en su caso;
- ♦ Documento de Identificación de Residuos No Peligrosos/Carta de Porte de los residuos de envases y del papel/cartón.

4. b Alcance y descripción de los trabajos y servicios realizados por el gestor autorizado

Descripción de las actividades que se llevan a cabo para su correcta ejecución y que consisten en los siguientes puntos:

- ♦ **Planificación de la recogida de residuos** en base a las solicitudes recibidas y las necesidades de los Laboratorios (centros productores).
- ♦ **Desplazamiento de un técnico especializado** para la revisión y la preparación previas a la retirada de residuos. Dicha preparación consiste en:
 - + Envasado correcto en bidones de pequeña capacidad (60L).
 - + Revisión del etiquetado y correcto estado de los envases.
 - + Re-etiquetado de uso, si es necesario, y etiquetado para cumplir con la normativa de transporte de mercancías peligrosas por carretera (ADR).
- ♦ **Control de los residuos peligrosos** generados.
- ♦ **Desplazamiento de personal especializado** para la retirada de residuos y transporte.
- ♦ **Suministro de envases homologados** para el almacenamiento y transporte de residuos peligrosos y de las etiquetas necesarias.
- ♦ **Control de cierre y para su correcto tratamiento**, prevaleciendo siempre la gestión vía valorización y reciclado antes que la eliminación, según marca la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. Estanqueidad de todos los envases, para proceder seguidamente a la retirada de residuos de cada uno de los centros productores, siempre con garantías de seguridad.
- ♦ **Preparación de cargas finales** (flejado y paletizado), en base a cada centro productor y asegurando la compatibilidad entre los productos químicos.
- ♦ **Traslado de residuos a gestor autorizado** a estación o planta de tratamiento

Después del tratamiento

- ♦ **Devolver al laboratorio la Documentación de Control y Seguimiento** con el peso definitivo de cada residuo

5. BIBLIOGRAFIA

Independientemente de aplicar la Ley 31/1995 sobre Prevención de Riesgos Laborales y Reglamentos y Disposiciones que la desarrollen, desde el punto de vista técnico se aplicará:

Desde el punto de vista técnico, el contratista adjudicatario, efectuará los trabajos encomendados, cumpliendo todas las normas legales vigentes aplicables a los mismos, y en especial:

- ⇒ **Ley de Residuos y suelos contaminados para una economía circular** (Ley 7/2022, de 8 de abril). Y desarrollo de la misma.
- ⇒ **Ley de Desechos y Residuos Sólidos Urbanos** (Ley 42/1975 de 19 de noviembre) de la Jefatura de Estado (BOE 21 nov. 1975).
- ⇒ **Ley de la calidad del aire y de la Protección de la atmosfera** (Ley 34/2007 de 15 de noviembre) de la Jefatura de Estado (BOE 16 nov. 2007).
- ⇒ **Ley de Industria** (Ley 21/1992 de 16 de julio) de la Jefatura de Estado (BOE 23 jul. 1992).
- ⇒ **“Guía Técnica. para la clasificación de los residuos”** (2021) Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico.
- ⇒ **“Guía de criterios para la aplicación de Reglamento 1357/2014”** (2021) Gobierno Vasco.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 17

TOMA DE MUESTRAS Y MUESTREO. PRINCIPIOS DE LAS TÉCNICAS DE MUESTREO. TIPO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO. RECEPCIÓN DE MUESTRA EN EL LABORATORIO. MANIPULACIÓN DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO. NORMAS A APLICAR

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.

TOMA DE MUESTRAS Y MUESTREO. PRINCIPIOS DE LAS TÉCNICAS DE MUESTREO. TIPO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO. RECEPCIÓN DE MUESTRA EN EL LABORATORIO. MANIPULACIÓN DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO. NORMAS A APLICAR

ÍNDICE

- 1. TOMA DE MUESTRAS Y MUESTREO**
- 2. REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA Y FUENTES DE ERROR EN EL MUESTREO**
- 3. PRINCIPIOS DE LAS TÉCNICAS DE MUESTREO**
 - 3.1. Plan de muestras**
 - 3.2. Tipos de muestreos**
 - 3.3. Tipos de muestras**
 - 3.4. Tamaño de la muestra y número de muestras**
 - 3.5. Apreciaciones de organismos técnico-normativos**
- 4. PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA HASTA EL LABORATORIO
(TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA)**
 - 4.1. Cadena de vigilancia y custodia de las muestras**
 - 4.2. Almacenamiento de muestras**
 - 4.3. Transporte de las muestras**
- 5. CASO QUE EL LABORATORIO QUE ANALICE LA MUESTRA TAMBIÉN INCLUYA MUESTREO (apdo. 7.3. de la norma ISO-17.025:2017)**
- 6. RECEPCIÓN DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO**
 - 6.1. Aceptación de la muestra en el laboratorio**
 - 6.2. Almacenamiento de muestras en el laboratorio**
 - 6.3. Análisis en el laboratorio**
- 7. TIPOS DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO**
- 8. MANIPULACIÓN (TRATAMIENTO) DE MUESTRAS EN LABORATORIOS**
- 9. NORMAS A APLICAR y BIBLIOGRAFIA**

1. TOMA DE MUESTRAS Y MUESTREO

La selección de qué muestra recolectar y las pautas a seguir para el muestreo requieren de conocimientos sobre la materia y de las buenas prácticas de inspección. El entrenamiento de los inspectores en esta área resulta fundamental para poder desarrollar su tarea de manera eficiente y eficaz.

La coordinación y el trabajo conjunto entre los responsables de la toma de muestras y de laboratorio son esenciales con el fin de garantizar, entre otros, que:

- las muestras tomadas sean las adecuadas,
- puedan ser analizadas con celeridad y acorde con la capacidad del laboratorio,
- la cantidad recolectada sea mayor o igual a la mínima necesaria según los métodos de análisis.

En el análisis de alimentos se busca verificar si se cumple o no con los requerimientos establecidos de calidad e inocuidad con la finalidad de proteger a los consumidores. Para que el resultado de este análisis sea significativo y confiable, debe provenir de una muestra representativa del lote que haya sido tomada y manejada de forma tal que asegure su integridad.

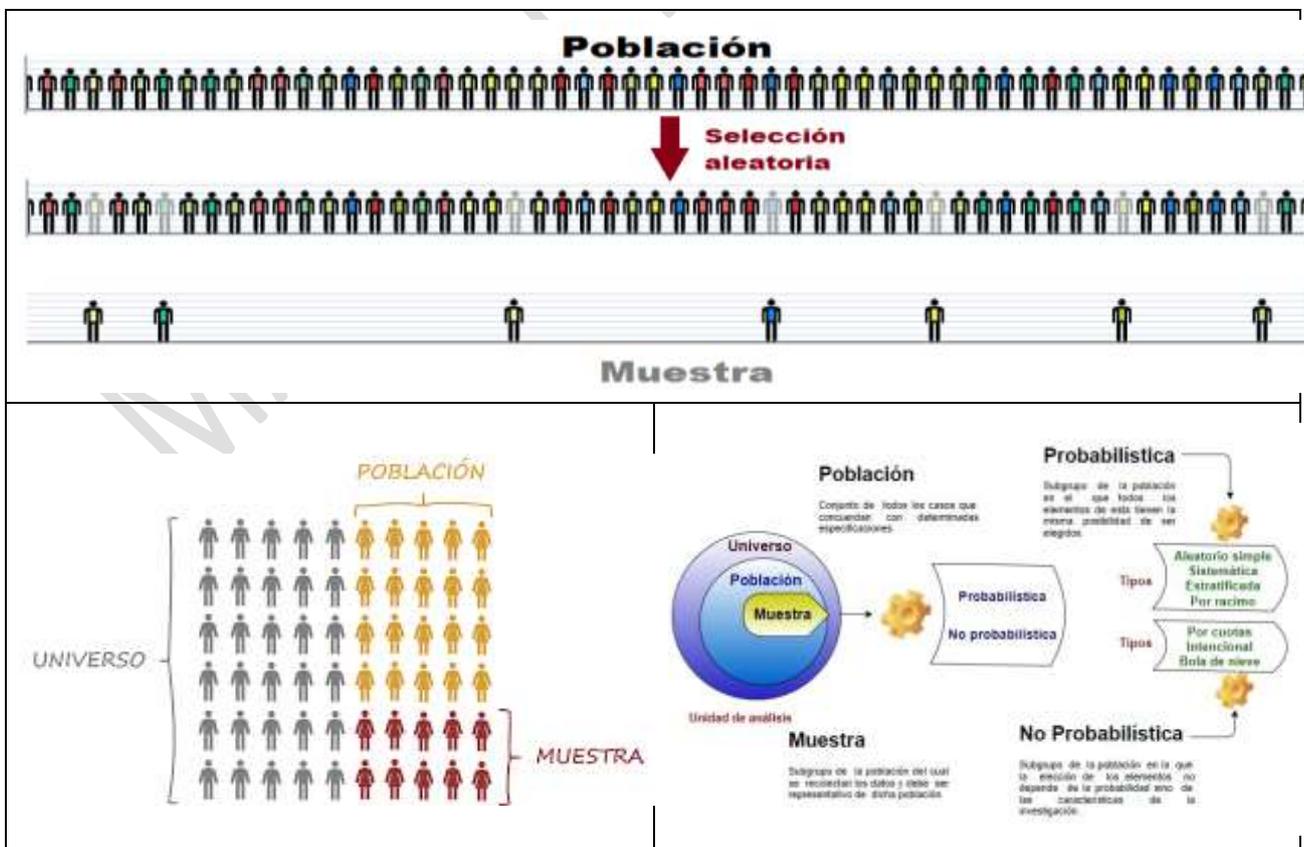
El muestreo es una herramienta de la investigación científica, cuya función básica es determinar qué parte de una población debe examinarse, con la finalidad de hacer inferencias sobre dicha población.

El muestreo tiene en cuenta todas las actividades relacionadas a la toma u obtención de muestras que pertenecen a una misma población.

La finalidad del muestreo es reducir los datos de una población mediante el acopio de información de un subgrupo en lugar de todo el conjunto, siendo este último una colección de datos que atañen a las características de un grupo de individuos u objetos.

El muestreo de alimentos se torna fundamental teniendo en cuenta que:

- El tamaño de la población es excesivamente alto y es imposible determinar con precisión el conjunto.
- Existe una escasez de recursos materiales o temporales para medir o experimentar sobre toda la población.
- El análisis es destructivo.
- Muchas veces la parte observada aporta suficiente información.



Cualquier conjunto de objetos o eventos individuales infinitos o finitos forman **una población**.

Población o Sistema material, es el conjunto de partículas u objetos de los que se requiere obtener información analítica.

La imposibilidad de analizar todo el sistema material (o población) nos obliga a seleccionar una parte con su misma composición y propiedades, es decir, una muestra que represente al conjunto del sistema material o población, una **muestra representativa**.

La población, es una colección de datos que atañen a las características de un grupo de individuos u objetos. Por este motivo, en lugar de examinar el grupo entero de la población, se examina una parte del grupo llamada **muestra**.

Las actividades de MUESTREO y TOMA DE MUESTRAS, en muchos casos son la base para la validez de los informes emitidos sobre la muestra que llevar a los laboratorios a través de las entidades de inspección que se lo han hecho llegar.

Un muestreo adecuado de aquello que se quiere evaluar y la posterior toma de muestras son actividades de vital importancia.

Posteriormente el Laboratorio determina los parámetros analíticos solicitados de la muestra que le llega (al laboratorio). Si esta muestra no es adecuada, o está degradada lo que analizara es algo inútil.

Pero hay que tener presente que el objetivo final de estas evaluaciones es aportar un resultado que se pueda asociar a aquello que ha sido muestreado. Por este motivo la toma de muestra por sí misma no es suficiente para poder garantizar el resultado de la inspección. El laboratorio en el informe de resultados, los emite respecto a la muestra que le llega para ensayo, no del lote que pertenece (que no se puede responsabilizar).

Es muy importante no confundir la actividad de muestreo con la actividad de toma de muestras.



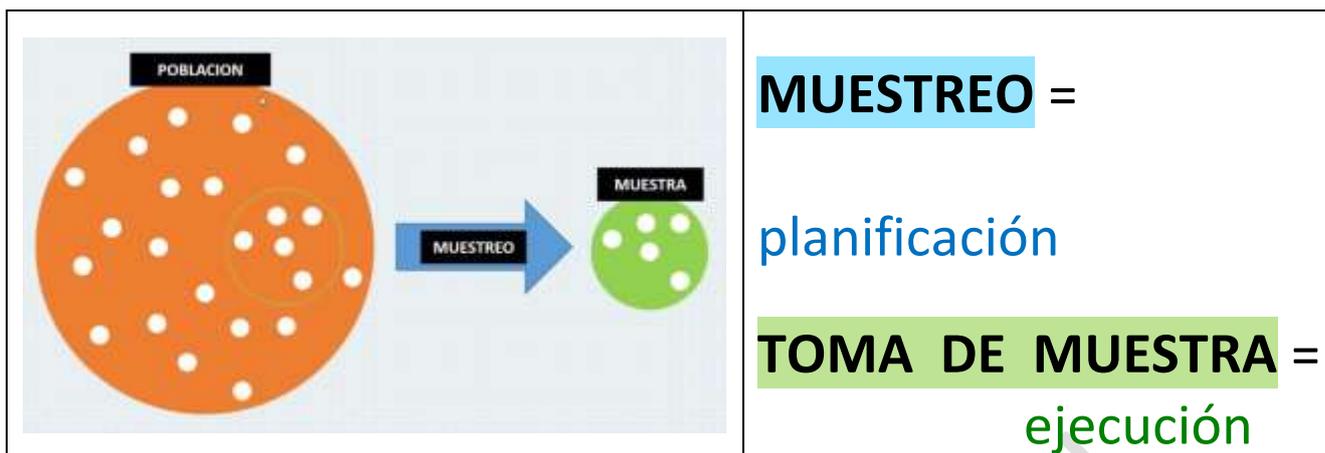
Todo el proceso de toma de muestra, su posterior transporte (si fuera necesario), condiciones ambientales, etc. debe estar documentado de forma que se evidencie su idoneidad. Además, durante todo el proceso de toma de muestras y posterior transporte se deben aplicar las medidas de calidad necesarias, como pueden ser tomar las muestras por duplicado y el empleo de blancos. De hecho, se deben establecer los criterios que deben cumplir las muestras para que estas se consideren adecuadas. Cualquier desviación debe ser registrada e informada en el posterior informe de resultados.

En términos de definición, la **IUPAC (International Unión of Puré and App lied Chemistry)** ha presentado las siguientes definiciones:

MUESTRA .- es una porción de la materia tomada y seleccionada de tal forma que posea las características esenciales del lote.

MUESTREO .- Procedimiento empleado para tomar o constituir una muestra. Es decir, es la sucesión de pasos para asegurar que las muestras posean las características del lote.





<p>MUESTREO <i>es el análisis y selección de cómo y qué muestra(s) escoger</i></p> <p><i>consiste en la acción de elegir una muestra después de fijar el proceso de selección adecuada</i></p>	<p>TOMA DE MUESTRA <i>es la obtención o recogida de la muestra en sí</i></p> <p>consiste en recoger la muestra</p>
---	---

MUESTRA : es una porción pequeña seleccionada (por muestreo) de una cantidad de material que es mucho mayor (lote de una población) representativa para la realización posterior de ensayo en laboratorio.

MUESTREO - es la técnica de análisis para la selección de extraer (o seleccionada) una muestra a partir de una población. Es el estudio y planificación previa.

TOMA u OBTENCIÓN DE MUESTRA: consiste en recoger una(s) determinada(s) muestra(s). se realiza después del estudio previo de muestreo. Es la ejecución de lo planificado en el muestreo.

Acto de la inspección administrativa, consiste en la recogida de los ejemplares de un producto para su análisis posterior.

LOTE .- es una cantidad determinada de un producto fabricado o producido en unas condiciones que se suponen uniformes para los fines propuestos.

LOTE .- Serie de unidades producidas uniformemente en un proceso del que se obtienen las muestras.

PLAN DE MUESTREO .- Procedimiento planificado de estudio que permite seleccionar o tomar muestras separadas de un lote para obtener la información necesaria,

p. ej., una decisión sobre el grado de cumplimiento de las normas en un lote.

Más concretamente, **un plan de muestreo** es un esquema en el que se determina el número de elementos que deben recogerse y el número de elementos no conformes que se requieren en una muestra para evaluar el grado de cumplimiento de las normas en un lote.

Se trata de disponer al final:

- ♦ de una muestra representativa del lote del producto agroalimentario;
- ♦ que sea identificada la muestra de manera fiable y con la información necesaria;
- ♦ que disponga asociada una documentación trazable de todo el proceso y la garantía de haber seguido todo el proceso;
- ♦ La conservación de la muestra en condiciones óptimas para depositarla en el laboratorio para analizar.

REFLEXIÓN

¿ ES LA TOMA DE MUESTRA UN PUNTO CRÍTICO EN LA CARACTERIZACIÓN Y CONTROL ?

- Es el aspecto que habitualmente más se cuestiona
- Difícil control de calidad
- Si no es correcta, limita o invalida la información analítica
- Fase en la que más errores se pueden cometer
- No se le da la importancia necesaria

RECORDATORIO



2. REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA Y FUENTES DE ERROR

Con anterioridad ya se comentaba, la importancia que la muestra sea representativa de la población a estudio, si la población es muy heterogénea será complicado.

La característica de la muestra en su composición debe reflejar lo mejor posible una porción representativa de todo el sistema material (o población).

Un **plan de toma de muestra** debe asegurar que la muestra obtenida refleje adecuadamente las propiedades que interesan del lote del que proviene, es decir, la muestra final extraída debe ser:

- + tan similar como sea posible a la población global a analizar;
- + poseer sus características esenciales;
- + ser reproducible.

La toma de muestra (u obtención de la muestra) requiere diseñar un plan de muestreo previo que garantice la representatividad e integridad de la muestra que al final le llegará al laboratorio.

El muestreo representativo es un procedimiento empleado para tomar o formar una muestra representativa.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA

Algunos factores que influyen para que una muestra sea representativa:

- + Estado físico del lote;
- + Equipos de muestreo: no inertes o sucios;
- + Número de las muestras tomadas;
- + Tamaño de las muestras tomadas;
- + Errores en el diseño de muestreo;
- + Errores en la ejecución de toma de muestra diseñada en el muestreo;
- + Fluctuaciones estacionales o temporales;
- + Sistema de manipulación, conservación y almacenamiento y transporte de la muestra;
- + Cambios físico-químicos: La posible degradación de la muestra.
- + Elección de lugares de la toma de muestras, después del estudio y metodología del muestreo.

Fuentes de error en la etapa de toma de muestra

La toma de la muestra introduce una fuente de error que es arrastrada al análisis.

Los errores principales cometidos en la etapa de toma de muestra son

- la **contaminación** y
- la **pérdida o alteración química de los analitos.**

Conocer las causas de error permitirá evitarlos al menos minimizarlos.

3. PRINCIPIOS DE LAS TÉCNICAS DE MUESTREO

Para sacar conclusiones acerca de la aceptación de la calidad del producto se hace necesario extraer muestras y evaluarlas. A este proceso se lo denomina **planes de muestreo**. El propósito del muestreo es una medición aleatoria de las características de calidad, composición o lo que contemplan propiedades relacionadas con la inocuidad para determinar si el lote de producto se acepta o se rechaza. Los planes de muestreo están representados en forma de tablas y se basan en el principio estadístico de que todas las unidades o porciones del material o alimento a evaluar tienen la misma probabilidad de ser tomadas de forma tal que la muestra obtenida es lo más representativa posible.

El MUESTREO es el proceso de obtención de la muestra que posteriormente se ensayará, dicho proceso permite garantizar su representatividad con respecto al ítem muestreado, e incluye:

- Un plan de muestreo;
- Una toma de muestra (u obtención de muestra), y
- Unos criterios de influencia adecuados.

Por tanto, el muestreo engloba todo el proceso, desde el estudio para conocer cómo tomar porciones representativas del total que se quiere evaluar, hasta las herramientas estadísticas necesarias para que los resultados obtenidos aporten unos valores sólidos al total muestreado.

La **operación de muestreo** en la industria de alimentos cobra relevancia para la calificación del producto y/o materia prima, nunca forma parte de control durante su procesamiento.

Dicha **operación de muestreo** consiste, al final en obtener una porción representativa del total de un lote de alimento, a través de técnicas de muestreo adecuadas que garantizan las características físicas, químicas y/o microbiológicas y no se produzcan cambios en la composición entre la recogida y el análisis de la muestra.

Un plan de muestreo debe contener los objetivos del análisis y su diseño debe responder a las siguientes cuestiones:

- ¿Qué parámetros se van a medir? ¿Qué tipo de información se quiere obtener?;
- ¿Cuáles son las características del sistema material o población?, estado de agregación, composición química, grado de homogeneidad;
- ¿Dónde tomar la muestra? La muestra ¿es accesible?;
- ¿Cuándo tomar la muestra?;
- ¿Cómo tomar la muestra?. Tipo de muestreo;
- ¿Qué tipo de muestra debemos recoger?;
- ¿Cuál es la mínima cantidad de muestra necesaria para cada análisis?. Tamaño de la muestra;
- ¿Cuántas muestras se han de analizar?. Número de muestras;
- ¿Qué sistema de conservación, transporte y almacenamiento se realizará?;
- ¿Cuántas submuestras serán necesarias para una exactitud determinada?;
- ¿En qué tipo de recipiente se va a guardar la muestra? Que no adsorba ningún analito en su superficie, ni cederlo de sus paredes;
- ¿Cómo podemos minimizar los errores analíticos?;
- ¿Qué medidas de protección?;
- ¿Qué recursos se dispone?.

Para la posterior toma de muestra se requiere adoptar un método operativo o protocolo concreto para obtener los resultados deseados previstos, es decir se requiere de una **estrategia de muestreo**. En algunos casos, los conocimientos previos sobre el sistema material (o población) permite seleccionar los puntos muestreo y momentos más adecuados para la toma de la muestra.

3.1. Plan de muestreo

Cualquier **plan de muestreo** tiene por objeto la obtención de muestras para la determinación de las propiedades físico-químicas, químicas o biológicas del medio en estudio o población. En consecuencia, debe prestarse un especial interés en que las muestras sean lo más representativas posible, así como que no sufran cambios relevantes entre el momento de la toma (u obtención) de la muestra y del posterior análisis de la misma. Para ello implica la elaboración de una documentación previa donde se evidencia el estudio realizado.

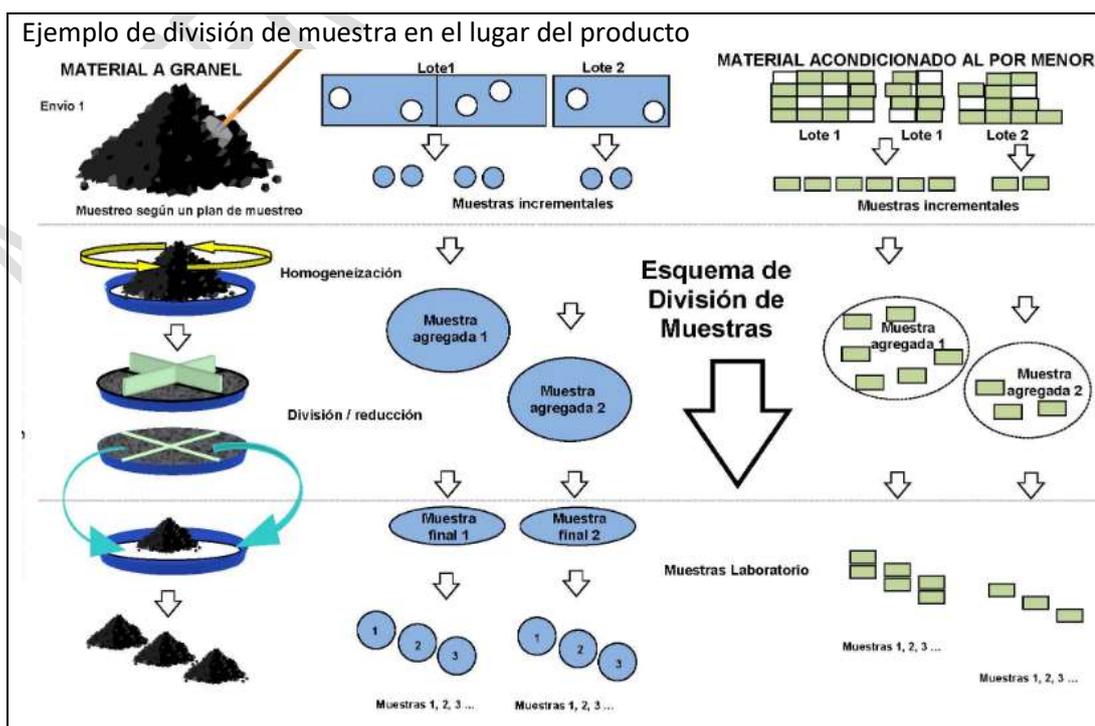
- ▷ En muchos casos, el plan de muestreo está definido en un documento reglamentario, por lo que ni será necesario diseñar un plan de muestreo. Por lo que se limitará a seguir los requisitos y la forma a seguir que señale dicho reglamento.
- ▷ Sin embargo, en otras situaciones el organismo de inspección tendrá que evaluar las peculiaridades de la entidad que está evaluando.
- ▷ en cualquier caso, el plan de muestreo debe desarrollarse teniendo presente el objetivo que se pretende conseguir y en base a la disposición que se disponga.

Etapas del plan de muestreo

El plan de muestreo debe estar formado por las etapas que garanticen que la muestra analizada (con posterioridad en el laboratorio) sea representativa del lote o de la población de estudio.

Como mínimo **el plan de muestreo ha de constar de las siguientes etapas:**

- 1ª. Definición de los objetivos y del tipo de muestra a establecer, tamaño de la muestra y criterio de evaluación;
- 2ª. Selección del lote de muestra, analitos a establecer;
- 3ª. Métodos analíticos a realizar;
- 4ª. Diseño del método y procedimiento operativo (tamaño y número de muestras recolectadas y espaciado entre ellas);
- 5ª. Selección de método de preservación y pretratamiento de la muestra;
- 6ª. Redacción del protocolo completo, recogiendo todos los aspectos anteriores.



3.2. Tipo de muestreo (para tomar u obtener muestras)

► **De forma PROBABILÍSTICA**

Una estrategia de muestreo probabilística es aquella en la que todos los elementos constituyentes de la población tienen la misma probabilidad de ser tomados. Este tipo se realiza cuando no se dispone de suficiente información previa de la población y se busca una muestra lo más representativa posible.

+ Para toma u obtención de muestra por muestreo **ALEATORIA**

Las muestras se seleccionan de la población de tal manera que porción o elementos tenga la misma probabilidad de salir escogido. Normalmente se divide la población en unidades iguales a las que se les asigna un único número a cada una seleccionando las unidades que formarán parte de la muestra con tablas de números aleatorios o programas informáticos.

+ Para toma u obtención de muestra por muestreo **SISTEMÁTICO**

Las porciones de muestras se toman en intervalos de tiempo y espacio predeterminados y definidos en un plan de muestreo para la toma de muestras.

+ Para toma u obtención de muestra por muestreo **ESTRATIFICADO**

Si la población es muy heterogénea se divide en grupos más homogéneos llamados **estratos**. Una vez establecidos los estratos y el número de muestras total se toman las porciones de muestras al azar dentro de cada estrato proporcionalmente a su peso o volumen relativo.

► **De forma NO PROBABILÍSTICA**

+ Para toma u obtención de muestra por muestreo **A JUICIO DEL MUESTREADOR**

Esta estrategia se fundamenta en el criterio del muestreador. Un muestreador con experiencia analítica es capaz de seleccionar la muestra que proporcione la información requerida si dispone de información suficiente sobre la distribución del analito dentro del sistema material o población.

+ Para toma u obtención de muestra por muestreo **DE CONVENIENCIA**

En este caso, el costo de conseguir la muestra y la accesibilidad son los factores que se utilizan en la selección de la muestra.

3.3. Tipos de muestras

+ **MUESTRAS SIMPLES** son las muestras colectadas en un tiempo y en un lugar particular.

Este tipo de muestras representan las condiciones puntuales de una muestra de la población en tiempo que fue colectada. Son aquellas muestras tomadas en un tiempo y lugar determinado para su análisis individual.

+ **MUESTRAS COMPUESTAS** son las muestras que son producto de las mezclas de muestras individuales o sub-muestras.

Son las obtenidas por mezclas y homogeneización de muestras simples recogidas en el mismo punto y en diferentes tiempos.

+ **MUESTRAS INTEGRADAS** son las obtenidas por mezclas de muestras simples recogidas en puntos diferentes y simultáneamente.

3.4. Tamaño de la muestra y número de muestras

Cuanto mayor sea la porción analizada del sistema material (o población), más seguros estaremos de obtener un resultado correcto. Pero analizar gran cantidad de muestra, o repetir muchas veces los análisis, implica un gran esfuerzo, por lo que será necesario estimar qué cantidad y número de muestras es necesario tomar para optimizar el proceso.

El número, tamaño y naturaleza de las muestras que se toman para analizar influye enormemente sobre los resultados.

En un análisis cuantitativo la composición de la muestra debe representar cuidadosamente la del sistema material (o población) objeto de estudio.

El tamaño de la muestra debe ser el adecuado para minimizar el error en la etapa de muestreo.

Si la muestra es demasiado pequeña, su composición puede ser sustancialmente diferente de la del sistema material (o población), resultando un error significativo.

Si la muestra es demasiado grande, requiere más tiempo y recursos, sin aportar, en muchas ocasiones, una mejora a la etapa de muestreo.

El tamaño de la muestra se calcula a partir de datos estadísticos.

Aunque en un principio no se conoce la concentración de los analitos en la muestra se puede hacer una estimación consultando la bibliografía, en los casos en los que la concentración es muy baja se puede aplicar técnicas de preconcentración de la muestra.

▷ **Tamaño de la muestra**

El tamaño de la muestra que se obtendrá del muestreo dependerá de las siguientes variables:

- + El número de analito que se analizarán;
- + La concentración de los analitos;
- + El volumen necesario para el análisis;
- + El número de repeticiones del análisis;
- + La matriz de la muestra;
- + El grado de homogeneidad;
- + la magnitud del error exigido

▷ **Número de muestras**

El número total de muestras depende directamente de:

- + El tipo de estudio;
- + El tamaño del sitio a muestrear y diseño de muestreo seleccionado;
- + El tipo de muestra (simples, compuestas, Integradas);
- + La exactitud y la precisión requerida;
- + Los recursos económicos disponibles.

El número de muestras que se debe tomar viene dado por el valor máximo del error admitido.

3.5. Apreciaciones de organismos técnico-normativos

► La **FAO** menciona que los métodos de muestreo de alimentos para estudios de composición, pueden ser:

- **al azar**, donde la muestra tiene la misma probabilidad de ser incorporado en la porción analítica;
- **selectivos**, siendo todos los demás métodos y por último;
- **el muestreo controlado o por conveniencia**, que es aquel que se toma sólo por el acceso que tiene a la muestra, cuyo resultado no puede ser considerado para una determinada calificación pero sí para estimar la variación en la composición.

► El **CODEX ALIMENTARIUS (de la FAO-WHO)**, resalta que la finalidad primordial de las directrices sobre el muestreo, es garantizar el uso de los procedimientos justos y válidos durante el análisis de los alimentos y comprobar una determinada característica propuesta del mismo documento sobre un producto, mencionando diversos planes de muestreo, entregando también las recomendaciones básicas para la selección de planes de muestreo, que pueden ser usados por las autoridades de control alimentos de cada país, profesionales y los gobiernos para resolver controversias comerciales internacionales.

Ahora bien, se sabe que el **plan de muestreo** es el procedimiento planificado que permite seleccionar o tomar muestras separadas de un lote para obtener la información necesaria sobre determinada característica cuantitativa (plan por variables) o cualitativa (plan por atributos) que viene a ser la propiedad que identificará los elementos de un lote o diferenciarlos entre ellos.

En la industria y sector de alimentos se aplican diversos planes, entre estos se pueden dividir en:

Caso 1. Por sus características químicas y físicas; que estos a su vez se subdivide en características cuantitativas y cualitativas,

Caso 2. Por sus características microbiológicas se subdivide por microorganismos con peligro grave o moderado y microorganismos sin peligro o con reducido peligro para la salud.

En el primer caso, para evaluar un alimento por sus características químicas o físicas en evaluaciones cuantitativas, se utiliza con mayor frecuencia para alimentos donde se va analizar la composición de los mismos, donde se puede realizar en:

- **Muestras a granel por lotes aislados:** Plan de muestreo por variables por ejemplo controlar el contenido de humedad en trigo en un camión cisterna.
- **Muestras en artículos:** Plan de muestreo por atributos por ejemplo en el caso de medir la cantidad de azúcar en un jugo de naranja.
- **Muestras a granel de lotes en serie continua:** Plan de muestreo por variables por ejemplo determinar el contenido de grasa de la leche en una cisterna.
- **Muestras en artículos en lotes en serie continua:** Plan de muestreo por atributos aplicable en una serie continua de lotes o por variables.

En el segundo caso, para evaluar un alimento por sus características microbiológicas basado en los riesgos que genera a la salud, tenemos:

- **Muestras con peligro grave o moderado y posible propagación en los alimentos:** Plan de muestreo por atributo de dos clases.
- **Muestras sin peligro o con reducido y moderado peligro directo para la salud:** Plan de muestreo por atributos de tres clases.

El equipo de calidad es el responsable de seleccionar el plan de muestreo adecuado, según las características a evaluar, por ello es necesario considerar en el plan de muestreo información proveniente de diversas fuentes para tener datos de producción, almacenamiento y distribución de alimentos.

4. PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA HASTA EL LABORATORIO (TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA)

El Transporte, conservación, almacenamiento de las muestras son etapas (también) clave en el procedimiento analítico posterior, pues en ellos pueden producirse cambios significativos de la composición de los analitos, variando tanto de concentración como de su estado, lo que conlleva una pérdida de representatividad.

En general, las muestras se almacenan en lugares fríos, en cámaras frigoríficas de conservación y si es necesario congelar en cámaras frigoríficas de congelación.

Para evitar alteraciones provocadas por la luz (reacciones fotoquímicas y desarrollo de algas) las muestras se tienen que guardar en neveras o congeladores. Igualmente evitar la exposición al aire. Reducir los riesgos de alteraciones por contacto con la atmósfera. Evitar la exposición a humedades extremas.

El movimiento durante el transporte de muestras sólidas puede originar disgregación o segregación por tamaños.

4.1. Cadena de vigilancia y custodia de la muestra

Toda la información recogida de la etapa de muestreo debe ser fácil acceso y conservarse para seguir y garantizar su **trazabilidad**. Para ello, es esencial asegurar, la integridad de la muestra desde el momento de la toma de muestra hasta la emisión del informe analítico del laboratorio. Esto implica hacer una relación del proceso de muestreo y manipulación de la muestra desde el momento en que fue tomada hasta análisis y obtención del informe final.

Este proceso se denomina **CADENA DE VIGILANCIA Y CUSTODIA DE LA MUESTRA** y resulta útil al control rutinario de la trayectoria de la muestra como si existiese un posible litigio.

Se considera que una muestra está bajo condiciones de cadena de vigilancia si se encuentra en posesión física de una persona, que es la que se encarga de custodiarla y de protegerla de posibles falsificaciones.

Principales pautas se deben cumplir para la cadena de vigilancia son:

+ **Envasado de la muestra:** tras el muestreo, deberá revisarse los recipientes para muestras en busca de fugas. La superficie externa de los envases debe estar limpia y seca. En caso de detectarse una fuga, habrá que reforzar o cambiar las tapas y los tapones. A continuación, habrá que realizar otra inspección y, si la fuga persiste, obtener nuevas muestras.

Los recipientes para muestras utilizadas para el envasado de muestras de líquidos volátiles deben llenarse hasta un 90 % de su capacidad total.

Señalar si es preciso la dirección hacia arriba. ↑↑

+ **Etiquetado de la muestra:** deben utilizarse etiquetas para evitar falsas identificaciones de la muestra. En ellas deben constar al menos la siguiente información: número de la muestra, nombre de la persona que ha hecho la toma, fecha, momento y lugar de la misma. **El marcado de las etiquetas** debe ser claramente legible y permanente para evitar que se borre o sea sustituido / alterado durante el almacenamiento, la manipulación o el transporte.

+ **Sellado y precintos de la muestra:** se utilizan sellos para detectar cualquier falsificación de la muestra que pueda hacerse antes del análisis. Al menos constará la siguiente información: número de la muestra (idéntico al número de la etiqueta), nombre de la persona que ha hecho la toma y fecha y momento de la misma.

Habrà que precintar el recipiente para muestras de forma adecuada en función del tipo utilizado, para evitar una manipulación no autorizada o inadecuada de las muestras (y garantizar la integridad del contenido). El precinto debe estar firmemente fijado, y ser estable para evitar daños durante el almacenamiento o el transporte de las muestras.

+ **Libro de registro de campo:** toda la información pertinente a un estudio de campo o de toma de muestra se registrará en un libro.

En el libro al menos constará la siguiente información: objeto de la toma, localización del punto donde se ha hecho, nombre y dirección del contacto de campo, productor del material del que se ha hecho la toma y dirección de dicho productor.

+ **Registro de la cadena de vigilancia:** es preciso rellenar el registro de la cadena de vigilancia que acompaña a cada muestra o grupo de muestras.

Este registro debe constar de la siguiente información: número de la muestra, firma de la persona que ha hecho la toma, fecha, momento y lugar de la toma, tipo de muestra, firma de las personas que han participado en la cadena de posesión y fechas de las distintas posesiones.

+ **Hoja de petición de análisis:** la muestra debe ir acompañada por una hoja de petición de análisis en la que se incluye gran parte de la información pertinente anotada en el libro de registro.

+ **Envío de la muestra al laboratorio:** la muestra se enviará al laboratorio lo antes posible e irá acompañada del registro de la cadena de vigilancia y de la hoja de petición de análisis. Se entregará a la persona que deba encargarse de su custodia.

+ **Recepción y almacenamiento de la muestra en el laboratorio:** La muestra debe llegar al laboratorio en unas condiciones correctas para que sea aceptable. Más adelante se amplía.

4.2. Almacenamiento de las muestras

Las condiciones de almacenamiento se determinan en función de las características y propiedades de las muestras obtenidas. Las condiciones de almacenamiento deberán garantizar que la muestra no se altere de ningún modo que pueda afectar a los parámetros que se deseen analizar.

En general, las muestras deberán guardarse en un lugar limpio, seco, oscuro, fresco y suficientemente ventilado. Habrá que controlar con regularidad la temperatura de almacenamiento. La temperatura de estas instalaciones no podrá ser inferior a 0 °C ni superar los 30 °C.

- Las muestras de alimentos deberán guardarse separadas de otras muestras. Las mercancías perecederas tendrán que almacenarse en refrigeradores o congeladores. En el caso de las mercancías congeladas, las muestras deberán conservarse por debajo de los -18 °C y habrá que controlar con regularidad la temperatura de almacenamiento.
- Las sustancias inflamables deberán guardarse respetando los reglamentos de seguridad antiincendios.

En caso de algunos productos, conviene adoptar condiciones específicas, bien por reglamentación o tipo de producto.

4.3. Transporte de las muestras

Se deberá comprobar que las condiciones de transporte garanticen la integridad y las características de las muestras que se van a transportar:

- por correo;
- mediante transporte ordinario sin o con equipamiento especial para el transporte de muestras de productos químicos o de mercancías refrigeradas o congeladas;
- por mensajería;
- por otros agentes (inspectores, agentes aduaneros, etc.);
- por el propio cliente.

5. CASO QUE EL LABORATORIO QUE ANALICE LA MUESTRA TAMBIÉN INCLUYA MUESTREO (aptdo. 7.3. de la norma ISO-17.025:2017)

- **LA NORMA INTERNACIONAL ISO-17025:2017** señala (si el laboratorio se acredita en muestreo) deberá tener un plan de muestreo y un método de muestreo cuando realiza el muestreo de sustancias, materiales o productos para el subsiguiente ensayo.

El método de muestreo debe considerar los factores a controlar, para asegurar la validez de los resultados del subsiguiente ensayo.

El plan de muestreo y el método de muestreo deben estar disponibles en el sitio donde se lleva a cabo el muestreo.

Siempre que sea razonable, los planes de muestreo deben basarse en métodos estadísticos apropiados.

El método de muestreo debe describir:

- La selección de muestras o sitios;
- El plan de muestreo;
- La presentación y tratamiento de muestras de la sustancia, material o producto para obtener el ítem requerido para el subsiguiente ensayo.

Cuando se reciben en el laboratorio, se puede requerir manipulación adicional.

El laboratorio que realiza muestreo, debe conservar los registros de los datos de muestreo que forman parte del ensayo que se realiza. Estos registros deben incluir, cuando sea pertinente:

- la referencia al método de muestreo utilizado;
- la fecha y hora del muestreo;
- los datos para identificar y describir la muestra (por ejemplo, número, cantidad, nombre,);
- la identificación del equipamiento utilizado (equipo muestreador) ;
- las condiciones ambientales o de transporte;
- los diagramas u otros medios equivalentes para identificar la ubicación del muestreo, cuando sea apropiado;
- las desviaciones, adiciones al, o las exclusiones del método y del plan de muestreo.



6. RECEPCIÓN DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

La recepción de las muestras en el laboratorio se efectúa por su Unidad de Registro y Emisión de Resultados.

En el momento de la recepción, si no se remite una hoja de expedición adecuada, se deberá rellenar el impreso de Solicitud de Análisis o el formulario de Solicitud de Análisis Informativo.

La Unidad de Registro y Emisión de Resultados del laboratorio deberá:

- Disponer de la información sobre las solicitudes de ensayo aceptadas por el cliente (en los casos en los que se hayan establecido acuerdos previos).
- Disponer del alcance de acreditación y del Catálogo de Servicios del Laboratorio actualizado.
- Disponer de la última actualización de la Listas de Ensayos Bajo Acreditación (LEBA) y de las Listas Públicas de Ensayos (LPEs) en la que estén incluidos todos los parámetros o productos acreditados por categorías.

6.1. Aceptación de la muestra en el laboratorio

La muestra debe llegar al laboratorio en unas condiciones correctas para que sea aceptable. Se deberá comprobar que se cumplan las siguientes condiciones durante el transporte y la entrega al laboratorio. El laboratorio se pondrá en contacto con el agente inspector y podrá rechazar la muestra si no se diesen las condiciones exigidas.

Todas las muestras deberán reunir los siguientes requisitos:

- Las muestras deben llevar una etiqueta con toda la información oportuna, incluida la referencia de la muestra.
- La muestra debe estar precintada.
- El paquete no debe haber sufrido daños ni estar abierto. Habrá que respetar el plazo máximo de entrega al laboratorio
- Junto a las muestras habrá que incluir un formulario de la muestra debidamente cumplimentado.
- La cantidad de muestra debe bastar para realizar los análisis.

En el caso de algunos productos concretos, deberán cumplirse las condiciones siguientes:

- Los productos ultracongelados no deben descongelarse. (no perder la cadena de frío).
- Los productos que se suelen conservar a bajas temperaturas (mantequilla, lácteos, zumos de frutas) deben mantenerse a esas temperaturas.
- Los productos que pueden fermentar deben manipularse con cuidado y guardarse en un refrigerador lo antes posible.
- Las muestras de aceites deben enviarse en cajas de transporte protegidas y habrá que comprobar que no tengan fugas.
- Cuando las muestras estén en su envase original para el consumo, dicho envase debe estar intacto.

En el momento de la recepción de la muestra se realizará por parte de la Unidad de Registro y Emisión de Resultados del laboratorio, y consultando a los departamentos analíticos si fuera necesario, las siguientes comprobaciones:

- Control de idoneidad de las muestras mediante una inspección visual del estado del embalaje externo. Caso de encontrarse deteriorado o dañado, se hará constar en el correspondiente albarán de entrega.
- Comprobar en la apertura del embalaje que el envase o recipiente que contiene las muestras está en condiciones idóneas. Además, si se trata de una muestra que debe estar congelada o refrigerada, se comprueba si las condiciones de conservación son las adecuadas. En el caso de que exista una rotura del recipiente, desprendimiento del lacre, o se detecte cualquier otra anomalía, se procederá a informar al cliente según se describe en el apartado correspondiente de este procedimiento.

- Comprobar que la/s muestra/s van acompañadas de un escrito de solicitud de análisis (carta de remisión, oficio, hoja de expedición, cuestionario, acta, etc.) que recoja todos los datos necesarios, incluyendo el tipo de análisis solicitado. Si la documentación que acompaña a la/s muestra/s es insuficiente, el personal encargado de la recepción de muestras se pondrá en contacto con el remitente preferiblemente por escrito para requerir los datos necesarios, registrando esta incidencia en la documentación que acompaña a la muestra. Si no existiera esta documentación, el Laboratorio procederá a contactar con el remitente para el envío de la documentación pertinente.
- Comprobar si existe un etiquetado o una codificación clara de la/s muestra/s, que no presente dificultades de interpretación, ni se preste a confusiones, y que sea suficiente clara para asegurar la identidad y procedencia de la/s muestra/s. Si hay varias muestras, se comprueba si se trata de la misma muestra, o si son diferentes.
- Comprobar que la cantidad de muestra es suficiente para efectuar los análisis requeridos y, en su caso, que cumpla con lo establecido en la normativa, de no ser así se solicita al cliente el envío de la cantidad de muestra necesaria.

Todas las incidencias se registran en la documentación que acompaña a la muestra, y a la que se le otorga un número en el programa de Registro del Laboratorio.

Por último, hay que mantener la/s muestra/s en estado óptimo de conservación hasta la realización de su análisis, siendo importante cumplir las condiciones de temperatura, tales como refrigeración (2-10°C), congelación ($\leq -18^{\circ}\text{C}$), protección de la luz, etc.. La manipulación de las muestras debe ser lo más rápida posible para mantener las citadas condiciones, antes de su entrada en el almacén o su distribución a los departamentos de análisis. Del mismo modo, las muestras que puedan deteriorarse por frío o calor en exceso deben protegerse adecuadamente.

Las muestras perecederas o lábiles deberán remitirse inmediatamente a los departamentos de análisis para evitar su deterioro y que puedan llevarse a cabo los ensayos lo más rápidamente posible y que no se afecten los resultados analíticos.

Si en la recepción se observa que pueden existir dudas sobre la idoneidad de las muestras, se solicitará al cliente información, por ejemplo sobre las condiciones de la toma de muestra, su conservación, etc., En el caso en que el Director Técnico, tras la comprobación de los datos, considere que la muestra no es adecuada para el ensayo solicitado se informará al cliente antes de continuar con el ensayo. Si se da el caso de que el cliente decide continuar con el análisis de la/s muestra/s, se le solicitará de manera documentada su decisión, procediendo el Laboratorio a indicar en el informe de ensayo que los resultados pueden estar afectados por las condiciones de recepción de la muestra.

El laboratorio **deberá tener al día procedimientos específicos:**

- Procedimiento en caso de muestras deterioradas
- Procedimiento en caso de rechazo de muestras

Para el registro e identificación de muestras **se dará prioridad en el registro y en la realización de los análisis** a las muestras que se encuentren en una de las siguientes situaciones:

- muestras perecederas,
- muestras para certificados de exportación,
- muestras para análisis contradictorios y dirimentes con plazos establecidos para la resolución de los expedientes correspondientes,
- muestras de comercio exterior cuando los resultados de los análisis puedan implicar rechazo o no de la mercancía,
y
- muestras sobre las que se soliciten ensayos de una categoría.

6.2. Almacenamiento de muestras en el laboratorio

Se diferencian **tres tipos de almacenamiento de muestras**, claramente separadas:

a. Almacenamiento pre-analítico:

Almacenamiento de muestras registradas antes de su distribución a los correspondientes departamentos analíticos. El registro de entrada de las muestras queda reflejado en el Libro de Almacenamiento y Distribución de muestras.

b. Almacenamiento de muestras no identificadas:

Muestras cuyo registro se demora por falta de documentación, instrucciones, información acerca del remitente, etc.

c. Almacenamiento post-analítico:

Según el Real Decreto 1945/1983, de 22 de Junio, la Administración dispone de un plazo máximo de seis meses para iniciar un proceso sancionador desde el momento en que tiene conocimiento de la existencia de un posible incumplimiento. Por ello, se ha establecido este periodo desde la emisión de los boletines de resultados como tiempo de conservación estándar de muestras correspondientes a un análisis inicial. Además, en términos generales, se someterán a este período de almacenamiento post-analítico solamente aquellas muestras con resultados analíticos que se consideren atípicos, y que sean lo suficientemente estables.

6.3. Tipos de análisis en el laboratorio

6.3.1. Desde un aspecto de **análisis oficial**

- **Análisis Inicial**
- **Análisis Contradictorio**
- **Análisis Arbitral/Dirimente**
- **Análisis de Exportación**
- **Análisis Intercomparativo**
- **Análisis de Estudios y Colaboraciones**
- **Análisis de Confirmación**
- **Análisis Informativo**

6.3.2. Desde un aspecto de **análisis técnico:**

Análisis de alimentos de todo tipo (vinos, aceites, carnes, pescados, comidas preparadas, helados, aceitunas y encurtidos, condimentos y especias, productos de panadería, bollería, confitería y pastelería, frutas y hortalizas, turrones, golosinas...) con los siguientes tipos de análisis de alimentos:

- ▷ **Análisis organoléptico:** Es una valoración cualitativa del alimento, basada, exclusivamente, en la utilización de los sentidos, englobando factores como la apariencia, color, olor, sabor y textura.
- ▷ **Análisis físico-químico** para obtener datos cuantitativos, presentes en los alimentos, relacionados con la composición y valor nutricional del producto. Parámetros de su composición química como pH,

actividad de agua, humedad etc. son de vital importancia para el desarrollo de microorganismos en los alimentos.

- ▷ **Análisis microbiológicos** a través del cual se pueden estudiar toxiinfecciones alimentarias, es decir, se comprueba la presencia de microorganismos nocivos para la salud. El Reglamento 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece los criterios microbiológicos para determinados microorganismos y las normas de aplicación que deben cumplir los explotadores de empresas alimentarias al aplicar las medidas de higiene, generales y específicas, dependiendo del tipo de alimento que se manipule en su industria. Este reglamento diferencia entre criterios de seguridad alimentaria (producto comercializado durante su vida útil) y criterios de higiene de los procesos (mejora en la higiene de la producción).
Eje.: Salmonella, Listeria monocytogenes, campylobacter E. Coli.

- ▷ **Estudio de vida útil:** El objetivo principal de este tipo de análisis es determinar el tiempo en el que un producto puede mantenerse sin sufrir algún cambio significativo en su calidad e inocuidad. Para conocer el estado del mismo a lo largo del tiempo se estudian varios factores:
 - Propiedades y composición del alimento
 - Procesos a los que se ve sometido
 - Formato y envase en el cual se comercializa
 - Condiciones de almacenamiento

- ▷ **Estudio nutricional** se analiza la composición nutricional de los alimentos (Grasas, proteínas, sal, azúcares, valores energéticos...). El Reglamento (UE) 1169/2011 sobre la información aportada al consumidor obliga a las industrias alimentarias a facilitar un etiquetado con la composición de sus productos. La demanda del consumidor tiene en cuenta tanto el valor nutricional del producto como las sustancias que puedan producir alergias y/o intolerancias alimentarias.

- ▷ **Análisis de alérgenos en alimentos**

- ▷ **Otro tipo de análisis** es el de toxinas tanto de origen biológico (micotoxinas, toxinas botulínicas, fúngicas etc) o químicas (mercurio, plomo, metales pesados).

- ▷ Otro tipo de **análisis es de identificación de especies**

- ▷ Por último, otro análisis habitual en industrias alimentarias el **de Residuos** de plaguicidas. Estos plaguicidas pueden proceder de una contaminación ambiental, puede haber residuos en muestras de alimentos que nunca han formado parte del proceso de fabricación.

7. TIPOS DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Como en el caso de los médicos es no perjudicar más al paciente, en el caso del laboratorio es no contaminar, ni degradar a la muestra, hay una multitud de tipos de muestras en laboratorio, considerando que la cantidad de ella sea suficiente para realizar las determinaciones solicitadas.

▶ Según se compartan o no con otros departamentos de análisis:

▷ **Muestras individuales para un solo departamento de análisis:**

No suele haber problema añadido si el tamaño de la muestra es suficiente

▷ **Muestras compartidas con varios departamentos de análisis:**

Donde existe el problema de considerar la homogeneidad de cada alícuota a repartir, para que la sub-muestra (que se reparte) mantenga la representatividad de la muestra que entra al laboratorio.

Por ej.. ♦ Un zumo que a un departamento se diera la parte superior y a otro la pulpa

♦ Una porción de carne se repartiera el magro a un departamento y a otro se diera la parte grasa

Otro problema es la secuencia o prioridad en la que deben intervenir por el tipo de muestra y por el tipo de determinación.

Es importante, si el tratamiento que se da en el primer departamento no introduzca algún analito que luego en otro departamento sea de interés (Ej.: tratamiento con algo que contenga gluten, y en el siguiente departamento mida el contenido de gluten.

▶ Según el gradiente de pérdida de características:

▷ **Muestras perecederas (o lábiles):** cuya duración es limitada perdiendo su validez por comenzar a degradarse. Exigen condiciones especiales de conservación. Ej.: huevos, leche, carnes, pescados, y deberán remitirse inmediatamente a los departamentos para realizar los análisis.

▷ **Muestras no perecederas:** No suele haber problema añadido

▶ Según el estado físico

▷ **Muestras sólidas:** por lo general suelen ser heterogéneas, si acaso removerlo para homogeneizar.

▷ **Muestras líquidas:** por lo general suelen ser homogéneas, si acaso agitarlo para mejorar su homogeneidad

▶ Según

▷ **Muestras homogéneas:** necesitan menos tratamiento, por poseer un mismo perfil o características, o bien compartes rasgos muy similares en distintas partes de ella.

▷ **Muestras no homogéneas:** en general precisan mayor tratamiento para homogeneizar.

▶ Según la procedencia

▷ **Muestras lineal,** (en su presentación comercial, con su envase que presenta en la bandeja del comercio)

▷ **Muestras a granel** o en fábrica, almazara o bodega

8. MANIPULACIÓN (TRATAMIENTO) DE MUESTRAS EN LABORATORIOS

Una vez en el laboratorio la muestra se realiza un tratamiento para dar lugar a una submuestra, esta última no deberá variar sus características de la muestra entrante.

Operaciones básicas o unitarias en el laboratorio son el conjunto de procedimientos y transformaciones de carácter físico que se aplican a las muestras para su acondicionamiento.

Cada operación unitaria tiene como objetivo cambiar las propiedades de una determinada cantidad de materia:

- ♦ Modificando su masa o composición (separación de fases, mezcla, reacción química)
- ♦ Modificando su nivel o cantidad de energía (enfriamiento, vaporización, incremento de la presión)
- ♦ Modificando sus condiciones de movimiento (aumentando o disminuyendo la velocidad, caudal, dirección)

Las operaciones unitarias también se pueden clasificar según la propiedad (materia, energía, o cantidad de movimiento) más relevante transferida en la operación:

- ♦ Operaciones unitarias químicas: hay reacción
- ♦ Operaciones unitarias físicas: no hay reacción

▷ **Las operaciones básicas, sin ser exhaustiva son las siguientes:**

- ♦ Separación mecánicas:
 - Disgregación
 - Tamizado
 - Mezclado y homogeneización
 - Trituración y molienda
 - Filtración
 - Sedimentación y decantación
 - Centrifugación
- ♦ Separación térmicas:
 - Destilación
 - Evaporación
 - Secado y calcinación
 - Cristalización
 - Liofilización
- ♦ Separación difusionales
 - Extracción
 - Absorción
 - Adsorción
 - Intercambio iónico
 - Ósmosis

- Disolución y digestión
- Cromatografía

Las separaciones denominadas difusionales se utilizan para la separación de los componentes de una mezcla y se basan en la mayor difusión de un componente desde una fase homogénea a otra.

Se entiende por **difusión** el movimiento de un componente a través de una mezcla, debido a un estímulo físico.

NOTA: No se profundiza en estos conceptos, porque corresponden con otros temas de la convocatoria de la oposición.

9. NORMAS A APLICAR Y BIBLIOGRAFIA

Se comentan las más generales porque para cada tipo de alimento prácticamente hay un reglamento específico europeo, e incluso su correspondiente Real Decreto nacional, donde figuran apartados sobre el muestreo y la consecuente toma de muestras

Seria inabarcable por ejemplo: de vinos, de aceites y de grasas, de productos cárnicos, de biotecnología de alimentos, de OGMs, de productos lácteos y sus derivados, de microbiología, de alimentos irradiados,...de residuos en alimentos..

de aguas, de suelos, de fitosanitarios, de piensos y cereales, de fertilizantes,

- ⇒ **Reglamento (UE) 691/2013** de la Comisión, de 19 de julio, sobre *métodos de muestreo y análisis*.
- ⇒ Organización Mundial de la Salud (2004), **Codex Alimentarius** – “*Directrices Generales sobre muestreo CAC/GL 50-2004*”. Recuperado de: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/es/>
- ⇒ Norma internacional **ISO-17020:2012** “*Evaluación de la conformidad. Requisitos para el funcionamiento de diferentes tipos de organizaciones que realizan la inspección*”.
- ⇒ Norma internacional **ISO-17025:2017**, aptdo. 7.3. “*Evaluación de la Conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración*”.
- ⇒ Norma internacional **ISO-19025:2011** “*Directrices para la auditoría de los sistemas de gestión*”
- ⇒ **Real Decreto 538/2015 de 26 de junio**, por el que se regula *la realización de estudios, informes y análisis comparativos sobre productos alimenticios*.
- ⇒ **Reglamento (UE) 2017/625** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo, 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) 1169/2011** del Parlamento europeo y del consejo de 25 de octubre sobre *la información alimentaria facilitada al consumidor*.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 18

ESTADÍSTICA I. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS APLICADOS AL ANÁLISIS QUÍMICO. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSIÓN. VERACIDAD Y PRECISIÓN. REGRESIÓN LINEAL Y CORRELACIÓN. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN. 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. REGRESIÓN LINEAL Y CORRELACIÓN

5. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

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 medido 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.

-Coefficiente 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. 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.

5. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La IUPAC define el límite de detección, como la menor cantidad o concentración de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado.

El límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación o de determinación es la menor cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible) mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable). Los términos cualitativos del tipo de "ausencia de" o "resultado negativo" tienen su expresión numérica en el límite de detección. Es más correcto decir "menos de 1 mg/l" que "ausencia de". Numéricamente es mayor el límite de cuantificación. Concentraciones comprendidas entre ambos límites pueden detectarse pero no cuantificarse.

Los procedimientos de determinación de los límites de detección y cuantificación son:

- a) Relación señal-ruido

Se compara la respuesta del blanco (matriz de la muestra que contiene lo mismo que ésta excepto el analito a estudiar) con la respuesta de muestras preparadas por la adición de pequeñas cantidades de analito al blanco.

El límite de detección corresponde con la concentración del analito cuya relación S/N sea de 3:1.

El límite de cuantificación corresponde con la concentración del analito cuya relación S/N sea de 10:1.

b) Estudio de la menor cantidad detectable

El límite de detección se determina mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el nivel mínimo que puede ser detectado fiablemente. Este método se emplea, por ejemplo, en cromatografía en capa fina. Primero se determina experimentalmente la máxima cantidad de materia prima (carga máxima) que se separa correctamente. Después se halla experimentalmente la menor cantidad de analito. Para ello se preparan una serie de disoluciones conteniendo una cantidad constante de materia prima, del orden de la carga máxima, y cantidades decrecientes del analito que se desea estudiar. El límite de detección se calculará a partir de la dilución en la que no se pueda distinguir la respuesta del analito de la del blanco. El resultado se expresa en valor absoluto o bien en forma de porcentaje respecto a la “carga máxima” de materia prima.

c) Estimación del límite de detección mediante el valor de la ordenada en el origen expresado en unidades de concentración

Para ello se realiza la recta de regresión que se ajusta por el método de mínimos cuadrados. Se admite utilizar la ordenada en el origen para estimar, aproximadamente, el límite de detección. El límite inferior de la respuesta detectable se toma como tres veces el valor absoluto de la ordenada en el origen. Este límite es necesario transportarlo desde el dominio señal al dominio de la concentración para calcular el límite de detección.

d) Análisis repetido del blanco de la muestra

Se analizan una serie de blancos de la muestra (al menos 10) y se calcula la media y la desviación estándar de las respuestas obtenidas. A partir de estos valores, existen diferentes expresiones en las que intervienen la sensibilidad (pendiente de la recta de calibración) y que se dan una estimación de los límites de detección y cuantificación expresados en unidades de concentración.

Las formulas a utilizar varían en función de si hay que realizar una corrección de lectura frente al blanco o no, y el número de réplicas que se realizan.

Existe corrección de lectura frente al blanco. (Métodos espectroscópicos)

$$C_L = \frac{K \cdot s_{blanco}}{b}$$

C_L : Límite de detección o cuantificación

K. Constante: 3 para límite de detección y 10 para límite de cuantificación

s_{blanco} . Desviación estándar de la respuesta de los n blancos

b: pendiente de la recta de calibración

No existe corrección de la lectura frente al blanco

$$C_L = \frac{\bar{y}_{blanco} + K \cdot s_{blanco}}{b}$$

\bar{y}_{blanco} : valor medio de las mediciones realizadas al blanco

Las ecuaciones anteriores sólo son válidas en el caso de que la mayor fuente de error la constituya la desviación estándar del blanco, es decir, si $s_{blanco} > s_a, s_b$; siendo s_a y s_b las desviaciones estándar de la ordenada en el origen y la pendiente de la función de calibrado.

Cuando los valores de las desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen obtenidas en el proceso de calibrado no resultan despreciables frente a s_{blanco} se hace preciso considerarlas en la ecuación de los límites de detección y cuantificación sustituyendo la desviación estándar del blanco en las anteriores ecuaciones por la siguientes expresión.

$$s_{blanco} = \sqrt{s_{blanco}^2 + s_a^2 + \left(\frac{a}{b}\right)^2 \cdot s_b^2}$$

Si en el método analítico se efectúa la medición final por duplicado o por triplicado, disminuye la incertidumbre de la medición y mejora la precisión.

Por este motivo el límite de detección es menor y se introduce el factor de corrección $1/\sqrt{n}$, siendo n el número de repeticiones.

- e) Estimación del límite de detección y cuantificación mediante el estudio de los residuales de la recta

Un supuesto fundamental del método de mínimos cuadrados sin ponderar es que cada punto en la representación gráfica tiene una variación distribuida normalmente (sólo en la dirección de y) con una desviación estándar estimada por $s_{y/x}$. Es apropiado utilizar $s_{y/x}$ en lugar de s_b en la estimación del límite de detección y cuantificación.

$$C_{LOD} = \frac{3 \cdot s_{y/x}}{b}$$

$$C_{LOQ} = \frac{10 \cdot s_{y/x}}{b}$$

$s_{y/x}$: representa el error típico de la regresión, también denominado, en ocasiones, desviación típica estimada, error estándar, error residual, desviación de los residuales, etc.

$$s_{y/x} = \left(\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 2} \right)^{1/2}$$

\bar{y} : Valor de la respuesta que resultaría al sustituir cada uno de los valores de concentración en la función de calibrado.

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 Madrid. 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.

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 19

ESTADÍSTICA II. ANÁLISIS DE RESULTADOS. ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE RESULTADOS. PRUEBAS DE SIGNIFICACIÓN PARA COMPARACIÓN DE MEDIAS Y VARIANZAS. ANÁLISIS 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. ESTADÍSTICA

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. CONCEPTOS GENERALES

2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3. ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE RESULTADOS

4. PRUEBAS DE SIGNIFICACIÓN PARA LA COMPARACIÓN DE MEDIAS Y VARIANZAS

4.1. PASOS PARA APLICAR UNA PRUEBA DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA

4.2. PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA

5. ANÁLISIS DE TENDENCIAS

MATERIAL NO OFICIAL

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 dos 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.

2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Desde el momento en que se empieza una determinación analítica hasta que se llega a la etapa final son necesarias toda una serie de operaciones, estando afectada cada una de ellas por un cierto error. Esto hace que junto con el resultado numérico final del análisis sea necesario expresar también la precisión con que se han obtenido dichos resultados, para lo cual se necesita el tratamiento estadístico correspondiente.

Los resultados analíticos están incompletos sin una estimación de su fiabilidad. Por tanto, si pretendemos que los resultados tengan valor, debe proporcionarse alguna medición de la incertidumbre relacionada con los cálculos obtenidos.

Además, el informe final no solo debe plasmar los resultados obtenidos sino también las limitaciones concretas del método de análisis empleado.

El tratamiento estadístico de datos tiene como fin principal la mejora sustancial de la calidad de la información obtenida en el análisis y permite, en definitiva, saber su grado de exactitud y precisión y, por tanto, su "fiabilidad".

En los análisis de resultados, se emplean términos como:

-Exactitud.

La exactitud de una medición indica cuan cerca está dicha medición del verdadero valor y normalmente se expresa mediante el error. La exactitud mide la concordancia entre el valor experimental obtenido y el verdadero valor de la magnitud determinada.

-Precisión.

La precisión mide la concordancia entre varios resultados obtenidos realizando las mismas observaciones. La precisión se puede determinar haciendo varias mediciones.

-Incertidumbre

Cuando se mide una propiedad de la materia se hace por comparación y, en estos casos, todas las medidas llevan consigo alguna incertidumbre. El grado de incertidumbre depende del propio sistema del cual se mide alguna propiedad, del operador y, fundamentalmente, de la sensibilidad del instrumento empleado. La incertidumbre de medida es la cuantificación de la dispersión de los valores que se le pueden atribuir al mensurando. Se puede expresar como una desviación típica, entonces se designa como incertidumbre típica (u), o como un intervalo de cobertura alrededor del valor medido, entonces se designa como incertidumbre expandida (U).

Se consideran dos tipos de errores:

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 mesurando se le otorgue siempre un valor mayor o menor del que realmente tiene. Se puede medir gracias a los valores o patrones de referencia, y por lo tanto, evitar.

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

3. ACEPTACIÓN Y RECHAZO DE RESULTADOS

Cuando se realizan varias determinaciones, pueden obtenerse valores aparentemente alejados de la tendencia central, a pesar de haber realizado las determinaciones en forma cuidadosa. En esos casos es necesario aplicar criterios de rechazo.

Ensayo Q: se denomina test de la Q de Dixon y consiste en comparar el dato dudoso con el valor más próximo. Para ello deben ordenarse los valores a fin de que el valor dudoso se ubique en uno de los extremos y se calcula el valor de Q_{exp} por la fórmula, entendiéndose que se rechaza si está fuera de unos límites establecidos.

$$Q_{exp} = \frac{|\text{valor dudoso} - \text{valor vecino}|}{\text{mayor valor} - \text{menor valor}}$$

-Desviación estándar respecto de la media. Que consiste en calcular la media de todos los datos fiables y medir la desviación de todos los valores fiables respecto a la media, de modo que los límites admisibles quedarán dentro del intervalo $\pm d$.

$$d = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})}{i}$$

4. PRUEBAS DE SIGNIFICACIÓN PARA LA COMPARACIÓN DE MEDIAS Y VARIANZAS

Las pruebas de significación se refieren a los procedimientos estadísticos mediante los cuales aceptamos o rechazamos una hipótesis nula (H_0) lo que automáticamente nos habilita para

rechazar o aceptar otra hipótesis denominada hipótesis alternativa (H_1). Mientras la primera postula la ausencia de diferencias significativas estadísticamente hablando entre dos medidas o más (las que existen se deben al azar), la segunda postula todo lo contrario, o sea, la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre dos o más medidas.

La H_0 (hipótesis nula) representa la afirmación de que no hay asociación entre las dos variables estudiadas y la H_1 (hipótesis alternativa) afirma que hay algún grado de relación o asociación entre las dos variables.

La decisión se toma a menudo utilizando el valor P (o p-valor): si el valor P es inferior al nivel de significación, entonces la hipótesis nula es rechazada. Cuanto menor sea el valor P, más significativo será el resultado.

El valor de "p" que indica que la asociación es estadísticamente significativa ha sido arbitrariamente seleccionado y por consenso se considera en 0.05. Una seguridad del 95% lleva implícito una $p < 0.05$. Una seguridad del 99% lleva implícita una $p < 0.01$.

Se dice que se ha cometido un error tipo α cuando se rechaza una hipótesis que es cierta y que se ha cometido un error tipo β cuando se acepta una hipótesis falsa.

Todo contraste de hipótesis puede ser bidireccional (dos colas) o unidireccional (una cola), es decir, cualquier hipótesis alternativa puede ser bidireccional o unidireccional. La hipótesis alternativa es bidireccional cuando únicamente afirma que la diferencia es distinta de 0, sin especificar la dirección o signo con el que el valor se aparta de 0. La hipótesis es unidireccional cuando se indica el signo de la diferencia.

La aplicación de estas pruebas parte del supuesto de que se ha utilizado un diseño de muestreo probabilístico para obtener la información muestral que permita tomar decisiones estadísticas.

Errores en la prueba de significación

Como ya se ha indicado anteriormente, en las pruebas de significación se pueden cometer dos tipos de error:

Error Tipo I (α).

Consiste en rechazar una hipótesis nula verdadera. Este error se conoce como nivel de significancia estadística a partir del cual se toma la decisión de rechazar o no rechazar la Hipótesis nula. Es equivalente a encontrar un resultado falso positivo, ya que el investigador concluye que hay diferencia, cuando en realidad no existe.

Error Tipo II (β).

El error tipo II o beta se comete en la situación contraria: cuando el investigador NO rechaza la hipótesis nula (H_0), siendo esta FALSA en la población. Es equivalente a un resultado falso negativo, ya que el investigador concluye que ha sido incapaz de encontrar una diferencia que existe en la realidad.

La probabilidad de cometer este error se conoce como β , y su complemento $1-\beta$ corresponde a la potencia estadística, que cuantifica la capacidad de un estudio para detectar como estadísticamente significativo es una determinada diferencia o asociación que existe en la realidad.

4.1. PASOS PARA APLICAR UNA PRUEBA DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA

Para llevar a cabo una prueba de significancia estadística, es recomendable seguir los siguientes pasos:

- a) Establecer las hipótesis nula y alternativa
- b) Definir nivel de significancia (usualmente 5 o 1 %).
- c) Cálculo de la probabilidad.
- d) Toma de decisiones.

Comparar el valor p con el nivel de significancia:

Si el valor obtenido tras la aplicación de la prueba se encuentra localizado en la región de aceptación de la hipótesis nula se acepta dicha hipótesis. Esto significa que "es probable o muy probable que el azar explique las diferencias observadas. Por consiguiente no existe asociación estadística entre las variables que se están comparando.

Si por el contrario, el valor obtenido cae fuera de dicha región, bien por debajo o por encima se acepta la hipótesis alternativa. Esto significa que "es poco probable o improbable que el azar explique las diferencias observadas.

4.2. PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA.

Las pruebas de significación estadística sirven para comparar variables entre distintas muestras. Si la distribución de la muestra es normal se aplican los llamados tests paramétricos. Si la distribución no puede asumirse normal se aplican las pruebas no paramétricas.

Hay que tener siempre en cuenta que los tests paramétricos son más potentes y dan más información que los no paramétricos, por lo que, si pueden usarse, se prefieren.

- a) Prueba t de Student.

La prueba permite comparar la media con su valor verdadero o bien las medias de dos poblaciones.

$$\mu = x \pm t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$$

El parámetro "t" es un parámetro tabulado que depende de los grados de libertad de la muestra y de los grados de confianza que se quiera.

Si $t_{calculada} < t_{tabulada}$ para cierto nivel de probabilidad, no se rechaza la hipótesis nula. En cambio, si es mayor, se rechaza.

- b) Comparación de varianzas por contraste de Fisher

Dos muestras tienen variancias diferentes cuando la razón de sus variancias "F", colocando en el numerador la variancia mayor para que siempre sea mayor de uno, excede el valor crítico F_{tabulado} . El valor crítico de F se escoge de una tabla en función de los tamaños de las muestras 1 y 2, y el nivel de significación deseado (generalmente 95%).

c) Análisis de Varianza

Análisis de la Varianza (ANOVA) es una fórmula estadística que se utiliza para comparar las varianzas entre las medias (o el promedio) de diferentes grupos.

El resultado de ANOVA es la 'estadística F'. Este ratio muestra la diferencia entre la varianza dentro del grupo y la varianza entre grupos, lo que finalmente produce una cifra que permite concluir que la hipótesis nula es respaldada o rechazada. Si hay una diferencia significativa entre los grupos, la hipótesis nula no es compatible y la razón F será mayor.

ANOVA de un factor o simple.

Como sugiere el nombre, ANOVA de una vía es adecuado para experimentos con una sola variable independiente (factor) con dos o más niveles.

Esencialmente, el diseño para el análisis simple de la varianza consistirá en obtener muestras aleatorias e independientes del valor de Y asociado a cada uno de los distintos niveles del factor X_1, X_2, \dots, X_n . Entonces podremos determinar si los diferentes niveles del factor tienen un efecto significativo sobre el valor de la variable dependiente, por lo tanto usaremos el análisis de la varianza (ANOVA) para contrastar la hipótesis nula de que las medias de distintas poblaciones coinciden. Un ANOVA simple asume:

- Independencia: el valor de la variable dependiente para una observación es independiente del valor de cualquier otra observación.
- Normalidad: el valor de la variable dependiente se distribuye normalmente
- Varianza: la varianza es comparable en diferentes grupos de experimentos.
- Continuo: la variable dependiente (cantidad de flores) es continua y se puede medir en una escala que se puede subdividir.

ANOVA bidireccional o completo

ANOVA factorial completo se utiliza cuando existen dos o más variables independientes. Cada uno de estos factores puede tener varios niveles. ANOVA factorial completo solo se puede utilizar en el caso de un experimento factorial completo, donde se utilizan todas las posibles combinaciones de los factores y sus niveles. Este ANOVA bidireccional no solo mide la variable independiente frente a la independiente, sino también si los dos factores se afectan entre sí. ANOVA bidireccional asume:

- Continuo: Al igual que un ANOVA unidireccional, la variable dependiente deberá ser continua.
- Independencia: cada muestra es independiente de otras muestras, sin combinaciones.
- Varianza: la varianza de los datos entre los diferentes grupos es la misma.

-Normalidad: las muestras son representativas de una población normal.

-Categorías: Las variables independientes deberán estar en categorías o grupos separados.

El análisis de la varianza se basa en la descomposición de la variabilidad total en dos partes, una parte debida a la variabilidad entre las distintas poblaciones o tratamientos (variabilidad entre grupos o variabilidad explicada por el diseño) y otra parte que puede considerarse como la variabilidad intrínseca de las observaciones (variabilidad dentro de los grupos o residual).

La variabilidad dentro de los grupos mide la variabilidad intrínseca de las observaciones, es decir, si el experimento está bien diseñado y no se incluyen factores de variación distintos al estudiado, debe ser error puramente aleatorio producido como resultado de la variabilidad biológica del material experimental.

El contraste del Análisis de la varianza se basa en la comparación de la variabilidad entre y la variabilidad dentro, rechazaremos la hipótesis nula siempre que la variabilidad "entre" sea grande, pero utilizando como patrón de comparación la variabilidad "dentro". Es decir, aceptaremos un efecto de los tratamientos siempre que estos produzcan mayores diferencias en las unidades experimentales que las que habría sin la aplicación de los mismos.

El cociente entre la variabilidad "entre" y la variabilidad "dentro", una vez que se han hecho comparables, sigue una distribución F de Snedecor. La distribución nos sirve para buscar el valor a partir del cual el cociente es lo suficientemente grande como para declarar las diferencias entre grupos estadísticamente significativas.

5. ANALISIS 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 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 los valores obtenidos en la 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 básicos 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, a saber:

- Resultado único
- Media de resultados
- Desviación estándar de los resultados
- Recorrido

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.

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.

MATERIAL NO OFICIAL

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.

-recursostic.educacion.es/pruebasdehipotesis

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 20

CURVAS DE CALIBRADO EN EL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO. PATRÓN INTERNO. PATRÓN EXTERNO. MÉTODO DE LAS ADICIONES ESTÁNDAR. MATERIALES DE REFERENCIA.

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. CURVAS DE CALIBRADO EN EL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO**
- 2. PATRÓN EXTERNO**
- 3. PATRÓN INTERNO**
- 4. MÉTODO DE ADICIONES ESTÁNDAR**
- 5. MATERIALES DE REFERENCIA**

MATERIAL NO OFICIAL

1. CURVAS DE CALIBRADO EN EL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

Una parte muy importante de todos los procedimientos analíticos son los procesos de calibración y de estandarización.

La calibración es el conjunto de operaciones que establecen en unas condiciones especificadas, la relación que existe entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada y los correspondientes valores conocidos de una magnitud de medida.

Esta relación se determina comúnmente mediante el uso de estándares químicos. Los estándares utilizados se pueden preparar a partir de reactivos purificados, si están disponibles, o de reactivos estandarizados por métodos cuantitativos clásicos.

El resultado de una calibración permite estimar los errores de indicación del instrumento de medida, del sistema de medida o de la medida materializada.

Es importante mencionar que podemos encontrarnos con dos tipos diferentes de calibraciones, la calibración instrumental y la calibración analítica.

La calibración instrumental se basa en la comprobación del funcionamiento correcto de un instrumento o equipo y su objetivo es corregir la respuesta instrumental de éste. Lo más característico es que existe una coincidencia entre la magnitud del patrón y la magnitud medida por el instrumento.

El resultado de una calibración puede ser recogido en un documento denominado certificado de calibración o informe de calibración.

En cambio, la calibración analítica se basa en la caracterización de la respuesta instrumental en función de las propiedades del analito. Su objetivo es por tanto, establecer una relación entre la señal y una propiedad del analito. La respuesta del equipo se expresa en una magnitud distinta a los patrones de calibración que contienen al propio analito.

En la calibración analítica, se expresa el resultado mediante un factor de calibración o de un conjunto de factores que puede tomar la forma de una curva de calibración.

Por lo tanto, una curva de calibración, es la expresión de la relación entre una indicación y el valor medido correspondiente. Expresa una relación biunívoca, que no proporciona un resultado de medida, ya que no contiene información alguna sobre la incertidumbre de medida.

Los métodos clásicos se caracterizan porque consisten en medir la cantidad de sustancia en una muestra (gravimetría y volumetría). Se caracterizan por ser métodos de alta precisión, y son considerados métodos absolutos porque es posible encontrar una relación directa entre la medida analítica y la concentración analítica sin necesitar estándares o patrones que contengan el analito en cuestión, tan solo utilizan reacciones químicas y coeficientes estequiométricos para calcular la concentración final de analito.

En cambio, los métodos instrumentales son métodos que utilizan técnicas más modernas, como son las técnicas cromatográfica, ópticas, térmicas, radioquímicas o másicas. Tienen gran capacidad de analizar de forma rápida muchas muestras, pero presentan una desventaja frente a los clásicos, son menos precisos y esto es debido al error de calibración. Las técnicas instrumentales son técnicas relativas, la señal obtenida de la medición de la muestra a analizar se compara con otras medidas para determinar la concentración analítica.

Los patrones utilizados ya contienen un error de medida, y este error se arrastra y se añade al resto de errores, tanto aleatorios como sistemáticos, que aparecen en el proceso de calibración, incrementando el posible error de la determinación de la concentración. A diferencia de lo que ocurre con los métodos clásicos, los métodos instrumentales requieren el uso de estándares químicos adecuados que contengan el analito a estudiar. Y la forma más común de determinar la concentración de una muestra usando estándares pasa por la elaboración de gráficas de calibrado con la correspondiente recta de calibración.

El procedimiento para elaborar las gráficas de calibrado se indica a continuación. Se toman una serie de patrones de calibración de concentración conocida. Estos patrones se miden en el equipo bajo las mismas condiciones que las utilizadas para las muestras. Una vez establecida la función de calibrado, puede obtenerse la concentración del analito por interpolación.

El primer problema que se plantea es demostrar la linealidad de la función de calibrado, o la forma de la curva. En segundo lugar, se trata de estimar la mejor línea (o curva) que pasa por los puntos de calibración.

Para demostrar la idoneidad de la función se debe estudiar la correlación entre la variable independiente (concentración) y la variable dependiente (respuesta del equipo).

Previamente se debe considerar lo siguiente:

-Rango o intervalo de la medida instrumental

Se debe establecer un mínimo y un máximo. Normalmente, el límite inferior estará determinado por el límite de cuantificación, y el superior estará determinado por valores legales, aunque en muchos casos, ante la imposibilidad de cubrir todo el rango, se recurre a la realización de diluciones.

-Blanco de la curva de calibrado

El blanco no contiene ningún analito que haya sido adicionado deliberadamente pero contiene los mismos disolventes, reactivos, etc, que las muestras y está sujeto al mismo procedimiento analítico. La señal, a veces, no será cero, pero deberá ser inferior a 1/3 del punto más bajo del calibrado.

-Preparación de los patrones

La concentración de los patrones constituye la variable independiente. La calibración presupone que las concentraciones están libres de error, mientras que la medida de la respuesta está sujeta a errores aleatorios. Se requiere, al menos, cuatro puntos de calibración distintos de cero.

La magnitud de los errores de la variable dependiente (y) en calibraciones simples, puede ser independiente de la concentración (datos homocedásticos); pero en muchos análisis, los datos son heterocedásticos, es decir, la desviación estándar de los valores de y aumenta con la concentración del analito, en lugar de tener el mismo valor para todas las concentraciones.

Dentro de los métodos instrumentales, existen diversos tipos de calibraciones y por consiguiente, diferentes formas de conseguir la función de calibrado. Destacamos la calibración externa, el método del patrón interno y el método de las adiciones estándar.

2. PATRÓN EXTERNO

Se trata de la forma más simple de calibración. En la calibración estándar externa se preparan una serie de disoluciones estándar independientes de la muestra. Los estándares son utilizados para establecer la función de calibración del instrumento, la cual es obtenida a partir del análisis de la respuesta del instrumento en función de la concentración del analito.

Se aplica este método cuando se desea determinar la concentración de un analito en la que, ni los componentes de la matriz de la muestra ni los reactivos usados en el procedimiento interfieren en el análisis. También se puede usar en el caso en que las interferencias se conozcan y se mantengan siempre constantes en las medidas, las cuales se podrían corregir posteriormente.

Se trata de un método simple y rápido, ya que usando un número necesario de patrones se puede analizar múltiples muestras.

Sin embargo, este método se basa en la suposición de que la respuesta instrumental del analito en la muestra será la misma que la respuesta del analito en la muestra patrón. Aunque se corrige con blanco, hay muchos factores que pueden hacer que esta suposición no se cumpla. Los más comunes son: los efectos de la matriz, los errores instrumentales, los errores del proceso, la contaminación de muestras durante la preparación y la incorrecta elaboración de blancos o patrones.

La función de calibración puede obtenerse gráfica o matemáticamente. Por lo general, se utiliza una gráfica de la respuesta de un instrumento con respecto a las concentraciones conocidas del analito para producir una curva de calibración. Es deseable que la curva de calibración sea lineal, al menos, en el intervalo de trabajo.

Los métodos estadísticos, como el método de mínimos cuadrados, son utilizados en forma rutinaria para encontrar la ecuación matemática que describe una función de calibración. La concentración de las muestras o incógnitas se calcula entonces por la función de calibración.

-Método de mínimos cuadrados

Existen numerosas leyes físicas en las que se sabe de antemano que dos magnitudes x e y se relacionan a través de una ecuación lineal

$$y = ax + b$$

donde las constantes b (ordenada en el origen) y a (pendiente) dependen del tipo de sistema que se estudia y, a menudo, son los parámetros que se pretende encontrar.

El método más efectivo para determinar los parámetros a y b se conoce como técnica de mínimos cuadrados. Consiste en someter el sistema a diferentes condiciones, fijando para ello distintos valores de la variable independiente x, y anotando en cada caso el correspondiente valor medido para la variable dependiente y.

De este modo se dispone de una serie de puntos (x₁,y₁), ..., (x_n,y_n) que, representados gráficamente, deberían caer sobre una línea recta. Sin embargo, los errores experimentales siempre presentes hacen que no se hallen perfectamente alineados.

El método de mínimos cuadrados determina los valores de los parámetros a y b de la recta que mejor se ajusta a los datos experimentales. Sin detallar el procedimiento, se dará aquí simplemente el resultado:

$$a = \frac{n(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$
$$b = \frac{(\sum y_i) - a(\sum x_i)}{n}$$

donde n es el número de medidas y \sum representa la suma de todos los datos que se indican.

El coeficiente de correlación es otro parámetro para el estudio de una distribución bidimensional, que nos indica el grado de dependencia entre las variables x e y. El coeficiente de correlación r es un número que se obtiene mediante la fórmula:

$$r = \frac{\sum[(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})]}{\sqrt{\sum[(x - \bar{x})^2] \cdot \sum[(y - \bar{y})^2]}}$$

El coeficiente de correlación es un valor sin unidades entre -1 y 1. Cuanto más se aproxima a cero, más débil es la relación lineal.

-Criterios adicionales para demostrar la linealidad

El coeficiente de correlación no es suficiente para demostrar la relación lineal entre variables. Por ello, se establece como requisito la necesidad de un criterio adicional para demostrar la linealidad.

A. COEFICIENTE DE LINEALIDAD

Se pueden producir situaciones con valores de r adecuados, pero que no asegure la relación lineal. El coeficiente de linealidad se estima a partir de la siguiente expresión:

$$C_{linealidad} = \left[1 - \frac{S_b}{b}\right] \cdot 100$$

Siendo S_b la desviación de la pendiente de calibrado.

El requisito de un criterio adicional se justifica en el hecho de que el establecimiento de la función de calibrado por el método de mínimos cuadrados va a conducir siempre a la obtención de unos coeficientes a y b, que satisfagan la distancia mínima entre el valor

obtenido y el esperado, aunque la verdadera relación entre la respuesta y concentración no sea lineal.

B. RESIDUALES

Por residuales se entiende la diferencia entre la respuesta práctica y el valor de la respuesta que resulta de sustituir cada uno de los valores en la función de calibrado. Su cálculo se realiza de forma porcentual, y el criterio establecido depende de la naturaleza del proceso, del nivel de contracción, etc, aunque de manera general, se establecen criterios del 15 o 20 % en los niveles bajos del calibrado y un 10 % en los altos.

-Calibración lineal ponderada

La calibración lineal ponderada consiste en dar diferente importancia en la contribución de cada punto de calibrado en el estudio de la linealidad. De manera general, suele interesar que la linealidad esté perfectamente estudiada en los valores bajos de calibración, que suelen ser los valores críticos de estudio de la muestra. De tal forma, que se puede considerar dar más peso a los valores bajos con una calibración ponderada $1/x$ o $1/x^2$.

3. PATRÓN INTERNO

Método utilizado para compensar errores debidos a fluctuaciones debidas a la técnica analítica. Los patrones internos, además, se consideran muy útiles, cuando la concentración de la muestra o la respuesta instrumental varía cada vez que se utiliza, por razones desconocidas y difíciles de controlar. También es un método de utilidad cuando se producen pérdidas del analito durante el proceso.

Se utiliza como estándar interno, una sustancia diferente al analito pero que tengan propiedades físico-químicas similares, provocando que se vean afectadas de forma similar durante el análisis. Añadiendo un patrón de propiedades parecidas al analito, la relación de concentración perdida de ambas se mantiene constante.

Se empieza por la adición de la sustancia pura a la muestra y a los patrones en concentración fija. Primero se determina la respuesta del equipo a las disoluciones estándares (A) por separado y después con el patrón interno (PI).

Se calcula el cociente de la respuesta de ambas, y este valor es el que se representa frente a la concentración del analito. Por tanto, se representa gráficamente el cociente entre la señal del analito y la del patrón interno en función de la concentración del analito de las disoluciones de los estándares. Si se varía algún parámetro que afecte a las respuestas medidas, dichas respuestas deberán afectar igual al analito y al patrón interno.

Se compensa el efecto de los errores no controlados, por lo que obtenemos resultados más exactos y precisos. Sin embargo, se trata de un procedimiento más laborioso.

4. MÉTODO DE ADICIONES ESTÁNDAR

En algunas ocasiones, al medir una sustancia, hay otros componentes en la muestra o disolución a analizar, y estos interfieren en los resultados de medición, es lo que se conoce como efecto matriz.

Cuando esto ocurre, hay dos soluciones posibles. Una primera solución, es lo que se conoce como aproximación a una matriz comparable, consiste en tomar una muestra similar a la muestra problema, pero sin el analito a determinar, y añadir esta sustancia para formar disoluciones patrón que poder comparar con la muestra problema. Aunque no es siempre posible obtener esta aproximación, depende de la matriz y del analito a analizar.

La segunda solución es utilizar el método de las adiciones estándar. El método consiste en añadir cantidades de concentración conocida de analito a la muestra a determinar. Con el aumento de la señal de respuesta, se puede determinar la concentración de analito que había antes de la adición.

Consiste en tomar volúmenes iguales de la muestra a analizar, y a todas, menos a una de ellas, se le adiciona concentraciones conocidas y crecientes del analito, y por último todas ellas se diluyen al mismo volumen. De esta forma se tienen disoluciones con una misma concentración de analito problema, a las que se añaden concentraciones distintas de patrón, que es la misma especie que el analito.

Después de medir la señal de cada una de las disoluciones se representan estas respuestas en función de la concentración de analito patrón añadido obteniéndose una línea recta que no pasa por el origen de coordenadas.

Una vez realizado, se determinan todas las señales para cada una de las disoluciones, y se representan gráficamente. Se calcula la línea de regresión, pero este método tiene una diferencia con los anteriores, y es que la concentración de analito problema se haya mediante extrapolación al eje X. Se considera, en valor positivo, que la concentración de analito en la muestra es el punto de corte de la recta con el eje X.

De manera previa, para evaluar si existe efecto matriz, se puede utilizar un método sencillo de comparación entre dos pendientes de dos rectas de calibrado. Una se elabora por calibración externa añadiendo concentraciones crecientes de analito a un disolvente determinado, y la segunda por adición estándar, añadiendo analito en distintas concentraciones a la muestra. Si las rectas son paralelas, es decir, si las pendientes son idénticas, no existe dicho efecto matriz. En el caso en el que no sean paralelas, sí hay efecto matriz.

Las ventajas principales de este método es que se consigue eliminar el efecto matriz, y el inconveniente principal es que se trata de un método muy laborioso que requiere la elaboración de una recta de calibrado por muestra.

5. MATERIALES DE REFERENCIA

Los materiales de referencia son una herramienta importante en la calidad y se usan para la validación del método, calibración, estimación de incertidumbre, etc.

Un material de referencia es un material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos para permitir 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 es un material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad con una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad para la cual cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación de un nivel de confianza.

Los MRC generalmente se preparan en lotes. Los valores de la propiedad se determinan dentro de las incertidumbres declaradas por medio de medidas, sobre muestras representativas del lote completo.

La principal diferencia entre un MR y un MRC es el certificado asociado al MRC emitido por un organismo competente. Este certificado garantiza que un MRC sea, desde un punto de vista práctico, la mejor referencia posible en la verificación de la trazabilidad de un método.

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. Ellos pueden caracterizarse para "identidad" o para "valores de propiedad" (por ejemplo, cantidad de entidad química especificada, dureza, etc.).

Algunos tipos de materiales de referencia normalmente disponibles son los siguientes:

1. Sustancias puras caracterizadas para pureza química y/o impurezas trazas.
2. Soluciones normalizadas y mezclas de gas, a menudo preparadas gravimétricamente a partir de sustancias puras y usadas para propósitos de calibración.
3. Materiales de referencia matrices, caracterizados por la composición del constituyente químico especificado mayor, menor o traza. Dichos materiales se pueden preparar de matrices que contienen los componentes de interés o preparando mezclas sintéticas.
4. Materiales de referencia físico-químicos caracterizados para propiedades tales como punto de fusión, viscosidad y densidad óptica.
5. Objetos o artefactos de referencia caracterizados para propiedades funcionales como sabor, olor, número de octano, punto de inflamación y dureza. Este tipo también incluye especímenes de microscopía caracterizados para propiedades que van desde tipo de fibra a especímenes microbiológicos.

Dentro de los usos de los materiales de referencia, podemos destacar en este tema, el uso para calibración.

Los MRs se utilizan para calibrar equipos Siempre que se disponga de un certificado resultará de mayor utilidad para demostrar una trazabilidad, de la misma forma que interesa que su incertidumbre sea baja ya que contribuye a la incertidumbre total de la medición.

Los materiales de referencia que se emplean en la calibración, se denominan también patrones. A partir de estos, se elaboran las disoluciones de concentración conocida para construir las curvas de calibrado, y es con ellos, con los que se calcula la concentración de analito presente en la muestra.

Es necesario que al patrón le acompañe su certificado que garantiza la fiabilidad de lo que se está utilizando. Los certificados de los patrones suele incluir el nombre del producto, la riqueza de éste (y cómo se ha determinado) y la fecha de caducidad.

Es importante el control de la caducidad de los patrones empleados en la calibración para evitar posibles fallos en las determinaciones analíticas. Es importante comprobar la fiabilidad de estos patrones con la comparación con otro patrón de distinto lote, con la participación en ejercicios de intercomparación o con la evaluación de materiales de referencia que tengan presente dicho analito.

MATERIAL NO OFICIAL

BIBLIOGRAFÍA

-<https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>

-Ajuste por mínimos cuadrados. FÍSICA I. Escuela politécnica de Ingeniería de Minas y Energía.

-Importancia de la calibración en los laboratorios de química analítica. Universidad de Sevilla. Facultad de farmacia.

-Guía para la selección y uso de Materiales de Referencia. ILAC-G9:2005.

-Fundamento de química analítica. Skoog., Novena Edición.

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 21

**MÉTODOS DE SEPARACIÓN I. CRISTALIZACIÓN.
DESTILACIÓN.PRECIPITACIÓN. FILTRACIÓN. EVAPORACIÓN.
DESECACIÓN. CENTRIFUGACIÓN. APLICACIONES A ANÁLISIS DE
PRODUCTOS 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

MÉTODOS DE SEPARACIÓN I. INTRODUCCIÓN

CRISTALIZACIÓN

DESTILACIÓN

PRECIPITACIÓN

FILTRACIÓN

Filtración por gravedad

Filtración a vacío

EVAPORACIÓN

Evaporación por aumento de la temperatura

Evaporación por disminución de la presión

Evaporación por combinación de ambos efectos

DESECACIÓN

Secado de sólidos

Secado de líquidos

Secado de gases

CENTRIFUGACIÓN

Centrifugación Preparativa

Centrifugación Analítica

Instrumentación

APLICACIONES AL ANÁLISIS DE PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

BIBLIOGRAFÍA

MÉTODOS DE SEPARACIÓN I. INTRODUCCIÓN

En análisis químico siempre se busca la aplicación de procedimientos que incluyan el mínimo número de etapas posibles, pues de esa forma se evitarán pérdidas de analito o contaminaciones, a la vez que el proceso global será más rápido y sencillo. Sin embargo, las muestras bajo estudio en el campo del análisis de alimentos son complejas y contienen normalmente moléculas de características semejantes que, en muchas ocasiones, son interferentes en las determinaciones individuales. Por ello, es muy común que resulte necesaria la inclusión en el proceso analítico de una etapa previa de separación con el fin de eliminar las especies interferentes o aislar el analito.

Se podría definir **separación** como una operación consistente en la división de una mezcla en, al menos, dos partes de composición diferente.

Las situaciones en las que se hace necesaria la inclusión de una técnica de separación en el procedimiento analítico global son (Universidad de Murcia, 2012):

- Cuando es necesario eliminar interferencias de la matriz de la muestra. Se busca por tanto incrementar la selectividad del método.
- Cuando la concentración del analito en la muestra es muy baja, es posible que la aplicación directa del método analítico no origine señal; en este caso, el método de separación se aplica para incrementar la sensibilidad del método.
- Cuando las dos situaciones anteriores se dan simultáneamente; es decir, tanto la selectividad como la sensibilidad del método han de ser mejoradas.

Es importante tener en cuenta que la aplicación de cualquier técnica de separación siempre implica un proceso físico y en ocasiones también un proceso químico.

A continuación se recoge el fundamento de algunas de las principales técnicas de separación aplicadas al análisis de alimentos.

CRISTALIZACIÓN

El valor de máxima solubilidad de una sustancia en un determinado disolvente es un valor límite en unas condiciones de presión y temperatura dadas. Por tanto, y siempre que estemos en condiciones de equilibrio, cualquier proceso que tienda a aumentar la concentración de una disolución saturada provocará la aparición del exceso de sólido. Si el sólido se forma de un modo lento, ordenado, en pocos núcleos, con la aparición de partículas poliédricas de tamaño apreciable de morfología característica (“cristales”), hablaremos de un proceso de **crystalización**.

La **crystalización** es la técnica más simple y eficaz para purificar compuestos orgánicos sólidos. El sólido que se vaya a purificar se disuelve en el disolvente caliente (generalmente a ebullición), de modo que la disolución esté prácticamente saturada, y la mezcla resultante se filtra en caliente para eliminar todas las impurezas insolubles. En estas condiciones se genera una disolución saturada que, al enfriar, se sobresatura produciéndose la crystalización. El proceso de crystalización es un proceso dinámico, de manera que las moléculas que están en la disolución están en equilibrio con las que

forman parte de la red cristalina. El elevado grado de ordenación de una red cristalina excluye la participación de impurezas en la misma. Para ello, es conveniente que el proceso de enfriamiento se produzca lentamente de forma que los cristales se formen poco a poco y el lento crecimiento de la red cristalina excluya las impurezas. Si el enfriamiento es muy rápido las impurezas podrían quedar atrapadas en la red cristalina

Para la elección de un disolvente de cristalización suele ser muy útil la regla “lo semejante disuelve a lo semejante”. Los disolventes más usados, en orden de polaridad creciente, son éter de petróleo, cloroformo, acetona, acetato de etilo, etanol y agua. Es mejor utilizar un disolvente con un punto de ebullición que sobrepase los 60°C, pero que a su vez sea al menos 10°C más bajo que el punto de fusión del sólido que se desea cristalizar.

Con frecuencia este procedimiento de purificación de un sólido mediante una *recristalización* sencilla con un solo disolvente falla. Ocurre con sustancias que son demasiado solubles en un disolvente, incluso en frío, y poco solubles en otros disolventes, aún en caliente. En estos casos se pueden utilizar pares de disolventes que sean miscibles entre sí, tales como metanol-agua, acetato de etilo-etanol, éter-acetona, etc.

DESTILACIÓN

La separación y purificación de líquidos por destilación constituye una de las principales técnicas para purificar líquidos volátiles. La destilación hace uso de la diferencia entre los puntos de ebullición de las sustancias que constituyen una mezcla (Universidad Jaume I, 2011).

Las dos fases en una destilación son: la vaporización o transformación del líquido en vapor y la condensación o transformación del vapor en líquido. Existen varias clases de destilación, la elección en cada caso se hace de acuerdo con las propiedades del líquido que se pretenda purificar y de las impurezas que lo contaminan.

Tipos de destilación

Destilación simple. Es una técnica utilizada en la purificación de líquidos a presión atmosférica y cuyo punto de ebullición es inferior a 150°C. Sirve para eliminar impurezas no volátiles. Esta técnica también se emplea para separar dos líquidos cuyos puntos de ebullición difieran al menos en 60-80°C.

Destilación al vacío. Esta técnica se emplea en la separación de líquidos con un punto de ebullición superior a 150°C. Ya que un líquido hierve cuando su presión de vapor iguala a la presión externa, se puede reducir el punto de ebullición disminuyendo la presión a la que se destila. Esta técnica se conoce como destilación a presión reducida o destilación al vacío.

La destilación al vacío se utiliza cuando el líquido tiene un punto de ebullición excesivamente alto o descompone a alta temperatura.

Destilación fraccionada. Es una técnica que se emplea en la separación de sustancias cuyos puntos de ebullición difieran entre sí menos de 25°C. La diferencia respecto a la destilación simple es la presencia de una columna de fraccionamiento entre el matraz y la cabeza de destilación.

Destilación por arrastre de vapor. La destilación por arrastre de vapor es una técnica aplicada en la separación de sustancias poco solubles en agua. Se emplea para separar una sustancia de una mezcla que posee un punto de ebullición muy alto y que se descomponen al destilar. También se emplea para purificar sustancias contaminadas por grandes cantidades de impurezas resinosas y para separar disolventes de alto punto de ebullición de sólidos que no se arrastran.

PRECIPITACIÓN

Cómo se ha comentado en el caso de la cristalización, el valor de máxima solubilidad de una sustancia en un determinado disolvente es un valor límite en unas condiciones de presión y temperatura dadas. Por tanto, y siempre que estemos en condiciones de equilibrio, cualquier proceso que tienda a aumentar la concentración de una disolución saturada provocará la aparición del exceso de sólido. Si el sólido se forma de un modo rápido, desordenado, en muchos puntos simultáneamente (“núcleos de cristalización”), y las partículas son de tamaño muy pequeño, hablaremos de un proceso de **precipitación**.

Se llama **precipitación** a la aparición de una fase sólida en el seno de un líquido, bien por adición de un reactivo que forma un producto insoluble con algunos de los iones de la disolución, o bien por concentración del mismo líquido hasta sobrepasar la saturación. El **precipitado** es el producto sólido que se origina.

En la precipitación intervienen los equilibrios químicos heterogéneos que tienen lugar entre una fase sólida y una líquida. Para estudiar dichos equilibrios se definen los conceptos de **solubilidad** y **producto de solubilidad**.

Cuando se tiene una disolución saturada en agua pura en equilibrio con un precipitado, a temperatura constante, la máxima cantidad de sólido disuelto en la disolución determina la **solubilidad (s)** del precipitado expresándose ésta normalmente en g/L o moles/litro. En general, para la mayoría de las sustancias hay un aumento de la solubilidad con la temperatura.

Para un electrolito AB que se disuelve en agua, por ejemplo una sal poco soluble como podría ser el AgCl, tendremos un equilibrio heterogéneo entre el sólido y la sustancia disuelta. Este sólido disuelto, a su vez está en equilibrio de disociación con sus iones, equilibrio que está casi totalmente desplazado a la derecha.



La constante de equilibrio sería la siguiente:

$$K = \frac{a_{A^-} \cdot a_{B^+}}{a_{AB\downarrow}} = \frac{[A^-][B^+]}{[AB]\downarrow}$$

La actividad ($a_{AB\downarrow}$) del sólido en el equilibrio se mantiene constante, por lo que se puede englobar en el valor de K. La nueva constante se denomina **producto de solubilidad (K_s)** y es igual al producto de las actividades de los iones de un sólido poco soluble en una disolución saturada. En estos equilibrios se consideran sustancias poco solubles, por tanto, su solubilidad va a ser pequeña. Al tratarse de disoluciones diluidas las actividades pueden sustituirse entonces por concentraciones.

$$K_s = [A^-][B^+]; \text{ si } [A^-] = [B^+] \rightarrow K_s = s \cdot s = s^2$$

Conocido K_s se puede calcular s y viceversa. En general, si tenemos una sal poco soluble del tipo A_mB_n , la solubilidad se obtiene mediante la fórmula:

$$s = \sqrt[m+n]{\frac{K_{sA_mB_n}}{m^m n^n}}$$

Dado que el producto de solubilidad rige el equilibrio que se establece en una disolución saturada, para un sólido poco soluble AB:

Si $[A^-][B^+] > K_s \rightarrow$ Precipitación

$[A^-][B^+] = K_s \rightarrow$ Condiciones de equilibrio de precipitación a saturación. Disolución saturada.

$[A^-][B^+] < K_s \rightarrow$ No hay precipitación. Si existiese precipitado este se redisolvería hasta alcanzar saturación.

Muchos iones inorgánicos se pueden separar por reacción con un compuesto orgánico o inorgánico que dé lugar a su precipitación. Generalmente se utilizan reactivos orgánicos, que muchas veces son altamente selectivos y pueden emplearse tanto para la separación como para la determinación de los iones con los que precipitan ya que dan factores gravimétricos favorables (Universidad de Murcia, 2012).

Modificación de la solubilidad en compuestos iónicos poco solubles

Una vez definido el producto de solubilidad de un sólido iónico poco soluble y estudiada su relación con la solubilidad, podría concluirse que mientras no varíe la temperatura, la solubilidad no cambia. Sin embargo la experiencia muestra que esto no es así y que la solubilidad de los compuestos iónicos puede modificarse a T^a constante por varias causas:

1. Presencia del ión común o efecto de ión común: la solubilidad de una sustancia disminuye (o lo que es lo mismo, aumenta la precipitación) por adición de un exceso de agente precipitante.
2. Presencia de iones no comunes o efecto salino: presencia en disolución de iones extraños que no reaccionan ni con los iones de los reactivos ni con el precipitado, pero que sin embargo, producen un aumento de la solubilidad.

3. Disolución incompleta del soluto en iones. Pares iónicos: los pares iónicos son dos iones con carga opuesta que permanecen unidos por atracción electrostática. El par iónico puede ser estable, si bien, tienen un tiempo de vida corto, formándose y destruyéndose con rapidez. Para que el producto de las concentraciones iónicas sea igual a K_{ps} , debe aumentar la cantidad de soluto disuelto, lo que hace que la solubilidad del soluto sea mayor que la esperada.

FILTRACIÓN

Se denomina **filtración** al proceso de separación de partículas sólidas de un líquido utilizando un material poroso llamado **filtro**. La técnica consiste en verter la mezcla sólido-líquido que se quiere tratar sobre un filtro que permita el paso del líquido pero que retenga las partículas sólidas. El líquido que atraviesa el filtro se denomina **filtrado**

El filtro en el laboratorio suele ser papel poroso, pero puede ser de otros materiales que permitan el paso de líquidos. En cualquier caso es necesario seleccionar la porosidad del filtro según el diámetro de las partículas que se quieren separar.

Según la fuerza impulsora que ayuda a que el líquido pase a través del filtro, la filtración puede clasificarse en (Angurell & cols.):

Filtración por gravedad

La única fuerza impulsora para que el líquido atraviese el filtro es la gravedad. Es el método más sencillo y tradicional. Permite separar un sólido de un líquido cuando lo que se quiere recuperar es el líquido. Ofrece la máxima superficie de filtración de manera que ésta es más rápida.

Filtración a vacío

La fuerza impulsora para que el líquido atraviese el filtro es la que ejerce la presión atmosférica cuando aplicamos el vacío al sistema. Para ello se necesita un embudo Büchner, un matraz kitasato y una bomba de vacío que va a reducir la presión en el kitasato lo que va a inducir una rápida filtración. Permite separar un sólido de un líquido, cuando lo que se quiere recuperar es el sólido. Ofrece una menor superficie de filtración para recoger mejor el sólido.

Un ejemplo de aplicación de este proceso es la separación del agente desecante de una disolución orgánica. (Angurell & cols.).

EVAPORACIÓN

Los términos **evaporación** o **vaporización** se aplican al paso del estado líquido al estado gaseoso. Cuando el fenómeno se produce únicamente en la superficie de la masa líquida se designa **evaporación** mientras que si tiene lugar afectando toda la masa se denomina **vaporización** o **ebullición**. También se denomina **evaporación** a la operación de separación basada en los dos fenómenos.

Tanto la evaporación como la vaporización son dos fenómenos endotérmicos. El caudal del líquido vaporizado se incrementa al aumentar la superficie libre del líquido.

Cuando un líquido llena parcialmente un recipiente cerrado, las moléculas que abandonan el estado líquido ocupan el espacio libre hasta saturarlo produciendo una presión determinada que se denomina **presión de vapor**. Cada líquido tiene una presión de vapor característica que depende de la temperatura.

Cuando la presión de vapor, que aumenta al incrementar la temperatura, se iguala a la presión del entorno, normalmente la presión atmosférica, se produce la ebullición del líquido.

Evaporación por aumento de la temperatura

Para evaporar un líquido o concentrar una disolución se utilizan baños de agua u otras fuentes de calor. Esta técnica también se puede utilizar para el secado de un sólido húmedo.

Evaporación por disminución de la presión

Este procedimiento se utiliza para el secado de una sustancia a temperatura ambiente cuando la sustancia es inestable a temperaturas más elevadas. Se introduce la muestra en un **deseCADOR de vacío**, en presencia de un agente desecante.

Evaporación por combinación de ambos efectos

Una operación frecuente en un laboratorio es la eliminación del disolvente orgánico volátil de una solución de un compuesto orgánico, como por ejemplo sucede al finalizar un proceso de extracción. La eliminación rápida de grandes cantidades de un disolvente orgánico se efectúa utilizando el **rotavapor**.

La evaporación tiene lugar a presión reducida, producida normalmente por una bomba de vacío y a temperaturas moderadas.

La eliminación de vapores por calentamiento y aplicación simultánea de vacío se puede realizar también en **estufas de vacío** que disponen de un regulador de temperatura así como de una conexión para el vacío. Estas estufas se utilizan también para el secado de sólidos.

DESECACIÓN

El secado o la desecación es la operación que consiste en separar mediante procedimientos no mecánicos un líquido de un sólido que lo retiene físicamente.

Secado de sólidos

Las condiciones para secar productos sólidos dependen de la cantidad de sólido, de la naturaleza del disolvente que se quiere eliminar y de la sensibilidad del producto al calor y a la atmósfera.

Las muestras cristalinas de compuestos estables húmedos con disolventes no tóxicos y volátiles a temperatura ambiente (como por ejemplo agua) se pueden secar al aire colocando los cristales entre hojas de papel desecante hasta que sólo queden trazas de disolvente. Finalmente se acaban de secar en una **estufa eléctrica** a la temperatura adecuada.

Es frecuente, sobre todo en el caso de sustancias orgánicas, el secado a temperatura ambiente en **desecadores de vacío** y con la ayuda de agentes desecantes (sílice, sosa, potasa o el óxido de fósforo (V)).

Otra manera de secar sólidos consiste en utilizar agentes desecantes junto con el vacío y la calefacción. Esto se consigue en las **estufas de vacío**.

Secado de líquidos

Normalmente los líquidos a secar son disolventes o disoluciones orgánicas que contienen agua como contaminante.

Secado de disoluciones

Para eliminar el agua de las disoluciones se trata la solución con un agente deshidratante. A la hora de escogerlo se ha de tener en cuenta que no reaccione con el material que se quiere secar, su capacidad de absorción de agua, la rapidez con la que seca la disolución y el precio.

Secado de líquidos puros o disolventes

Un procedimiento eficaz para obtener un disolvente anhidro es añadir un deshidratante al disolvente, llevarlo a reflujo y destilarlo después. Este proceso depende de la naturaleza del disolvente.

Secado de gases

Los gases pueden secarse haciéndolos pasar a través de columnas que contienen un agente desecante (gel de sílice, CaO, KOH, tamices moleculares, etc.). También se pueden secar haciéndolos burbujear a través de ácido sulfúrico concentrado.

CENTRIFUGACIÓN

La centrifugación es una técnica de separación que se utiliza para aislar o concentrar partículas suspendidas en un líquido aprovechando la diferente velocidad de desplazamiento según su forma, tamaño o peso al ser sometidas a una fuerza centrífuga. La fuerza centrífuga es la que se ejerce sobre un cuerpo cuando éste gira alrededor de un eje. Esta fuerza, cuya magnitud es directamente proporcional a la masa del cuerpo, el radio de giro y la velocidad de giro (o angular), es perpendicular al eje y tiende a alejar el cuerpo del mismo. La fuerza centrífuga puede acelerar el proceso de sedimentación de partículas que tienen tendencia a hacerlo espontáneamente (densidad superior a la del líquido), o en aquellas que tienden a flotar (densidad inferior a la del líquido) (Angurell & cols.) Es por tanto una sedimentación en un campo de alta aceleración.

La centrifugación se puede llevar a cabo a escala preparativa o escala analítica. La primera se utiliza para aislar partículas para su aprovechamiento posterior y la segunda permite determinar propiedades físicas como la velocidad de sedimentación o el peso molecular. Las partículas se pueden separar en función de la velocidad de sedimentación (centrifugación diferencial), la masa (centrifugación zonal) o la densidad (centrifugación isopícnica). La centrifugación zonal y la centrifugación isopícnica son modos de centrifugación mediante un gradiente de densidades (Angurell & cols.).

Centrifugación Preparativa

Centrifugación diferencial

En este tipo de centrifugación la muestra va a ocupar la totalidad del tubo. Al aplicar el campo centrífugo los componentes con mayor coeficiente de sedimentación (s) avanzan más rápidamente alcanzando las paredes del tubo. Se separan así dos fracciones, el sedimento, que no será homogéneo ya que estará formado por partículas con diferentes coeficiente de sedimentación, y el sobrenadante que sí puede serlo si sólo está formado por las partículas de menor s . Por ello, cuando se desea separar varios componentes la centrifugación se realiza en varias etapas, aplicando campos centrífugos crecientes y tiempos cada vez mayores.

Centrifugación mediante un gradiente de densidades

Este tipo de centrifugación es un proceso mediante el cual las partículas se distribuyen en fracciones de diferentes densidades de un fluido líquido. La técnica permite la separación de varios o todos los componentes de la muestra y la realización de medidas analíticas. El método de gradiente de densidades implica la utilización de un soporte fluido cuya densidad aumenta desde la zona superior a la inferior. El gradiente se consigue con un soluto preferiblemente de baja masa molecular, de tal manera que la muestra a analizar pueda ser suspendida en la solución resultante. Como solutos se utilizan la sacarosa, polisacáridos sintéticos, derivados yodados del ácido benzoico, o sales de metales alcalinos pesados, entre otros. La muestra se deposita en la parte superior del gradiente como una fina banda y, tras centrifugar, la separación de los componentes de la muestra se presenta como diferentes bandas o zonas que pueden ser separadas (o fraccionadas).

Hay dos variantes de este método, la centrifugación zonal y la centrifugación isopícnica:

Centrifugación zonal

En la centrifugación zonal la muestra a analizar se deposita en la parte superior de un gradiente de densidades previamente formado. A causa de la fuerza centrífuga **las partículas se mueven a velocidades que dependen de la masa** y sedimentan en diferentes zonas del gradiente. La densidad máxima del gradiente no ha de exceder a la de las partículas a separar.

Centrifugación isopícnica

Se trata de una centrifugación de equilibrio que separa por diferencia de densidades. Se suele llevar a cabo en gradientes autogenerados. Las partículas se mueven en el gradiente hasta que llegan a un punto donde la densidad de éstas y la del gradiente son idénticas (de aquí el nombre de 'isopícnico'). En este caso, es condición fundamental que la densidad máxima del gradiente final ha de exceder siempre a la densidad de las partículas. Esta técnica se utiliza, por ejemplo, para separar **partículas similares en tamaño pero de diferente densidad**. En este sentido, la centrifugación isopícnica es un método adecuado para separar ácidos nucleicos o diferentes orgánulos celulares.

Centrifugación Analítica

Su objetivo es medir las propiedades físicas de las partículas que sedimentan, tales como su coeficiente de sedimentación o su masa molecular, especialmente en la variante **ultracentrifugación** analítica.

Instrumentación

El aparato en el que se desarrolla una centrifugación recibe el nombre genérico de **centrífuga**. Consta de un *rotor* o recipiente para contener las muestras. Éste va a estar sometido a una rotación generada por un motor y que se transmite a través de un vástago. El rotor gira en el interior de una cámara que puede estar termostatazada con el objeto de efectuar el análisis a temperatura controlada. La cámara en la que se produce el giro está blindada para prevenir accidentes derivados de la rotura del vástago. Se pueden incorporar también sensores que detienen el motor en caso de que el rotor no esté convenientemente equilibrado.

Hay diferentes tipos de centrífugas **según el rango de velocidades de giro**:

- A. **Centrífugas de baja velocidad**, de sobremesa o clínicas. De pequeño tamaño y sin refrigeración. Alcanzan una velocidad máxima de 5000 rpm. Son útiles para la separación de partículas grandes.

Las centrífugas microfugas son una variante de las anteriores que permiten llegar a velocidades de más de 10.000 rpm. Los volúmenes de trabajo son muy pequeños y se emplean principalmente en biología molecular.

- B. **Centrífugas de alta velocidad**. Alcanzan velocidades de entre 18.000 y 25.000 rpm. Son refrigeradas y algunas tienen sistema de vacío para evitar el calentamiento del rotor a causa del rozamiento con el aire.
- C. **Ultracentrífugas**. Superan las 50.000 rpm, por lo que tienen sistemas auxiliares de refrigeración y de alto vacío.

Los rotores responden a tres tipos básicos:

- 4. **Rotores flotantes**: los tubos se alojan en el interior de unas carcasas metálicas que cuelgan de un eje perpendicular al vástago. En el momento en que actúa el

campo centrífugo las carcasas se orientan a su favor. Pueden transportar una reducida cantidad de muestra.

5. **Rotores angulares:** tiene forma de tronco cono, donde hay una serie de perforaciones dónde se aloja la muestra. Forman cierto ángulo con la vertical y admiten grandes volúmenes de muestra.
6. **Rotores verticales:** forma cilíndrica con perforaciones para contener los tubos de muestra dispuestos en posición vertical. El campo centrífugo es más uniforme y permiten una sedimentación de la muestra más rápida.

APLICACIONES AL ANÁLISIS DE PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

Los productos agroalimentarios son matrices complejas en las que, a menudo, hay que determinar analitos a concentraciones muy bajas, lo que supone el empleo de técnicas instrumentales muy sensibles. Las aplicaciones de las técnicas de separación en el campo agroalimentario están dirigidas a extraer y concentrar el analito de interés. En la actualidad es frecuente el empleo de, por ejemplo, técnicas cromatográficas que conllevan la extracción del analito con un disolvente adecuado. Para eliminar la parte sólida de la muestra se centrifuga y se filtra para retener los sólidos en suspensión. El filtrado obtenido se somete a evaporación bajo corriente de nitrógeno para eliminar el disolvente de extracción y reconstituir la muestra en otro disolvente de interés. Posteriormente se pasa por un filtro de jeringa, obteniéndose un extracto filtrado, listo para su inyección en un cromatógrafo.

Los métodos de separación se usan también de manera tradicional en ciertas determinaciones analíticas, como por ejemplo, la acidez volátil en vinos y otras bebidas alcohólicas en la que se realiza una destilación y una yodometría.

BIBLIOGRAFÍA

Angurell, I., & cols. (s.f.). *Operaciones Básicas en Laboratorio de Química*. Recuperado el 18 de Julio de 2015, de Universidad de Barcelona:

<http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/index.html>

García Segura, J. M., & cols. (2008). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Madrid: Síntesis.

López Sánchez, M., & cols. (Febrero de 2005). *Métodos Físicos de Separación y Purificación de Sustancias Orgánicas*. Recuperado el 18 de Julio de 2016, de Universidad de Las Palmas de Gran Canaria:

<http://repositorio.ulpgc.es/bitstream/10553/436/1/494.pdf>

Universidad Autónoma de Madrid. (s.f.). Recuperado el 20 de Julio de 2016, de https://www.uam.es/docencia/qmapcon/QUIMICA_GENERAL/Practica_6_Precipitacion_y_Cristalizacion.pdf

Universidad de Murcia. (2012). *Tema 15: Técnicas de Separación*. Recuperado el 18 de Julio de 2016

Universidad Jaume I. (2011). *Tema 11. Métodos Físicos de Separación y Purificación*. Recuperado el 18 de Julio de 2016, de Grupo de Síntesis Orgánica. Universidad Jaume I: <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA11FQO.pdf>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 22

MÉTODOS DE SEPARACIÓN II. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. FLUIDOS SUPERCRÍTICOS. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN APLICADAS A LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS. APLICACIONES AL ANÁLISIS DE PRODUCTOS 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. MÉTODOS DE SEPARACIÓN II. INTRODUCCIÓN
2. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO
 - 2.1. COEFICIENTE DE REPARTO
3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA
 - 3.1. INTERACCIÓN ANALITO-ADSORBENTE
 - 3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS SPE
 - 3.3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN
 - 3.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA. MÉTODO QUECHERS.
 - 3.5. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA (SPME)
4. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS
5. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN APLICADAS A LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS
 - 5.1. APLICACIONES AL ANÁLISIS DE PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS.

1. MÉTODOS DE SEPARACIÓN II. INTRODUCCIÓN

En análisis químico siempre se busca la aplicación de procedimientos que incluyan el mínimo número de etapas posibles, ya que de esa forma se evitarán pérdidas de analito o contaminaciones y el proceso global será más rápido y sencillo. Para lograr la sensibilidad y selectividad que los métodos analíticos requieren, es habitual que se complementen con alguna **técnica de extracción**, tal como la extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) o extracción con fluidos supercríticos (SFE). Estos métodos se encargan de separar los analitos de la muestra original, consiguiendo una mejor selectividad al eliminar los posibles interferentes que podamos encontrar en la muestra. Así mismo, pueden contribuir a mejorar la sensibilidad del método analítico ya que, si el volumen de muestra tratado es mayor que el volumen de extractante, se consigue la concentración del analito (Peña Badenas, 2011).

2. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

La **extracción** es una técnica de separación de compuestos, sólidos, líquidos o gaseosos, en la que se aprovecha las diferencias de solubilidad de los componentes de una mezcla en un disolvente adecuado.

La extracción líquido-líquido es una técnica muy utilizada para llevar a cabo la extracción de compuestos orgánicos que se encuentran en fuentes naturales como son los alimentos.

Esta técnica se suele llevar a cabo mediante la utilización de una fase acuosa y una fase orgánica, de modo que generalmente el compuesto deseado suele extraerse en la fase orgánica dejando muchas de las impurezas (reactivos inorgánicos u orgánicos polares, impurezas polares, etc...) en la fase acuosa. Generalmente, el compuesto orgánico deseado no suele obtenerse puro, salvo casos excepcionales, pero es un primer paso de purificación que permite eliminar algunas de las impurezas que contiene. Muchas de las primeras operaciones que se realizan en los tratamientos de reacción se denominan lavados, debido a que sirven para eliminar reactivos inorgánicos, subproductos polares, etc...

2.1. COEFICIENTE DE REPARTO

Cuando una sustancia se distribuye entre dos líquidos miscibles entre sí o ligeramente miscibles, la relación de las concentraciones de esa sustancia en las dos fases será constante, independientemente de la cantidad de soluto que se disuelva o del volumen de líquido empleado. Esta distribución está sujeta a las siguientes condiciones:

- La temperatura influye en sobre la cantidad de soluto disuelta en cada líquido, por lo que el proceso debe realizarse a temperatura constante.
- No debe producirse ningún reacción química entre los componentes del sistema.
- Las disoluciones deben ser diluidas, ya que a altas concentraciones aparecen interacciones entre soluto y disolventes que interfieren en la proporción de soluto que se distribuye entre las fases.

Bajo estas condicionantes podemos formular la siguiente ley de distribución que podemos considerar un caso particular de la Ley de Henry:

$$K=C1/C2$$

Donde

C1 = Concentración del soluto en la fase I

C2 = Concentración del soluto en la fase II

K = Constante adimensional denominada **Coefficiente de Reparto** (también se le puede denominar Constante de Distribución o de Partición).

Esta ley permitiría predecir la concentración final de soluto en las distintas fases, siempre y cuando conozcamos el valor del Coeficiente de Reparto para un sistema determinado y estemos trabajando bajo las condicionantes en las cuales se cumple esta ley de distribución. En la bibliografía podemos encontrar tablas en las que se listan valores de Coeficientes de Reparto para distintos solutos, distintos disolventes y condiciones (Universidad de Cádiz).

Para que el proceso de extracción sea efectivo es importante que el coeficiente de reparto tenga un valor elevado, de modo que se asegure una mayor extracción del compuesto deseado en el medio orgánico, pero no las impurezas que lo acompañan, que quedarán en la fase acuosa. Además, generalmente, no se realiza una única extracción con todo el volumen de disolvente orgánico, sino que se realizan 2 ó 3 extracciones con la parte proporcional, ya que así se optimiza la obtención del compuesto deseado. Un requisito imprescindible para el disolvente orgánico es que sea inmiscible con el agua. (Universidad de Zaragoza, 2016)

Después de agitar la mezcla de las dos fases para aumentar la superficie de contacto entre ellas y permitir un equilibrio más rápido del producto a extraer, se producirá su transferencia desde la fase acuosa inicial hacia la fase orgánica, en una cantidad tanto mayor cuanto mayor sea su coeficiente de reparto entre el disolvente orgánico de extracción elegido y el agua. Unos minutos después de la agitación, las dos fases se separan de nuevo, espontáneamente debido a la diferencia de densidades entre ellas, con lo que la fase orgánica que contiene el producto deseado se podrá separar mediante una simple decantación de la fase acuosa que contiene las impurezas. La posición relativa de ambas fases depende de la relación de densidades. Dado que después de esta extracción, la fase acuosa frecuentemente aún contiene cierta cantidad del producto deseado, se suele repetir el proceso de extracción un par de veces más con disolvente orgánico puro (Angurell).

Una vez finalizada la operación de extracción, si lo que se quiere es recuperar el producto extraído a partir de las fases orgánicas reunidas, se elimina el disolvente orgánico de la disolución, por ejemplo, llevando una porción del extracto a sequedad en un evaporador, y resuspendiendo en un disolvente y a un volumen de interés para su inyección en un sistema cromatográfico.

3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

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, pero también puede ser una emulsión, un gas o un fluido supercrítico. El objetivo principal de la SPE es separar selectivamente los analitos de interés de una muestra y la eliminación de la matriz interferente. Estos analitos pueden ser adsorbidos por el sólido, o bien permanecer en la otra fase siendo en este caso los compuestos interferentes los que quedarían retenidos en la fase sólida. En el primer caso, posteriormente los analitos podrán ser recuperados empleando un disolvente adecuado para su elución. El adsorbente puede estar dispuesto en cartuchos o en discos. La selección del adsorbente es un factor muy importante, que dependerá del analito y de sus grupos funcionales, del tipo de muestra y de cómo interacciona esta con el adsorbente (Peña Badenas, 2011).

3.1. INTERACCIÓN ANALITO-ADSORBENTE

Se puede introducir selectividad en el proceso de extracción en fase sólida utilizando distintos adsorbentes y variando la naturaleza del eluyente. Las interacciones entre el sólido adsorbente y los analitos de una muestra pueden ser de tres tipos: apolares, polares e iónicas.

Interacciones apolares

Este tipo de interacción se produce entre las cadenas hidrocarbonadas del sólido adsorbente y los analitos de la muestra. Dado que la mayoría de los compuestos orgánicos posee una estructura apolar, estos pueden ser fácilmente adsorbidos mediante fuerzas de Van der Waals. Sin embargo hay compuestos que poseen un gran número de grupos polares o iónicos, que pueden enmascarar el carácter apolar del esqueleto carbonado. Adsorbentes típicos con un pronunciado carácter apolar son las sílices modificadas C18 y C8. Estas resinas muestran, no obstante, una baja selectividad, debido a que sus grupos funcionales, los sustituyentes alquilo, pueden interactuar con casi todos los analitos apolares. En general, los compuestos apolares presentes en una disolución polar son fácilmente adsorbidos en adsorbentes apolares y eluidos con disolventes apolares. La C18 es, en la actualidad, la fase más ampliamente utilizada.

Interacciones polares

Las interacciones polares incluyen la formación de puentes de hidrógeno, interacciones dipolo - dipolo e interacciones $\pi - \pi$ que pueden ocurrir entre el sólido adsorbente y los grupos funcionales de los analitos. Algunas de esas interacciones son posibles entre grupos amino, hidroxilo y carbonilo, al igual que anillos aromáticos, dobles enlaces y grupos con heteroátomos como el nitrógeno, el azufre, el fósforo y el oxígeno.

Adsorbentes típicos de este tipo son la sílice no modificada, o las sílices modificadas con grupos -CN, -NH₂ y -OH. En general, los compuestos polares presentes en una disolución apolar son fácilmente adsorbidos en adsorbentes polares y eluidos con disolventes polares.

Interacciones iónicas

Las interacciones iónicas se producen entre un analito con carga positiva o negativa, y un sólido adsorbente con grupos funcionales de carga opuesta. La retención se ve favorecida si los analitos se encuentran presentes en una matriz de poca fuerza iónica, mientras que, para la elución de los analitos, lo más adecuado es utilizar un disolvente de elevada fuerza iónica. Algunos adsorbentes típicos para interacciones iónicas son las resinas Chelex-100 y Metpac CC-1.

3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS SPE

Los métodos SPE presentan un gran número de ventajas frente a otras técnicas de extracción: Se trata de una técnica que utiliza una instrumentación económica, sencilla y con un consumo de disolventes relativamente bajo comparado con los habituales en los métodos LLE. Por otra parte, el SPE es rápido y proporciona elevados factores de recuperación y se puede usar en combinación con otros sistemas de extracción. Además, se puede automatizar el proceso e incluso acoplarlo a sistemas cromatográficos. La selectividad dependerá de la correcta selección del adsorbente y del eluyente empleados.

Cabe resaltar que la extracción del analito, además de eliminar potenciales interferentes, permite preconcentrar la muestra: el volumen de muestra que se trata suele ser superior al volumen empleado en la etapa de elución.

El principal inconveniente estriba en la posibilidad de que otros componentes de la matriz afecten a la interacción del analito y el adsorbente. En otras ocasiones, compuestos oleosos y/o sólidos pueden obstruir el cartucho impidiendo la retención del analito. Ambas situaciones se traduce en una baja recuperación del analito de interés.

Otro inconveniente de la técnica reside en las variaciones que se pueden dar entre lotes del mismo adsorbente, lo que se traduciría en una falta de reproducibilidad. Finalmente, indicar que esta técnica únicamente se puede aplicar a compuestos semivolátiles y no volátiles con temperaturas de ebullición muy por encima de la temperatura de trabajo, para evitar pérdidas de los analitos (Peña Badenas, 2011).

3.3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

La metodología para llevar a cabo la extracción consta de cuatro etapas:

- Primera etapa: Acondicionamiento del cartucho. Se emplea un disolvente adecuado para equilibrar, solvatar y limpiar el lecho.
- Segunda etapa: Adición de la muestra. Se hace pasar la muestra líquida a través del cartucho donde se retienen tanto los analitos como algunas sustancias interferentes. La muestra se introduce por gravedad, presión positiva o vacío, a una velocidad de flujo controlada, que permita la completa retención de los analitos.
- Tercera etapa: Etapa de lavado. Se eluyen las sustancias interferentes mediante un disolvente selectivo, mientras que los analitos permanecen en el lecho adsorbente.
- Cuarta etapa: Elución de los analitos mediante un disolvente selectivo. La elución de los analitos, una vez purificados y concentrados, puede llevarse a cabo por gravedad o

con ayuda de una fuente de vacío, mediante presión o por centrifugación. La velocidad del flujo debe ser adecuada para permitir que se alcance el equilibrio y la extracción sea próxima al 100%. A veces el extracto se evapora para concentrar el analito o para redisolverlo en un disolvente compatible con la técnica analítica que se vaya a emplear a continuación.

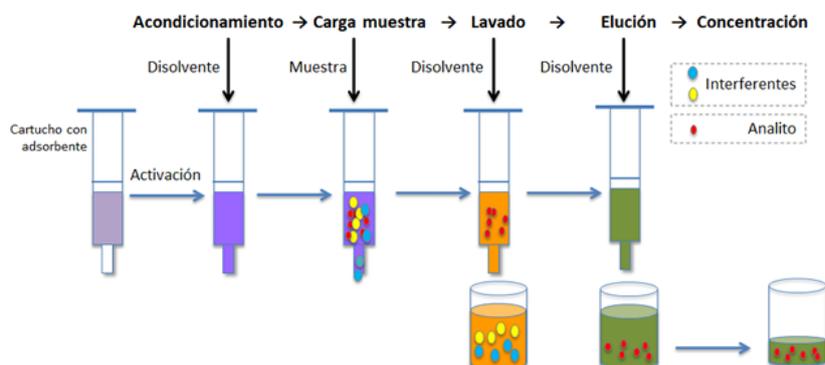


Figura 1: Procedimiento SPE. Fuente: (Fuentes López, Fernández Segovia, & Fuentes López, Preparación de muestra mediante la técnica de EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA, 2020)

3.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA. MÉTODO QUECHERS.

Entre los procedimientos de extracción más empleados en la actualidad se encuentra la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) por ser uno de los métodos más rápidos y sencillos. Basado en este tipo de extracción, se ha desarrollado una nueva metodología para el análisis de residuos de plaguicidas en material vegetal denominada “QuEChERS”, acrónimo en inglés de Quick (rápido), Easy (fácil), Cheap (barato), Effective (efectivo), Rugged (robusto), Safe (seguro) (Fuentes López, García Martínez, & Fernández Segovia, Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas, 2015).

El método “QuEChERS” combina una primera fase de extracción simple con acetonitrilo y diferentes sales y una segunda etapa de dispersión en fase sólida (dSPE). Esta última fase permite la eliminación del agua presente en la muestra y una limpieza o “clean-up”, que se consigue adicionando una mezcla de sulfato de magnesio y un sorbente, que puede ser una amina primaria y secundaria (PSA), C18, carbón negro grafitado (GCB), o la mezcla de estos, en función de las características de la muestra analizada. Después de la etapa de extracción, el extracto obtenido puede analizarse por cromatografía de gases o cromatografía líquida (Fuentes López, García Martínez, & Fernández Segovia, Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas, 2015).

En la primera etapa, se realiza una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo, en presencia de diferentes sales. Las sales que pueden ser empleadas en esta etapa son el sulfato de magnesio, el cloruro sódico, el citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato. La función de cada una de estas sales en la etapa de extracción es diferente:

- Sulfato de magnesio ($MgSO_4$): retiene agua, con lo que mejora la recuperación del analito al facilitar la partición de los pesticidas en la fase orgánica (acetonitrilo).

- Cloruro sódico (NaCl): ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación de fases entre el contenido de agua y la orgánica.
- Acetato de sodio: ayuda 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 de este procedimiento corresponde a una limpieza o “cleanup” del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva. Este paso facilita la eliminación del agua residual y de los compuestos presentes en la matriz del alimento que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos. Las sales y sorbentes empleados en esta fase son:

- Sulfato de magnesio (MgSO₄): elimina el exceso de agua residual.
- Amina primaria/secundaria (PSA): elimina ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares y pigmentos.
- 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.

Después del proceso de limpieza, se lleva a cabo una centrifugación y, o bien el extracto está listo para ser directamente analizado o se somete a evaporación y reconstitución en el disolvente apropiado para su análisis.

El método QuEChERS ofrece las ventajas de altas recuperaciones, resultados precisos, rapidez de tratamiento, poco uso de solvente y material de vidrio y además requiere poco espacio de laboratorio y pocos reactivos. Y el proceso es robusto y fiable.

3.5. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA (SPME)

La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de una muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico

El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a las técnicas de preconcentración, ya que es muy simple, presenta un bajo coste, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y generalmente no precisa del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración.

Puede utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas como por ejemplo aire, líquidas como aguas, o sólidas como sedimentos, alimentos, etc. Además, se puede aplicar a la determinación de compuestos de diferente volatilidad. Como inconveniente se puede mencionar que debido a la limitada capacidad de las fibras (la cantidad de

recubrimiento es muy pequeña) en ocasiones no se obtienen unos límites de detección bajos, sobre todo si la SPME se utiliza combinada con la cromatografía de líquidos.

El principio en el que se basa la SPME generalmente es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra. El transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra.

Existen básicamente dos modos de extracción posibles en SPME, introduciendo la fibra directamente en la muestra o bien en el espacio de cabeza o headspace. En cualquier caso, la cantidad de analito extraída es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra e independiente de su volumen.

Para aumentar la velocidad de la extracción es necesario utilizar un sistema de agitación de manera que se facilite la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra. La agitación con barras magnéticas agitadoras es la más frecuente.

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas. Una primera etapa de extracción en la que la fibra recubierta del sorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinadas, de manera que se produce una migración de los analitos desde la solución a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Después de esta primera etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra. La etapa de desorción se realiza térmicamente o bien por adición de un solvente orgánico, dependiendo de la técnica analítica que se utilice a continuación (Peñalver Hernando, 2002).

4. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción ya que, cabe esperar que las extracciones con fluidos supercríticos sean tan completas como las realizadas con disolventes líquidos por sus similares características solvatantes, y a la vez más rápidas y eficientes ya que su baja viscosidad favorece el transporte de los analitos y la penetrabilidad en los poros de la matriz de la muestra (Valverde, 1995) (Villada, Velasco, & Carrera, 2007).

La extracción con fluidos supercríticos tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión. Se entiende que a mayor presión, mayor densidad y por tanto mayor solubilidad. La solubilidad (δ) se puede correlacionar con la presión crítica de la siguiente manera (Vázquez Frutos, 2008):

$$\delta = 1.25 P_c^{1/2} (\rho_{r,g} / \rho_{r,l})$$

Donde P_c es la presión crítica del fluido, $\rho_{r,g}$ la densidad reducida del gas y $\rho_{r,l}$ la correspondiente al estado líquido.

Esta ecuación es particularmente útil cuando se pretenden establecer condiciones de extracción que permitan obtener el mayor poder de solubilización de un grupo de compuestos. El aumento de la densidad provoca un aumento en el parámetro de solubilidad, que puede dar lugar a una disminución de la selectividad del proceso de extracción (Vázquez Frutos, 2008).

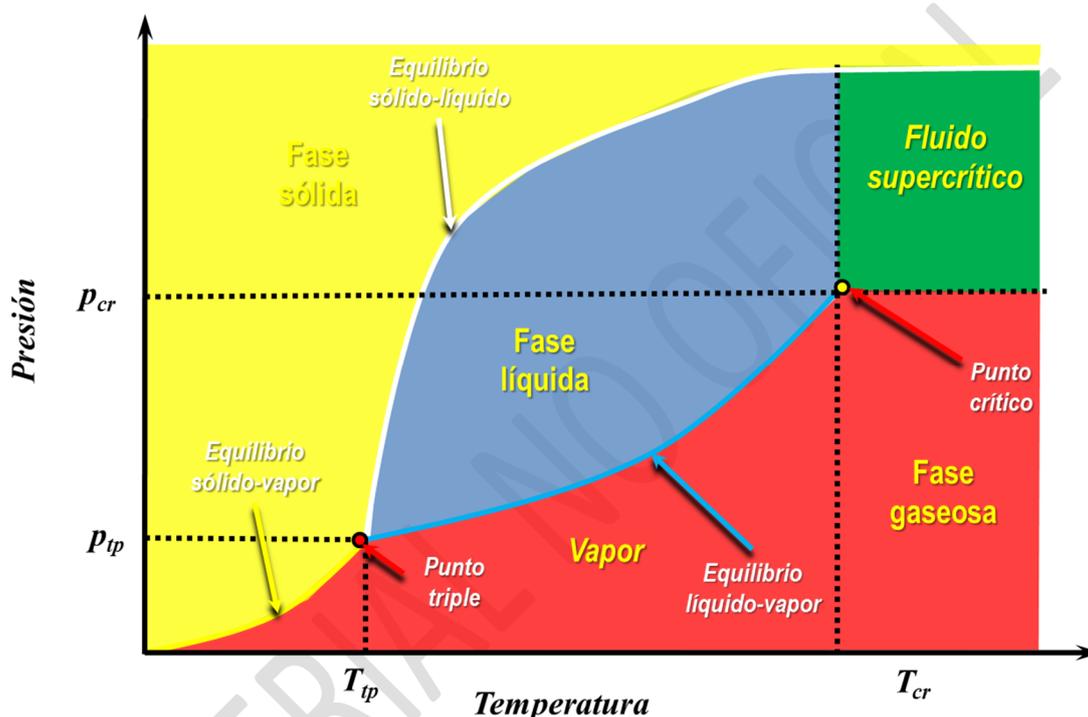


Figura 2 Diagrama de fases. Fuente:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Comportamiento_de_fases_Diagrama_de_fases.png

El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar y se consigue con diferentes grados de pureza, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles, se puede obtener a partir de procesos de fermentación alcohólica y ayuda a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos de los alimentos cuando son extraídos. El problema con muchos de los fluidos utilizados habitualmente, en comparación con el CO₂ es que hay ciertas dificultades en obtener solventes puros del fluido (Villada, Velasco, & Carrera, 2007).

Las principales ventajas de los fluidos supercríticos son:

1. Poseen alto coeficiente de difusión y viscosidad más baja que los líquidos.
2. Ausencia de tensión superficial, la cual aumenta la operación de extracción dada la rápida penetración de estos al interior de los poros de la matriz heterogénea.

3. La selectividad durante la extracción puede ser manipulada dada la variación de las diferentes condiciones de operación temperatura y presión afectando la solubilidad de varios componentes en el fluido supercrítico.
4. La extracción con fluidos supercríticos no deja residuos químicos.
5. La extracción con CO₂ supercrítico permite su fácil recuperación por procesos de reciclaje. El CO₂ supercrítico también ha sido usado en innumerables aplicaciones industriales que incluyen diferentes campos como: alimentos, agricultura, acuicultura, pesticidas, procesos microbianos, petroquímica y farmacéutica.

5. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN APLICADAS A LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La extracción es la primera etapa de la preparación de la muestra, una vez conseguida ésta de manera homogénea y representativa. El objetivo de esta etapa del método analítico es aislar el analito de la matriz de la forma más completa posible evitando la presencia de interferencias. Por tanto, hay que evaluar la naturaleza no sólo del analito sino también de la matriz, para que esta etapa sea lo más eficiente posible.

La elección correcta de la técnica de extracción depende de muchos factores. Entre ellos destacan la naturaleza de la matriz y del analito a aislar (su volatilidad, polaridad, reactividad y termoestabilidad, en qué concentración se encuentra y cómo está distribuido en la matriz) y el propósito mismo del análisis, cualitativo o cuantitativo.

Son múltiples y variadas las técnicas de extracción aplicadas al análisis de productos agroalimentarios. De manera tradicional la extracción directa de las grasas se ha realizado con el método **Soxhlet** empleando un extractor del mismo nombre. Este extractor consta de un cuerpo central comunicado con un matraz de recogida situado en la parte inferior mediante un dispositivo tipo sifón. En el cuerpo central se introduce un cartucho de material poroso con la muestra y en el matraz un disolvente o mezcla de disolventes. Al calentar el disolvente se evapora y asciende y al enfriarse condensa, cayendo al compartimento con la muestra y disolviendo parte de la grasa. Cuando se llena el compartimento de disolvente cae al matraz, arrastrando la grasa disuelta. Se repite el proceso varios ciclos. Tras eliminar el disolvente con un rotavapor se pesa el matraz. La diferencia con el peso del matraz vacío proporciona la cantidad de grasa de la muestra. Otros métodos de extracción son el Goldfish o Bligh-Dyer.

Los métodos convencionales para extraer contaminantes de los alimentos se han basado principalmente en el uso de disolventes orgánicos, aunque en la actualidad se han desarrollado una gran cantidad de métodos basados en la SPE.

La microextracción en fase sólida (SPME) se puede aplicar al análisis de matrices líquidas y gaseosas, y los analitos se pueden extraer por inmersión directa (DI, direct immersion) en líquidos o mediante el análisis del espacio de cabeza (HS, headspace).

La extracción con fluidos supercríticos (SFE, supercritical fluid extraction) ha sido también empleada en la industria agroalimentaria, utilizándose sobre todo en el análisis de plaguicidas.

5.1. APLICACIONES AL ANÁLISIS DE PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS.

Las técnicas de extracción son ampliamente usadas en un laboratorio agroalimentario: desde las técnicas más tradicionales, como en la determinación de grasa por gravimetría en alimentos y piensos extrayendo la grasa con un extractor Soxhlet, hasta la extracción como paso previo en la preparación de muestras para la determinación de micotoxinas, plaguicidas y otros contaminantes como nitritos en piensos.

La extracción líquido-líquido se emplea, por ejemplo en la determinación de ciertos contaminantes como los ftalatos en vinos y bebidas espirituosas o como parte de la preparación de muestra en la determinación de la patulina en productos derivados de la manzana.

La versatilidad y la reducción en el consumo de disolventes han hecho que la SPE y la SPME se impongan en los laboratorios agroalimentarios. La SPE se emplea en numerosas determinaciones, como la determinación de ECN42 real en aceites de oliva, o de micotoxinas y otras contaminantes en piensos y materias primas. La SPME es frecuente en el análisis de aguas y de compuestos volátiles en aceites y vinos como técnica previa al análisis con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

El método "QuEChERS" fue desarrollado inicialmente para el análisis de plaguicidas en alimentos vegetales, pero en la actualidad se emplean algunas modificaciones de este método con el objetivo de adaptarse a las distintas matrices y a nuevos compuestos. Hay métodos adaptados para el análisis de pesticidas en aceites y alimentos infantiles, fármacos veterinarios en tejidos vegetales, acrilamida,...

Por último, la extracción con fluidos supercríticos, aunque menos extendida, se ha empleado en el análisis de plaguicidas, en especial con el uso del CO₂ supercrítico, que se ha aprovechado para la extracción de ciertos plaguicidas en matrices sólidas con bajos contenidos en agua. La tecnología basada en fluidos supercríticos es utilizada también para extraer vitaminas, aditivos o aromas.

BIBLIOGRAFÍA

- Angurell, I. &. (s.f.). *Operaciones Básicas en Laboratorio de Química*. Recuperado el 18 de Julio de 2015, de <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/index.html>
- Fuentes López, A., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, C. (2020). Preparación de muestra mediante la técnica de EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. Universidad Politècnica de València. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/145915/Fuentes?sequence=1>
- Fuentes López, A., García Martínez, E., & Fernández Segovia, I. (2015). Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas. Universitat Politècnica de València. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/51363/Extracci%C3%B3n%20PSE%20QuEChERS.pdf?sequence=1#:~:text=El%20m%C3%A9todo%20QuEChERS%20es%20un,e n%20fase%20s%C3%B3lida%20por%20dispersi%C3%B3n>.
- Peña Badenas, A. (2011). Estudio de sistemas de extracción en fase sólida para su aplicación en la determinación del plaguicida Dimetoato. Universidad Politècnica de Valencia.
- Peñalver Hernando, A. (11 de Diciembre de 2002). *tesisenred.net*. Obtenido de <https://www.tesisenred.net/handle/10803/8988#page=1>
- Universidad de Cádiz. (s.f.). *Práctica 11: Coeficiente de Reparto*. Obtenido de <https://docplayer.es/49718447-Practica-11-coeficiente-de-reparto-1-fundamento-teorico.html>
- Universidad de Zaragoza. (22 de Julio de 2016). Extracción líquido-líquido. Curso Técnicas básicas de laboratorio químico. Obtenido de <http://ocw.unizar.es/ocw/course/view.php?id=22§ion=3>
- Valverde, A. (Enero de 1995). *Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas*. (D. p. Almería, Ed.) Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/28151856_Extraccion_con_fluidos_supercriticos_principios_y_aplicaciones_al_analisis_de_residuos_de_plaguicidas
- Vázquez Frutos, L. (2008). Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales. *Universidad Autónoma de Madrid*.
- Villada, H., Velasco, R., & Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, 18(1), 53-65.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 23

GRAVIMETRÍA: 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. CONCEPTO DE GRAVIMETRÍA

2. TIPOS DE ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO

2.1. Métodos gravimétricos por volatilización o destilación

2.2. Métodos gravimétricos por extracción

2.3. Métodos gravimétricos por precipitación

3. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

MATERIAL NO OFICIAL

1. CONCEPTO DE 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.

TIPOS DE ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO

2.1. 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 (pues se pesa directamente el analito) y en el segundo estamos en presencia de un método por volatilización indirecto (puesto que la masa de analito se calcula por diferencia entre la muestra inicialmente pesada (matriz) y el residuo que queda luego de la volatilización).

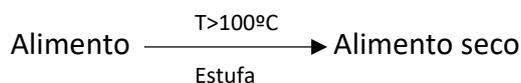
Método directo

Muestra $\xrightarrow{\text{Calor}}$ Residuo (analito) + componente volatilizado

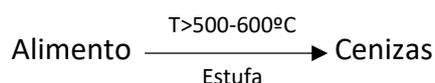
Método indirecto

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.



$$\% \text{Humedad} = \frac{m(\text{agua})}{m(\text{alimento})_{\text{inicial}}} \times 100 = \frac{m(\text{alimento})_{\text{inicial}} - m(\text{alimento})_{\text{seco}}}{m(\text{alimento})_{\text{inicial}}} \times 100$$



$$\% \text{Cenizas} = \frac{m(\text{cenizas})}{m(\text{alimento})_{\text{inicial}}} \times 100$$

2.2. 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 solubilicen 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.

2.3. Métodos gravimétricos por precipitación

El tipo de análisis gravimétrico más importante y habitual es el de precipitación.

En este procedimiento se define como **forma precipitada** el compuesto insoluble que se forma en la reacción entre la sustancia de interés y la del 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, 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, 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.

La forma ponderable debe cumplir también una serie de condiciones:

1. Composición química conocida: es totalmente necesario que la composición del precipitado corresponda exactamente con su fórmula química, si no, es imposible realizar los correspondientes cálculos del análisis.
2. Deben tener estabilidad química, es decir, no sea higroscópico, ni absorba CO₂ atmosférico, que no se oxide fácilmente al aire, etc.
3. Peso fórmula elevado, es deseable que el contenido del elemento que se desea determinar en el precipitado sea lo menor posible, puesto que los errores de determinación (errores de pesada, pérdidas debidas a la solubilidad del precipitado o a la transferencia incompleta del precipitado al filtro) perturbarán menos sobre el resultado final del análisis.

La precipitación consistirá en añadir a la disolución que contiene el elemento a determinar, otra del reactivo precipitante, de manera que éste quede en exceso para desplazar el equilibrio hacia la formación del compuesto insoluble. Se considera que la precipitación es completa, si la cantidad del compuesto a determinar que permanece en la disolución se halla fuera de los límites de la precisión de la pesada.

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.

Capacidad de filtración y pureza de los precipitados

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.

La relación entre tamaño de partícula y pureza es más compleja. Se puede generalizar que a mayor tamaño de partícula menor cantidad de contaminantes solubles.

Los precipitados están frecuentemente contaminados con compuestos solubles que no se espera que precipiten bajo las condiciones existentes en la disolución. El arrastre de estas especies se conoce como coprecipitación.

Hay que señalar que la disolución está por debajo de la saturación con respecto a las sustancias que han coprecipitado y que la precipitación simultánea de una segunda sustancia cuya solubilidad ha sido excedida no constituye coprecipitación.

Aislamiento del precipitado del resto de la disolución

La filtración y el lavado son operaciones sumamente importantes de las que depende la precisión del resultado. 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 se lava el precipitado con objeto de eliminar las impurezas adsorbidas en la superficie del precipitado y la disolución madre que lo impregna. Si el precipitado se va a calcinar el líquido del lavado debe contener únicamente sustancias volátiles. Si el precipitado se va a secar, deben utilizarse para el lavado, líquidos que se eliminen totalmente por secado. Solamente en el caso que se sepa que no puede haber pérdidas por solubilidad, se usará agua como solución de lavado, pero normalmente se utilizan disoluciones que contienen el reactivo precipitante, o reactivos que eviten la peptización o la solubilización del precipitado. La peptización hará que el precipitado pase por el filtro muy fácilmente.

Secado y Calcinación

Se seca o deja secar el precipitado 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 eliminar y para que el compuesto pase a la forma ponderable (eliminación del agua de cristalización, formación de otro compuesto con diferente estequiometría, etc).

Si se filtra sobre placa filtrante, se seca el precipitado en la trompa de vacío y luego en la estufa a 110-120°C, para eliminar el agua adsorbida.

3. 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 Fe_3O_4 y sustancia pesada Fe_2O_3 :

$$FG = \frac{2}{3} \cdot \frac{PF(\text{Fe}_3\text{O}_4)}{PF(\text{Fe}_2\text{O}_3)}$$

Analito 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:

$$\% \text{ analito} = \frac{\text{masa (sustancia pesada)}}{\text{masa (muestra tomada)}} \cdot FG \cdot 100$$

4. APLICACIONES

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 1700μ , de los cuales menos del 10% serán superiores a 1000μ y más del 50% inferiores a 500μ .

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.

BIBLIOGRAFÍA

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 24

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. INTRODUCCIÓN

2. PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ANÁLISIS VOLUMÉTRICO

2.1. Curva de valoración

2.2. Detección del punto final

2.3. Patrones

3. TIPOS DE VOLUMETRÍAS

3.1. Clasificación en función del procedimiento de valoración

3.1.1. Volumetrías directas

3.1.2. Volumetrías indirectas

3.2. Clasificación en función de la naturaleza de la reacción química

3.2.1. Volumetrías ácido-base (o neutralización)

3.2.2. Volumetrías de precipitación

3.2.3. Volumetrías de oxidación-reducción (redox)

3.2.4. Volumetrías de formación de complejos (complexometría)

4. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

1. INTRODUCCIÓN.

Un análisis volumétrico es todo aquel procedimiento basado en la medida de volumen de reactivo necesario para reaccionar con el analito. De este modo, al medir de forma exacta el volumen de reactivo, de concentración perfectamente 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, debido a que no suelen ser necesarios procesos de separación para preparar las disoluciones de valoración. Y 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. No obstante, la necesidad de un material de laboratorio escrupulosamente limpio para prevenir las adherencias en las superficies del material es un problema y otro es la necesidad de consistencia en las apreciaciones subjetivas, como en la determinación de los cambios ligeros de color o en la lectura del nivel de un menisco.

2. PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ANÁLISIS VOLUMÉTRICO

En un montaje típico empleado para llevar a cabo una volumetría la disolución de analito se encuentra en un vaso de precipitados o en un matraz Erlenmeyer y la disolución del reactivo en la bureta. El medio de valoración debe ser agitado de forma continua para favorecer el contacto entre las especies reaccionantes, pudiendo agitarse de forma manual, por medio de una varilla, o automática, a través de un agitador magnético.

El objetivo de una valoración es la adición de la disolución patrón en una cantidad que es químicamente equivalente a la sustancia con la que reacciona. Esta condición se consigue en el **punto de equivalencia**. El punto de equivalencia de la valoración es un concepto teórico; sólo se puede apreciar este punto observando algún cambio físico asociado con esta condición de equivalencia. Estos cambios ocurren en el **punto final** de la valoración, por lo que las diferencias de volumen entre el punto de equivalencia y el punto final de la valoración deben ser pequeñas. Las diferencias pueden deberse a cambios físicos inadecuados y a una falta de habilidad para su observación; el resultado es un **error en la valoración** que está dado por:

$$E_{\text{valoración}} = V_{\text{punto final}} - V_{\text{punto equivalencia}}$$

El modo de minimizar el error de valoración consiste en escoger 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.

2.1. Curva de valoración

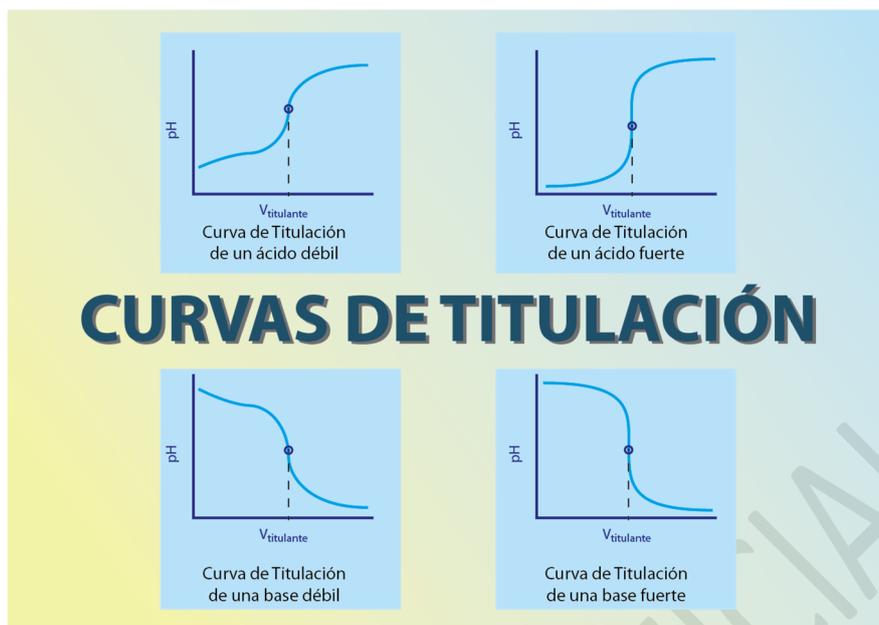
La **curva de valoración** es una representación gráfica de la variación de la concentración de uno de los reactivos de la valoración (analito o valorante) con respecto al volumen de valorante añadido al medio de valoración. Ya que las concentraciones de reactivo y analito varían en varios órdenes de magnitud, resulta muy útil representar en el eje de ordenadas la función **p** (-log) de la concentración, en vez de la concentración.

En toda curva de valoración pueden distinguirse dos regiones perfectamente diferenciadas, ya que se hallan separadas por el punto de equivalencia. A la región que comprende todos los volúmenes de valorante inferiores al correspondiente al del punto de equivalencia se le llama zona de pre-equivalencia, mientras que la zona de post-equivalencia incluye todos los valores de volumen de valorante superiores al del punto de equivalencia.

Según la forma de la curva de valoración podemos distinguir dos tipos:

- En las curvas sigmoideas las observaciones importantes se hallan en una pequeña región (normalmente de $\pm 0,1$ a $\pm 0,5$ mL) en torno al punto de equivalencia. En este tipo de curvas se representa la función p del analito (o del reactivo) como función del volumen de reactivo.
- En las curvas de segmento lineal las observaciones importantes se realizan a ambos lados y bien alejadas del punto de equivalencia. Las medidas cerca del punto de equivalencia se evitan. En estas curvas, en el eje de ordenadas se representa la lectura de señal analítica en un instrumento que es directamente proporcional a la concentración de reactivo o de analito.

Las curvas sigmoideas presentan las ventajas de rapidez y utilidad. Las curvas de segmento lineal son especialmente útiles para reacciones químicas que se completan solamente en presencia de un exceso considerable de analito o de reactivo.



Para trazar la curva de valoración, en primer lugar se estudia cómo varían las concentraciones de valorante y/o analito a lo largo de la valoración y se aplican las ecuaciones adecuadas que predicen la curva de valoración bajo estudio

2.2. Detección del punto final

La **detección del punto final** se basa en los cambios físicos observables que ocurren en la disolución en el transcurso de la valoración.

Estos cambios pueden ser:

- visuales: cambios de color, de turbidez y de dispersión de la luz.
- eléctricos: cambios en el potencial, corriente eléctrica y conductividad.
- variación de una propiedad térmica.

Los dos métodos más utilizados para conocer el punto final de una valoración consisten en:

- cambio de color debido al reactivo, a la sustancia que se analiza o al indicador.
- cambio de potencial de un electrodo sensible a la concentración de la sustancia o del reactivo.

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 o desaparición de color, cambio de color, o aparición o desaparición de turbidez.

Los **indicadores** pueden clasificarse de acuerdo al tipo de reacción química de valoración en la que se empleen; sin embargo, es necesario considerar que existe gran número de indicadores cuyos cambios de color pueden ser provocados por varias causas, por ejemplo

existen indicadores que cambian de color por variación del pH, pero también lo pueden hacer sufriendo reacciones de oxidación-reducción, lo que significa que estas especies pueden emplearse tanto como indicadores ácido-base como también como indicadores redox.

Diferentes mecanismos son los que están envueltos en las reacciones de cambio de color, pero muchas se refieren al cambio de una molécula orgánica neutra incolora en un ión coloreado con dobles enlaces conjugados.

Un cambio de cuatro unidades de pH se produce sobre un intervalo de volumen correspondiente a $\pm 0,001$ mL del punto de equivalencia en la valoración ilustrada en la figura anterior. Esta valoración es suficientemente adecuada para la detección visual del punto final. Existen varios indicadores que muestran cambios bruscos de color en esta zona, y la valoración se puede realizar con un error volumétrico mínimo.

Punto final instrumental

Como ejemplo de vía instrumental podemos destacar la detección de un cambio brusco de potencial o de intensidad de corriente en las inmediaciones del punto de equivalencia. La monitorización de la absorción de radiación electromagnética es otro ejemplo de vía instrumental para la detección del punto final de una volumetría. Los turbidímetros, monitores de temperatura, refractómetros, medidores de corriente y de conductividad son otros instrumentos que también se emplean para detectar el punto final de una valoración.

2.3. Patrones

Un **patrón primario** es un compuesto de alta pureza que sirve de referencia en todos los métodos volumétricos. Generalmente son sólidos, que a veces son primero secados, y luego pesados, disueltos y diluidos a un volumen fijo. Ejemplos de estos compuestos son: dicromato potásico, oxalato sódico, ftalato potásico, ...

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.

Pocas sustancias cumplen o reúnen estos requisitos. Por ello, se acude a la utilización de sustancias **patrón tipo secundario**, cuya riqueza debe comprobarse previamente. Tampoco pueden ser pesadas y usadas sin una valoración previa. Ejemplos de valorantes comunes que

no son estándares primarios son: sulfato amónico ferroso, permanganato potásico, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, etc.

Algunos patrones secundarios no mantienen la concentración (normalidad). Es esencial, por tanto, revalorarlos cada vez que vayan a ser usados. Muchos se deterioran más rápidamente por la luz, por lo que es aconsejable que sean guardados en la oscuridad.

Disoluciones patrones

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.

Pocos reactivos volumétricos cumplen todos estos requisitos. La exactitud de un método volumétrico no puede ser mejor que la exactitud de la concentración de la disolución patrón utilizada en la valoración. Son dos los métodos más utilizados para la preparación de la disolución estándar:

- Método directo:

Se usa si se dispone de un compuesto estándar primario. Una vez seco el patrón, se pesa con exactitud una determinada cantidad del compuesto, se disuelve y se enrasa cuidadosamente a un volumen exactamente conocido, en un matraz aforado.

- Método indirecto:

Se usa cuando el compuesto químico no es un patrón primario. Se prepara una disolución de concentración aproximada y se **estandariza** frente a un patrón primario. La **estandarización** es un proceso por el cual se determina la concentración exacta de una disolución, utilizando la disolución para valorar una cantidad conocida de otro reactivo. La disolución valorante obtenida de esta forma se denomina disolución patrón o estándar secundario.

3. TIPOS DE VOLUMETRÍAS

No todas las reacciones químicas pueden ser empleadas como reacciones de valoración, es necesario que la reacción sea:

- 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.

3.1. Clasificación en función del procedimiento de valoración

Dependiendo la forma en que se realiza la valoración, los métodos volumétricos pueden clasificarse en métodos de valoración **directos** y métodos de valoración **indirectos**.

3.1.1. 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.

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. En estos casos, con vistas a no renunciar a la cuantificación de estas reacciones por métodos volumétricos, se recurre a los métodos de valoración indirectos.

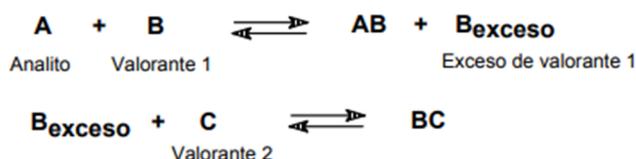
3.1.2. Métodos de valoración indirectos

Una valoración indirecta es aquella en la que el analito no reacciona directamente con el patrón valorante contenido en la bureta, 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.

3.2. 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.

3.2.1. 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 (acidimetría) o, empleando una solución valorada de algún álcali, se pueden determinar cuantitativamente sustancias que se comportan como ácidos (alcalimetría).

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 satisface las exigencias que deben reunir los patrones primarios, por lo que una vez preparadas a una concentración aproximada deben ser valoradas o estandarizadas para determinar exactamente su concentración.

Indicadores ácido/base

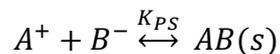
Hay una larga lista de indicadores ácido/base disponibles, todos son ácidos orgánicos débiles o bases orgánicas débiles que muestran distintos colores en sus formas disociada y no disociada. Para la valoración de ácidos o bases fuertes con ácidos o bases fuertes, casi cualquier indicador sirve ya que el rango de pH en el punto equivalente es de 4 a 10. Como ejemplo se pueden citar:

- fenoftaleína 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

3.2.2. 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:



Pese a que se conocen muchísimas reacciones que culminan con la formación de un precipitado, solo muy pocas de ellas pueden emplearse en el análisis volumétrico. Ello se debe a un conjunto de requisitos que debe cumplir una reacción química para ser empleada en volumetría de precipitación:

- 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.

Estas exigencias limitan considerablemente el número de reacciones de precipitación prácticamente aplicables en el análisis volumétrico. De hecho, los métodos más importantes son los llamados “métodos argentométricos” los cuales se basan en reacciones de formación de sales de plata difícilmente 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”:

$$K_{eq} = K_{ps} = c(A^+) \cdot c(B^-)$$

Indicadores para valoraciones de precipitación

Hay dos categorías:

- 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.

3.2.3. Volumetrías de oxidación-reducción (redox)

La volumetría de oxidación reducción, también conocida como volumetría redox, se basa en reacciones que llevan implícito una transferencia de electrones entre dos sustancias, una de las cuales se reduce (acepta electrones) y la otra, simultáneamente, 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, es decir, el agente oxidante acepta los electrones que le transfiere el 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:



El equilibrio de una reacción de oxidación reducción está determinado por la facultad que tienen los reaccionantes de donar o aceptar electrones; por ello, la mezcla de un oxidante (Oxi_2) con alta capacidad para aceptar electrones (oxidante fuerte) con un reductor (Red_1) que tenga una alta disposición para cederlos (reductor fuerte) alcanza una posición de equilibrio en que la formación de los productos de reacción (Oxi_1 y Red_2) está ampliamente favorecida, es decir, desplazada hacia la formación de los productos. Por supuesto, una reacción menos completa ocurrirá cuando esta capacidad para aceptar o ceder electrones en las sustancias reaccionantes sea menor o no sea tan favorable.

Indicadores oxido - reducción

Estos pueden diferenciarse en:

- Indicadores redox verdaderos, es decir, sustancias que por ellas mismas experimentan oxidación o reducción en el punto de equivalencia de la valoración "pseudos" indicadores redox que son otros métodos visuales de detectar la presencia de un exceso de valorante (p.ej. almidón más yodo, se produce una reacción en la superficie de la molécula de almidón, KMnO_4)
- Los indicadores redox verdaderos se oxidan o reducen por un exceso de valorante, provocando el cambio de color. El potencial de transición del indicador debe corresponder al potencial de transición en el punto equivalente de valoración, si esto no es así, algunas veces es posible ajustar las condiciones de valoración para que las transiciones coincidan (p. ej. Mediante la adición de ácidos).

3.2.4. 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. Así, la aplicación fundamental de esta técnica está dirigida a la cuantificación de elementos metálicos por medición volumétrica del complejo soluble formado.

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 formador de complejo pueda usarse en complexometría ha de satisfacer:

- 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 formación del complejo soluble ocurre, por lo general, cuando un ion metálico (generalmente solvatado) reacciona con especies donantes de pares de electrones. Estas especies donantes tienen uno o más pares de electrones disponibles para ser compartidos y se llaman ligandos. Los ligandos más comunes son el H_2O , SCN^- , NH_3 y Cl^- los cuales se enlazan al ion metálico por un solo par de electrones y son llamados ligandos monodentados. Sin embargo, en la mayor parte de las determinaciones analíticas se emplean como ligandos moléculas capaces de donar más de un par de electrones en la reacción de formación del complejo.

Este tipo de ligando se denomina multidentado o polidentado y forma con los iones metálicos complejos internos llamados quelatos.

Indicadores metalocrómicos (valoraciones complexométricas)

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. Durante una valoración quelométrica, el valorante se compleja con el analito, produciéndose el cambio de color cuando se consume todo el analito en el punto de equivalencia. Los indicadores metalocrómicos también cambian el color con el pH, por lo que su uso está restringido a un rango estrecho de concentraciones de H^+ .

Los cambios de color de los indicadores ocurren a muy bajas concentraciones, por lo que es importante seleccionar los indicadores que presentan cambios de color muy distintos en las formas libres y complejadas con el metal. Son ejemplos de indicadores metalocrómicos más conocidos están el **Negro de Eriocromo T** y el **Violeta de Pirocatecol**.

4. EXPRESIÓN DE 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 (ω) 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 (φ) 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:

$$N = \frac{eq_s}{V_d(L)} = M \cdot \text{valencia}$$

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:

$$n^\circ eq = \frac{\text{peso}}{\left(\frac{PM}{n^\circ \text{partículas intercambiadas}} \right)}$$

Peso equivalente en reacciones de neutralización

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: $P_{eq} Ba(OH)_2 = \frac{1}{2} PM Ba(OH)_2$

$P_{eq} SO_4^{2-} = \frac{1}{2} PM H_2SO_4$

Peso equivalente en reacciones reducción-oxidación

En una volumetría de oxidación-reducción, el peso equivalente de una sustancia es el peso en gramos de esta, que está directa o indirectamente implicado en la transferencia de un mol de electrones. El valor numérico del peso equivalente se obtiene dividiendo el peso fórmula

gramo de la sustancia en cuestión por el cambio originado en el estado de oxidación, asociado a la reacción que tenga lugar.

Peso equivalente en reacciones de precipitación y de formación de complejos

El peso equivalente de una sustancia que participa en una reacción de precipitación o de formación de complejos es el peso de la misma, que proporciona o reacciona con un peso fórmula gramo del catión reaccionante, si es monovalente; la mitad del peso fórmula gramo si es divalente, un tercio del mismo si es trivalente, etc.

El peso equivalente está basado en un mol de un catión monovalente (o su equivalente). En esta definición, la equivalencia siempre se establece con el catión que está directamente implicado en la reacción, que no tiene que ser necesariamente el mismo catión que forma parte del compuesto cuyo peso equivalente se está definiendo. En algunas ocasiones, el peso equivalente de la sustancia que participa en una reacción de formación de complejos es un múltiplo de su peso fórmula.

Por ejemplo, la valoración: CN^- con Ag^+ . El complejo formado es $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$

Ag^+ es un catión monovalente, y se combina con dos CN^- .

$\text{Peq}(\text{KCN}) = 2\text{PM}(\text{KCN})$

5. APLICACIONES

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-alcalina.

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.

BIIBLIOGRAFÍA

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 25

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS: DENSIDAD. VISCOSIDAD. ÍNDICE DE REFRACCIÓN Y GRADOS BRIX. ROTACIÓN ÓPTICA. DETERMINACIÓN DE LOS PUNTOS DE CONGELACIÓN Y PUNTO DE EBULLICIÓN. 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. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS
2. DENSIDAD.
APLICACIONES
3. VISCOSIDAD.
APLICACIONES
4. ÍNDICE DE REFRACCIÓN Y GRADOS BRIX.
LEY DE SNELL
GRADOS BRIX
APLICACIONES
5. ROTACIÓN ÓPTICA.
APLICACIONES
6. DETERMINACIÓN DE LOS PUNTOS DE CONGELACIÓN Y PUNTO DE EBULLICIÓN.
APLICACIONES
7. BIBLIOGRAFÍA

1. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS

La investigación básica de alimentos, piensos y sus materias primas comprende no sólo la determinación de sus principales componentes, como carbohidratos, proteínas, grasas y otros compuestos, sino también la determinación de magnitudes generales que se emplean en la caracterización y evaluación de los distintos productos y que pueden ser determinados de manera sencilla por métodos físico-químicos.

Algunas de las propiedades físicas clásicas utilizadas para caracterizar una sustancia son la densidad, el índice de refracción o los puntos de fusión y ebullición. Estos parámetros no sólo sirven para confirmar la identidad de un compuesto, sino que también permiten valorar su pureza. Es por ello que se utilizan en el sector de la alimentación para detectar adulteraciones y evitar fraudes, además de poder integrarse en procesos de producción de alimentos como puntos críticos de control.

Las sustancias en disolución presentan diferentes propiedades, muchas de ellas derivadas del pequeño tamaño de las partículas dispersas. Algunas de estas propiedades son función de la naturaleza del soluto, como la densidad, la viscosidad o el índice de refracción. Son las llamadas propiedades **no coligativas**. En contraposición, las propiedades **coligativas** solo van a depender de su concentración como son, por ejemplo, los puntos de congelación y ebullición (Rodríguez Alzamora, 2017).

En este tema se expondrán algunas de las propiedades físicas más relevantes en la caracterización y control de alimentos, piensos, materias primas y medios de producción.

2. DENSIDAD.

La densidad de una sustancia homogénea es una propiedad física que la caracteriza y está definida como una magnitud referida a la cantidad de masa contenida en un determinado volumen. Puede utilizarse en términos absolutos o relativos.

La densidad absoluta (ρ_T) de un cuerpo homogéneo (sólido, líquido y gas) a una temperatura determinada es el cociente de su masa (m) entre su volumen (V_T) a esa misma temperatura.

$$\rho_T = \frac{m}{V_T}$$

La densidad relativa o gravedad específica de una sustancia es su densidad con relación a otra que se toma como referencia. La referencia tomada habitualmente es agua a 4°C

$$\rho_{rel} = \rho_{sustancia} / \rho_{agua}$$

La densidad aparente de un sólido granular o pulverulento se define como la relación entre la masa de una cantidad del sólido y el volumen total ocupado por el sólido en el

recipiente que lo contiene, es decir, el volumen ocupado por las partículas más el volumen de aire de los espacios entre ellas. La densidad aparente se determina llenando completamente con el material pulverulento o granular, y enrasando luego, un recipiente de volumen conocido, y pesando posteriormente la cantidad de material en él contenido.

El peso específico corresponde a la relación entre el peso de un cuerpo y su volumen

$$p_e = \frac{p}{v} = \frac{m \cdot g}{v} = \rho_a \cdot g$$

La relación entre el peso específico de la sustancia y el peso específico de otra sustancia tomada como referencia es el peso específico relativo.

El instrumento tradicional para la determinación de la densidad es el **densímetro**. Este instrumento se basa en el principio de Arquímedes: se introduce en una probeta, gradualmente, una cantidad de muestra que permita flotar al densímetro sin tocar las paredes ni el fondo de la misma. La medida de la densidad se tomaría directamente de una escala.

Los **areómetros** tienen el mismo fundamento que los densímetros, pero se distinguen de ellos porque están graduados en grados Baumé ($^{\circ}\text{B}$ ó $^{\circ}\text{Bé}$), una unidad relativa de concentración de los líquidos o de ciertas disoluciones.

Existen varios tipos de densímetros especiales dependiendo de la matriz de la que se quiera determinar la densidad, entre otros, se pueden nombrar los siguientes:

- **Alcohómetro de Gay-Lussac** para bebidas alcohólicas; es un areómetro centesimal en el que los números de la escala indican el porcentaje en peso de alcohol puro en una disolución hidroalcohólica.
- **Lactómetro** o **Galactómetro**: mide la densidad de la leche; su escala está graduada según Quevenne de 15 a 40 $^{\circ}$, que corresponden a un peso específico de entre 1.028 a 1.040.
- **Oleómetro**: mide la densidad de los aceites vegetales; su escala está graduada de 50 a 0 $^{\circ}$, que corresponde a pesos específicos de 0.87 a 0.97.

Para determinar la densidad de **líquidos, sólidos y productos pastosos** por el método del matraz se emplean los **picnómetros**. Un picnómetro es un vaso de precipitado de vidrio con un volumen definido. Se pesa vacío (M1) y, a continuación, se llena con la muestra y se vuelve a pesar (M2). La diferencia entre M1 y M2 (= masa de la muestra) dividida entre el volumen del vaso de precipitado corresponde a la densidad de la muestra.

Picnómetros y areómetros son los aparatos de medición que mejor se adaptan al control de materias primas y alimentos en laboratorios debido a su manejo fácil, bajo costo y especificidad. Sin embargo estos instrumentos han sido sustituidos en muchos

laboratorios por los **densímetros digitales**. Un densímetro, también conocido como medidor de densidad o medidor de gravedad específica, es un instrumento analítico que usa la oscilación de un tubo de vidrio hueco con forma de U para medir la densidad de las muestras líquidas de forma rápida y automática. La densidad medida se puede convertir automáticamente a otras unidades y concentraciones para aplicaciones concretas, como la gravedad específica, el porcentaje de alcohol o los grados Brix (Mettler Toledo, s.f.)

APLICACIONES

La densidad se determina para controlar la genuinidad de productos, generalmente líquidos (leche, vinos, aceites, etc.) y como índice de concentración de soluciones, siempre que se cuente con una tabla o gráfico de correlación (ej.: soluciones azucaradas o alcohólicas). Se suele informar como “densidad relativa” utilizando un líquido de referencia, que casi siempre es agua. La masa volúmica y densidad relativa a 20°C en vinos, bebidas espirituosas, otras bebidas alcohólicas como sidra, cerveza o bebidas a base de vino, así como vinagres de estos productos, se determinan por densimetría electrónica.

El grado alcohólico volumétrico en bebidas espirituosas, grado alcohólico en vinos y cerveza, así como el extracto seco total (parámetro calculado) en vinos, espirituosas y otras bebidas alcohólicas también se puede determinar por densimetría electrónica.

La densidad de los aceites que se elaboran industrialmente nos va a ofrecer (junto con el índice de refracción y el punto de fusión) información en relación a su identidad y pureza. También se determina la densidad relativa en zumos empleando el picnómetro (método oficial).

La densidad es un parámetro relevante en medios de producción como en productos fitosanitarios y fertilizantes. En el caso de los productos fitosanitarios el organismo encargado del desarrollo de métodos analíticos en este sector, CIPAC (Collaborative International Pesticide Analytical Council), recoge varios métodos para la determinación de la densidad aparente en formulados granulares, y peso específico y densidad en formulados líquidos que puede determinarse, entre otros métodos, con picnómetro o hidrómetro. En laboratorio es frecuente el uso de la densimetría electrónica.

En el caso de productos fertilizantes existen diversas norma UNE para la determinación de la densidad. Por ejemplo, en fertilizantes como tal, la densidad aparente sin compactar se analiza siguiendo la norma UNE 1236:1996 y después de compactar siguiendo la norma UNE 1237:1996. La densidad aparente en mejoradores de suelo y sustratos de cultivo se analiza siguiendo la norma UNE 13041:2012. Todos ellos suponen pesar una porción de muestra en un recipiente de volumen conocido. Es frecuente también el uso de densimetría electrónica para la determinación de la densidad en productos líquidos.

3. VISCOSIDAD.

La reología es la ciencia que se encarga de estudiar las propiedades viscosas de los fluidos. Se define **Viscosidad** (η) como la resistencia de un líquido a fluir. Esta resistencia se opone al movimiento de unas partículas del fluido sobre otras adyacentes a las mismas y se considera fruto del rozamiento interno de las moléculas. La constante de proporcionalidad denominada coeficiente de viscosidad indica la resistencia que el líquido opone al flujo.

Un fluido Newtoniano es aquel en el que se cumple que el esfuerzo de cizalla es proporcional a la velocidad de deformación, de acuerdo con la ecuación:

$$\sigma_{xy} = \mu \frac{\partial v_y}{\partial x} = \mu \dot{\gamma}$$

Donde σ_{xy} es el esfuerzo por unidad de área o esfuerzo de cizalla; $\dot{\gamma}$ el gradiente de velocidades o velocidad de deformación o cizalla y μ la viscosidad. Esto significa que un **fluido newtoniano** es aquel para el cual la **viscosidad**, a una temperatura y presión dadas, es **constante** para cualquier velocidad de deformación, independientemente del tiempo que se esté aplicando la cizalla. Por tanto, serán fluidos no newtonianos los que no cumplan esta condición (UCM, 2022).

Los fluidos no newtonianos se puede agrupar en dos grandes categorías (UCM, 2022):

1. Aquellos para los que la viscosidad cambia con la velocidad de deformación:
 - 1.1. **Dilatantes**: son aquellos fluidos que aumentan su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación aplicada, como almidón de maíz.
 - 1.2. **Pseudoplásticos**: son aquellos fluidos que disminuyen su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación aplicada, como los zumos de frutas y diversas emulsiones.
 - 1.3. **Viscoplásticos o de comportamiento plástico**: Son materiales que se comportan como un sólido elástico hasta que el esfuerzo alcanza un valor umbral, una vez alcanzado este valor pasan a comportarse como fluidos donde el esfuerzo puede tener una dependencia lineal con la velocidad de deformación o no. Por ejemplo la mermelada o la clara de huevo
2. Aquellos para los cuales la viscosidad cambia con el tiempo durante el esfuerzo.
 - 2.1. **Tixotrópicos**: Aquellos para los cuales la viscosidad disminuye con el tiempo, como las gelatinas.
 - 2.2. **Reopécticos**: Aquellos para los cuales la viscosidad aumenta con el tiempo.

La unidad de viscosidad es el poise ($\text{g/cm}\cdot\text{s}$); más comúnmente, se usa un submúltiplo de ella, el centipoise. Es importante considerar la relación que existe entre la viscosidad y la temperatura, razón por la cual ésta debe mantenerse constante al hacer las mediciones para obtener resultados comparables. Normalmente a mayor temperatura

menor viscosidad. En el caso de fluidos newtonianos la dependencia es exponencial. Al añadir a un líquido simple moléculas grandes o pequeñas partículas sólidas el comportamiento reológico se desvía del newtoniano.

Casi nunca se indica la viscosidad absoluta, sino la viscosidad relativa, es decir, la viscosidad de la sustancia comparada con la de un líquido de referencia, generalmente el agua. La viscosidad se mide por medio de *viscosímetros* los cuales están basados en principios tales como la medida del flujo a través de un tubo capilar (viscosímetro de Ostwald), el flujo a través de un orificio (viscosímetro de Saybolt o Redwood) o rotación de un cilindro o aguja en el material de prueba (viscosímetro de Stormer y Brookfield).

APLICACIONES

Los estudios reológicos pueden aportarnos información que facilite una mejor comprensión de la estructura o de la distribución de los componentes moleculares de los alimentos, especialmente de los componentes macromoleculares, así como para predecir los cambios estructurales durante los procesos de acondicionamiento y elaboración a los que son sometidos.

Los métodos empleados para medir viscosidades varían según el alimento presente flujo newtoniano (vinos, aceites, soluciones azucaradas) o no newtonianos (sopas, salsas, purés, cremas).

Las medidas de la viscosidad en continuo son cada vez más importantes en muchas industrias alimentarias con objeto de controlar el buen funcionamiento del proceso productivo, así como la calidad de las materias primas, productos intermedios y acabados.

En el ámbito de los productos fitosanitarios y fertilizantes la viscosidad es un parámetro que caracteriza este tipo de productos, muy a tener en cuenta debido a su importancia en la preparación y aplicación de los formulados. En fitosanitarios, CIPAC establece la determinación de la viscosidad en líquidos opacos y transparentes y en aceites minerales, así como siguiendo el método Redwood (un tipo de viscosímetro). En fertilizantes se puede emplear el viscosímetro de Brookfield para su análisis.

4. ÍNDICE DE REFRACCIÓN Y GRADOS BRUX.

La refracción es el fenómeno por el cual la luz cambia de dirección al pasar de un medio a otro de distinta magnitud óptica. La magnitud de esta variación depende de la densidad óptica del medio.

El Índice de Refracción (n_a) de un medio es la relación existente entre la velocidad de la luz en el vacío ($c=3 \cdot 10^8$ m/s), respecto a la velocidad que lleva la luz en dicho medio.

$$n_a = \frac{c}{v_a}$$

La luz se propaga a velocidad máxima en el vacío pero más lentamente en los demás medios transparentes; por tanto en todos ellos $n > 1$. Cuando un rayo luminoso incide oblicuamente sobre la superficie de separación entre dos medios diferentes, el haz incidente se divide en tres: el más intenso penetra en el segundo medio formando el **rayo refractado**, otro es **reflejado** en la superficie y el tercero se descompone en numerosos haces débiles que emergen del punto de incidencia en todas direcciones, formando un conjunto de haces de **luz difusa**.

LEY DE SNELL

Centrándonos en el rayo refractado que penetra en el medio, si la recta perpendicular a la superficie de separación entre medios diferentes, el rayo incidente, y el rayo refractado están en el mismo plano, la ley de Snell establece que:

$$n_1 \text{ sen } \theta_1 = n_2 \text{ sen } \theta_2$$

donde n_1 y n_2 son los índices de refracción del primer y segundo medio, respectivamente y θ_1 y θ_2 son los ángulos de incidencia y de refracción medidos respecto a la normal a la superficie.

Si $\theta_1 = 0$, entonces $\theta_2 = 0$, por lo que el rayo no se desvía si incide perpendicularmente a la superficie de separación de los dos medios.

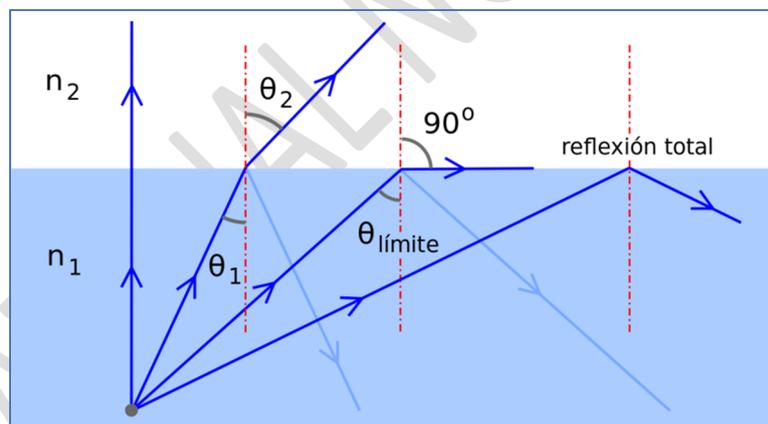


Figura 1: Fenómeno de refracción

Fuente: <https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:ReflexionTotal.svg>

Para medir el Índice de Refracción se usan refractómetros que generalmente se basan en la medición del ángulo crítico o ángulo límite, definiéndose como el ángulo de refracción a partir del cual desaparece el rayo refractado y toda la luz se refleja. Éste corresponde a $\theta_{2 \text{ máx}} = 90^\circ$ (cuyo seno es 1), pudiendo conocerse el ángulo límite por la ley de Snell. El ángulo crítico va a depender de la longitud de onda, por lo que debe emplearse luz monocromática.

GRADOS BRIX

Se trata de una medida de sólidos solubles. Originariamente, los grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) eran una medida de densidad de forma que un grado Brix es la densidad que tiene una solución de sacarosa al 1% a 20 $^{\circ}\text{C}$. El grado Brix es, por tanto, una unidad representativa del contenido en azúcar de una disolución acuosa. A esta concentración corresponde también un determinado índice de refracción. El índice de refracción depende, entre otras variables, de la longitud de onda del haz luminoso, de la temperatura, de la composición y concentración del medio donde se produce la propagación del haz, por lo que puede usarse esta técnica para medir concentraciones o identificar sustancias. Existen diferentes equipos de medida entre los que caben destacar, los refractómetros manuales y los digitales (Alonso Gaite, 2011).

APLICACIONES

La refractometría de líquidos se utiliza en el análisis de alimentos con fines de identificación y caracterización, para control de pureza y para la determinación cuantitativa de ciertos componentes. Así, por ejemplo, sirve para comprobar el aguado de la leche, para la determinación aproximada del contenido en alcohol de aguardientes y cervezas y del contenido en agua de la miel. Su importancia es aún mayor en la determinación de extractos de productos alimenticios constituidos principalmente por azúcar (zumos de fruta, mermeladas, miel, jarabe de almidón).

La estimación del contenido en sólidos solubles en zumos se realiza usando un método refractométrico y determinando los grados Brix, parámetro absoluto de autenticidad y calidad en zumos.

En la industria vinícola, la escala Brix informa de la cantidad de azúcares presentes en los mostos, que serán determinantes en la calidad final del vino tras la fermentación.

5. ROTACIÓN ÓPTICA.

Según la teoría electromagnética, la luz es un movimiento vibratorio en el que la vibración se verifica perpendicularmente a la dirección de propagación. La vibración no se verifica en una dirección determinada sino en todas las imaginables, siempre que sean perpendiculares al sentido de la propagación. La luz en la que, gracias a la instrumentación adecuada, se eliminan todos esos planos dejando que la vibración se realice solo en **uno** determinado, constituye la **luz polarizada**.

La **polarimetría** se define como el estudio de la rotación de luz polarizada por sustancias transparentes. Estudia por tanto la actividad óptica de estas sustancias.

Para realizar mediciones de la rotación del plano de luz polarizada se emplean pares de prismas de Nicol. Si la luz atraviesa un cristal de Nicol se aíslan determinados rayos de luz. Cuando ciertos tipos de soluciones se interponen entre dos cristales de Nicol, el rayo

de luz sufre una rotación hacia la derecha o hacia la izquierda. Las sustancias que provocan rotación en el plano de polarización de la luz se dice que son **ópticamente activos** o que poseen poder óptico rotatorio y se caracterizan por presentar asimetría molecular o cristalina.

Las sustancias ópticamente activas pueden desviar el plano de vibración de la luz polarizada hacia la derecha (dextrógiras) o hacia la izquierda (levógiras).

Para comparar las actividades ópticas de las distintas sustancias es preciso referirlas todas a unas condiciones semejantes. Por ello se habla de *poder rotatorio específico* o *rotación específica* de una sustancia ópticamente activa, que se define como la desviación que una sustancia imprime a un plano de vibración de la luz polarizada bajo un espesor de un decímetro y si su densidad fuera igual a la unidad.

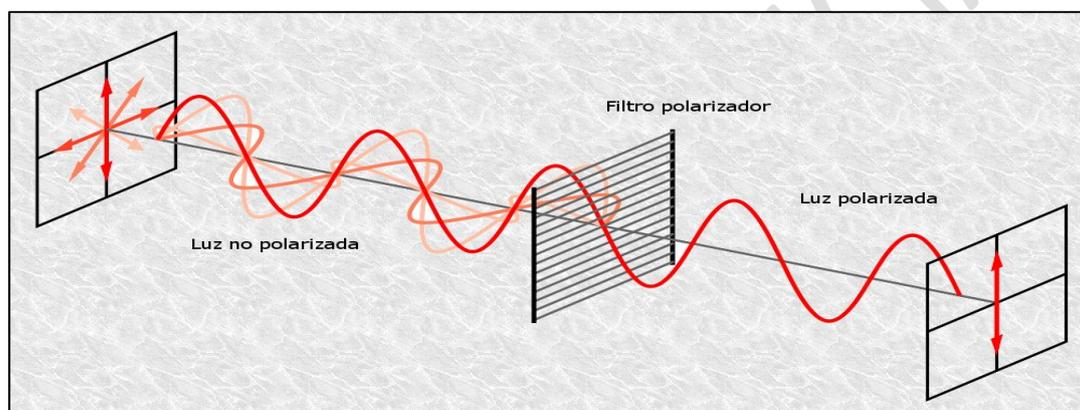


Figura 2 Polarización de la luz

Fuente: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:LuzPolarizada.jpg>

La rotación específica se representa como α . El ángulo de rotación va a depender de la propia sustancia activa, de la longitud de onda de la radiación y de la temperatura, por lo que hay que fijar ambos parámetros: la **rotación específica** se suele medir a 20°C con la línea D del sodio (589 nm) (α_D^{20})

$$(\alpha_D^{20}) = \frac{\alpha}{LC}$$

Dónde α es la rotación observada en grados; L es la longitud de la trayectoria en decímetros y C la concentración de soluto.

APLICACIONES

Este método presenta aplicaciones cualitativas y cuantitativas.

Desde el punto de vista cualitativo la rotación óptica de un compuesto puro es una constante física útil para fines de identificación junto con la medida de otras propiedades físicas. La rotación óptica para diferentes azúcares está tabulado a una

temperatura de 20° y una longitud de onda de 589nm. También se emplea para identificar ciertos líquidos o soluciones como aminoácidos, esteroides, alcaloides y carbohidratos

Desde el punto de vista cuantitativo se pueden realizar curvas que relacionan la rotación óptica con la concentración, por lo que permite medir la concentración de compuestos que son ópticamente activos, por ejemplo carbohidratos como sacarosa, glucosa o almidón o medir el grado de conversión de ellos en procesos químicos o enzimáticos. Así, por ejemplo se emplea en la determinación de almidón en piensos y sus materias primas. Permite además el análisis del azúcar de la remolacha u otros azúcares comerciales como la dextrosa, la lactosa y la maltosa y productos que contienen estos azúcares, y se emplea en la determinación de sacarosa en azúcares sólidos y soluciones azucaradas.

6. DETERMINACIÓN DE LOS PUNTOS DE CONGELACIÓN Y PUNTO DE EBULLICIÓN.

Los **puntos de congelación y ebullición** de una disolución respecto al disolvente puro son dos puntos críticos que pertenecen al grupo de características de las disoluciones que se conocen como características coligativas. Como se ha indicado al principio, éstas no dependen de la naturaleza del soluto, sino de su concentración.

El punto de congelación de un líquido es la temperatura a la cual ocurre un cambio de fase del estado líquido al sólido, estableciéndose un equilibrio dinámico entre ambos estados. En este estado de equilibrio la velocidad de congelación del líquido es igual a la velocidad de fusión del sólido. Por ello al punto de congelación también se le llama punto de fusión (esto es así para la mayoría de sustancias, pero otras como el agar-agar tienen distintas temperaturas para la fusión y la congelación; a este fenómeno se le conoce como **histéresis**). **El punto de fusión** corresponde a la temperatura a la cual un sólido pasa a líquido a la presión atmosférica. Durante el proceso de cambio de estado de una sustancia pura, la temperatura se mantiene constante puesto que todo el calor se emplea en el proceso de fusión. Por esto el punto de fusión de las sustancias puras es definido y reproducible, y puede ser utilizado para su identificación.

El punto de ebullición de un líquido es definido como la temperatura a la cual su presión de vapor es igual a la presión externa. La presión de vapor de una sustancia pura a una temperatura es la presión de la fase gaseosa que se genera a esa temperatura en la que ambas fases (líquido y vapor) están en equilibrio (Atarés Huerta, 2016). Por convención, los puntos de ebullición informados en la literatura científica están indicados a una presión externa de 1 atm.

Este fenómeno está explicado por la **Ley de Raoult**: cuando una sustancia pura pasa a formar parte de una disolución, su presión de vapor desciende de acuerdo con la siguiente ecuación (Atarés Huerta, 2016):

$$P_i(T) = x_i^l P_i^*(T)$$

Dónde: $P_i(T)$ es la presión de vapor de la sustancia i en la disolución ideal; $P_i^*(T)$ es la presión de vapor de la sustancia i pura y x_i^l es la fracción molar de la sustancia i en la fase líquida (en la disolución).

Según la Ley de Raoult la presión debida al componente i siempre se ve reducida cuando pasa a formar parte de una disolución ideal en comparación con el estado puro. Esta reducción será más acusada en la medida en que la fracción molar de ese compuesto en la disolución ideal sea menor (Atarés Huerta, 2016).

La adición de un soluto provoca que los puntos de congelación y de ebullición se desplacen en la escala de temperatura. La **constante crioscópica** es una constante que define el punto de congelación de un disolvente dado. Tanto la molaridad del soluto adicionado como la constante crioscópica de cada disolvente definen cuánto disminuye el punto de congelación de dicho disolvente. Este fenómeno, la disminución de la temperatura de congelación, se conoce como **descenso crioscópico** (P-SA-93, 2021).

El descenso del punto de fusión (o descenso crioscópico) o la elevación del punto de ebullición de una disolución es directamente proporcional a la concentración de soluto. La presencia de impurezas tendrá una influencia considerable sobre el punto de fusión, actuando como soluto y disminuyendo el punto de fusión de la sustancia.

APLICACIONES

El punto de ebullición, junto con el índice de refracción, se emplea como criterio de identidad y pureza de las sustancias líquidas.

El punto crioscópico se usa para evaluar la calidad de la leche cruda entera y sus productos. Es un parámetro importante para la determinación de adulterantes en leches, principalmente cuando se altera la leche mediante la adición de agua (aguado de la leche).

La leche por tener numerosas sustancias en disolución tiene un punto de congelación inferior al agua, variando dentro de unos límites muy reducidos. El descenso crioscópico normal en la leche se debe a la lactosa y las sales minerales. Un cambio en la acidificación debido a la fermentación de la lactosa aumenta el descenso crioscópico por la formación de más moléculas de soluto originadas en el proceso fermentativo. Lo mismo ocurre con la adición de sal. Cuando se agrega agua a la leche se diluyen los solutos y el punto de congelación aumenta, acercándose al del agua. El aumento será proporcional al agua añadida (González Cuascota, 2013).

En la actualidad, la determinación del punto crioscópico se realiza con crióscopos: equipos automáticos para una rápida y exacta determinación de la variación del punto de congelación de leche y nata y del porcentaje de agua añadida.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso Gaité, M. A. (2011). *Caracterización sensorial y físico-química de manzanas reineta y pera conferencia, figuras de calidad en Castilla y León*. León: Universidad de León.
- Atarés Huerta, L. (28 de Julio de 2016). *Universidad Politécnica de Valencia*. Recuperado el 04 de Mayo de 2022, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/68313/Atar%C3%A9s%20-%20La%20ley%20de%20Raoult.pdf?sequence=1>
- Camargo Sánchez, M. d., & cols. (2008). *Laboratorio de Química Orgánica. Manual de Prácticas*. Ciudad de México: Instituto Politécnico Nacional.
- Departamento de Física. Universidad de Sonora. (s.f.). Práctica 10: Laboratorio de Mecánica y fluidos. Recuperado el 08 de Abril de 2022, de <https://www.fisica.uson.mx/manuales/mecyfluidos/mecyflu-lab10.pdf>
- González Cuascota, M. (Noviembre de 2013). Estudio del punto crioscópico de leche cruda bovina, en dos pisos altitudinales y dos épocas del año. Ecuador 2012. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Mettler Toledo. (s.f.). Recuperado el 08 de Abril de 2022, de https://www.mt.com/es/es/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/density-meter.html
- P-SA-93. (2021). *Procedimiento de determinación del punto de crioscopia en leches*. PNT. Recuperado el 03 de Mayo de 2022, de https://devx.meta.gov.co/media/centrodocumentacion/2021/11/26/P-SA-93_CRIOSCOPIA_V2.pdf
- Rodríguez Alzamora, R. (2017). *Repositorio de la Universidad Estatal de la Península de Santa Elena*. Ecuador: Editorial UPSE. doi:ISBN:978-9942-776-01-3
- UCM. (25 de Abril de 2022). www.ucm.es. Obtenido de <https://www.ucm.es/data/cont/docs/76-2015-03-19-Fluido%20no%20newtoniano.pdf>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 26

POTENCIOMETRÍA. FUNDAMENTO. ELECTRODOS. 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 indicador

2.2.1. Electrodo indicador metálico

2.2.2. Electrodo de membrana

3. APLICACIONES

3.1. Potenciometría directa.

3.2. Valoraciones potenciométricas

MATERIAL NO OFICIAL

1. FUNDAMENTO TEÓRICO.

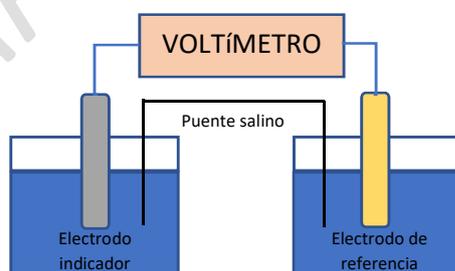
El potencial de un electrodo viene determinado por la concentración o estrictamente por la actividad de una o más especies químicas presentes en la disolución en que está sumergido.

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. Por lo tanto, una potenciometría consiste en determinar el voltaje de una pila compuesta por los dos electrodos citados y la disolución objeto de estudio.

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_{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.

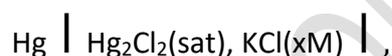
2.1. Electrodo de referencia

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 $\text{AgCl}(\text{s}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}(\text{s}) + \text{Cl}^-$

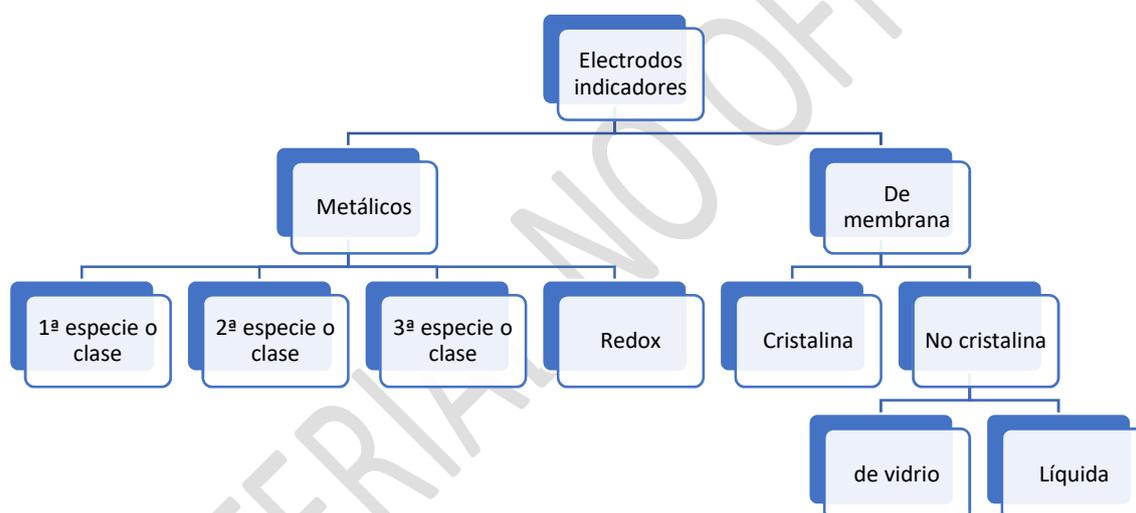
Los modelos comerciales de este electrodo son semejantes en apariencia externa a los electrodos de calomelanos, si bien en estos de plata / cloruro de plata, el tubo interno se reemplaza por un alambre de plata recubierto con una capa de cloruro de plata que se

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. Electrodos 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. Electrodos indicadores metálicos

Primera especie

Son aquellos que están en equilibrio directamente con el catión del metal que constituye el electrodo (Cobre, Hierro Niquel, 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

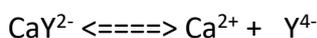
Son aquellos metales que no solo sirven como indicadores de sus propios cationes sino que también responden a la concentración de aniones que forman precipitados poco solubles o complejos de gran estabilidad con esos cationes. Por ejemplo el electrodo de Plata/Cloruro de Plata,

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.)

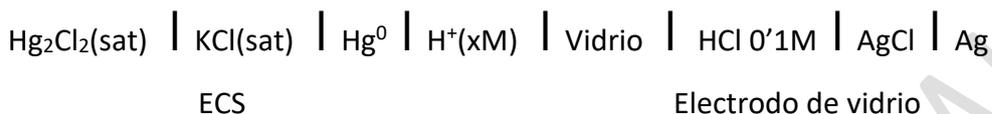
2.2.2. Electrodos de membrana

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 de actividad conocida y constante. El bulbo se sumerge en la disolución a la que se le va a determinar el pH junto con un electrodo de referencia externo, generalmente un ECS. La pila se puede representar como sigue:



La pila tiene dos electrodos de referencia; uno de los cuales es el electrodo externo (ECS) mientras que el otro es el electrodo interno de Ag/AgCl, que aún siendo parte del electrodo de vidrio, no es el elemento sensible al pH. En realidad, es la fina membrana de vidrio la que responde al pH.

Puesto que los dos potenciales de referencia permanecen constantes cualquier cambio en el potencial de la celda, que ocurre cuando cambiamos la disolución problema, debe reflejar un cambio en el potencial que se genera a través de la membrana de vidrio.

Se han desarrollado electrodos de vidrio que permiten la medida potenciométrica directa de especies monovalentes como Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Li⁺, Ag⁺ y NH₄⁺.

Electrodos de membrana líquida

Los electrodos de membrana líquida deben su respuesta al potencial que se establece a través de la interfase entre la disolución que contienen al analito y un intercambiador de iones líquido, que se une selectivamente con el ion analito.

Por ejemplo, el electrodo de membrana líquida para el calcio consiste en una membrana conductora que une selectivamente a los iones calcio, una disolución interna que contiene una concentración fija de cloruro cálcico y un electrodo de Ag/AgCl que forma el electrodo de referencia interno.

Al igual que ocurre con el electrodo de vidrio, se establece un potencial a través de la membrana como consecuencia de las distintas actividades del ion calcio en las disoluciones externa e interna, siendo el potencial:

$$E = V_1 - V_2 = \frac{0,059}{2} \cdot \log \frac{a_1}{a_2}$$

donde a₁ y a₂ son las actividades del ion calcio en las disoluciones externa e interna respectivamente. Dado que la a₂=cte, tendremos:

$$E = C + \frac{0,059}{2} \cdot \log a_1$$

Donde $C = \text{cte}$, $E = C - \frac{0,059}{2} pCa$

Los electrodos sensibles a los aniones utilizan una disolución con una resina cambiadora de aniones en un disolvente orgánico.

Electrodos de membrana cristalina o de estado sólido y de precipitados

Hay materiales sólidos que son selectivos para los aniones, al igual que el vidrio es selectivo para los cationes. Un electrodo de estado sólido tiene una membrana en forma de gránulo o de cristal único de un compuesto que contiene el anión que se va a determinar. Un electrodo de precipitado se prepara suspendiendo una sal insoluble finamente pulverizada en una matriz inerte semiflexible fabricada con un material adecuado para la membrana.

Un electrodo de estado sólido muy satisfactorio es el que se emplea para determinar fluoruro. Un cristal de F_3La actúa como membrana. El cristal se estimula con $Eu(II)$, para aumentar su conductividad eléctrica. El electrodo responde al ion fluoruro a concentración por encima de $10^{-6}M$. El ion hidroxilo interfiere y la utilización del electrodo se limita al rango de pH de 0 a 8'5. Otros electrodos de estado sólido que son satisfactorios y que se encuentran disponibles en el comercio es el de cloruro, bromuro, yoduro, sulfuro, cianuro y tiocianato. En estos electrodos la membrana es un gránulo fundido de una sal insoluble del anión, como el $AgCl$ para los iones cloruro.

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.

En la práctica lo habitual es preparar una gráfica de calibración del potencial en función del logaritmo de la concentración del ion a determinar, manteniendo la fuerza iónica constante (Para ello, se le añade tanto a las muestras como a los patrones un exceso medido de un electrolito inerte. De este modo, el efecto del electrolito de la matriz será despreciable y la gráfica de calibración resultará lineal, de otra manera (fuerza iónica variable) no lo sería). Se mide el potencial de la disolución desconocida y se calcula su concentración a partir de la gráfica de calibrado.

Por ejemplo, en la determinación potenciométrica de **ion fluoruro en aguas potables**. Las muestras y los patrones se diluyen con una disolución que contiene cloruro sódico y disoluciones reguladoras de acetato y citrato. Este diluyente está lo suficientemente concentrado como para que las muestras y los patrones presenten prácticamente la misma

fuerza iónica. Mediante este método se pueden determinar concentraciones de fluoruro del orden de ppm.

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⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Li⁺, Ag⁺ y NH₄⁺**) y el desarrollo de electrodos de estado sólido selectivos para la determinación de aniones tipo **Br⁻, Cl⁻, F⁻, CN⁻**, 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.

El proceso, normalmente, comprende la medida del potencial de la pila (mv ó pH, según el caso) después de cada adición de reactivo. Al principio se añade el agente valorante en grandes incrementos de volumen, los cuales hay que ir haciendo menores a medida que llegamos al punto final (debido a los grandes cambios de potencial por unidad de volumen).

Después de cada adición de reactivo hay que esperar suficiente tiempo para que se alcance el equilibrio. Por ejemplo las reacciones de precipitación pueden necesitar varios minutos para equilibrarse, especialmente en las proximidades del punto de equivalencia. El que nos estamos acercando al equilibrio se pone de manifiesto por la desaparición de fluctuaciones en el potencial. Con frecuencia la agitación hace que se consiga el equilibrio más rápidamente.

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.

Otro procedimiento llamado de primera derivada consiste en calcular la variación de potencial por unidad de volumen de valorante ($\Delta E/\Delta V$). La representación de estos datos en función del volumen promedio origina una curva con un máximo que corresponde al punto final y por tanto al punto de inflexión.

El último procedimiento llamado de segunda derivada $\Delta^2 E/\Delta V^2$ se representa frente al volumen de agente valorante, mostrando que se produce un cambio de signo en el punto de inflexión.

Valoraciones de neutralización

Este tipo de valoraciones son especialmente útiles para el análisis de mezclas de ácidos o de ácidos polipróticos. Las mismas consideraciones para las bases. Se puede evaluar el valor de las constantes de disociación de un ácido o una base a partir de las curvas de valoración potenciométricas.

Una valoración potenciométrica de un ácido puro puede aportar los datos suficientes (peso equivalente y K_a) para que sea posible su identificación.

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 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.

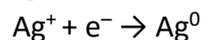
El $AgNO_3$ es el reactivo más versátil para las valoraciones de precipitación. En este caso un hilo de plata sirve como electrodo indicador.

Una curva teórica para una valoración potenciométrica se deduce fácilmente. Por ejemplo, el potencial de un electrodo de plata para una valoración de cloruro sería:



$$E = E_{Ag^+/Ag^0}^0 - 0,059 \log [Cl^-]$$

Alternativamente, si lo que pretende es valorar ion plata sería:



$$E = E_{Ag^+/Ag^0}^0 - 0,059 \log \frac{1}{[Ag^+]}$$

Valoraciones de oxidación-reducción

Para detectar puntos finales en valoraciones redox se utilizan normalmente electrodos inertes de platino.

BIBLIOGRAFÍA

-Skoog, Holler, Nieman (2001). Principios de análisis instrumental, Quinta edición. McGraw Hill

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 27

**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

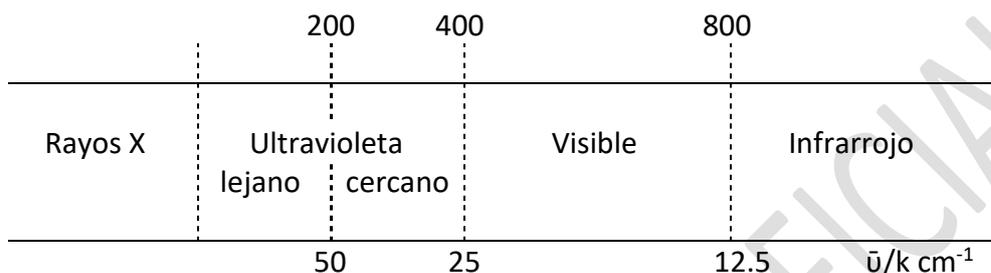
2. FLUORESCENCIA

- 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, CaF₂, 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 (ϵ)**.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

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 absorptividades molares del absorbente a diferentes longitudes de onda, menores serán las desviaciones.

Además, las absorptividades 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:

$$\Delta E = E(y_1) - E(y_{01}) = h\nu$$

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 λ_{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 σ , π 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 π , 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 π^* .

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.

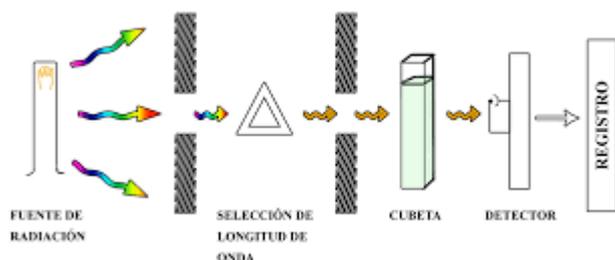
Los disolventes más comunes para estudios en UV VIS son el agua, alcoholes, dioxano, isooctano, cloroformo, benceno, ciclohexano, acetonitrilo..., cuyos límites de aplicación termina en torno a los 220-240 nm, es decir en el punto de corte o absorción final.

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 auxócrono..., 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 dimetilgloxina 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.

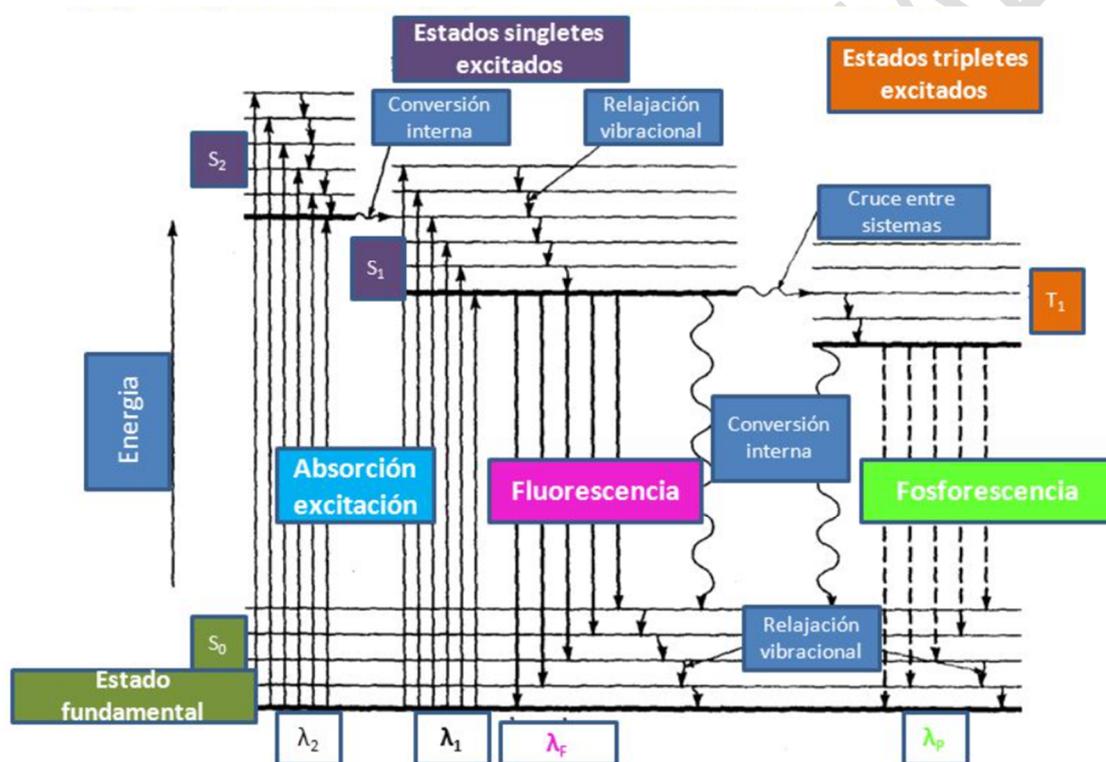
La velocidad a la cual se absorbe un fotón de radiación suele estar en torno a los 10^{-15} a 10^{-14} segundos, sin embargo la velocidad de emisión fluorescente es significativamente más lenta (entre 10^{-4} y 10 segundos).

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 estado 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.

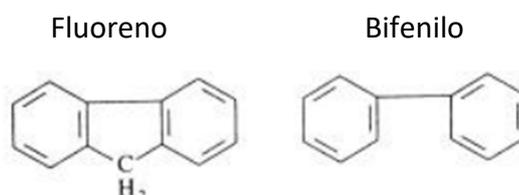
Estructura

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

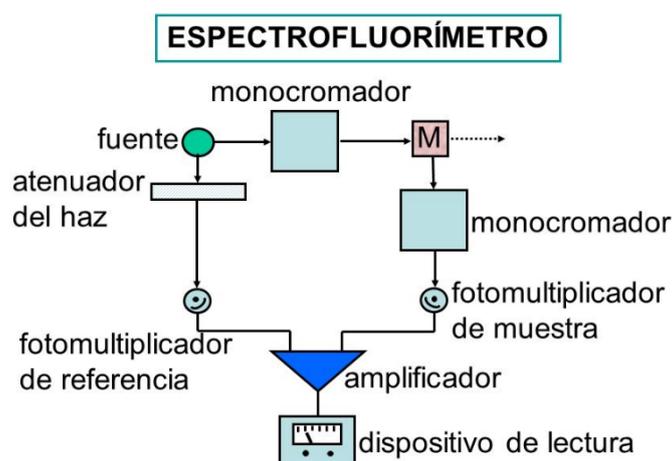
La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto. Por lo tanto será muy frecuente en los métodos 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 λ_{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

BIBLIOGRAFÍA

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 28

**LENTES Y MICROSCOPIOS. TIPOS. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.
FUNDAMENTO. 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. 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.

2.3.2 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 45° 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 90°, alcohol 70° y 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

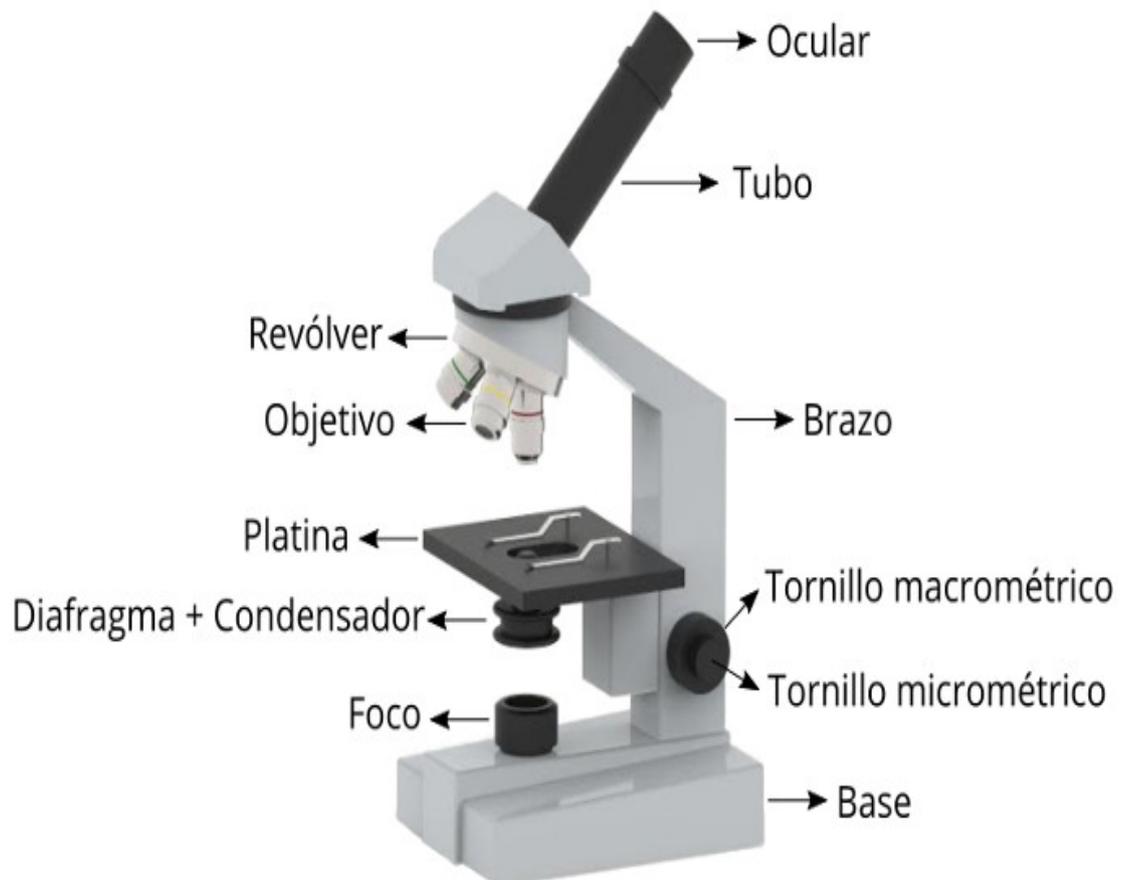
Microscopia de los alimentos .Olga Flint Ed. Acribia I.S.B.N 84-200-0816-8

Prácticas de Microbiología Ed Everest

La célula tópicos acerca de su estudio

5-ANEXO

PARTES DEL MICROSCOPIO



MA

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 29

**BIOTECNOLOGÍA Y TÉCNICAS MOLECULARES.
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA:
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. BIOTECNOLOGÍA Y TÉCNICAS MOLECULARES

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. TÉCNICAS MOLECULARES

1.2.1. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)

1.2.2. INMUNOENSAYOS

1.2.2.1. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

1.2.2.2. *Western blot*

1.2.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

2.1. CONCEPTOS

2.2.1. Termociclador

2.2.2. Reactivos

2.2.3. Ciclo de amplificación

2.2. TIPOS

2.2.1. RT-PCR

2.2.2. PCR-RFLP

2.2.3. PCR a tiempo real (Rti-PCR)

2.2.4 PCR digital (dPCR)

2.3. APLICACIONES AL CAMPO AGROALIMENTARIO

1. BIOTECNOLOGÍA Y TÉCNICAS MOLECULARES

1.1. INTRODUCCIÓN

El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica (2000) define la biotecnología moderna como la aplicación de:

- Técnicas in vitro de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos, o
- La fusión de células más allá de la familia taxonómica que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional.

De esta manera, podemos hacer una clasificación de la biotecnología en cinco grandes áreas:

- Biotecnología en salud humana y alimentaria.
- Biotecnología animal.
- Biotecnología industrial.
- Biotecnología vegetal.
- Biotecnología ambiental.

De estas áreas, combinadas con conocimientos de otras ciencias, surgen nuevas especialidades como la bioinformática, bioingeniería, genómica, proteómica, metabolómica, inmunología, bioética y bioseguridad.

El método de los colores es el más empleado para clasificarla en diferentes tipos según sus aplicaciones:

Biotecnología amarilla	relacionada con los procesos alimentarios
Biotecnología roja	se aplica a la utilización en procesos médicos
Biotecnología blanca	aplicada a los procesos industriales
Biotecnología gris	dedicada a la protección de los problemas medioambientales
Biotecnología azul	para procesos relacionados con el mar
Biotecnología verde	aplicada a procesos agrícolas

1.2. TÉCNICAS MOLECULARES

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado un gran potencial en el desarrollo de técnicas modernas referentes a la biología celular, molecular y genética.

Las técnicas moleculares son herramientas que se emplean para el análisis de macromoléculas, fundamentalmente ácidos nucleicos y proteínas, así como para la identificación de microorganismos. Para ello, previamente se necesita la extracción de ADN o ARN, así como su posterior purificación para permitir a continuación aplicar técnica de manera correcta.

1.2.1. SECUENCIACIÓN DE PRÓXIMA GENERACIÓN (NGS)

La secuenciación de próxima generación (NGS), también llamada secuenciación masiva, es una técnica de alto rendimiento, capaz de generar simultáneamente millones de fragmentos de ADN de diversas especies, en forma masiva y paralela. Las primeras técnicas de NGS que se desarrollaron fueron

- a) Secuenciación por síntesis
- b) Secuenciación por ion semiconductor

Las referidas tecnologías constan de tres pasos sencillos:

1. Preparación de librerías
2. Secuenciación
3. Análisis de datos

Para la autenticación de alimentos procesados es preferible utilizar este tipo de secuenciación basada en lecturas cortas, pues el ADN recuperado de esas matrices suele estar muy degradado.

1.2.2. INMUNOENSAYOS

Los inmunoensayos se basan en la reacción de un antígeno (Ag), con un anticuerpo específico (Ac), formando uniones de alta afinidad (complejo Ag-Ab) que pueden ser medidas (detectadas y/o cuantificadas).

Los anticuerpos son glicoproteínas producidas por células específicas del sistema inmune como respuesta a la estimulación de diferentes antígenos (ej. proteína transgénica). Dentro de un individuo animal, se pueden hallar múltiples anticuerpos que se unen a uno o más sitios antigénicos, los denominados epítomos de un mismo antígeno.

- **Anticuerpos policlonales:** reactivo de anticuerpos que contienen gran variedad de inmunoglobulinas producidas por distintos clones de células. Son capaces de reaccionar sobre varios epítomos del mismo antígeno.
- **Anticuerpos monoclonales:** reactivo de anticuerpos que contienen gran variedad de inmunoglobulinas producidas por un solo clon celular (célula hibridoma). Son capaces de reaccionar sobre un epítomo específico del antígeno.

1.2.2.1. Ensayo por inmun absorción ligado a enzimas (ELISA)

La técnica ELISA es el formato de inmunoensayos más empleado para la detección de macromoléculas (ej. proteínas genéticamente modificadas o anticuerpos específicos). Es un ensayo cualitativo y cuantitativo, de alta sensibilidad y especificidad, capaz de identificar el origen de los tejidos y el tipo de proteínas animales.

El método ELISA se basa en la identificación de un antígeno inmovilizado sobre la fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente. Dentro las múltiples variantes, la más utilizada en laboratorios agroalimentarios es la **ELISA tipo sándwich**.

1.2.2.2. Western blot

Método utilizado para la detección de proteínas de un muestra en 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). Las proteínas son transferidas desde el gel hacia la membrana (originalmente de nitrocelulosa).
- 3) Inmunoensayo enzimático. Se examinan utilizando anticuerpos específicos para la proteína.

1.2.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Método molecular cuantitativo que utiliza sondas de ADN marcadas con un fluoróforo para detectar o confirmar anomalías génicas o cromosómicas que, generalmente, están más allá de la capacidad de resolución de la citogenética de rutina.

2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

2.1. 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.

2.1.1. 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.

2.1.2. 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.

2.1.3. 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 una 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.

2.2. TIPOS DE PCRs

2.2.1. 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.

2.2.2. 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 más 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, ...).

2.2.3. 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

2.2.4. 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

2.3. 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 RTPCR. 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 más 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 30

ELECTROFORESIS.

FUNDAMENTOS.

TIPOS.

APLICACIONES EN PRODUCTOS 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 PRODUCTOS 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)

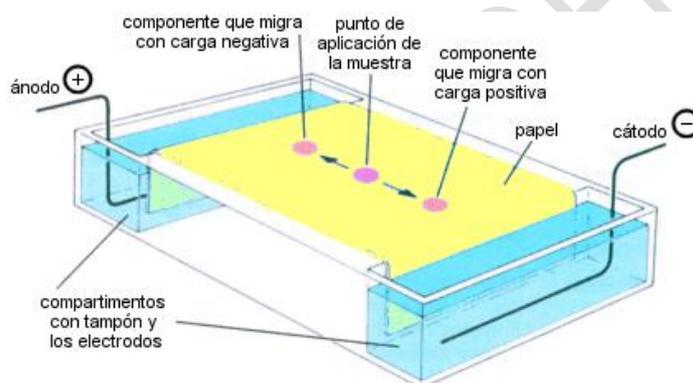
1. FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFORESIS

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/cm².
- 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 β -mercaptoetanol (β -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)

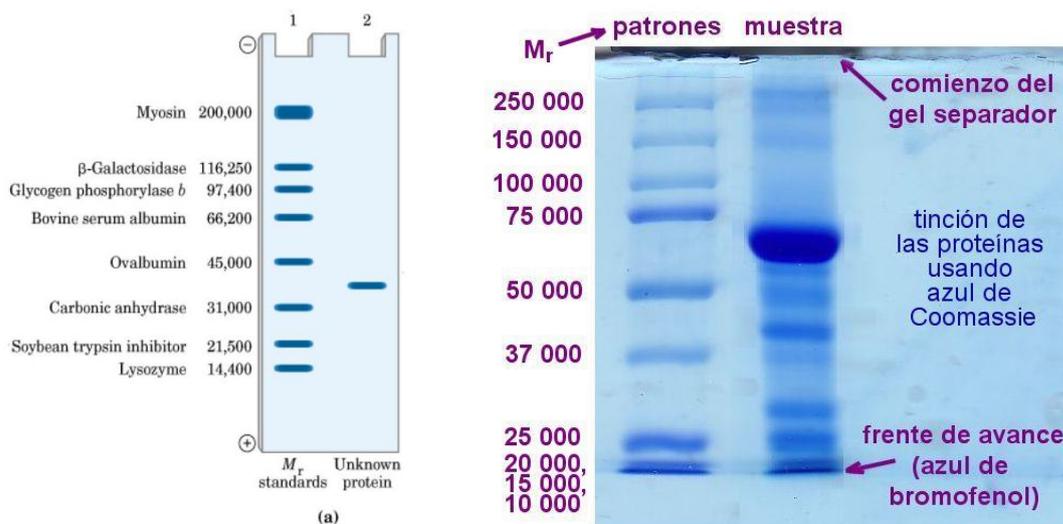
El SDS-PAGE es una técnica empleada para analizar el peso molecular de las proteínas en condiciones desnaturizantes, utilizando diferentes tinciones para visualizarlas. El SDS es un detergente aniónico que se une a todas las proteínas, formando una micela cargada negativamente. De este modo, se enmascara 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 anfólitos 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.

*Anfólitos: mezcla de compuestos de ácidos policarboxílicos y poliaminoácidos.

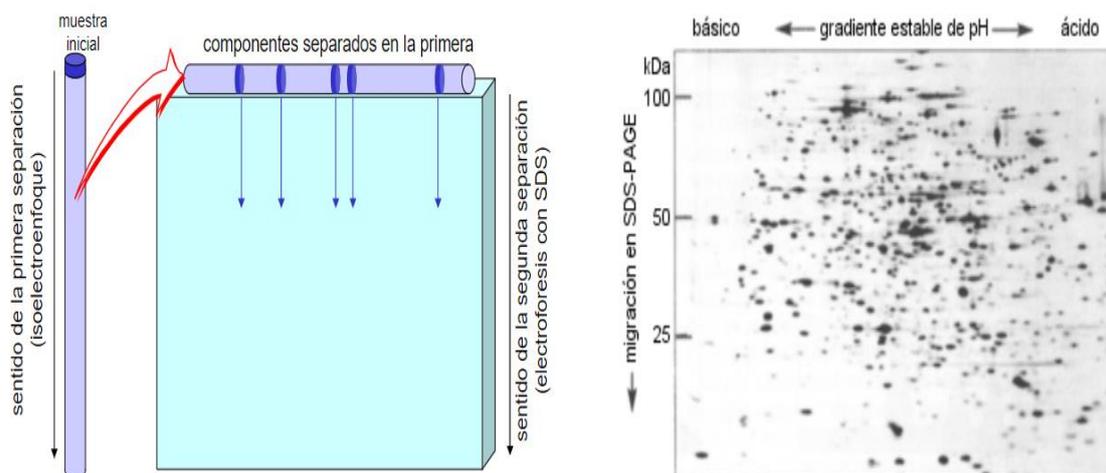
2.3. Electroforesis bidimensional (2-DE)

➤ 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

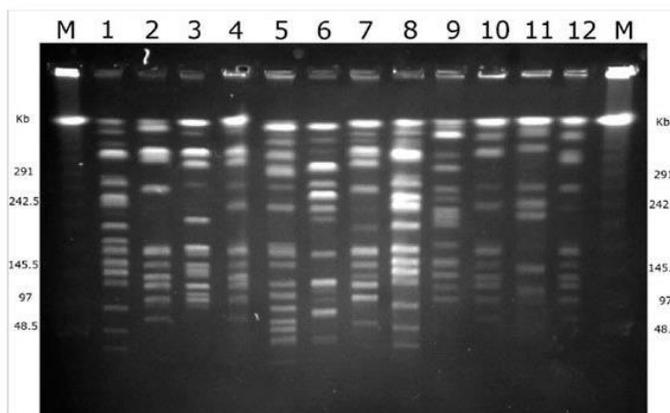
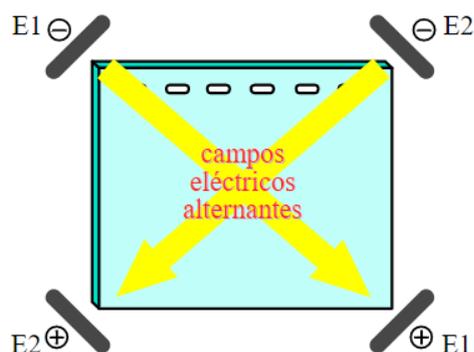
Técnica muy habitual para mapeos genéticos. En este caso se realiza en geles de agarosa. En la primera dimensión la muestra se digiere con una endonucleasa de restricción, separándose los fragmentos. A continuación, los fragmentos se tratan con una segunda endonucleasa de restricción sobre el propio 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 purezas.

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 PRODUCTOS 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 procesado 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 poli(acrilamida) 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. 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>
6. 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 31

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 energética.

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 epítopos 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
 - ✓ Enzimoimunoensayos
 - ✓ Fluoroimunoensayos
- 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 enzimoimunoanálisis (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 INMUNOENZIMÁTICAS

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.

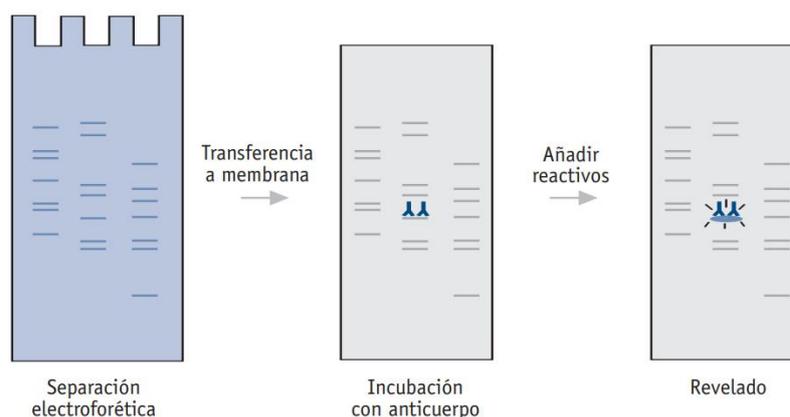
- ✓ Gracias a ello, no se precisa de una cromatografía o electroforesis en gel, por lo que se ahorra tiempo de manera significativa.
- ✗ No proporciona información acerca del tamaño de la biomolécula diana.
- ✗ Si dos moléculas de diferente tamaño son detectadas, aparecen como un único punto.
- ✗ Sólo puede confirmar la presencia o ausencia de la biomolécula.

3.2. *Western blot* o *inmunoblot*

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**

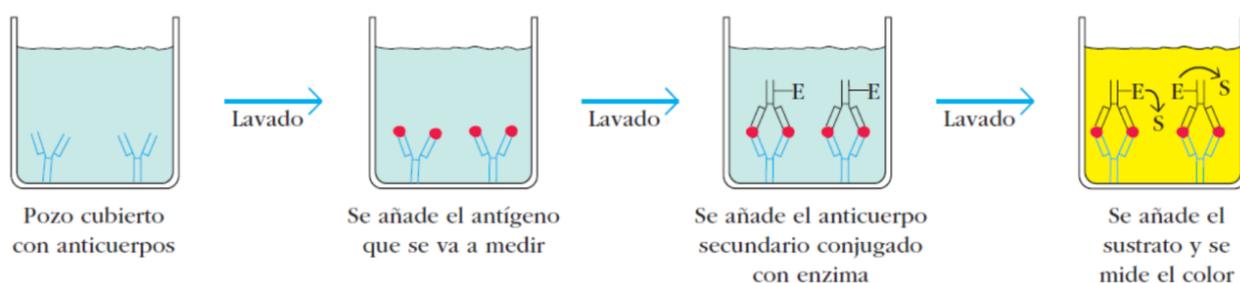
- Se recubren los pocillos de la placa ELISA con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno.
- Se incuban con anticuerpos marcados que indiquen la presencia del antígeno en la solución.
- Se incluyen controles negativos (muestras del mismo tipo de las analizadas que no presentan el antígeno buscado) así como controles positivos- (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado).

- **ELISA indirecto**

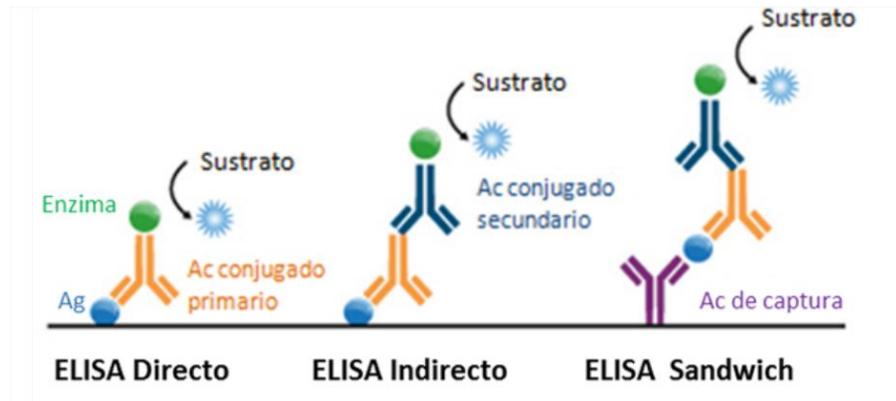
- La preparación del ELISA indirecto es idéntica al del ELISA directo.
- La diferencia es que el sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. Gracias a esto, la detección tiene mayor sensibilidad pues presenta una amplificación 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 patogénicos 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 (β -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	β -lactoglobulin	ELISA Kit using PABs	LOD 0.07 mg/kg, LOQ 0.22 mg/kg
Cheese	Three peptides from α_1 -casein	Direct binding of scFvs to analyte, detected by fluorescence microscopy	Direct monitoring proteolysis of casein
River buffalo milk and curd	Nonhydrolyzed β -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 μ 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, β -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 desnaturizantes, 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
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>.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 32

**MÉTODOS ENZIMÁTICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE ALIMENTOS.
FUNDAMENTO. 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. MÉTODOS ENZIMÁTICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE ALIMENTOS.

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

1.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESTRUCTURA

2. FUNDAMENTO Y APLICACIONES DE LOS MÉTODOS ENZIMÁTICOS

MATERIAL NO OFICIAL

1. MÉTODOS ENZIMÁTICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

1.1. INTRODUCCIÓN.

Las enzimas son un grupo de proteínas cuya función es actuar como catalizadores, acelerando reacciones químicas específicas y permitiendo así, que las reacciones que transcurren en los seres vivos puedan desarrollarse a un ritmo adecuado. Se entiende por catalizador aquel compuesto que con su sola presencia aumenta la velocidad de la reacción sin experimentar ninguna modificación.

Como proteínas que son, presentan todos los rasgos estructurales y propiedades químicas que las caracterizan. Los enzimas presentan un **centro activo** a través del cual interactúan con la(s) molécula(s) de ligando, que en este caso recibe(n) el nombre de sustrato(s), mediante un acoplamiento espacial, gracias a que las superficies moleculares de ambos tienen formas complementarias, y químico, gracias a los grupos funcionales complementarios del enzima y el (los) sustrato(s). Tanto la actividad catalítica como el elevado grado de especificidad química que presentan los enzimas residen en esta interacción específica entre el enzima y su sustrato.

El centro activo está consiste en un conjunto de aminoácidos de los que constituyen el enzima. Por regla general los aminoácidos que forman parte del centro activo no se encuentran contiguos en la cadena polipeptídica, sino ocupando posiciones a veces muy alejadas en la misma. El hecho de que estos aminoácidos coincidan próximos entre sí sobre el centro activo es una consecuencia del plegamiento característico de la cadena polipeptídica, es decir, de la conformación tridimensional de la proteína enzimática.

En cuanto al resto de los aminoácidos de la cadena polipeptídica del enzima, los que no forman parte del centro activo, se encargan de mantener la conformación tridimensional catalíticamente activa del enzima; sin ella no existiría centro activo y el enzima no podría interactuar con su sustrato.

Su capacidad catalizadora depende de su conformación, la supresión de alguno de sus niveles de estructuración, causa la pérdida de funcionamiento. De este modo, se observa que los enzimas pierden su actividad catalítica cuando sufren desnaturalización por efecto de los mismos agentes que afectan a las demás proteínas. Así, la conformación tridimensional de la proteína enzimática resulta indispensable para que ésta desempeñe su función.

Para desarrollar su actividad, algunas enzimas tan sólo requieren de su estructura aminoacídica, mientras que otras requieren la presencia de un cofactor. Este compuesto puede ser, sencillamente un ión inorgánico, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} ; o una molécula orgánica más o menos compleja, que si se encuentra unida covalentemente se denomina **grupo prostético**, y si establece uniones de naturaleza débil y reversible se denomina **coenzima**. Muchas vitaminas, o derivados de las mismas, funcionan como coenzimas. La enzima completa junto a su cofactor se denomina **holoenzima** y su parte exclusivamente proteica **apoenzima**.

Las enzimas se clasifican en varios grupos:

- 1. Oxidorreductasas.** Transferencia de electrones.
- 2. Transferasas.** Transferencia de grupos funcionales.
- 3. Hidrolasas.** Rotura de enlaces incorporando una molécula de agua.
- 4. Liasas.** Rotura de enlaces covalentes por adición o eliminación de grupos.
- 5. Isomerasas.** Reacciones de isomerización: transferencia de grupos dentro de la misma molécula.
- 6. Ligasas.** Formación de enlaces covalentes mediante reacciones de condensación.

2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Las reacciones sean catalizadas o no, dependen para su desarrollo de las leyes termodinámicas. El principal parámetro que desde el punto de vista termodinámico, permite deducir si una reacción se desarrolla o no de forma espontánea, es el cambio en la energía libre de Gibbs, (ΔG) deducido de la segunda ley de la termodinámica (una reacción es espontánea si la entropía global del universo aumenta), que mide la capacidad de un sistema para desarrollar trabajo. Para que se realice la transformación de una molécula, que denominamos sustrato (S), en otra que denominamos producto (P), el cambio de energía libre de Gibbs ha de ser negativo, lo que implica que la energía libre del producto ha de ser menor que la del sustrato.

En una reacción química, la conversión de sustrato en producto requiere una situación energética intermedia que se denomina estado de transición, donde el nivel de energía es superior al del sustrato o del producto. La diferencia entre el nivel de energía basal y la correspondiente al estado de transición se denomina energía de activación y cuánto más alta sea, menor será la velocidad de reacción. La presencia del catalizador provoca una disminución en la energía de activación requerida, y de esta forma aumenta la velocidad con que se desarrolla la misma.

La forma que tiene la enzima de realizar su actividad consiste, en primer lugar, en unirse con el sustrato, y en segundo lugar, en facilitar la modificación del mismo para su cambio a producto. La molécula o moléculas a modificar se sitúan en una región concreta de la enzima denominada centro o sitio activo. Esta zona de la enzima es responsable de las dos propiedades básicas de la molécula: la especificidad y la acción catalizadora de la proteína.

Algunas enzimas presentan una alta especificidad, aceptando tan sólo un tipo de moléculas sobre las que realizar la catalización, y siendo capaces de discriminar incluso entre moléculas isoméricas. Otras enzimas con menor nivel de especificidad catalizan reacciones utilizando como sustratos moléculas que presenten una cierta similitud. La interacción entre enzima y sustrato se realiza a través de enlaces de naturaleza débil entre la molécula de sustrato y el centro activo. Cuanto mayor sea el número de estos enlaces, mayor será la especificidad de la enzima y mayor también su capacidad de discriminar entre sustratos estructuralmente próximos.

3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las enzimas son proteínas que funcionan en un determinado medio donde las condiciones pueden variar, por lo tanto el nivel de actividad de la molécula puede verse modificado a lo largo del tiempo. Dentro de los factores que afectan a la actividad enzimática destacan:

a) El pH. Todas las enzimas tienen en su estructura primaria aminoácidos con grupos radicales ionizables. Dependiendo del pH del medio en el que se encuentren pueden no tener carga, o por el contrario estar cargados, positiva o negativamente. Estas cargas sirven para estabilizar la conformación natural de la proteína y cuando el pH las cambia, también se modifica la estructura, llevando en último extremo a la desnaturalización de la proteína, y en el caso de las enzimas a la pérdida de actividad.

Dependiendo del medio dónde deba ejercer su acción catalítica, cada enzima tendrá su conformación más adecuada, y por lo tanto su máxima actividad, alrededor de un valor concreto de pH, que recibe el nombre de **pH óptimo**. El cambio, bien sea hacia valores más altos o más bajos provocará una disminución de la actividad.

En el caso de la pepsina gástrica, una enzima digestiva, su pH óptimo está alrededor de 2 ya que el medio estomacal es un medio de gran acidez; mientras que otra enzima digestiva como la tripsina, cuyo lugar de acción catalítica es el intestino delgado, presenta su pH óptimo aproximadamente a 8.

La mayor parte de las enzimas son muy sensibles a las variaciones de pH, con algunas excepciones. Esta adaptación garantiza su funcionamiento independientemente del valor del pH del alimento ingerido.

b) La temperatura. Este factor presenta dos efectos contrapuestos. Por un lado, el aumento de temperatura produce un incremento de la velocidad de la reacción química; por el otro, las enzimas experimentan desnaturalización y pérdida de actividad al superar una determinada temperatura.

2. FUNDAMENTO Y APLICACIONES DE LOS MÉTODOS ENZIMÁTICOS.

En cuanto a las aplicaciones, distinguimos:

a) Determinación de componentes presentes en alimentos. Estos métodos enzimáticos se basan en la actuación de forma específica de una enzima sobre una sustancia concreta, llamada sustrato, catalizando su transformación en otra diferente, conocida como producto. A lo largo de la reacción, algún elemento de los que intervienen en la misma absorbe luz a una longitud de onda determinada, con lo que la reacción puede seguirse por colorimetría o espectrofotometría.

- **Ácido cítrico en vino.** El contenido en ácido cítrico se determina mediante método enzimático. El ácido cítrico se transforma en oxalacetato y acetato en una reacción catalizada por la citrato-liasas. Por acción de la enzima malato-deshidrogenasa y la lactato-deshidrogenasa, el oxalacetato y su derivado de descarboxilación, el piruvato, se reducen a malato y lactato por el NADH. La cantidad de NADH oxidado a NAD⁺ en estas reacciones es proporcional al citrato presente. El NADH se mide mediante la disminución de su absorbancia a 340 nm.

b) Medición de actividad enzimática. La actividad de una enzima se determina conociendo la velocidad de la reacción que cataliza. La velocidad de reacción se define como la cantidad de sustrato consumido o de producto formado por unidad de tiempo.

- **Presencia de fosfatasa alcalina en leche.** La fosfatasa alcalina es una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que libera fosfato al medio. Esta enzima se utiliza como control de la adecuada pasterización de la leche, dado que la fosfatasa alcalina se inactiva por calentamiento. Puesto que las temperaturas normales de pasterización la inactivan, debería estar ausente en una leche correctamente pasterizada. Uno de los métodos de ensayo de la actividad de esta enzima emplea como sustrato un éster de fosfato artificial, el p-nitrofenilfosfato, cuya hidrólisis da lugar a fosfato y a p-nitrofenol. Éste último es un compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, por lo que su aparición en el transcurso de la reacción puede seguirse colorimétricamente. Para detener la reacción se añade fosfato, ya que el exceso de este producto de la reacción inhibe la actividad enzimática.
- **Actividad diastásica en miel.** Este método, basado en la medida de una actividad enzimática se establece en la Orden de 12 de junio de 1986 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel. La diastasa cataliza la hidrólisis del almidón. El método oficial para determinar su actividad, se basa en la velocidad de hidrólisis del almidón por las diastasas contenidas en una solución amortiguada de miel. El final de la reacción se determina tomando muestras a distintos tiempos y midiendo la abs a 660 nm en espectrofotómetro. Es un indicador de la frescura de la miel. A medida que la miel envejece o cuando es sometida a procesamientos que involucren incremento de la temperatura, disminuye el contenido de enzimas por destrucción de las mismas. Por tanto, niveles bajos de diastasa indican conservación inadecuada.

- **índice de caída (falling number)**. El método de referencia consiste en la determinación de la actividad α -amilasa de los cereales. Las α -amilasas son enzimas que degradan el almidón, permitiendo que las levaduras dispongan de azúcares para llevar a cabo la fermentación. La actividad amilasa muy elevada será consecuencia de que el grano esté deteriorado.

BIBLIOGRAFÍA

Orden de 12 de junio de 1986 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel.

Bárcena Ruiz, J.A., García Alfonso, C., Padilla Peña, C.A., Martínez Galisteo, E. Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina.

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.

Merino Pérez, J., Noriega Borge, MJ. Fisiología general. Open Course Ware. Universidad de Cantabria. <https://ocw.unican.es/pluginfile.php/879/course/section/967/Tema%25202B-Bloque%2520I-Enzimas.pdf>

<http://www.bionova.org.es/biocast/tema14.htm>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 33

ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA. ICP. TIPOS. OTRAS TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES.

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 λ 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 λ 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 CH₄ o NH₃ 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 34

SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS. CONSIDERACIONES GENERALES. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES DE LOS EQUILIBRIOS CROMATOGRÁFICOS. TIPOS DE CROMATOGRAFÍAS. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS. RESOLUCIÓN, EFICACIA, SELECTIVIDAD

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. SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS. CONSIDERACIONES GENERALES.**
- 2. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES DE LOS EQUILIBRIOS CROMATOGRÁFICOS**
- 3. TIPOS DE CROMATOGRAFÍAS.**
- 4. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS. RESOLUCIÓN, EFICACIA, SELECTIVIDAD**

MATERIAL NO OFICIAL

1. SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS. CONSIDERACIONES GENERALES

La mayoría de los métodos de análisis son poco específicos. Por ello, cuando se trata de analizar muestras complejas, la separación del analito del resto de la muestra es una etapa esencial. Uno de los mejores métodos para conseguir la separación, y posiblemente el más utilizado, es el de la cromatografía.

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 de rutina dedicados a la Seguridad Alimentaria. 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 al 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).

Si consideramos una mezcla que se introduce en un sistema cromatográfico en un tiempo t_0 en una fase móvil que está en contacto con una segunda fase, la estacionaria y a este sistema se le proporciona una determinada cantidad de fase móvil, esta transporta los componentes de la mezcla a través de la fase estacionaria. Según los componentes de la mezcla van tomando contacto con la fase estacionaria se distribuyen entre las dos fases, en función de sus afinidades relativas por estas fases, según determinen su estructura molecular y las fuerzas intermoleculares implicadas.

Un analito A, que tiene mayor afinidad que el B por la fase estacionaria, empleará mucho más tiempo en recorrer esta fase que el B. Parece claro, que cuando un analito está presente en la fase móvil, pasará a través del sistema con la misma velocidad que la fase móvil, pero cuando está en la fase estacionaria, su velocidad será cero.

Por tanto, los analitos con una alta afinidad por la fase estacionaria se moverán a través del sistema muy lentamente mientras que los analitos con una menor afinidad migrarán más rápidamente. Esta migración diferencial de los analitos resultará en una separación de los componentes según se mueven a través del sistema.

Prácticamente no existen restricciones sobre la naturaleza de las fases a utilizar, siempre que la fase estacionaria sea sólida o líquida y la fase móvil líquida o gaseosa, por lo que es posible, en principio, realizar por medio de estas técnicas la separación de los componentes de cualquier mezcla. Por otra parte, la utilización de las técnicas cromatográficas no está exenta de dificultades, debido fundamentalmente a la gran cantidad de parámetros que pueden influir en el proceso de separación, lo cual dificulta la elección de las condiciones óptimas de separación y en muchas ocasiones, implica la irreproducibilidad de los resultados. Por ello, la cromatografía no es una técnica de rutina que pueda aplicarse sin más a cualquier mezcla, sin invertir en muchos casos gran cantidad de esfuerzo y tiempo.

2. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES DE LOS EQUILIBRIOS CROMATOGRÁFICOS

Como se ha comentado anteriormente, la cromatografía consiste en el desplazamiento de un analito en el seno de una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria de diferente naturaleza. La eficacia de esta separación cromatográfica depende de las diferentes afinidades que presente el analito por la fase móvil y la fase estacionaria.

Por tanto, la efectividad de una columna depende, entre otras, de la distribución y la velocidad del analito a lo largo del sistema cromatográfico.

-Coeficiente de distribución

Bajo las condiciones de equilibrio, el sistema puede ser caracterizado por un coeficiente de distribución o reparto termodinámico, K , el cual se expresa como el coeficiente de la concentración del analito en la fase estacionaria (C_S) y la concentración del analito en la fase móvil (C_M).

$$K_c = \frac{C_S}{C_M}$$

El coeficiente de distribución es una propiedad física característica de cada analito, el cual depende sólo de la estructura del analito, de la naturaleza de las dos fases y de la temperatura. Por tanto, la separación de los componentes en un sistema cromatográfico particular requiere que tengan distintos coeficientes de distribución. En este caso, la separación puede ser mejorada variando la fase móvil, la fase estacionaria o la temperatura. En la práctica es muy difícil predecir cómo van a afectar estos factores a la separación cromatográfica y la única manera de comprobarlo es experimentalmente.

No obstante, la ecuación mostrada anteriormente es una simplificación, ya que K , como cualquier constante de equilibrio termodinámica es realmente un cociente de las actividades de los analitos. Sin embargo, en los sistemas cromatográficos normalmente se trata con soluciones que tienden hacia dilución infinita, y por tanto sus coeficientes de selectividad son 1. Este equilibrio también asume que el analito está presente como una única estructura molecular y que el analito no interacciona con otras moléculas de analito en dilución infinita. Se considera que a los bajos niveles de analitos involucrados, esta última suposición es razonable. Pero a nivel molecular, varios efectos de difusión del soluto y movimientos estadísticos al azar de las moléculas causan la dispersión de las bandas de analito.

-Tiempo de retención

El tiempo que transcurre desde la inyección hasta que el pico del analito alcanza el detector se denomina tiempo de retención (t_R). En un cromatograma, de manera general, a la izquierda aparece un pico que se corresponde con una especie que no es retenida por la columna y el resto de pico, se corresponden con los diferentes analitos que son eluidos.

El tiempo necesario para que la especie no retenida alcance el detector se denomina tiempo muerto (t_M). La velocidad de migración de la especie no retenida coincide con la velocidad promedio del movimiento de las moléculas en la fase móvil.

La velocidad lineal promedio del soluto es:

$$v = \frac{L}{t_R}$$

Donde L es la longitud de la columna.

-Factor de retención o capacidad (k')

El factor de retención constituye un parámetro muy importante en cromatografía. Relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y la temperatura. Se trata de un parámetro experimental que es ampliamente utilizado para comparar las velocidades de migración de los solutos en las columnas cromatográficas.

$$k' = \frac{\text{masa soluto en fase estacionaria}}{\text{masa de soluto en fase móvil}}$$

La relación entre k' y K (coeficiente de distribución) queda definido de la siguiente manera:

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{m_s/V_S}{m_s/V_M} = k' \cdot \frac{V_M}{V_S}$$

Expresado con otras palabras, el factor de retención será el tiempo adicional que un determinado analito que sí es retenido tarda en recorrer una columna cromatográfica, con respecto a un analito no retenido, dividido por el tiempo de retención del analito no retenido.

3. TIPOS DE CROMATOGRAFÍAS

La cromatografía puede clasificarse de diversas formas y atendiendo a diversos parámetros, en función de la fase móvil, en función de la polaridad columna-eluyente o en función de la técnica o del método de desarrollo.

En función de la fase móvil:

Es la clasificación más simple, basada simplemente en qué tipo de fluido constituye la fase móvil.

- a) Cromatografía líquida.
- b) Cromatografía gaseosa
- c) Cromatografía de fluidos supercríticos

En función de la polaridad columna-eluyente:

- a) Fase normal
- b) 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.

Desde el punto de vista cromatográfico, en los sistemas en fase normal, se pretende aumentar la polaridad de la fase móvil, haciéndola más similar a la polaridad de la fase estacionaria, así se consigue que la fase móvil compita más efectivamente con la fase estacionaria por el soluto. Las moléculas pasan menos tiempo en la fase estacionaria y eluyen más rápido. Usando el mismo argumento, puede deducirse una elución más lenta según aumenta la polaridad de la fase móvil para la cromatografía en fase reversa.

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 de la técnica:

Se refiere al equipamiento y procedimiento de operación a través de los cuales se lleva a cabo los procesos de separación:

- a) Planar (cromatografía en papel y cromatografía en capa fina.).
- b) En columna (GC, HPLC, etc).

En función del método de desarrollo:

Las diversas técnicas de cromatografía pueden llevarse a cabo en tres modos de desarrollo: elución, desplazamiento o análisis frontal. El término modo de desarrollo se refiere a la manera en la cual la muestra y la fase móvil son aplicadas a la fase estacionaria y consecuentemente darán un determinado perfil de pico en el cromatograma.

a) Elución

Se trata del método más común. La muestra se aplica como una banda compacta en la fase móvil (o eluyente) seguido por un continuo flujo de fase móvil fresca. Los componentes individuales se mueven a través de la columna en forma de zonas separadas mezcladas con la fase móvil que los transporta.

b) Análisis Frontal

Es útil para la obtención de datos termodinámicos a partir de datos cromatográficos. En este modo la muestra es continuamente arrastrada en la columna por la fase móvil durante todo el curso del proceso. Cuando la columna se satura con respecto a un determinado componente, dicho componente debe ser eluido de la columna. Cuando la zona de compuesto puro ha sido completamente eluido, le sigue una mezcla con el siguiente compuesto y así sucesivamente. No se produce una separación cuantitativa, pero sí permite la estimación de trazas de impurezas en sustancias de elevada pureza, ya que dichas impurezas pueden ser concentradas delante del componente principal.

c) Desplazamiento

Es particularmente útil en las separaciones a nivel preparativo. Así, la muestra es aplicada como bloque discreto como en la elución, pero al contrario que en esta, la fase móvil tiene una afinidad más elevada por la fase estacionaria que cualquier componente de la muestra.

En función del mecanismo de separación:

La naturaleza de la interacción entre los componentes de la muestra y las dos fases constituye una de las principales bases para la clasificación de los distintos métodos cromatográficos.

a) Adsorción

Es la técnica más antigua. En ella las moléculas de soluto y de fase móvil compiten por los sitios activos de la superficie sólida de la fase estacionaria (adsorbente). La separación resulta de la interacción de los grupos polares funcionales del soluto con los sitios discretos de adsorción de la superficie del 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) Fase unida (o fase enlazada)

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria está químicamente unida al soporte sólido o entrecruzada y unida a la pared interna de la columna. En comparación con los sistemas de adsorción, se equilibran más rápido, no exhiben adsorción irreversible y están disponibles en un amplio rango de funcionalidades.

d) 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. La fase estacionaria es una matriz rígida cuya superficie lleva grupos funcionales cargados positiva o negativamente. A cada sitio de la matriz se asocian contraiones de carga opuesta que pueden ser intercambiados con iones de características similares a los de la muestra. Si la matriz contiene grupos ácidos cargados negativamente, entonces será capaz de intercambiar cationes y se llamará de intercambio catiónico. Para mejorar la separación, la matriz debe exhibir algún tipo de afinidad por los iones de la muestra. Además, el contraión presente en la resina no debe estar demasiado fuertemente unido.

e) Exclusión de tamaños

También recibe el nombre de cromatografía de permeación en gel (GPC). Se basa en un proceso de filtrado físico, por lo que difiere del resto de procesos en cuanto a que o existen interacciones específicas o no específicas entre las moléculas de analito y la fase estacionaria. De hecho un objetivo de este tipo de cromatografía es eliminar todo tipo de interacciones. De esta forma, las moléculas más grandes eluyen primero, pues no son retenidas por presentar un tamaño mayor que el poro, y las de menor tamaño, van pasando por los diferentes poros, tardando más en eluir.

f) Afinidad

Es un tipo de cromatografía antagónica a la anterior. Ya que 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. Una vez unidos los analitos de interés se altera la composición de la fase móvil o el pH para debilitar las interacciones analito-matriz y eluir los analitos de interés. Se emplea en ocasiones para purificar muestras.

g) Micelar

Se trata de un tipo de cromatografía de interacción iónica, en la que la interacción analito-fase estacionaria se mejora mediante la adición de bajas concentraciones de modificadores de fase móvil. Estos modificadores (surfactantes, detergentes, restos hidrofóbicos, etc) forman micelas, que mejoran la selectividad y retención de algunos compuestos.

h) Acomplejamiento

La cromatografía de acomplejamiento o quelación puede considerarse como un término genérico que engloba todas las separaciones cromatográficas dependientes de la formación rápida y reversible de un complejo entre un ácido de Lewis (ión metálico) y una base de Lewis.

i) Exclusión de iones

Se define como una técnica empleada para separar ácidos débiles, aminoácidos, alcoholes y otras moléculas en una columna de intercambio iónico. Debido a exclusiones por carga, el material iónico es excluido de las resinas de intercambio iónico y pasa rápidamente a través de la columna. Las sustancias no iónicas no son excluidas y se reparte entre la fase móvil acuosa y agua ocluida dentro de las gotas de resina. A causa de los diferentes efectos de reparto y las fuerzas de Van der Waals los solutos no iónicos son retardados por la columna y separados. Por ejemplo, ácidos orgánicos e inorgánicos pueden ser cromatografiados en una resina de intercambio catiónico: los ácidos fuertes eluyen con el volumen muerto del sistema debido a que están fuertemente ionizados y son repelidos por la carga negativa inmovilizada de la resina. Los ácidos débiles generalmente existen sin ionizar y son separados por reparto entre la fase móvil y el solvente ocluido.

4. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS: RESOLUCIÓN, EFICACIA Y SELECTIVIDAD

Existen diversos parámetros cromatográficos que sirven para evaluar la separación cromatográfica. Algunos de ellos son la resolución, la eficacia y la selectividad.

-Resolución de la columna

La resolución o grado de separación depende de la elección de la fase estacionaria, fase móvil, temperatura y longitud de columna. Es una medida cuantitativa de la capacidad de la técnica cromatográfica para separar dos analitos. La resolución indica cuán separadas están dos bandas en relación con su anchura. La resolución de cada columna se define como:

$$R = \frac{t_{RB} - t_{RA}}{1/2 (W_A - W_B)}$$

Una resolución de 1.5 es suficiente para completar la separación de los analitos A y B, y con una resolución de 1, la zona de A tiene un 4 % de la zona de B.

-Factor de selectividad

El factor de selectividad, denominado α , describe el grado de separación de dos componentes (A y B) en la columna:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

Donde K_B es la constante de distribución de B que es retenida con mayor fuerza, y K_A es la constante para la especie química A que es retenida con menor fuerza o que eluye más rápido.

-Ensanchamiento de banda y eficiencia de la columna

La evaluación visual de un pico cromatográfico revela una semejanza con las curvas de tipo gaussiano. Las moléculas en su viaje obligado a través de la columna cromatográfica experimentan miles de transferencias entre la fase móvil y la fase estacionaria. El tiempo que pasa en la fase estacionaria va a ser muy irregular y depende de que gane accidentalmente la suficiente energía térmica para realizar la transferencia inversa. En unos casos este tiempo será relativamente corto y en otros más largos. Debido a esta variabilidad del tiempo de residencia, la velocidad promedio con la que se mueven las moléculas individuales con respecto a la fase móvil varía notablemente. Algunas moléculas se desplazan con rapidez en virtud de su inclusión accidental en la fase móvil durante la mayor parte del tiempo, y otras por el contrario, pueden retrasarse debido a que casualmente se han incorporado a la fase estacionaria durante un tiempo mayor que el promedio. La consecuencia, es lo indicado al principio del párrafo, hay una dispersión simétrica de las velocidades alrededor del valor medio, el cual representa obviamente, el comportamiento medio de las moléculas.

Los últimos avances en relación a la fabricación de las columnas cromatográficas (sobre todo el caso de las columnas de cromatografía líquida) residen en una mayor homogeneidad de las partículas de la fase estacionaria, esto conlleva a que las transferencias fase estacionaria-fase móvil sean más reproducibles, llevando a dispersiones de pico menores (picos cromatográficos más estrechos).

El ensanchamiento de esta banda que ocurre a medida que el soluto pasa a través de la columna cromatográfica afecta de modo importante en la eficiencia de la columna.

La teoría de la velocidad de la cromatografía describe en términos cuantitativos las formas y anchuras de las bandas de elución, basándose en el mecanismo de la trayectoria aleatoria para la migración de las moléculas a través de la columna.

Así, podemos evaluar la calidad de un pico cromatográfico como el cociente entre el tiempo de retención y la dispersión del mismo.

Dos términos relacionados se utilizan ampliamente como mediciones cuantitativas de la eficiencia de una columna cromatográfica, la altura de plato (H) y el número de platos teóricos (N). L es generalmente la longitud del empacamiento de la columna

$$N = \frac{L}{H}$$

La eficiencia de las columnas cromatográficas se incrementa a medida que el número de platos aumenta y conforme con la altura de plato se reduce.

La amplitud de una curva gaussiana se describe con la desviación estándar y la varianza. Debido a que las bandas cromatográficas suelen ser de tipo gaussiano y debido a que la eficiencia de una columna está reflejada en la amplitud de los picos cromatográficos. La varianza por unidad de longitud de la columna es utilizada por muchos cromatógrafos como medida de la eficiencia de la columna.

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

El número de platos teóricos y la altura de pico son ampliamente utilizados en la bibliografía química y por los fabricantes de instrumentos como medida del desempeño de una columna. Se puede determinar N a partir de un cromatograma, sabiendo su tiempo de retención y el ancho de pico en su base (W). Quedando la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Es posible definir un segundo número de plato, llamado efectivo, para prever el sobre valor de N obtenido para los primeros picos en eluir, donde el volumen muerto tiene una contribución importante en el conjunto del proceso. La ecuación anterior se modificaría sustituyendo t_R por el tiempo de retención corregido ($t_R - t_M$).

-Teoría de la velocidad

El ensanchamiento de una banda refleja una pérdida de la eficiencia de la columna. Cuanto más lenta sea la velocidad de los procesos de transferencia de masas que ocurren mientras un soluto migra a través de la columna, más ancha será la banda. Algunas de las variables que afectan a este ensanchamiento de bandas pueden controlarse y mejorarse, y su explicación radica en la Teoría de la Velocidad.

La ecuación de Van Deemter, establece el cálculo de H a partir de la siguiente ecuación:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Donde u, es velocidad lineal de la fase móvil

Término A: Contribución al ensanchamiento de picos por la difusión de Eddy. Es el ensanchamiento que se produce por la multitud de caminos por los cuales las moléculas o iones pueden caminar a través de una columna rellena. Como el camino puede diferir, el tiempo que permanecen en la columna el mismo tipo de moléculas es variable, alcanzando el

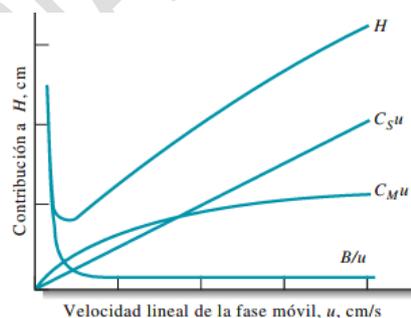
final de columna en un intervalo de tiempo (en lugar de un tiempo concreto). Este término tiene poca importancia a velocidades bajas.

Término B: Contribución de la difusión longitudinal. Constituye una causa de ensanchamiento por la que los solutos difunden desde la zona central donde mayor es la concentración hacia regiones más diluidas, situadas por delante y por detrás del centro de banda. Esta contribución es inversamente proporcional a la velocidad de la fase móvil, ya que cuando mayor es la velocidad, más breve es el tiempo que pasa el analito en la columna y el tiempo que tiene para desplazarse hasta los extremos es igualmente menor.

Término C: Resistencia a la transferencia de masa. El término C-n es el factor más importante en cromatografía. Describe la contribución de la resistencia a la transferencia de masa tanto a la fase móvil como a la estacionaria y aparece porque el flujo de fase móvil es tal que la distribución de equilibrios del analito entre las dos fases no puede establecerse. Este efecto se hace más importante al aumentar la velocidad, ya que existe menos tiempo para alcanzar el equilibrio.

Una segunda parte de este término representa el efecto de la resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil. Esta magnitud depende del factor de capacidad del analito y del diámetro de partícula de la fase estacionaria. En cualquier caso la eficiencia aumenta según disminuye el tamaño de la partícula o el diámetro de la columna. Por ello en cromatografía de gases, gases con alta difusibilidad como He o H₂ están favorecidos como fase móvil. La eficiencia aumenta con la temperatura y particularmente para los analitos de masas moleculares altas.

La ecuación de Van Deemter tiene una representación gráfica cuyo objetivo es minimizar H, es decir, minimizar la dispersión zonal y maximizar la eficiencia de separación



Al minimizar H, el número de platos teóricos aumenta y con ello aumenta la eficacia de la columna.

BIBLIOGRAFÍA

-Fundamentos de Química Analítica. Skoog.

-Tema 6. Técnicas Cromatográficas. Universidad de Jaén.

- <https://cienciadelux.com/2015/08/04/ensanchamiento-de-banda-y-eficacia-de-una-columna-cromatografica/>

-Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Reduca (Biología). Serie Técnicas y Métodos. 4 (3): 1-32, 2011.

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 35

**CROMATOGRAFÍA 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 H₂ y aire, para luego encenderlo con una chispa eléctrica.

La mayoría de los compuestos cuando son pirolizados a la temperatura de una llama H₂/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 CO₂, SO₂, NO_x, H₂O.

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}Ni), que emite partículas β 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, HPO^* y 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

-Cromatografía de gases. <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8247/4/T3gascromat.pdf>

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 36

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN. 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 DE ALTA RESOLUCIÓN. 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 DE ALTA RESOLUCIÓN. 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 (μl) 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 μm . 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 $t^{\circ}\text{a}$ ambiente. Sin embargo, muchas veces si se controla la $t^{\circ}\text{a}$ 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

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 37

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS. FUNDAMENTO. ACOPLAMIENTOS CON
OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS. 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. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

2. FUNDAMENTO-COMPONENTES DE LOS EQUIPOS

2.1. SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA

2.2. FUENTE DE IONIZACIÓN

2.3. ANALIZADOR

2.4. DETECTOR

3. ACOPLAMIENTO CON OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.1. ACOPLAMIENTO GC-MS

3.2. ACOPLAMIENTO LC-MS

3.3. ACOPLAMIENTO ICP-MS

4. APLICACIONES

MATERIAL NO OFICIAL

1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una técnica de análisis cualitativo, de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas, por sí sola o en combinación con otras técnicas de espectrofotometría.

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su relación masa/carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Un espectro de masas será una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

La espectrometría de masas ofrece numerosas ventajas frente a los métodos espectrométricos ópticos como son límites de detección menores y espectros notablemente sencillos que generalmente son únicos y con frecuencia, fácilmente interpretables.

Entre las desventajas están el coste del instrumento, la deriva del instrumento y las interferencias.

La espectrometría de masas (EM) es una técnica instrumental universal y específica, altamente sensible y que permite la identificación inequívoca de una sustancia.

Características de la EM:

- Permite realizar análisis cuantitativo y cualitativo.
- Huella dactilar de un compuesto. Es la única técnica analítica capaz de proporcionar la fórmula molecular de un compuesto orgánico.
- Rapidez.
- Gran sensibilidad para detectar pequeñas concentraciones.
- GC-MS y LC-MS: actualmente son las técnicas más poderosas para la determinación cuantitativa de trazas o para el análisis de mezclas complejas de compuestos orgánicos.
- Técnica destructiva.

2. FUNDAMENTO-COMPONENTES DE LOS EQUIPOS

El análisis por espectrometría de masas se realiza en cuatro etapas básicas:

1. Introducción de la muestra.
2. Ionización de la muestra, en la que se transforman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones.
3. Separación y análisis de los iones moleculares y de los fragmentos cargados producidos según su relación m/z .
4. Finalmente, se obtiene el espectro de masas, en el que se representa la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación masa/carga.

Con la espectrometría de masas somos capaces de proporcionar información acerca de:

- La composición elemental de las muestras: de ésta se encarga la espectrometría de masas atómica.
- De la composición de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas.
- De la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas.
- De la estructura y composición de superficies sólidas.
- De las relaciones isotópicas de átomos en las muestras.

Los elementos básicos de un espectrómetro de masas son: sistema de introducción de muestra, fuente de ionización, analizador y detector.

2.1. SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA

Existen 3 tipos de sistemas de introducción de la muestra: introducción directa, introducción indirecta, y a través de sistemas cromatográficos o electroforesis. Por lo tanto, la finalidad del sistema de entrada es la de permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío.

-Introducción indirecta. La vaporización de la muestra se realiza en un recipiente externo al espectrómetro.

-Introducción por sonda directa. En líquidos y sólidos no volátiles se pueden introducir en la región de ionización mediante un soporte de muestra o sonda.

-Cromatografía de gases / Espectrometría de masas. El caudal de las columnas capilares en general es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas.

-HPLC / Espectrometría de masas. Un 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 interfaces. La técnica más usada actualmente es el Electrospray (ESI).

2.2. FUENTE DE IONIZACIÓN

Que es donde se produce la fragmentación molecular característica de cada compuesto.

Las fuentes de iones se clasifican a menudo en duras o blandas. La fuente dura más importante es la fuente de impacto de electrones. Las fuentes duras comunican energías elevadas a los iones formados, de manera que se encuentran en estados vibracionales y rotacionales excitados. La relajación de estos iones produce una gran cantidad de fragmentación y resultan espectros de masas complejos.

Por el contrario, las fuentes blandas, tales como las fuentes de ionización química, ESI y la de desorción, producen relativamente poca excitación de los iones, de modo que, tiene lugar poca fragmentación, y los espectros son sencillos. Ambos tipos de espectros son

útiles. Los espectros sencillos de las fuentes blandas permiten la determinación exacta del peso molecular del analito, mientras que los modelos espectrales más complejos de las fuentes duras a menudo permiten una identificación inequívoca del mismo.

- 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. La elevada energía cinética de los electrones acelerados y su pequeña masa proporcionan a las moléculas con las que impactan, una energía que provoca una elevada fragmentación dando lugar a un gran número de iones positivos que pueden tener mayor o menor masa que la del ión molecular. 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.

- Ionización química

Las moléculas de la muestra en fase gaseosa se ionizan al colisionar con los iones producidos al bombardear un gas reactivo con electrones. 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 daltons 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.

- Fotoionización

Sistema de ionización para moléculas pequeñas. Se produce la ionización cuando una molécula en estado gaseoso es irradiada con un haz de fotones de energía conocida. Una condición básica para poder utilizar la fotoionización, es que la molécula del analito tiene que estar en fase gaseosa, las muestras sólidas deben someterse a un proceso de desorción o vaporización previo a la PI. La fotoionización es un sistema de elevada sensibilidad, se puede utilizar una radiación determinada y conocida, lo cual produce una ionización controlada de la forma que se desea.

- Electrospray (ESI).

La disolución de la muestra se bombea a través de una aguja capilar de acero inoxidable a un flujo de algunos microlitros por minuto. La aguja se mantiene a un potencial de varios kilovoltios con respecto al electrodo cilíndrico que rodea a dicha aguja. La niebla de finas gotitas cargadas resultante, pasa después a través de una capilar de desolvatación donde se produce la evaporación del disolvente y de las moléculas de analito y es donde éstas adquieren la carga. Debido a que las gotitas se vuelven más pequeñas como consecuencia de la evaporación del disolvente, su densidad de carga aumenta, produciéndose la desorción de los iones en la atmósfera gaseosa.

Generación de iones en cromatografía gaseosa

En estos sistemas, al flujo proveniente de la columna cromatográfica se le somete a un bombardeo de electrones generados en un filamento. Estos electrones al pasar cerca de las moléculas arrancan un electrón de las capas superficiales, quedando la molécula cargada positivamente, generando el ión molecular (M^+). No obstante, este proceso es altamente improductivo, y sólo una molécula de cada millón experimenta este proceso.

Para aumentar la eficiencia del proceso es preciso aumentar la energía de los electrones, acelerándolos a potenciales próximos a 70 V. La pequeña masa de las moléculas y la alta energía cinética de los electrones, produce aumentos muy pequeños de la energía traslacional de las moléculas con las que chocan, sin embargo estas moléculas adquieren estados rotacionales y vibracionales excitados. La subsiguiente relajación de estas moléculas tiene lugar normalmente mediante una elevada fragmentación, que da lugar a un gran número de iones positivos de varias masas, que son menores (y en ocasiones mayores) que el ion molecular. Estos iones reciben el nombre de iones hijos.

En el caso de cromatografía gaseosa, también es posible generar iones mediante ionización química.

Generación de iones en cromatografía líquida

En este caso, la generación de iones es no destructiva, de forma que siempre se obtiene el ión molecular y este será el ión de mayor peso molecular (no se generarán especies iónicas de mayor peso molecular al de la sustancia a analizar, salvo generación de aductos), al contrario que en cromatografía gaseosa. En este caso que las moléculas se carguen eléctricamente se consigue a través de modificadores de la fase móvil (generalmente ácido fórmico o acético) que hacen que las moléculas adquieran una determinada carga.

El eluyente de la columna se introduce en el sistema cromatográfico a través de un capilar calefactado y en un flujo de nitrógeno a alta temperatura. A la salida de ese capilar se forman gotas cargadas eléctricamente, en las cuales el disolvente de la fase móvil (mucho más volátil) se va evaporando, de forma que la repulsión electrostática va creciendo hasta el punto de que las gotas estallan, quedando los iones moleculares de los iones de interés.

Por otro lado, la carga hace que se sientan atraídos hacia el interior del espectrómetro de masas, debido a la diferencia de potencial (varios KV) entre la punta del capilar y la entrada al espectrómetro de masas.

Los sistemas de generación de iones pueden ser del tipo electrospray (el más común) o del tipo APCI (atmospheric pressure chemical ionization) en el que el sistema posee una aguja (corona) que emite una descarga eléctrica que ocasiona cierta recombinación entre moléculas.

2.3. ANALIZADOR

Es donde tiene lugar la separación. El analizador o filtro de masas separa los fragmentos iónicos generados en función de su relación masa/carga. 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 masa / carga se dispone de varios dispositivos. Lo ideal es que el analizador fuera capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa.

- Analizador del sector magnético

Los analizadores de sector magnético se basan en la dispersión provocada sobre los flujos de iones por campos magnéticos. Su principio de funcionamiento es sencillo: el campo magnético provoca una fuerza sobre los iones en movimiento que desvía su trayectoria en función de su masa y velocidad. Variando la intensidad del campo magnético es posible enfocar sucesivamente iones con diferente relación carga-masa, ya sea en orden creciente o decreciente, sobre una rejilla tras la cual se coloca el detector.

- Analizadores 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.

- Analizador de masas cuadrupolar

Es el tipo más común de espectrómetro de masas. El corazón de un instrumento cuadrupolar es el conjunto de las 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 alcanzarán al detector.

- Analizadores de masas de triple cuadrupolo

Una vez obtenidos los iones, el gran potencial de los sistemas de triple cuadrupolo radica en dejar pasar únicamente a los iones de interés (relación masa-carga de interés).

Un equipo de triple cuadrupolo consta de dos cuadrupolos similares y entre medias se ubica una celda de colisión, en la que se introduce un gas no reactivo (generalmente argón) que

produce una fragmentación controlada de las moléculas (generalmente esta celda se considera como un cuadrupolo más y de ahí el nombre de triple).

Cuando los iones llegan a la celda de colisión, estos se fragmentan debido a la energía cinética de un gas de colisión. Finalmente, en el último cuadrupolo, se dejan pasar únicamente los fragmentos de interés (generalmente dos por cada molécula), que permiten identificar con una altísima seguridad la molécula de interés. Esto permite establecer transiciones específicas para cada molécula (ión padre>ión hijo).

Los analizadores anteriores tienen una limitación funcional, sólo encuentran aquellos analitos que buscan, es decir, que se programa su adquisición. Es decir, se trata de una búsqueda de conocidos.

Por contraposición, últimamente empiezan a incorporarse a los laboratorios de rutina equipos de alta resolución (o masa exacta). Estos sistemas no precisan que se les indique de inicio los compuestos a analizar, sino que van a capturar la información de todas las moléculas que aparezcan en una muestra.

Las ventajas obvias son la realización de ensayos no dirigidos (búsqueda de desconocidos, non-target analysis) y la posibilidad de realizar ensayos retrospectivos.

La masa exacta, expresada en Da o u.m.a de una molécula puede ser calculada sumando la masa de cada uno de los componentes de la misma. En espectrometría de masas, esta masa monoisotópica se obtiene ignorando las contribuciones de los isótopos a la masa de la molécula. Este cálculo nos permite obtener la masa monoisotópica exacta, con 4 decimales, que el equipo comparará con las masas obtenidas, ya que su precisión en la masa vendrá dada, también con 4 decimales. Cabe mencionar que un triple tiene una resolución de 0.5-1 Da.

Analizador de masas de tiempo de vuelo

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. El tiempo empleado estará relacionado con la relación masa/carga de la molécula, de forma directamente proporcional, es decir, a mayor masa, más tiempo tardará la molécula en llegar al detector. Estos equipos se caracterizan por tener unas grandes "chimeneas", que buscan maximizar el camino de los iones hacia el detector, de forma que aumenta la capacidad de distinguir entre iones (resolución).

- Orbitrap

En estos equipos, las masas de interés son confinadas en una especie de trampa, que consiste en dos electrodos exteriores y uno interior. Los iones capturados oscilan entre este electrodo central y los dos exteriores. 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.

2.4. DETECTOR

Es el encargado de recoger y caracterizar los fragmentos iónicos que salen 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 por ello se requiere una amplificación significativa para conseguir una señal mínimamente procesable. El funcionamiento del electromultiplicador se basa en el efecto cascada producido al impactar un determinado ión (o iones) en el mismo. Aplicando una diferencia de potencial entre sus extremos, se consigue aumentar el factor de amplificación, que vendrá determinado por el número de subetapas amplificadoras que componen el detector. Destacan los fotomultiplicadores o la copa de Faraday.

- Canales multiplicadores de electrones

Los canales multiplicadores de electrones son robustos y fiables y son capaces de proporcionar ganancias de corriente elevadas y tiempos de respuesta de nanosegundos. Estos detectores pueden situarse directamente delante de la rendija de salida de un espectrómetro de masas de sector magnético, ya que los iones que alcanzan el detector suelen tener la suficiente energía cinética como para expulsar electrones desde la primera zona del dispositivo. Los canales multiplicadores de electrones también pueden usarse con analizadores de masas que utilizan haces de iones de baja energía cinética (como cuadrupolos), sin embargo, en estas aplicaciones, el haz de iones que sale del analizador se acelera a varios miles de eV antes de que incida en la primera zona.

- Copa de Faraday

El detector está alineado de manera que los iones que salen del analizador incidan sobre el electrodo colector. Este electrodo está rodeado por una jaula que impide que escapen los iones reflejados y los electrones secundarios expulsados. El electrodo colector está inclinado respecto a la trayectoria de los iones entrantes, de forma que las partículas que incidan o abandonen el electrodo sean reflejadas hacia zonas alejadas de la entrada de la copa.

El electrodo colector y la jaula están conectados al potencial de tierra a través de una resistencia grande. La carga de los iones positivos que inciden en la placa son neutralizados por un flujo de electrones procedente de tierra a través de la resistencia. La caída del potencial resultante a lo largo de la resistencia se amplifica con un amplificador de alta impedancia.

3. ACOPLAMIENTO CON OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.1. ACOPLAMIENTO GC-MS

La elección del sistema de introducción de muestra en el espectrómetro de masas dependerá de las propiedades físico-químicas de los compuestos a detectar. Cuando el sistema de introducción de muestra es un acoplamiento GC, la muestra se encuentra en estado vaporizado y la única función de la fuente de ionización es ionizar las moléculas neutras

(conferirles carga) por aplicación de una determinada energía. En este tipo de acoplamientos la ionización se produce en estado de vacío.

La cromatografía de gases 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, GC ("Gas Chromatography") y MS ("Mass Spectrometry") da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio 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.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elusión 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, constituyendo el 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 SIM ("selected ion monitoring"). 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. En acoplamientos MS/MS, también puede trabajarse en modo MRM (Multiple Reaction Monitoring), que permite seleccionar transiciones de un ion a otro ión (selección de un ión en el primer cuadrupolo, el cual se fragmenta en la celda de colisión, dando lugar a varios iones, y seleccionando otro ión en el tercer cuadrupolo).

3.2 ACOPLAMIENTO LC-MS

En el caso de los acoplamientos LC, las fuentes de ionización son interfases más sofisticadas que han tardado casi más de 30 años en ser desarrolladas. Este lento desarrollo se ha debido a que en el acoplamiento LC la muestra se encuentra disuelta en el eluyente procedente del sistema LC. Esto resulta incompatible con el alto vacío requerido en la espectrometría de masas. Por esta razón, las interfases o fuentes de ionización desarrolladas han tenido la doble función de eliminar el disolvente (normalmente presente en ordenes de 0.5-0.5 ml/min), y

vaporizar la muestra e ionizarla. En este acoplamiento, la ionización se produce a presión atmosférica.

La forma de trabajar es parecida, se puede llevar a cabo la determinación del total de los iones (TIC) o la detección de iones en cuestión (SIM). O en técnicas tándem, el empleo de MRM.

3.3. ACOPLAMIENTO ICP-MS

La Espectrometría de Masas con Plasma de acoplamiento Inductivo es un 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 masa/carga 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.

4. APLICACIONES

En los alimentos se pueden encontrar un gran número de sustancias tóxicas, tales como plaguicidas, antibióticos y toxinas, presentando distintos orígenes (naturales o sintéticos) y niveles de toxicidad para la salud humana. Este tipo de compuestos se encuentran generalmente a muy bajas concentraciones en matrices muy complejas, por lo que es necesario la utilización de metodologías lo más fiables posibles. En este sentido, el empleo de las técnicas cromatográficas (de gases y de líquidos) acopladas a detectores de espectrometría de masas, ha permitido la detección adecuada de este tipo de sustancias en los alimentos a concentraciones extremadamente bajas. Por ello, y en función de las características del contaminante, se debe elegir la técnica cromatográfica que posibilite una mejor separación del contaminante de los interferentes presentes en la matriz, así como de los contaminantes entre sí. Esta metodología proporciona datos de gran valor que mejoran nuestro conocimiento de la Salud Pública a través de la Seguridad Alimentaria.

El empleo de técnicas cromatográficas permite la determinación simultánea de varios contaminantes presentes en una muestra. En este sentido, el acoplamiento de un espectrómetro de masas a un sistema de separación cromatográfica ha permitido que se puedan identificar y cuantificar con una gran fiabilidad sustancias presentes en alimentos, puesto que un falso positivo puede desembocar en la paralización errónea de un determinado cargamento de alimentos, así como un falso negativo puede permitir que lleguen al mercado alimentos que no cumplen con la legislación.

En función de la naturaleza del tóxico a determinar se aplica la combinación de técnicas más adecuada. De esta manera, para el análisis de compuestos de baja-media polaridad, la técnica más apropiada es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). De hecho, en la década anterior, la GC-MS ha sido la técnica más ampliamente usada para la detección de la mayoría de los contaminantes orgánicos, puesto que se trata de una técnica reproducible entre distintos laboratorios que permite discriminar entre compuestos que aparecen coeluidos.

Destaca la determinación de ftalatos en vinos y bebidas espirituosas mediante simple cuadrupolo, o la determinación Trihalometanos en agua, que son compuestos químicos volátiles que se generan durante el procesos de potabilización del agua.

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.

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.

Por último, mencionar la determinación del THC por GC-MS en muestras de cáñamo con el objetivo de comprobar que su valor es inferior al límite legal establecido.

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 que hace aumentar el tiempo total de análisis así como su complejidad, debiendo de emplearse la cromatografía de líquidos acoplada también a un detector de masas (LC-MS). 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 a la GC-MS como técnica de rutina en los laboratorios agroalimentarios.

Así, es posible agrupar los compuestos anteriores de modo que micotoxinas, acrilamida, plaguicidas polares y residuos veterinarios se determinan mayoritariamente mediante LC-MS/MS alcanzando niveles de ppb en muestras complejas para conseguir cumplir los límites legales vigentes para este tipo de compuestos.

Los métodos basados en ICP-MS permiten la detección simultánea de diferentes compuestos metálicos en muestras de alimentos previamente digeridas alcanzando niveles muy bajos que permiten cumplir con los límites legales como en el caso de plomo o cadmio. Además, el acoplamiento con HPLC permite a su vez la determinación de diferentes especies metálicas, las cuales varían considerablemente su toxicidad según el estado en el que se encuentren.

BIBLIOGRAFÍA

-Principios de análisis instrumental. Skoog. 5ª edición.

- <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf>

https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf

http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema7.pdf

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 38

TÉCNICAS INSTRUMENTALES APLICADAS AL ESTUDIO DE GENUINIDAD EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS. RMN. ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS. CENTELLEO LÍQUIDO. OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS

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 INSTRUMENTALES APLICADAS AL ESTUDIO DE GENUINIDAD EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS**
- 2. RMN**
 - 2.1 INTRODUCCIÓN
 - 2.2 EQUIPO DE RMN
 - 2.3 ¹H-RMN
 - 2.4 RMN DE DEUTERIO: SITE-SPECIFIC NUCLEAR ISOTOPIC FRACTIONATION-NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (SNIF-NMR)
- 3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS**
 - 3.1 INTRODUCCIÓN
 - 3.2 EQUIPO DE IRMS
 - 3.3 APLICACIÓN ANÁLISIS POR IRMS
- 4. CENTELLEO LÍQUIDO**
- 5. OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS**

1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES APLICADAS AL ESTUDIO DE GENUINIDAD EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS.

La noción de fraude alimentario y autenticidad de los alimentos recibió una mayor atención como campo de investigación por parte tanto de la comunidad científica, como de la industria alimentaria, a finales de la década del 2000, tras las crisis altamente mediáticas como el escándalo de la melamina en China en 2007/2008, y posteriormente, el escándalo de la carne de caballo (Horsegate) en 2013, que supusieron un impacto adverso en la confianza de los consumidores. Estos incidentes pusieron de manifiesto la necesidad de disponer de una definición clara de fraude alimentario que incluyera la identificación de los diferentes tipos de fraude como primer paso para combatir estas prácticas. A lo largo de la última década han surgido iniciativas enmarcadas en campos tan distintos como el académico, el comercio internacional (Codex Alimentarius) o proyectos europeos de investigación (FoodIntegrity, Authen-Net).

Desde un punto de vista académico el fraude alimentario ha sido definido a grandes rasgos como un engaño ilegal con fines económicos. Un problema antiguo, que ha sido ampliamente revisado y conceptualizado, y cuyas causas fundamentales para que se produzca difieren totalmente de los conocimientos establecidos hasta la fecha en materia de seguridad alimentaria. La fuerza motriz de la adulteración de alimentos es maximizar los ingresos, ya sea utilizando un ingrediente de un precio inferior para sustituir (total o parcialmente) a otro más caro, o eliminando (total o parcialmente) el componente más valioso, con la esperanza de que el producto alterado pase desapercibido para el consumidor final.

El Codex, con la intención de aclarar las definiciones de integridad y autenticidad alimentaria, fraude alimentario y adulteración por motivos económicos, ha publicado un documento de posición en el que se identifican los elementos clave subyacentes a estas nociones. Este documento se plantea ser utilizado como base para iniciar nuevos trabajos en este ámbito, con el fin de proporcionar orientación sobre cómo garantizar la autenticidad de los alimentos minimizando la vulnerabilidad al fraude y mitigando las consecuencias del fraude alimentario.

Por otro lado, los proyectos europeos que han surgido en los últimos años destacando los citados previamente, han permitido establecer una primera terminología consensuada sobre autenticidad y fraude alimentario, y ha conseguido que los términos y conceptos relacionados con el fraude alimentario sean más claros y precisos ("CEN Workshop Agreement" (CWA 17369:2019)).

Por todo ello, todos estos trabajos han sentado las bases para futuras definiciones normativas a nivel internacional. Por el momento, no existe una definición explícita de fraude alimentario en el marco jurídico de la UE y tampoco la tienen los principales socios comerciales de la UE. No obstante, la legislación alimentaria de la UE cuenta con disposiciones relevantes para dicho fraude:

- El Reglamento (CE) nº 178/2002, sobre los principios de la legislación alimentaria, hace referencia en el artículo 8 (Protección de los intereses de los consumidores) específicamente a la prevención de: las prácticas

fraudulentas o engañosas, la adulteración de los alimentos, y cualquier otra práctica que pueda inducir a error al consumidor.

- El Reglamento sobre la información alimentaria a los consumidores (Reglamento (UE) 1169/2011) concreta los aspectos relevantes relacionados con las prácticas fraudulentas o engañosas mencionadas en los principios generales de la legislación alimentaria en el artículo 7 (Prácticas informativas leales), al estipular que la información alimentaria no deberá inducir a error, en particular en cuanto a las características del alimento y, en particular, sobre su naturaleza, identidad, propiedades, composición, cantidad, duración, país de origen o lugar de procedencia, método de fabricación o producción.
- -El Reglamento de Controles Oficiales (Reglamento (UE) 2017/625) destaca entre otros aspectos prioritarios del control alimentario, la lucha contra el fraude, y el control de la autenticidad e integridad de la cadena alimentaria. A ese efecto, define las tareas y responsabilidades de Centros de Referencia de la Unión Europea para la autenticidad y la integridad de la cadena alimentaria, aún por designar y obliga a las autoridades competentes de los Estados miembros de la UE a incluir esos aspectos en las actividades de control oficial. El artículo 9 (Normas generales sobre los controles oficiales) les obliga a realizar controles oficiales a todos los operadores con regularidad, en función del riesgo y con la frecuencia adecuada, teniendo en cuenta cualquier información que indique la probabilidad de que se pueda inducir a error a los consumidores, en particular en cuanto a la naturaleza, la identidad, las propiedades, la composición, la cantidad, la durabilidad, el país de origen o lugar de procedencia y el método de fabricación o producción de los alimentos.

En respuesta a una petición del Parlamento Europeo, la Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria de la Comisión Europea (DG SANTE) creó una Red de Fraude Alimentario de la UE e instaló una herramienta informática específica para el intercambio de información sobre el fraude alimentario entre Estados miembros (Sistema de Asistencia y Cooperación Administrativa, AAC). Otra medida fue la creación del Centro de Conocimiento sobre el Fraude y la Calidad Alimentarios (KCFFQ), gestionado por el Centro Común de Investigación (CCI) de la Comisión Europea. Cuya misión es producir, recoger y cotejar información, darle sentido y transformarla en conocimientos validados que sirvan de base para la elaboración de políticas que garanticen y protejan la autenticidad y calidad de los alimentos suministrados en la UE.

La detección del fraude constituye un reto analítico por el elevado número y tipo de ingredientes que componen un alimento, así como por el numeroso potencial de adulterantes disponibles. Hasta la fecha los métodos empleados para el control oficial han sido métodos dirigidos, centrados en la detección de una o varios compuestos.

La evolución de un gran número de técnicas analíticas en la última década (técnicas espectroscópicas incluidas las aplicadas al análisis isotópico, cromatográficas, y las basadas en

el análisis de ADN y enzimático entre otras) ha permitido el desarrollo de metodologías muy potentes que garantizan la genuinidad de los alimentos. Sin embargo, los defraudadores emplean cada vez técnicas más sofisticadas para adulterar los alimentos, y por ello, debido a su creciente complejidad la lucha contra el fraude alimentario requiere de un esfuerzo de colaboración entre la administración (autoridades competentes), los laboratorios y los centros de investigación. El desarrollo de nuevas metodologías de análisis y la coordinación son esenciales.

Los recientes avances en el campo de la espectrometría (espectrometría de masas) y espectroscopía (resonancia magnética nuclear) están permitiendo el desarrollo de diferentes metodologías, enfocadas en su mayoría a corroborar la autenticidad de los alimentos (origen geográfico y/o botánico), así como para detectar distintos tipos de adulteraciones (diluciones, sustituciones, mezclas).

Esta novedosa metodología tiene como objetivo no sólo centrarse en la monitorización de un espectro pequeño de compuestos, sino ampliar el espectro de analitos monitorizados para combatir las complejidades de las muestras adulteradas. Sin embargo, no hay que olvidar los retos analíticos a los que nos estamos enfrentando. Entre ellos cabe destacar que son metodologías analíticas que en muchos casos requieren el uso de modelos multivariables estadísticos que gestionan un volumen de datos masivo, por lo que son necesarias herramientas informáticas muy sofisticadas y conocimientos técnicos muy específicos para tratar la minería de datos generada y poder emplear aproximaciones metabolómicas. Además, nos enfrentamos actualmente a un vacío tanto legislativo como científico para el desarrollo, validación y posterior aplicación en el control oficial de estas metodologías, así como la necesidad de armonizar la terminología implicada y la dificultad en la obtención de muestras auténticas completamente trazables.

En el contexto de los controles y otras actividades oficiales, la legislación europea establece que los métodos de análisis utilizados durante dichos controles han de cumplir la normativa de la Unión y en caso de no existir dicha normativa los laboratorios oficiales podrán utilizar, entre otros, 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).

A este respecto, la Comisión Europea está priorizando sus esfuerzos. Dentro de las medidas de mitigación y prioridades establecidas por la UE en la lucha contra el fraude, es importante destacar la creación de centros de referencia de la UE para la autenticidad e integridad de la cadena agroalimentaria. Sin embargo, mientras se crean estos centros y en ausencia de normas de la UE la legislación vigente en materia de control oficial, la existencia de un comité técnico del CEN/TC 460 Food Authenticity, de reciente creación, sobre autenticidad de los alimentos es crucial y de gran utilidad. Dicho comité tiene como principal objetivo dar apoyo, a través de la elaboración de normas, a las distintas reglamentaciones europeas que luchan contra el fraude alimentario, la protección de las denominaciones de origen, así como de los derechos de los consumidores.

La comunidad científica ha planteado en reiteradas ocasiones y foros la necesidad de disponer de métodos de análisis validados y contrastados para la detección del fraude. De hecho, en el contexto del CEN se ha comenzado con la identificación y priorización de las metodologías disponibles pendientes de ser estandarizadas/normalizadas, mediante: la adopción tanto de normas nacionales o internacionales como europeas, la normalización de metodologías no cubiertas actualmente por la estandarización, la normalización de conceptos de validación para métodos novedosos no dirigidos, así como la definición de conceptos, términos y definiciones relacionados con el fraude alimentario.

2. RMN

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 el 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 acuerdo 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 (^1H), y otros como ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}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 (δ). 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 (^1H -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 EQUIPO DE RMN

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 ^1H 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 ^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.

2.4 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}C .

3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS

3.1 INTRODUCCIÓN

La exigencia cada vez mayor de controlar los productos agroalimentarios en cuanto a autenticidad, pureza y adecuación a una norma, han llevado al químico analítico a utilizar nuevas técnicas y a recurrir a la medida de nuevos parámetros, con el fin de cumplir su cometido.

La adulteración de un alimento implica la alteración de sus propiedades originales, por ejemplo, la dilución del vino con agua o zumo de frutas o la adulteración de la miel por la adición de azúcares extraños. Estas alteraciones no deseadas, que se realizan con fines fraudulentos, dan lugar a cambios mensurables de la firma química de los alimentos o bebidas, pero el aspecto físico general sigue siendo el mismo.

En consecuencia, las técnicas analíticas como la espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS), que permite determinar con precisión las relaciones de isótopos estables ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ y $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) dentro de un producto, se han hecho cada vez más populares y se encuentran dentro del grupo de las herramientas favoritas para evaluar la autenticidad de los alimentos y bebidas.

Los valores isotópicos nos proporcionan una visión única de muestras que parecen físicamente iguales, pero que tienen sutiles diferencias químicas. Esto es lo que denominamos huella isotópica de un material. Una huella isotópica se define como un patrón único de valores isotópicos de un conjunto de muestras auténticas de alimentos y bebidas de origen geográfico conocido.

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.

Estos métodos se centran fundamentalmente en el estudio de los elementos que en mayor proporción forman parte de la materia orgánica, es decir C, H y O. Todos ellos se presentan bajo distintas formas isotópicas, siendo en todos los casos una de ellas altamente predominante sobre la otra, pudiendo ser la relación particular que guardan los isótopos en los alimentos la clave para su caracterización.

Las diferencias en los contenidos isotópicos encontrados para una misma molécula, se deben a los fraccionamientos isotópicos ocurridos durante su formación, debidos principalmente a causas físicas, químicas o biosintéticas. Recibe el nombre de marcado isotópico el proceso por el cual las moléculas iguales producidas por diferentes especies tienen relaciones isotópicas diferentes. Además, una misma especie según la región geográfica de producción, puede diferenciarse también por sus distintas relaciones isotópicas.

Así en el caso del carbono, sí bien la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ es similar en cualquier parte de la tierra, en las plantas encontramos diferentes contenidos de ^{13}C , dependiendo del ciclo metabólico seguido para la biosíntesis de los carbohidratos. Si el proceso de asimilación del

CO₂ sigue el ciclo fotosintético de Calvin (C3), la relación ¹³C/¹²C es menor (δ‰) que en las plantas que siguen el ciclo fotosintético de Hatch-Slack (C4).

Por otro lado, la relación isotópica del oxígeno y el hidrógeno depende en gran medida del ciclo del agua a nivel planetario. En el caso del hidrógeno es el agua la única fuente de este elemento que participa en la síntesis de las sustancias orgánicas, mientras que en el caso del oxígeno, este proviene en dos terceras partes del CO₂ atmosférico y una tercera parte del agua.

En la última década la caracterización y comparación de las composiciones isotópicas naturales de diferentes especies vegetales o animales y sus regiones de producción ha permitido verificar las auténticas procedencias de algunos productos agrícolas y la adulteración con productos naturales o sintéticos de menor coste.

Para facilitar la caracterización isotópica de los vinos, productos vitivinícolas y productos derivados, la Comisión Europea dispuso la creación de una base de datos isotópicos con muestras auténticas. Dicha base de datos tiene como objetivo fundamental mejorar el control del aumento del grado alcohólico natural de los productos vinícolas, poner de manifiesto la adición de agua a estos productos o, en relación con los resultados del análisis de otras características isotópica de estos, contribuir a la comprobación de la conformidad con el origen indicado en su designación.

El análisis isotópico es por lo tanto un método analítico utilizado para el control oficial y la lucha contra el fraude en el sector vitivinícola, cuyo objetivo principal es la protección de los derechos del consumidor.

La técnica analítica más habitual para la determinación de relaciones isotópicas de elementos ligeros es la espectrometría de masas de relaciones isotópicas (en inglés IRMS, Isotope Ratio Mass Spectrometry).

3.2 EQUIPO DE IRMS

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.

Existen principalmente dos modelos de espectrómetro de masas de relaciones isotópicas: el de flujo continuo y el de entrada doble. El primer modelo considera un doble sistema de entrada para la muestra de referencia y la muestra problema. En este caso, el gas purificado obtenido de una muestra se alterna rápidamente con un gas de referencia (de composición isotópica conocida), por medio de un sistema de válvulas, de modo que se realizan una serie de mediciones comparativas de ambos gases.

En contraposición a este modelo, en los años 80 se creó un sistema con una sola entrada, denominado de flujo continuo. En este caso la preparación de la muestra se produce inmediatamente antes de la introducción en el espectrómetro, y el gas purificado producido a partir de la muestra se mide una única vez. El gas de referencia puede medirse antes y después de la muestra, o después de una serie de mediciones de la muestra. Este sistema

permite una mayor productividad con una capacidad de análisis de muestras en torno a 10-100 veces mayor. Si bien, los instrumentos de flujo continuo pueden lograr un mayor rendimiento de la muestra y son más convenientes de usar que los instrumentos de entrada doble, los datos obtenidos tienen una precisión aproximadamente 10 veces menor. 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_2), dióxido de carbono (CO_2) o dióxido de azufre (SO_2)) se purifica mediante trampas, filtros, catalizadores y/o cromatografía. 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.

Estos equipos pueden medir las relaciones isotópicas como $^{12}C/^{13}C$, $^{14}N/^{15}N$, $^{18}O/^{16}O$, $^{34}S/^{32}S$ e $^2H/^1H$ a partir de muestras gaseosas de: CO_2 ($^{12}C/^{13}C$ y $^{18}O/^{16}O$), N_2 ($^{14}N/^{15}N$), CO ($^{12}C/^{13}C$ y $^{18}O/^{16}O$), O_2 ($^{18}O/^{16}O$), SO_2 ($^{34}S/^{32}S$ y $^{18}O/^{16}O$) e H_2 ($^2H/^1H$).

Gracias al uso de periféricos on-line (o preparaciones off-line), también se permiten mediciones en matrices distintas a las gaseosas como, por ejemplo:

- El análisis de las relaciones isotópicas de C, N y S en muestras sólidas y líquidas, previa combustión realizada on-line con un analizador elemental (EA-IRMS).
- El análisis de las relaciones isotópicas de O, N y H en muestras sólidas y líquidas, previa pirólisis realizada on-line con un analizador elemental de conversión a alta temperatura (TC/EA-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.

En términos más generales, el instrumento opera ionizando la muestra de interés, acelerándola sobre un potencial en el rango de kilovoltios y separando la corriente resultante de iones de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Los haces con iones más ligeros se curvan en un radio más pequeño que los haces con iones más pesados. A continuación, se mide la corriente de cada haz de iones utilizando una copa de Faraday o un detector multiplicador.

3.3 APLICACIÓN ANÁLISIS POR IRMS

El campo donde la IRMS puede encontrar aplicación es muy amplio y se encuentra en continuo crecimiento. Abarca áreas de conocimiento tales como el análisis forense, la investigación en el cambio climático, geología, arqueología, ecología, control de sustancias dopantes, la fisiología y bioquímica (estudios metabólicos y de consumo energético), hidrología (ciclo global del agua, acuíferos), paleontología (paleodietas), agricultura y control de alimentos (adulteraciones, autenticidad) entre otros.

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.

En un análisis isotópico, se miden las relaciones isotópicas de los elementos biológicos y se comparan con las de muestras de origen conocido. Esto da lugar a patrones isotópicos detectables y específicos que permiten verificar el origen, reduciendo así el engaño al consumidor debido a un etiquetado de origen erróneo.

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.

Tabla 1. Huellas dactilares de isótopos en alimentos y bebidas.

Isótopo	Interpretación bio/geoquímica	Ejemplo de aplicación	Productos que pueden verse afectados
Carbono	Origen botánico (fotosíntesis planta C3, C4 y CAM)	Detección de adulteración (ej. adición de azúcar, glicerol, CO ₂ , ácidos orgánicos, origen endógeno/exógeno/natural/sintético, etc...)	Miel, vino, licor, vinagre, zumo, aceite de oliva, productos lácteos, aromas, anhídrido carbónico, etc.
Nitrógeno	Procesos del suelo y procesos de fertilización de la planta	Etiquetado erróneo (ej. diferenciación entre orgánico y no orgánico)	Frutas y vegetales, carne, etc.
Azufre	Condiciones del suelo y proximidad a la costa	Origen del producto	Frutas y vegetales, carne, miel, etc.
Oxígeno	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.
Hidrógeno	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.

4. CENTELLEO LÍQUIDO

El fenómeno del centelleo se basa en la capacidad que tienen ciertos materiales de emitir luz cuando son atravesados por una radiación ionizante. Al producirse la incidencia del fotón o partícula cargada en un medio material se crea el fenómeno de luminiscencia, donde el material absorbe parte de la energía de la partícula incidente y la excitación molecular producida da lugar a una desexcitación rápida (en menos de unos 10^{-8} s) en forma de un corto destello de luz, conocida como fluorescencia o centelleo. Cada una de las emisiones de luz visible o destellos correspondiente a un solo fotón puede ser detectado y, si se dispone de un elemento transductor, transformado en una señal eléctrica y posteriormente medida mediante un fotomultiplicador.

A finales del siglo XIX ya se tenía constancia de este fenómeno, aunque no fue hasta mediados del siglo XX, al observarse la fluorescencia que producían ciertas soluciones orgánicas después de ser irradiadas, cuando tiene su origen surge el centelleo en fase líquida. Actualmente, y debido sobre todo al empleo de dispositivos que disminuyen en gran medida el fondo, y que son capaces de discriminar entre partículas alfa y beta, el centelleo líquido se ha convertido en una de las técnicas de detección de la radioactividad más versátiles y empleadas para multitud de aplicaciones ambientales y biológicas.

En este proceso, el elemento fundamental es el cóctel de centelleo, ya que es el encargado de absorber la radiación incidente y producir los fotones de luz. Generalmente, el cóctel de centelleo está formado por un disolvente orgánico junto con uno o más solutos centelleadores. El disolvente toma su nombre por ser el componente mayoritario de la mezcla y por disolver a los diferentes solutos. El proceso de centelleo líquido puede subdividirse en dos fases: transformación radiactividad-luz, y detección y cuantificación instrumental.

El análisis de Carbono-14 (un isótopo radioactivo de carbono presente de forma natural) permite determinar la naturaleza de un alimento, y comprobar así si un producto es de origen natural, además de diferenciar entre productos naturales y los derivados de fuentes petroquímicas.

La forma radiactiva del carbono decae con una vida media predecible ($t_{1/2} = 5.730$ años) y la actividad residual del ^{14}C proporciona un medio útil para estimar la edad de los materiales en un periodo aproximado de 1.000 a 10.000 años (desde el presente). La abundancia natural de radiocarbono, el ^{14}C , que se forma en las capas superiores de la atmósfera bajo la influencia del componente de neutrones de los rayos cósmicos, es variable. Al participar en el ciclo de intercambio con la biomasa de la Tierra, el ^{14}C es absorbido por las plantas vivas. Por ello, los productos elaborados con ingredientes naturales contienen altos niveles de Carbono-14. En cambio, los productos elaborados a partir de componentes petroquímicos no contienen Carbono-14.

El isótopo radioactivo de Carbono-14 se utiliza, en particular, para determinar si el producto fue elaborado a partir de fuentes de carbono renovable (derivados de plantas o animales), o a partir de componentes petroquímicos (de origen fósil). Por ejemplo muchos aditivos artificiales utilizados en alimentos y bebidas se derivan del petróleo y no tienen registros de Carbono-14. De la misma manera, los alcoholes sintéticos obtenidos por síntesis del petróleo

o del gas natural, debido a la descomposición completa, presentan una concentración de ^{14}C igual a cero, sin embargo, en el caso del etanol, elaborado a partir del material vegetal de un nuevo cultivo, sí que contiene una cantidad fija de ^{14}C .

Los resultados pueden expresarse en unidades dpm/g (desintegraciones por minuto por gramo) o como % de carbono de base biológica, determinando el porcentaje de carbono derivado de fuentes vegetales o animales, con respecto del carbono derivado de fuentes petroquímica, conforme a las normas internacionales ISO16620-2 y ASTM D6866. De esta forma permite detectar con veracidad aquellos productos que han sido adulterados, por ejemplo, con aditivos derivados de petroquímicos que no son reconocidos o revelados por el proveedor.

A modo de apunte en las décadas de 1950 y 1960 se produjo un aumento significativo de la concentración de ^{14}C atmosférico en el hemisferio norte como resultado de las pruebas de armas nucleares (bomb-pulse), aunque actualmente se encuentra prácticamente a los niveles de 1950. Como el radiocarbono se incorpora a todos los seres vivos, puede emplearse como cronómetro isotópico de los últimos 55 años. De esta forma, la actividad residual de estas pruebas puede utilizarse para datar materiales biológicos posteriores a mediados de la década de 1950 con una resolución de ± 2 años. Tanto la datación por radiocarbono convencional, como la datación bomb-pulse han encontrado aplicaciones forenses y se han aplicado para comprobar la autenticidad de la cosecha declarada de los vinos.

Asimismo, el compendio de los métodos de análisis de los vinagres de vino de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV por sus siglas en inglés) certifica al análisis de Carbono-14 como una herramienta para determinar si los vinagres de vino han sido adulterados con ácido acético de síntesis, mediante la determinación de la radioactividad beta del ^{14}C del ácido acético por centelleo líquido. Los vinagres naturales presentan contenidos de ^{14}C que dependen estrechamente del año de producción de los vinos correspondientes. Los valores inferiores a los contenidos del año ponen en evidencia la adición de todo o parte del ácido acético de síntesis.

El Compendio hace referencia a la técnica de recuento de centelleo líquido (LSC) como método de análisis de Carbono-14. Sin embargo, la técnica LSC, ha sido ampliamente desplazada por el método más moderno de espectrometría de masas con aceleradores (AMS por sus siglas en inglés).

Por lo tanto, el análisis de Carbono-14 es efectivo en la detección de ingredientes naturales adulterados y constituye así, un método de control de calidad que permite verificar la autenticidad de los productos etiquetados como naturales, diferenciando los productos obtenidos de fuentes renovables de los productos elaborados con petroquímicos.

5. OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS

La determinación de la autenticidad de los alimentos es el proceso por el que se verifica que un alimento cumple con la descripción de su etiqueta y conlleva una serie de verificaciones, en función del nivel de sofisticación del fraude perpetrado. Dentro de los aspectos a verificar se pueden incluir, entre otros, la composición (presencia de compuestos exógenos), el origen (geográfico o genético), el método de producción (convencional, orgánico, procedimientos

tradicionales) o tecnologías de procesamiento (irradiación, congelación, calentamiento por microondas) entre otros. Por ello, la declaración de atributos de calidad específicos en productos de alto valor es de especial interés, ya que estos productos suelen ser objeto de un etiquetado fraudulento. La prueba de procedencia es un tema importante para la seguridad alimentaria, la calidad de los alimentos y la protección del consumidor, así como para garantizar el cumplimiento de la legislación nacional y las normas internacionales. Debido a la globalización de los mercados alimentarios y al consiguiente aumento de la variabilidad y la disponibilidad de productos alimentarios de otros países, los consumidores están cada vez más interesados en conocer el origen geográfico junto con la supuesta calidad de los productos que forman parte de su alimentación. La garantía de calidad y los métodos utilizados para autenticar los productos alimenticios son de gran interés tanto desde el punto de vista comercial, jurídico y de control oficial.

Las técnicas analíticas empleadas para verificar el origen de nuestros alimentos varían en función de los requisitos normativos, así como del desarrollo tecnológico en este campo. Aunque están en continua progresión, a continuación se indican, a modo de ejemplo posibles técnicas empleadas actualmente en la autenticación de productos alimentarios que permiten corroborar la veracidad y consistencia de la información proporcionada al consumidor, basados en la determinación de las características químicas del producto alimentario:

- Técnicas moleculares, genómicas-proteómicas
- Técnicas cromatográficas
- Espectroscopía vibracional y de fluorescencia
- Técnicas elementales
- Espectrometría de masas no cromatográfica
- Técnicas inmunológicas

BIBLIOGRAFÍA

Carter J. F y Chesson Lesley A. (2017) Food forensics. Stable Isotopes as a Guide to Authenticity and Origin. CRC Press.

CEN Workshop Agreement" (CWA 17369:2019). Authenticity and fraud in the feed and food chain - Concepts, terms, and definitions.

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://foodintegrity.fera.co.uk>

<https://www.oiv.int>

Mosqueda Peña F. (2009). Desarrollo de procedimiento para la determinación de radioisótopos en muestras ambientales mediante técnicas de bajo recuento pro centelleo líquido y radiación Cerenkov. Universidad de Huelva.

Reglamento (CE) nº 178/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.

Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2017 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.

Sevastyanov V.S. (2015) Isotope Ratio Mass Spectrometry of Light Gas-Forming Elements. CRC Press.

Spink J, y Moyer D.C. (2011), Defining the Public Health Threat of Food Fraud. 76, R157-163, Journal of Food Science.

Ulberth F. (2020) Tools to combat food fraud – A gap analysis. Food Chemistry, 330 127044.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 39

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

6-METODOS DE ANÁLISIS

7-OTRAS SUSTANCIAS NITROGENADAS

8-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 (-NH₂)

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 $-NH_2$ 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.

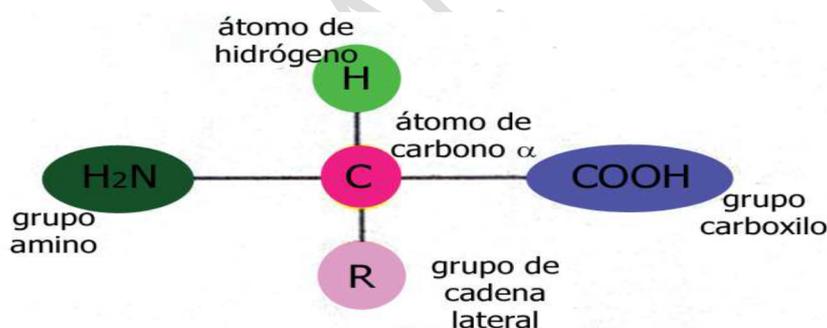
2-Comportamiento químico: los aminoácidos en disolución acuosa muestran un comportamiento anfótero, es decir, pueden ionizarse dependiendo del P^H como un ácido, como una base o como un ácido y una base a la vez. En el último caso, los aminoácidos se ionizan doblemente, apareciendo una forma dipolar 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 α , 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
- ✓ Heteroproteínas 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:

- α 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 β 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 β . 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

4.1-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.

4.2-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

4.3-Especificidad en su secuencia de aminoácidos, las proteínas presentan sectores estables y sectores variables

4.4-Capacidad amortiguadora: Las proteínas, al estar constituidas por aminoácidos, tienen un comportamiento anfótero. Tienen 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

5.1-Función estructural las proteínas forman tejidos de sostén y relleno que confieren elasticidad y resistencia a órganos y tejidos. EJ queratina de la epidermis

5.2-Función de transporte tenemos por ej. La hemoglobina y la mioglobina que son proteínas transportadoras de oxígeno en la sangre y en los músculos respectivamente

5.3-Función enzimática llevan a cabo esta función aquellas proteínas que tienen una acción biocatalizadora

5.4-Función hormonal son biocatalizadores que a diferencia de las enzimas actúan por todo el organismo por ejemplo insulina y glucagón

5.5-Función de defensa las principales proteínas que ejercen una defensa del organismo son las inmunoglobulinas

5.6-Función contráctil llevan a cabo esta función la actina y la miosina

5.7-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.

6.-METODOS DE ANÁLISIS

6.1-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.

6.2-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

6.4- 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

6.5-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 α amino. Los dos reactivos usados son fluoro-2,4 dinitrobenzenceno (DNF) o reactivo de Sager y el cloruro de dansilo. El α 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

6.6-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 NH_3 , el aldehído correspondiente, que tiene un átomo de carbono menos que el aminoácido original, CO_2 e hidrante que proviene de la reducción simultánea de la ninhidrina. El NH_3 liberado reacciona con una molécula de hidrante 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.

7-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 biogénicas las fermentaciones favorecen por descarboxilación enzimática de diversos aminoácidos libres y su transformación en aminas biogénicas. 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 nitratos/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

8-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 40

**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 cotidianas¹.

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 alimentos³.

Los alimentos se pueden clasificar según distintos criterios: origen, composición y componente predominante, principal función nutritiva que desempeñan⁴

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 bioactivos⁷. 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 particulares⁵.

El agua es el principal componente de la mayoría de los alimentos y forma parte de la composición de prácticamente la totalidad de los mismos⁴. Los principales componentes sólidos son: hidratos de carbono, proteínas, lípidos y sus correspondientes derivados⁵.

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 fosfoesfingolípidos 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 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.

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 41

**COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS. CARBOHIDRATOS. 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

3. MONOSACARIDOS

3.1 ESTRUCTURA QUIMICA

3.2 REACCIONES DE CICLACION

3.3 PROPIEDADES QUIMICAS

4. OLIGOSACARIDOS

5. POLISACARIDOS

6. METODOS DE ANALISIS

6.1 GLUCIDOS DIGESTIBLES

6.1.1 METODOS CUALITATIVOS

6.1.2 METODOS CUANTITATIVOS

6.1.3 METODOS DE DETERMINACION DEL ALMIDON

6.2 GLUCIDOS NO DIGESTIBLES

6.2.1 FIBRA CRUDA

6.2.2. FIBRA DETERGENTE NEUTRO Y ÁCIDO DETERGENTE

6.2.3 FIBRA DIETETICA

7. BIBLIOGRAFIA

COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS. CARBOHIDRATOS. PROPIEDADES GENERALES. METODOS DE ANALISIS

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:
 - ◆ **Homopolisacaridos** se repite un tipo de monosacáridos
 - ◆ **Heteropolisacaridos** si se repiten 2 o más tipos de monosacáridos.

3.-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 reciben 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).

3.1.-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.

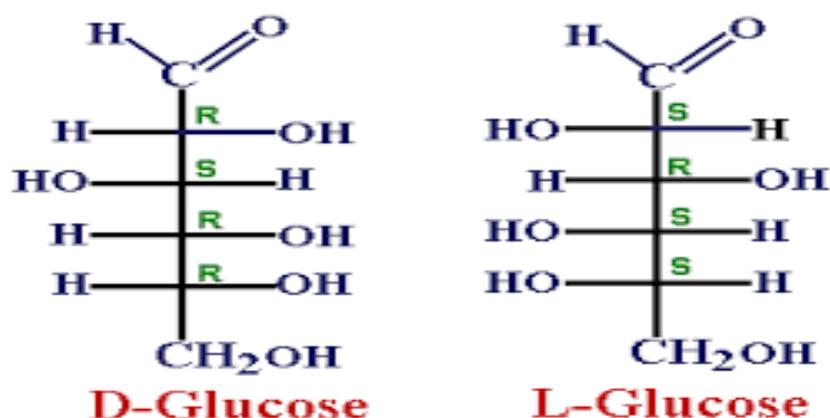
Las moléculas que teniendo la misma composición química tienen diferentes propiedades se denominan **isómeros**, Que se diferencian por la disposición espacial de los grupos sustituyentes de un centro **quiral** se denominan isómeros ópticos o **estereoisómeros**, estos

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



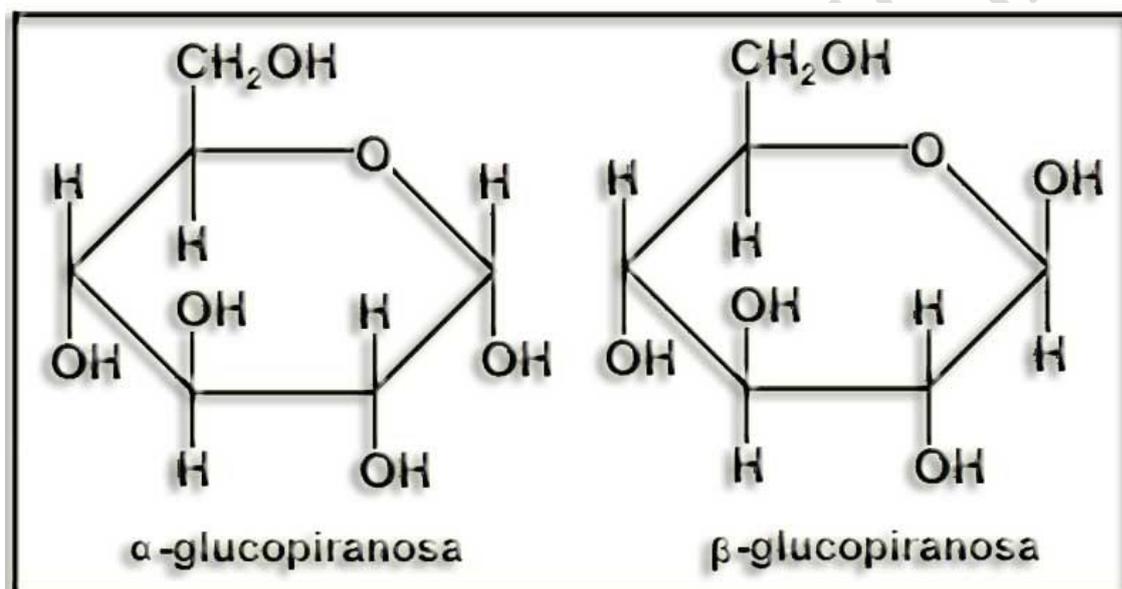
3.2.-Reacciones de ciclación de los monosacáridos La presencia de 5 o 6 carbonos en la cadena proporciona a estos compuestos la posibilidad de formar estructuras de anillo muy estables mediante la formación de un enlace hemiacetal interno, en el caso de las aldosas, o un hemicetal interno si son cetosas. 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 α y el otro con el grupo hidroxilo por encima del anillo, anomero β .

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 α y β



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 cetohexosa, es fuertemente levógira por lo que también se llama levulosa

3.3.-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 NH_2 . Tiene gran importancia en la formación de nucleosidos, entre ellos, la adenosina que forma parte del ATP y de los ácidos ribonucleicos.

4.-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 α glucosídico si el primer monosacárido es α y β glucosídico si es β . 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

5.-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 β glucosídicos y los que llevan a cabo función de reserva enlace α 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 α (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 α (1-4) pero presenta también ramificaciones cada 24-30 unidades de glucosa, mediante enlaces α (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 β (1-4) glucosídicos: Los vertebrados no poseen enzimas capaces de hidrolizar el enlace β (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.

6.- MÉTODOS DE ANÁLISIS

Distinguimos entre los glúcidos digestibles y los no digestibles

6.1 Glúcidos digestibles

6.1.1 Métodos cualitativos

- **Método de Molisch** se deshidrata el glúcido en forma de furfural que al reaccionar con la α -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 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.

6.1.2. 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 un color 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⁺ 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 ésteres 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 simultánea del NADP

La cantidad de NADP reducido a NADPH.H⁺ es proporcional a la cantidad de glucosa.

6.1.3. 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,

6.2 Glúcidos digestibles

6.2.1 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

6.2.2 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.

6.2.3 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 amiolíticos 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.

7. BIBLIOGRAFIA

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

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 42

COMPOSICION DE LOS ALIMENTOS. MINERALES. MACRO Y MICRONUTRIENTES. PROPIEDADES GENERALES. METODOS DE ANALISIS

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. Minerales
2. Propiedades generales
3. Descripción
4. Métodos de análisis
5. Bibliografía

MATERIAL NO OFICIAL

**COMPOSICION DE LOS ALIMENTOS. MINERALES. MACRO Y MICROMINERALES.
PROPIEDADES GENERALES. METODOS DE ANALISIS**

1-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.

2-PROPIEDADES GENERALES

Los minerales se encuentran en el organismo y en el alimento, principalmente, en estado iónico, como cationes por ej. Na^+ K^+ o como aniones 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-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.

4-MÉTODOS DE ANÁLISIS

4.1-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

4.2-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 molibdo vanadato dando un compuesto coloreado el fosfomolibadto vanadato.

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 (2000-3000°) 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. Por ej. El Se^{4+} se convierte en SeH_2 , en presencia de NaBH_4 .

Espectroscopia de emisión atómica (EAA) el uso del plasma acoplado inductivamente permite alcanzar temperaturas superiores a los 10.000°C, 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

Bibliografía

Química de los alimentos Grosch 2ª edición.

Análisis nutricional de los alimentos Ed Acribia I.S.B.N 84-200-0919-9.

Análisis de los alimentos Suzanne Nielsen Ed Acribia

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 43

**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 β -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 D₂, ergocalciferol, previamente conocida como calciferol y la vitamina D₃, colecalciferol. A su vez estos dos vitámeros tienen sus precursores en el organismo humano, el ergoesterol y el 7-dehidroesterol 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 α -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 α -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 β -tocoferol de γ -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 fluorimetría 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 44

CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS POR EL CALOR. TRATAMIENTOS TÉRMICOS. EFECTOS DEL CALOR EN LOS NUTRIENTES. IRRADIACIÓN DE 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. INTRODUCCIÓN
2. CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS POR CALOR
3. TRATAMIENTOS TÉRMICOS
 - ESCALDADO
 - PASTEURIZACIÓN
 - ESTERILIZACIÓN
 - UPERIZACIÓN
 - ESTABLECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS
4. EFECTOS DEL CALOR EN LOS NUTRIENTES.
5. IRRADIACIÓN DE ALIMENTOS
 - TIPOS DE RADIACIONES IONIZANTES EMPLEADAS EN INDUSTRIA ALIMENTARIA
 - TIPOS DE TRATAMIENTOS POR IRRADIACIÓN
 - PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA EFICACIA DE LA IRRADIACIÓN
 - EFFECTO DE LA IRRADIACIÓN EN LOS ALIMENTOS
 - NORMATIVA
6. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

El concepto de conservación o preservación de alimentos consiste en la eliminación o reducción de los microorganismos causantes de la alteración de las características nutricionales y organolépticas de los mismos (aspecto, olor, sabor) para que el alimento no se deteriore durante su almacenamiento. Estos agentes pueden ser ajenos a los alimentos (microorganismos del entorno como bacterias, mohos y levaduras) o estar en su interior. Al mismo tiempo, se deben controlar los cambios químicos y bioquímicos que provocan deterioro. De esta manera, se logra obtener un alimento sin alteraciones en sus características organolépticas típicas y que puede ser consumido sin riesgo durante un cierto período (Patrinieri, Figuerola, & Rojas, 1993)

La conservación de alimentos utilizando procesos por cambio de temperatura es, quizá, el método más antiguo empleado por la humanidad para el tratamiento y conservación de los alimentos. Se divide en tratamientos por calor, que se abordan en este tema, y tratamientos por frío que se verán en el tema siguiente.

2. CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS POR CALOR

Los tratamientos por calor, o tratamientos térmicos son aquellos en los que se somete al alimento a una temperatura determinada durante cierto tiempo para reducir o eliminar su carga microbiana y la acción de enzimas. Estos tratamientos ofrecen un margen de seguridad para garantizar la destrucción de los microorganismos patógenos que pudieran tener los alimentos.

El tratamiento térmico que precisa cada alimento depende de su naturaleza. Algunos sólo permiten ciertas temperaturas pues, de otro modo, se producirían cambios en su aspecto y sabor. Así, la adecuada relación entre tiempo y temperatura es fundamental para garantizar la eliminación de patógenos sin alterar las características propias del alimento tratado.

Muchas bacterias pueden existir en dos formas, vegetativa o de menor resistencia a las temperaturas, y formas de resistencia o esporas. Se pueden seleccionar una serie de bacterias como microorganismos indicadores del éxito de un tratamiento térmico por ser los más difíciles de destruir, de manera que si el tratamiento es eficiente con ellos, lo será también con aquellos más sensibles a la temperatura. Uno de los microorganismos más usados como indicador para procesos de esterilización es *Clostridium botulinum*.

Además, los efectos letales del calor son acumulativos, por lo que los tratamientos térmicos suaves, como el escaldado (temperatura inferior a 100°C), pueden incrementar la eficacia del tratamiento térmico subsiguiente al eliminar los gérmenes más sensibles al calor, reduciendo así el número de microorganismos, principalmente mohos, levaduras y células vegetativas de la superficie de los alimentos.

La destrucción de microorganismos por el calor es una función exponencial decreciente expresada como la pendiente obtenida frente a temperaturas y tiempos de exposición. Es lo que se conoce como cinética de muerte térmica.

Con respecto al efecto de los tratamientos térmicos sobre los microorganismos debemos tener en cuenta tres conceptos importantes:

- Dosis de Reducción Decimal (D_t): tiempo que debe mantenerse una temperatura determinada para destruir el 90% de los microorganismos existentes en un medio.
- Valor Z: relaciona la temperatura y el tiempo del tratamiento y el efecto en la destrucción del microorganismo, lo que nos permite establecer tratamientos equivalentes variando estos parámetros.
- Valor F: intensidad del efecto producido por el tratamiento térmico, expresado por la fórmula:

$$F = D(Lg_a - Lg_b)$$

dónde D es la dosis de reducción decimal; Lg_a el número inicial de microorganismos; Lg_b el número de microorganismos después del tratamiento térmico.

La efectividad del tratamiento térmico va a venir condicionada por una serie de parámetros:

- La temperatura de aplicación, mayor efecto a mayor temperatura.
- El tiempo de exposición, con más efectividad cuanto mayor sea.
- Los microorganismos a destruir, ya que el tratamiento dependerá de la concentración inicial, de si hay sólo formas vegetativas o también esporas (de gran resistencia térmica) y de la resistencia a la temperatura de las especies presentes en el alimento (presencia de especies termorresistentes).
- Las características químicas del alimento a tratar: pH, la actividad de agua (A_w), el contenido en grasas y el contenido en sales. Con pH ácidos o altos valores de A_w los microorganismos son más sensibles al tratamiento térmico. Respecto a las grasas éstas actúan como aislante, de modo que a mayor proporción en el alimento más fuerte tendrá que ser el tratamiento térmico. Las sales hacen disminuir el valor de la actividad de agua por lo que a mayor contenido en sales mayor deberá ser la temperatura.
- El volumen del alimento a tratar. Teniendo en cuenta que el calor tiene que difundirse hasta el centro del alimento, cuanto más distancia haya desde la superficie más tiempo habrá que mantener la temperatura.
- El material y la forma del envase. No todos los materiales difunden el calor de igual modo, por lo que a peor coeficiente de difusión más tiempo habrá de mantenerse la temperatura.

3. TRATAMIENTOS TÉRMICOS

Los tratamientos térmicos más utilizados son los siguientes:

- Escaldado
- Pasteurización
- Esterilización
- Uperización

ESCALDADO

Es un tratamiento térmico suave que somete al producto, durante un tiempo más o menos largo, a una temperatura inferior a 100°C. Se aplica antes del procesado para, por ejemplo, destruir la actividad enzimática de frutas y verduras. Se utiliza en la conservación de las hortalizas para fijar su color o disminuir su volumen antes de su congelación con el fin de destruir enzimas que puedan deteriorarlas durante su conservación. Esta manipulación no constituye un método de conservación en sí, sino un tratamiento aplicado en las manipulaciones de preparación de la materia prima. El escaldado reduce el número de microorganismos contaminantes, principalmente mohos, levaduras y formas bacterianas vegetativas de la superficie de los alimentos y contribuye, por tanto al efecto conservador de operaciones posteriores (López Alonso).

PASTEURIZACIÓN

La pasteurización es el proceso por el cual se destruyen las formas vegetativas de los microorganismos patógenos de los alimentos, y se destruye o inactiva la casi totalidad de la flora banal, sometiendo los alimentos a temperaturas variables, en función del tiempo de tratamiento, de forma que no sufran modificaciones esenciales en su composición y se asegure su conservación a temperatura adecuada durante un período de tiempo no inferior a cuarenta y ocho horas (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967).

Este método, que conserva los alimentos por inactivación de sus enzimas y por destrucción de sus microorganismos sensibles a las altas temperaturas (bacterias no esporuladas, levaduras o mohos), provoca cambios mínimos tanto en el valor nutritivo como en las características organolépticas del alimento.

La intensidad del tratamiento y el grado de prolongación de su vida útil se ven determinados principalmente por el pH. El objetivo principal de la pasteurización aplicada a alimentos de baja acidez ($\text{pH} \geq 4.6$) es la destrucción de bacterias patógenas, mientras que los alimentos de pH inferior a 4.6 persigue la destrucción de los microorganismos causantes de su alteración y la inactivación de sus enzimas.

Aunque prolonga la vida comercial de los alimentos, la efectividad de la pasteurización es solo relativa, pues debe ir acompañada por otros métodos de conservación como la acidificación, reducción del agua o la refrigeración (López Alonso)

Según sus combinaciones de tiempo y temperatura, la pasteurización puede ser:

- Pasteurización lenta (LTLT-Low Temperature Long Time): con bajas Tº y largos tiempos de exposición (62,8ºC durante 30 minutos).
- Pasteurización rápida (HTST-High Temperature Short Time): con altas temperaturas y corto tiempo de exposición (71,7ºC durante 15 segundos).

La pasteurización persigue los siguientes objetivos:

- Eliminación de riesgos sanitarios en alimentos destinados a su consumo en crudo y que, por tanto, tienen un periodo corto de conservación, como la leche.
- Evitar la alteración en aquellos alimentos cuyo periodo de conservación se prevé más largo, como el mosto y el zumo de frutas.
- Servir de método complementario en aquellos alimentos que van a someterse a un proceso fermentativo para su conservación. Es el caso de la pasteurización del vino, que tiene por objeto evitar procesos fermentativos no deseados.

Hay casos en los que la pasteurización cumple estos tres objetivos, como los productos lácteos, que han de ser elaborados con leche previamente pasteurizada.

ESTERILIZACIÓN

La esterilización es el proceso por el que se destruyen en los alimentos todas las formas de vida de microorganismos patógenos o no patógenos, a temperaturas adecuadas, aplicadas de una sola vez o por tindalización¹. En el ámbito industrial alimentario se considera también como esterilización el proceso por el que se destruyen o inactivan por un período determinado de tiempo, todas las formas de vida de los microorganismos capaces de producir alteraciones en los alimentos en condiciones normales de almacenamiento (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967). Es un procedimiento más drástico, en el que se somete al alimento a temperaturas de entre 115 y 127ºC durante cierto tiempo (en algunos alimentos, hasta veinte minutos), lo que permite destruir no solo las formas vegetativas, sino también las formas de resistencia, pero afecta al valor nutricional (se pueden perder algunas vitaminas) y características organolépticas de ciertos productos. Este proceso va dirigido a aquellos alimentos que van a ser conservados durante un largo periodo de tiempo y lleva asociado un sistema de envasado hermético que impide la contaminación posterior por microorganismos procedentes del medio ambiente.

El tratamiento térmico a seguir será más o menos drástico en función del pH del alimento y del tipo de microorganismo asociado al alimento a tratar. Así, aquellos

¹ método de esterilización en el que el calor se utiliza intermitentemente, dejando un tiempo entre dos calentamientos para permitir el desarrollo de las esporas que son destruidas más fácilmente en el siguiente calentamiento

alimentos envasados en un medio poco ácido ($\text{pH} > 4,6$) requieren tratamientos térmicos drásticos para asegurar la total destrucción de microorganismos termófilos y esporas termorresistentes. En esta categoría se incluyen carnes enlatadas, aves, pescados, hortalizas y sopas, entre otros, cuyas alteraciones se deben principalmente a ciertas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* por la termorresistencia de sus esporas. En el caso de alimentos envasados en medio ácido ($\text{pH} < 4,6$) la temperatura es menor, ya que la acidez del medio limita el desarrollo de microorganismos. Es el caso de tomates, peras, melocotones, piñas y sus jugos, encurtidos y ciertas salsas.

UPERIZACIÓN

La uperización (o UHT-*Ultra High Temperature*) permite utilizar temperaturas más elevadas, reduciendo a segundos el tiempo de exposición. Su repercusión sobre las propiedades nutritivas y características organolépticas de los alimentos es menor que la de la esterilización convencional. En la actualidad es un método muy utilizado para el tratamiento de la leche, en el que se emplean temperaturas de 135-150°C con tiempos de exposición de 2 segundos.

Sobre los alimentos envasados se realizan pruebas de estabilidad para comprobar si el producto va a mantener sus características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas durante su vida útil.

ESTABLECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS

Los tratamientos térmicos o de otra índole deberán, como mínimo, producir la reducción logarítmica deseada del microorganismo o microorganismos que han de combatirse para lograr el grado de inocuidad deseado. Se calcula para el punto más frío del producto durante el tratamiento. Debe basarse en el supuesto de las condiciones más desfavorables en lo que respecta al tipo de contaminación, la carga microbiana y la transferencia de calor en los productos, como por ejemplo materias primas congeladas o trozos de alimentos de gran tamaño (CAC/RCP 46, 1999).

Para lograr la reducción requerida del microorganismo o microorganismos que han de combatirse podrán aplicarse otros tratamientos (por ejemplo, calentamiento por microondas, calentamiento óhmico, campo magnético oscilante, presión hidrostática alta, irradiación, etc.).

4. EFECTOS DEL CALOR EN LOS NUTRIENTES.

El tratamiento térmico constituye uno de los métodos más importantes de conservación de alimentos y también es la principal causa de los cambios que se producen en las propiedades nutricionales de los alimentos (Baranda, 2012)

El efecto conservador de los tratamientos térmicos se debe a la desnaturalización de las proteínas, que destruye la actividad enzimática y metabólica de los microorganismos.

Cuanto más elevada es la temperatura y mayor la duración del tratamiento, mayor es el efecto destructor sobre microorganismos y enzimas. Aunque la exposición a altas temperaturas durante tiempos cortos equivale, en cuanto a efecto inhibitor sobre microorganismos y enzimas, a tratamientos con temperaturas más bajas durante tiempos largos, el efecto destructivo sobre las propiedades nutricionales y organolépticas es menor para aquellos tratamientos realizados a bajas temperaturas (Baranda, 2012)

Un resumen de los efectos más característicos se recoge en la tabla siguiente:

PROTEÍNAS

- Desnaturalización de proteínas (mejora biodisponibilidad y digestibilidad)
- Entrecruzamiento y/o coagulación de proteínas (empeora la biodisponibilidad y digestibilidad)
- Destrucción de aminoácidos, sobre todo los sulfurados. Y otras reacciones que involucran aminoácidos libres o unidos a proteínas (racemización, hidrólisis, desulfuración, desaminación)
- Reacción entre azúcares y proteínas (Reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático)

GLÚCIDOS	<ul style="list-style-type: none">• pérdida de digestibilidad por reacciones de pardeamiento• Gelatinización de almidones
LÍPIDOS	<ul style="list-style-type: none">• alteraciones de tipo lipolítico, autooxidativo y de polimerización• destrucción de ácidos grasos esenciales• aparición de sabores y aromas desagradables
VITAMINAS	<ul style="list-style-type: none">• pérdida de vitaminas sobre todo C y algunas del complejo B
MINERALES	<ul style="list-style-type: none">• en general poco afectados, aunque en algunos casos puede alterarse su absorción por la formación de complejos insolubles

Tabla 1: Principales efectos de los tratamientos térmicos sobre los nutrientes.
(Hernández Rodríguez & Sastre Gallego, 1999) (Baranda, 2012).

Los cambios provocados sobre el valor nutritivo de los alimentos al aplicar los tratamientos menos drásticos (ej. escaldado y pasteurización) son de escasa importancia. Éstos, combinados con otras operaciones (ej. congelación, refrigeración, y con un envase adecuado) permiten prolongar la vida útil de muy diversos alimentos así como su valor nutricional (Baranda, 2012).

5. IRRADIACIÓN DE ALIMENTOS

La irradiación de alimentos es un método físico de conservación que presenta interesantes beneficios pues prolonga el tiempo de comercialización de los productos y mejora la calidad higiénico-sanitaria de los mismos. Muchas de las investigaciones encaminadas a descubrir procedimientos nuevos y más eficaces para conservar alimentos se han centrado en el empleo de los rayos ultravioleta, de las radiaciones ionizantes, y del calentamiento mediante microondas. La destrucción de microorganismos sin producción de temperaturas elevadas sugirió el término de “esterilización fría” (Suárez, 2001).

La conservación por irradiación consiste en someter los alimentos a la acción de radiaciones obtenidas por procedimientos autorizados con el fin de inhibir la germinación de ciertos alimentos vegetales, combatir infestaciones por insectos y contribuir a la destrucción de la flora microbiana junto con la aplicación de otros métodos de conservación.

Puede utilizarse, por tanto, para prolongar la vida de los alimentos y/o para reducir riesgos relacionados con la presencia de patógenos. El empleo de este método debe asegurar que no se alteran las propiedades esenciales de los alimentos. En alimentos se usan dosis inferiores a 10 kGy (kilogray).

TIPOS DE RADIACIONES IONIZANTES EMPLEADAS EN INDUSTRIA ALIMENTARIA

Las radiaciones utilizadas para el tratamiento de alimentos son (Curso Forum, 2015):

- A. **Radiaciones ultravioleta**: poco energéticas, ya que tiene longitudes de onda superiores a los 2000 Å. Tiene menor poder de penetración y provocan oxidaciones en los ácidos grasos causando alteraciones organolépticas. Por estas razones se emplea menos que las radiaciones ionizantes.
- B. **Radiaciones ionizantes (rayos β , γ y X)**: son muy penetrantes (longitudes de onda inferior a 2000 Å) y su efecto microbicida se debe a la ionización de los componentes celulares, dando lugar a radicales libres muy oxidantes que destruyen el microorganismo. Los más usados en industria alimentaria son los rayos gamma. Se obtienen por medio de subproductos de fisión atómica Cobalto 60 (Co^{60}) y Cesio 137 (Cs^{137}).

Las radiaciones ionizantes más utilizadas en industria alimentaria son los rayos gamma y las partículas beta, que son igualmente eficaces y producen alteraciones similares en los alimentos que se están tratando (Suárez, 2001).

Los rayos gamma son muy penetrantes, si bien su eficacia disminuye a medida que aumenta la profundidad de penetración, siendo eficaces en la mayoría de los alimentos hasta 20 cm (dependiendo del tiempo que hayan sido expuestos). Las partículas beta son poco penetrantes, siendo eficaces sólo a profundidades de 0.5 cm/MeV de energía en caso de irradiación cruzada (desde lados opuestos) (Suárez, 2001).

Las radiaciones beta son direccionales, pueden ser dirigidas en línea recta pudiendo ser empleadas con una mayor eficacia que la radiación gamma, que es emitida desde fuentes radiactivas en todas direcciones (Suárez, 2001).

TIPOS DE TRATAMIENTOS POR IRRADIACIÓN

Se pueden definir tres conceptos según el efecto del tratamiento de irradiación sobre el alimento (Curso Forum, 2015), (Suárez, 2001):

1. **Radapertización:** equivale a una **esterilización** y tiene por objetivo destruir esporas y toxinas, principalmente de *Clostridium botulinum*, lo que hace que sea empleada preferentemente en industrias de conservas. Las dosis típicas de irradiación para conseguir este tratamiento son de 30 a 40 KGy.
2. **Radacidación:** equivale a una **pasteurización** ya que reduce la carga microbiana, sobre todo de patógenos, pero no afecta a las esporas. Se refiere a la reducción del número de microorganismos patógenos viables específicos, exceptuando los virus. Las dosis típicas de irradiación son de 2.5 a 10 KGy.
3. **Radurización:** similar a la radacidación, pero con dosis más débiles de radiación. Se consigue una considerable disminución del número de microorganismos alterantes viables específicos. Las dosis típicas de irradiación son de 0.75 a 2.5 KGy. El término picorradiado se emplea para designar a todo alimento que ha sido tratado con una dosis muy baja de energía ionizante. Se aplica a alimentos frescos (carnes, pescado, frutas y semillas no oleaginosas).

Antes de irradiar alimentos, deben tenerse en cuenta algunas consideraciones: en primer lugar deben elegirse alimentos sin alteraciones visibles y limpiarlos bien, preferiblemente con agua clorada eliminando todas las partes dañadas. En el caso de vegetales, se recomienda someterlos a un tratamiento previo como el escaldado para inactivar las enzimas. Se recomienda también envasar el alimento en frasco de cristal claro herméticamente cerrado para ver si el tratamiento provoca cambios en su aspecto. Con posterioridad deben ser tratados térmicamente a fin de que no se produzcan cambios indeseables una vez irradiados. Este proceso denominado blanqueamiento o desactivación enzimática, evita posibles reacciones que tienen lugar en los alimentos tras la irradiación (Curso Forum, 2015) (Suárez, 2001).

PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA EFICACIA DE LA IRRADIACIÓN

La eficacia bactericida de una determinada dosis de radiación depende de los siguientes factores (Suárez, 2001):

1. **Tipo y especie de microorganismo:** Los microorganismos pueden ordenarse de más a menos radorresistencia en virus, esporas bacterianas, bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, mohos y levaduras y parásitos.

2. **Número de microorganismos o esporas iniciales:** A mayor número de microorganismos existentes inicialmente, tanto menor será la eficacia bactericida de una determinada dosis de radiación.
3. **Composición del alimento:** Las proteínas ejercen un efecto protector frente a las radiaciones, como también a algunos agentes químicos antimicrobianos y al calor. Algunos constituyentes de los alimentos como la catalasa y sustancias reductoras (nitritos, sulfitos, y compuestos sulfhidrúlicos) pueden ejercer una acción protectora sobre los microorganismos. Las sustancias químicas que se combinan con los grupos SH actuarían como sensibilizadoras.
4. **Existencia o ausencia de Oxígeno:** La resistencia de los microorganismos a la radiación es mayor en ausencia de oxígeno que en su presencia.
5. **Estado físico del alimento durante la irradiación:** Tanto la temperatura como la humedad del alimento ejercen distintas influencias para los diferentes tipos de microorganismos. En general, la resistencia de las células desecadas es mayor que la de las células que contengan humedad.
6. **Factores propios de los microorganismos:** La edad, la temperatura de crecimiento y la de esporulación, y el estado (células vegetativas o esporas) influyen en el grado de sensibilidad.

EFFECTO DE LA IRRADIACIÓN EN LOS ALIMENTOS

La irradiación de alimentos presenta una serie de ventajas como son el evitar el empleo de tratamientos térmicos o el uso de conservantes, así como su uso en alimentos precocinados debido a su poder de penetración. Pero también tiene inconvenientes, los principales los cambios provocados en olor y sabor por la liberación de peróxidos debido a la radiolisis del agua. El empleo de dosis de radiación suficientemente elevadas para conseguir la esterilización de los alimentos, produce en muchos de ellos reacciones secundarias que originan colores, olores, sabores o palatabilidades indeseables. Los cambios indeseables pueden ser causados por la radiación o como consecuencia de las reacciones que tienen lugar en los mismos tras la irradiación (Suárez, 2001).

Las **proteínas** y otros compuestos nitrogenados son las sustancias más sensibles a las radiaciones en los alimentos. Los productos resultantes de los aminoácidos, péptidos y proteínas, dependen de las dosis de radiación, de la temperatura, de la cantidad de oxígeno, de la humedad presente y otros factores. Entre los productos formados están: NH_3 , CO_2 , H_2S , hidrógeno, amidas y carbonilos.

Con respecto a los **aminoácidos**, los aromáticos tienden a ser los más sensibles y experimentan modificaciones en las estructuras de los anillos. Los más sensibles a la radiación son: metionina, cisteína, histidina, arginina y tirosina.

La irradiación de **lípidos** y **grasas** da como resultado la producción de carbonilos y otros productos de oxidación tales como peróxidos, en especial si la radiación y posterior almacenaje tienen lugar en presencia de oxígeno. El efecto organoléptico más notable de la irradiación de lípidos en presencia de aire es la rancidez.

Con respecto al efecto sobre las **vitaminas**, en algunos alimentos las dosis de irradiación comprendidas entre 2 y 6 KGy con Co⁶⁰ destruían parcialmente la tiamina (B1), niacina (B3), piridoxina (B6), biotina (B8) y cobalamina (B12), mientras que riboflavina (B2), ácido pantoténico (B5) y ácido fólico (B9) aumentaban probablemente debido a la liberación de vitaminas ligadas. Las vitaminas C, D, E y K disminuyen su concentración en la mayoría de los alimentos.

En frutas y hortalizas irradiadas se han observado algunos efectos perjudiciales como el ablandamiento debido a la degradación de la pectina y de la celulosa (Suárez, 2001).

NORMATIVA

Los alimentos irradiados están regulados por dos Directivas transpuestas al ordenamiento jurídico español en el **Real Decreto 348/2001**, de 4 de abril, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes:

- a) **Directiva marco 1999/2/CE** relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. Esta Directiva establece que el tratamiento de un producto alimenticio sólo podrá autorizarse cuando exista necesidad tecnológica justificada, no presente peligro para la salud, sea beneficioso para los consumidores, no se utilice como sustituto de medidas de higiene y sanitarias ni de procedimientos de fabricación o agrícolas correctos.
- b) **Directiva de aplicación 1999/3/CE** relativa al establecimiento de una lista comunitaria de alimentos e ingredientes alimentarios autorizados para el tratamiento con radiaciones ionizantes.

6. BIBLIOGRAFÍA

Baranda, A. (12 de Agosto de 2012). *Procesado de Alimentos e Impacto Nutricional*. Recuperado el 21 de Abril de 2022, de Alimentatec: <http://www.alimentatec.com/procesado-de-alimentos-e-impacto-nutricional/>

Boletín Oficial del Estado (BOE). (21 de Septiembre de 1967). Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.

CAC/RCP 46. (1999). Código de Prácticas de Higiene para Alimentos Envasados Refrigerados de Larga Duración en Almacén.

Curso Forum. (2015). *I+D+i en Industria Alimentaria*.

Hernández Rodríguez, M., & Sastre Gallego, A. (1999). Tratado de Nutrición. Ediciones Díaz de Santos.

López Alonso, R. &. (s.f.). *Tecnología de Envasado y Conservación de Alimentos*. Recuperado el 21 de Abril de 2022, de [https://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info49/articulos/Envasado%20y%20Conservacion%20de%20Alimentos%20\(1\).pdf](https://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info49/articulos/Envasado%20y%20Conservacion%20de%20Alimentos%20(1).pdf)

Patrinieri, G., Figuerola, F., & Rojas, L. (1993). *fao.org*. Recuperado el 21 de Abril de 2022, de <https://www.fao.org/3/x5062s/x5062s08.htm#:~:text=El%20concepto%20general%20de%20la,y%20bioqu%C3%ADmicos%20que%20provocan%20deterioro>.

Suárez, R. (Junio de 2001). Conservación de Alimentos por Irradiación. *Invenio*, 85-124.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 45

CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS POR EL FRÍO. TRATAMIENTOS. EFECTO SOBRE LOS NUTRIENTES. ATMÓSFERAS MODIFICADAS

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. CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS POR EL FRÍO.
3. TRATAMIENTOS.
ENFRIAMIENTO Y REFRIGERACIÓN
CONGELACIÓN
LIOFILIZACIÓN
4. EFECTO SOBRE LOS NUTRIENTES.
5. ATMÓSFERAS MODIFICADAS
ENVASADO AL VACÍO (EV)
ENVASADO AL VACÍO “SEGUNDA PIEL” (VSP)
ENVASADO EN ATMÓSFERA CONTROLADA (CAP)
ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA (EAM)
6. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

Los peligros microbiológicos en los alimentos pueden controlarse mediante una combinación de factores inhibitorios, llamados barreras. Estas barreras pueden contribuir a retrasar o evitar la proliferación de algunos microorganismos, entre ellos los microorganismos patógenos. Las barreras que pueden utilizarse son, entre otras, la refrigeración, la disminución del pH y de la actividad de agua (A_w) o la adición de conservantes (CAC/RCP 46, 1999)

En general, los tratamientos térmicos u otros tratamientos de conservación que reciben los alimentos no son suficientes para asegurar su esterilidad comercial. La refrigeración supone una barrera importante que retrasa el deterioro de los alimentos y la proliferación de la mayoría de los patógenos, pero por sí sola no siempre es suficiente para reducir al mínimo el riesgo microbiológico dado que algunos microorganismos son psicrótrofos (es decir, proliferan a temperaturas de refrigeración), como ciertas cepas de *Listeria monocytogenes* o ciertas cepas de *Clostridium botulinum*, que pueden desarrollarse a temperaturas de 4°C o menos. Por consiguiente, en ausencia de barreras adicionales existe la posibilidad de que algunos de estos microorganismos indeseables proliferen a temperaturas de refrigeración.

Existen otros posibles peligros asociados con ciertos alimentos refrigerados. Por ejemplo, en el caso de los alimentos envasados en atmósfera modificada (EAM), el medio ambiente anaerobio limita la proliferación de microorganismos aerobios que compiten con los patógenos posibilitando que proliferen estos últimos. Los microorganismos aerobios son también con frecuencia los que causan el deterioro de los alimentos. Al evitarse una proliferación apreciable de los aerobios, los productos EAM pueden dejar de ser inocuos sin que haya signos visibles de deterioro, si no se refrigeran debidamente o si no se incorporan otras barreras.

En esta exposición se desarrollarán los distintos métodos de conservación por frío, así como los efectos sobre los nutrientes y el desarrollo de otras barreras como las atmósferas modificadas.

2. CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS POR EL FRÍO.

La conservación de alimentos por frío es el procedimiento consistente en someter los alimentos a la acción de bajas temperaturas, para reducir o eliminar las actividades microbianas y enzimáticas y para mantener determinadas condiciones físicas y químicas del alimento. En estos tratamientos se tendrá en cuenta, la temperatura, la humedad relativa, la circulación y renovación del aire, la estiba o rotación de productos y la densidad y duración del almacenamiento que requiere cada alimento conservado (Sánchez, 2011).

En lo que afecta a la conservación por frío, son de especial interés los microorganismos psicrófilos y psicrótrofos, capaces de reproducirse a bajas temperaturas. Hay que considerar distintos intervalos de bajas temperaturas dentro de los que los alimentos pueden mantenerse en buenas condiciones (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967).

3. TRATAMIENTOS.

Los tratamientos por frío incluyen:

- Enfriamiento y refrigeración
- Congelación
- Liofilización

ENFRIAMIENTO Y REFRIGERACIÓN

Consiste en someter los alimentos a la acción de bajas temperaturas, sin alcanzar las de congelación. La temperatura deberá mantenerse uniforme, durante el período de conservación, dentro de los límites de tolerancia admitidos y ser la apropiada para cada tipo de producto (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967).

El efecto de las temperaturas moderadamente bajas depende de la temperatura en sí, del tiempo de almacenamiento y de la fisiología de los microorganismos implicados de modo que, a medida que la temperatura desciende por debajo de la óptima, el crecimiento bacteriano se hace más lento.

Las temperaturas de **enfriamiento** son moderadamente inferiores a las ambientales, situándose generalmente entre 10-15°C y son adecuadas para el mantenimiento de ciertas frutas y hortalizas. La finalidad del enfriamiento es lograr cuanto antes la temperatura especificada de almacenamiento en todo el producto para reducir al mínimo la proliferación de patógenos transmitidos por los alimentos. Deberá realizarse de manera que el producto alcance la temperatura especificada con la mayor rapidez posible. Los productos deberán enfriarse de manera que su temperatura se mantenga durante un período mínimo de tiempo entre 60°C y 10°C, que es el intervalo de temperaturas más favorable para la proliferación microbiológica.

La **refrigeración** consiste en someter los alimentos a la acción de bajas temperaturas, sin alcanzar las de congelación. Las temperaturas de refrigeración son más bajas que las anteriores comprendiendo un rango de 0 a 7°C. La temperatura deberá mantenerse uniforme durante el período de conservación y ser la apropiada para cada tipo de producto. Permite conservar los alimentos durante días o semanas. La refrigeración reduce la velocidad de crecimiento de los microorganismos termófilos y de muchos mesófilos, de manera que son los psicrófilos y psicrótrofos los que podrán multiplicarse y originar alteraciones. El principal género bacteriano que ocasiona problemas de deterioro en alimentos refrigerados es *Pseudomonas*. También son resistentes a

temperaturas de refrigeración el género *Lactobacillus* y hongos del género *Penicillium* y *Cladosporium*.

Los tiempos de generación de estos microorganismos son prolongados, pero los largos periodos de almacenamiento en refrigeración utilizados para muchos alimentos, permite a la población psicrófila alcanzar tasas elevadas de crecimiento, originando alteraciones organolépticas del producto. Dado que la mayoría de patógenos son mesófilos, su crecimiento no constituye un problema en alimentos refrigerados, a excepción de *Clostridium botulinum* y *Yersinia enterocolitica*.

MANTENIMIENTO DE LA CADENA DE FRÍO

El término **Cadena de Frío** indica la continuidad de los medios empleados sucesivamente para mantener la temperatura de los alimentos, según corresponda, desde la recepción, hasta la elaboración, el transporte, el almacenamiento y la venta al por menor. Con objeto de asegurar el mantenimiento de la inocuidad y calidad del producto en el curso de su duración declarada, es esencial que se mantenga constantemente frío desde el momento en que se envasa hasta que se consume o prepara para el consumo. Si la temperatura del producto es el principal medio de conservación, dicho producto deberá mantenerse a la temperatura más baja que sea posible (CAC/RCP 46, 1999).

Deberá ejercerse una vigilancia periódica y efectiva de las temperaturas en las zonas de almacenamiento, los vehículos de transporte y los mostradores de los almacenes o tiendas tanto en el lugar donde se almacena el producto, como dentro del cargamento, lo que puede hacerse utilizando sistemas que indiquen y registren la temperatura. Esta vigilancia deberá efectuarse, en particular, cuando se carga o descarga el vehículo de transporte (CAC/RCP 46, 1999)

CONGELACIÓN

La congelación consiste en someter los alimentos a temperaturas iguales o inferiores a las necesarias para que la mayoría de su agua congelable se encuentre en forma de hielo. Durante el período de conservación, la temperatura se mantendrá uniforme de acuerdo con las exigencias y tolerancias permitidas en cada producto (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967)

La congelación es un tratamiento adecuado para la conservación de alimentos a largo plazo, ya que mantiene perfectamente las condiciones organolépticas y nutritivas de los alimentos. Las temperaturas inferiores a -18°C son suficiente para prevenir el crecimiento de todos los microorganismos ya que, si bien algunos son capaces de crecer a dicha temperatura, el ritmo de crecimiento sería extremadamente lento. Existen algunos productos más susceptibles de facilitar el desarrollo de microorganismos resistentes a la temperatura de congelación, como las frutas, zumos concentrados de frutas, helados y el bacon.

Se conocen gran número de microorganismos capaces de crecer por debajo de 0°C, aunque la capacidad de supervivencia es diferente para cada tipo de microorganismo. En general, son más sensibles los bacilos Gram Negativos. Así, las bacterias ven inhibido su crecimiento a partir de -5°C, las levaduras a -10°C y los mohos a -12°C. Sin embargo la mayoría de los patógenos sobreviven a la congelación, volviendo a multiplicarse al recuperarse la temperatura. Las endosporas y las toxinas de *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus* no parecen verse afectadas por las temperaturas de congelación.

La congelación puede realizarse de dos formas diferentes:

- **Congelación lenta**, en la que la temperatura deseada (entre -18 y -20°C) se consigue en un periodo de 3 a 72h dependiendo del volumen y del tipo de alimento. En esta forma el agua libre, la que se congela, adopta forma de cristales grandes e irregulares lo que perfora las membranas celulares y provoca un exudado mayor en la descongelación con pérdida de calidad del alimento.
- **Congelación rápida o total**, en la que la temperatura desciende hasta -20°C- -30 °C en 30 min. Presenta ventajas respecto a la calidad del producto debido a que forma cristales de hielo mucho más pequeños que en el caso anterior con exudados mucho menores, e impide la adaptación de microorganismos a las bajas temperaturas por el choque térmico.

Según el Real Decreto Real Decreto 1109/1991, de 12 de julio, por el que se aprueba la Norma General de alimentos ultracongelados destinados a la alimentación humana, se entenderá por alimentos ultracongelados aquellos productos que (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1991):

- Hayan sido sometidos a un proceso de congelación rápida (ultracongelación)
- Aquellos cuya temperatura en todas sus partes, tras la estabilización térmica, se mantenga sin interrupción a temperaturas iguales o inferiores a -18°C.
- Aquellos comercializados de modo que indiquen que poseen esta característica.

Para congelar alimentos se pueden emplear métodos muy diversos, pero todos ellos deben cumplir unas consideraciones previas:

- Solo deben congelarse alimentos que se encuentren en perfecto estado
- Si no es posible su congelación inmediata, mantener los alimentos en refrigeración a una temperatura cercana o inferior a 0°C

Antes de proceder a la congelación es conveniente realizar unas operaciones previas:

- Vegetales: escaldado para inactivar enzimas y reducir carga microbiana. Enfriamiento a 10°C.
- Carne: los animales sacrificados deben ser sangrados, eviscerados y pelados si procede. Pueden ser despiezados o fileteados manteniéndolos a temperaturas cercanas a 0°C.

- Pescados: deben ser limpiados y eviscerados tras su captura. Si no son congelados deben ser conservados en refrigeración hasta ese momento.

El proceso de congelación se puede dividir en tres etapas:

1. Enfriamiento del producto desde su temperatura inicial hasta el punto de congelación. Se destruye de parte importante de los microorganismos presentes en el alimento y se reduce la velocidad de crecimiento de los psicrotolerantes.
2. Cambio de estado. La transformación del agua en hielo produce lesiones mecánicas en los microorganismos.
3. Enfriamiento posterior hasta alcanzar la temperatura de almacenamiento, inhibiendo todavía más la multiplicación de los microorganismos, hasta que su crecimiento cesa a temperaturas inferiores a -8°C .

En la supervivencia de los microorganismos en alimentos congelados es de gran importancia la **descongelación** ya que, cuando los microorganismos no han muerto en el proceso de congelación pueden ser capaces de recuperarse tras la descongelación y crecer. El proceso de descongelación debe ser más lento que el de congelación, con el fin de obtener un recuento menor.

En los productos destinados a consumirse crudos o que no serán cocinados totalmente antes de su consumo, el proceso de congelación puede utilizarse para controlar los parásitos helmintos, tales como los *Anisakis spp.* y *Trichinella spiralis*. Las condiciones requeridas para controlar eficazmente a los parásitos utilizando el proceso de congelación incluyen la temperatura final y el tiempo que el producto permanece congelado. Estos parámetros varían dependiendo de varios factores, desde el tipo de producto, a las especies de parásitos, el grosor del producto o la distribución en el congelador (CAC/RCP 8, 1976).

LIOFILIZACIÓN

Se basa en la reducción del contenido de agua de los alimentos mediante congelación y la sublimación del agua presente en el producto en condiciones de vacío, reduciendo al mínimo el arrastre de sustancias y el daño a su estructura. Con este proceso se obtiene la pérdida de peso y preservación de los productos desecables, pero manteniendo el contenido y distribución de los componentes en su interior y obteniendo una apariencia muy similar al producto fresco. El proceso de liofilización se divide en dos etapas, la primera para congelar el producto y la segunda para eliminar el agua en él contenida. Para obtener resultados óptimos, es muy importante tener un buen sistema de congelación, de forma que no se dañen las estructuras internas de los productos durante la formación de los cristales de hielo, lo que produce pérdida de textura durante la rehidratación (Cruz Guillén).

4. EFECTO SOBRE LOS NUTRIENTES.

En principio los nutrientes soportan bien los procesos de conservación en frío, aunque existe un cierto grado de desnaturalización proteica que se traduce en cambios de textura, y se siguen produciendo reacciones de oxidación en los lípidos aunque se vean ralentizadas. El contenido de vitaminas y sales minerales se modifica escasamente, aunque las pérdidas pueden ser considerables a la hora de la descongelación por la pérdida de nutrientes junto al exudado (aminoácidos, proteínas, minerales y vitaminas). Por tanto, si las condiciones de tratamiento, acondicionamiento y descongelación son las adecuadas, los productos congelados mantienen satisfactoriamente su valor nutritivo (Asturnatura.com).

Al evaluar la pérdida de nutrientes que pueden tener los alimentos cuando son sometidos a los diversos procesos, hay que tener en cuenta la temperatura a la que han sido sometidos:

En la **refrigeración**, apenas si hay variaciones en el valor nutritivo de los alimentos. El efecto más significativo es el endurecimiento provocado por la solidificación de las grasas y aceites.

En cuanto a la **congelación**, el principal efecto sobre la calidad de los alimentos es el daño que ocasiona en las células el crecimiento de los cristales de hielo. La congelación apenas afecta, desde el punto de vista nutritivo.

En el caso de los alimentos **liofilizados**, correctamente envasados, se conservan durante más de 12 meses sin apenas modificar su valor nutritivo y sus características organolépticas. Su estructura porosa los hace accesibles al oxígeno, lo que puede provocar alteraciones por oxidación de sus lípidos. Para evitarlo, se envasan en atmósferas inertes. (Cruz Guillén).

5. ATMÓSFERAS MODIFICADAS

Para mantener el estado natural de los alimentos se recurre actualmente a distintas técnicas de envasado. De esta forma se logra conservar y proteger el alimento durante periodos más largos de tiempo (López Alonso & cols.)

La conservación de los alimentos en atmósfera modificada consiste en sustituir el aire de los envases por una mezcla de gases, siendo los más usuales el dióxido de carbono (CO₂), el oxígeno (O₂) y el nitrógeno (N₂). El Reglamento 1333/2008 sobre aditivos alimentarios define los *gases de envasado* como aquellos gases distintos del aire, introducidos en un recipiente antes o después de colocar en él un producto alimenticio o mientras se coloca, y establece los gases autorizados y las condiciones de utilización según la categoría de los alimentos (Diario Oficial de la Union Europea (DOUE), 2008).

De acuerdo al Real Decreto 1334/1999 los productos alimenticios deben incluir en su etiquetado una serie de datos relativos a su denominación de venta, fecha de caducidad, lista de ingredientes, lote, etc. En el caso de los productos cuya duración se ha prolongado por el empleo de gases de envasado además debe añadirse obligatoriamente la indicación “**envasado en atmósfera protectora**”.

ENVASADO AL VACÍO (EV)

El envasado al vacío fue el primer método de envasado en atmósfera protectora. Se trata de un sistema muy sencillo, que únicamente conlleva la evacuación del aire contenido en el paquete sin que sea remplazado por otro gas. Si el proceso se realiza de forma adecuada la cantidad de oxígeno residual es inferior al 1%.

En este caso, el material de envasado se pliega en torno al alimento como resultado del descenso de la presión interna frente a la atmosférica. Dicho material debe presentar una permeabilidad muy baja a los gases, incluido el vapor de agua.

Inicialmente, el vacío se limitaba al envasado de carnes rojas, carnes curadas, quesos duros y café molido. En cambio, en la actualidad se aplica a una extensa variedad de productos alimenticios (García Iglesias, Gago Cabezas, & Fernández Nuevo).

Las ventajas del envasado al vacío son:

- Es el más sencillo y económico puesto que no hay consumo de gases en él.
- La baja concentración de oxígeno inhibe el crecimiento de microorganismos aerobios y las reacciones de oxidación.
- Favorece la retención de los compuestos volátiles responsables del aroma
- Impide las quemaduras por frío, la formación de cristales de hielo y la deshidratación de la superficie del alimento gracias a la barrera de humedad de pequeño espesor existente entre el material de envasado y el producto.

Presenta además una serie de inconvenientes:

- Durante un cierto tiempo, las bacterias aerobias del alimento continúan desarrollándose, alterándolo. Además se siguen produciendo reacciones de oxidación pudiendo dar lugar a cambios de color y enranciamiento.
- Es un método poco recomendable para productos de textura blanda o frágil, porque pueden deformarse de manera irreversible con el vacío.
- No es adecuado para alimentos que precisan cierta cantidad de oxígeno.
- En algunos casos, se ha observado la acumulación de exudado en productos envasados al vacío durante periodos de tiempo prolongados.

ENVASADO AL VACÍO “SEGUNDA PIEL” (VSP)

A partir del envasado al vacío se ha desarrollado la tecnología denominada envasado al vacío “segunda piel” o VSP (vacuum skin packaging). En ella el material de envasado se

calienta antes de situarse sobre el alimento, una vez evacuado el aire del interior del paquete. Las temperaturas que soporta el material en esta etapa pueden superar los 200 °C. Por efecto del calor la bolsa o la lámina se retrae adaptándose al contorno del producto. Gracias a este contacto tan estrecho se previene la formación de burbujas de aire y arrugas y se realza la presentación final del alimento (García Iglesias, Gago Cabezas, & Fernández Nuevo).

Las ventajas del envasado al vacío “segunda piel”, además de las del envasado al vacío convencional, son:

- Proporciona una apariencia mucho más atractiva al producto y evita los problemas de exudado que afectan a ciertos productos.
- Reduce el riesgo de roturas en los envases porque no se forman pliegues ni arrugas en el mismo.
- En algunos productos se ha comprobado que prolonga su vida útil. Por ejemplo, en filetes de pescado fresco.

Los principales inconvenientes son:

- No es apto para productos de textura frágil o que requieran la presencia de oxígeno para mantener sus características. Tampoco se aconseja su uso en alimentos con filos cortantes que pueden rasgar el material de envasado.
- Su mayor coste, por lo que suele emplearse en productos con cierto valor añadido, sobre todo, carnes y pescados en porciones para la venta al detalle.

ENVASADO EN ATMÓSFERA CONTROLADA (CAP)

El envasado en **atmósfera controlada (CAP** en sus siglas en inglés, *controlled atmosphere packaging*) supone la sustitución del aire por un gas o una mezcla de gases específicos cuya proporción se fija de acuerdo a las necesidades del producto.

Es deseable que la composición de la atmósfera creada se mantenga constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, las reacciones metabólicas de determinados productos consumen algunos gases (oxígeno) y generan otros (dióxido de carbono, etileno) que alteran esta composición inicial. Estas variaciones se detectan mediante dispositivos de control y se compensan con distintos mecanismos de producción/eliminación de gases. Las atmósferas controladas se utilizan en cámaras y contenedores de gran volumen por lo que la denominación más acertada para esta tecnología es “**almacenamiento en atmósfera controlada**” o AAC (controlled atmosphere storage o CAS en inglés). Se emplea sobre todo con frutas y hortalizas dónde se lleva a cabo un seguimiento estricto de determinados parámetros con el fin de retrasar su maduración. (García Iglesias, Gago Cabezas, & Fernández Nuevo).

Sus ventajas son:

- Es el sistema más adecuado para los vegetales frescos después de su recolección porque soporta su actividad metabólica y reduce las alteraciones ocasionadas por el frío.
- La atmósfera creada artificialmente inhibe la proliferación de microorganismos e insectos.
- También actúa sobre las reacciones de pardeamiento y la producción de etileno retrasando la senescencia de los vegetales y preservando su calidad sensorial.

Los principales inconvenientes son (García Iglesias, Gago Cabezas, & Fernández Nuevo):

- Es una tecnología costosa puesto que requiere equipos para la generación/eliminación de gases en la cámara y otros dispositivos para el control de la atmósfera interna.
- No es aplicable a envases de pequeño tamaño destinados a la venta al detalle.
- Se ha detectado la aparición de nuevas patologías y desórdenes en los productos vegetales debidos al almacenamiento en condiciones controladas.

ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA (EAM)

Dentro de los tres tipos de envasado en atmósfera protectora, esta tecnología es la de aparición más reciente. El envasado en atmósfera modificada (EAM o MAP de sus siglas en inglés, *modified atmosphere packaging*) consiste en la evacuación del aire contenido en el envase y la inyección del gas o de la combinación de gases más adecuado de tal manera que la atmósfera que se consigue en el envase va variando con el paso del tiempo en función de las necesidades y respuesta del producto, permitiendo controlar mejor las reacciones químicas, enzimáticas y microbianas y evitando o minimizando las principales degradaciones que se producen durante el periodo de almacenamiento.

Si se envasan en atmósfera modificada alimentos con una actividad metabólica importante, como frutas y hortalizas frescas, es imprescindible emplear materiales de permeabilidad selectiva. En caso contrario, su vida útil se reduce considerablemente. La estructura de estas láminas poliméricas permite el intercambio de gases entre el espacio de cabeza del envase y la atmósfera exterior alcanzando un estado de equilibrio entre los gases consumidos y producidos por el alimento y los que entran y salen a través de la película de envasado. De esta manera, se logra mantener una composición gaseosa dentro del paquete muy similar a la de partida.

En el resto de productos los cambios en la atmósfera creada se deben a reacciones enzimáticas de poca intensidad y al paso de los gases a través del material de envasado. Para ellos se seleccionan láminas de alta barrera en las que la difusión de los gases es mínima (García Iglesias, Gago Cabezas, & Fernández Nuevo).

Sus principales ventajas son:

- Es un sistema aplicable a una amplia variedad de productos independientemente del tratamiento de elaboración y conservación al que se someten y de sus características.
- Mantiene la calidad organoléptica del producto porque inhibe las reacciones de pardeamiento, de oxidación, preserva el color rojo en la carne fresca, etc.
- Soporta el metabolismo activo de los productos frescos y mínimamente procesados.

Entre los principales inconvenientes de este sistema de envasado se encuentran:

- Es imprescindible realizar un buen diseño de la atmósfera interna para garantizar la conservación del producto durante el tiempo necesario.
- Una vez cerrado el envase no puede controlarse la composición gaseosa del espacio de cabeza.
- Elevado coste
- Problemas de colapso del envase y formación de exudado en atmósferas con una proporción elevada de dióxido de carbono.

Los procesos de envasado en atmósfera protectora utilizan fundamentalmente tres gases: oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono. Estos gases producen un efecto individual o combinado para mantener la calidad de los alimentos. Permiten la conservación del producto en estado fresco, sin tratamientos químicos o térmicos utilizados en otras técnicas de conservación, o bien se utiliza conjuntamente con estas técnicas para prolongar y garantizar un mayor periodo de conservación .

El oxígeno (O_2) es uno de los principales agentes alterantes de los alimentos. En la mayoría de los productos envasados en atmósfera protectora el objetivo es eliminarlo o reducirlo, ya que su presencia evita el desarrollo de microorganismos anaerobios como las bacterias causantes de la putrefacción en el pescado.

La aportación del CO_2 en el envasado de alimentos es su capacidad bacteriostática, fungistática e insecticida. Debido a su acción antimicrobiana las atmósferas que contienen dióxido de carbono se denominan **atmósferas activas** (100% de CO_2 o combinación de CO_2-O_2 con una proporción elevada del primero) o **semiactivas** (mezclas de CO_2-N_2 o $CO_2-N_2-O_2$).

El nitrógeno (N_2) es un gas inerte y muy poco soluble en agua y grasas, lo que lo convierte en un producto ideal para la conservación de alimentos y bebidas. Aprovechando su naturaleza poco reactiva se utiliza como sustituto del oxígeno, desplazándolo en el espacio de cabeza del envase con el fin de evitar el desarrollo de microorganismos aerobios y los problemas de oxidación en productos de alto contenido de grasas. También actúa como gas de relleno previniendo el colapso del envase. Las atmósferas que contienen exclusivamente nitrógeno se denominan **atmósferas inerte** (Curso Forum, 2015).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Asturnatura.com. (s.f.). Recuperado el 03 de Julio de 2016, de <http://www.asturnatura.com/articulos/nutricion/fundamentos-nutricion/efectos-procesamiento-alimentos.php>.
- Baranda, A. (12 de Agosto de 2012). *Procesado de Alimentos e Impacto Nutricional*. Recuperado el 21 de Abril de 2022, de Alimentatec: <http://www.alimentatec.com/procesado-de-alimentos-e-impacto-nutricional/>
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (21 de Septiembre de 1967). Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (12 de Julio de 1991). Real Decreto Real Decreto 1109/1991, de 12 de julio, por el que se aprueba la Norma General de alimentos ultracongelados destinados a la alimentación humana.
- CAC/RCP 46. (1999). Código de Prácticas de Higiene para Alimentos Envasados Refrigerados de Larga Duración en Almacén.
- CAC/RCP 8. (1976). Código de Prácticas para la Elaboración y Manipulación de los Alimentos Congelados Rápidamente.
- Cruz Guillén, S. (s.f.). *Pérdida de Nutrientes por Diversos Procesos*. Recuperado el 03 de Julio de 2016, de <https://es.scribd.com/doc/24578909/Laboratorio-10-Perdida-de-Nutrientes-x-Diferentes-Procesos>
- Curso Forum. (2015). *I+D+i en Industria Alimentaria*.
- Diario Oficial de la Union Europea (DOUE). (16 de Diciembre de 2008). Reglamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios.
- García Iglesias, E., Gago Cabezas, L., & Fernández Nuevo, J. I. (s.f.). *Tecnologías de envasado en atmósfera protectora*. Recuperado el 04 de Julio de 2016, de www.madrimasd.org:
https://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/VT_3_Tecnologias_de_Envasado_en_Atmosfera_Protectora.pdf
- López Alonso, R., & cols. (s.f.). *Tecnología de Envasado y Conservación de Alimentos*. Recuperado el 27 de Junio de 2016, de <http://www.usmp.edu.pe/>:
[http://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info49/articulos/Envasado%20y%20Conservacion%20de%20Alimentos%20\(1\).pdf](http://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info49/articulos/Envasado%20y%20Conservacion%20de%20Alimentos%20(1).pdf)
- Patrinieri, G., Figuerola, F., & Rojas, L. (1993). *fao.org*. Recuperado el 21 de Abril de 2022, de <https://www.fao.org/3/x5062s/x5062s08.htm#:~:text=El%20concepto%20general%20de%20la,y%20bioqu%C3%ADmicos%20que%20provocan%20deterioro.>

Sánchez, M. P. (09 de Septiembre de 2011). *Ingeniería Alimentaria*. Recuperado el 03 de Julio de 2016, de <https://ingenierialimentaria.es/2011/09/09/alimentos-congelados/>:
<https://ingenierialimentaria.es/2011/09/09/alimentos-congelados/>

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 46

FERMENTACIONES. PRINCIPALES FERMENTACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. ALIMENTOS IMPLICADOS. CULTIVOS INICIADORES.

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. FERMENTACIONES.
2. PRINCIPALES FERMENTACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.
 - 2.1. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA O ETANÓLICA
 - 2.2. FERMENTACIÓN LÁCTICA
 - 2.3. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA
 - 2.4. FERMENTACIÓN ACÉTICA
 - 2.5. FERMENTACIÓN PROPIÓNICA
 - 2.6. FERMENTACIÓN BUTÍRICA
3. ALIMENTOS IMPLICADOS.
 - 3.1. PAN
 - 3.2. VINO Y OTRAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS:
 - 3.3. VINAGRES
 - 3.4. PRODUCTOS LÁCTEOS
 - 3.5. PRODUCTOS VEGETALES. ENCURTIDOS
 - 3.6. EMBUTIDOS
4. CULTIVOS INICIADORES
5. BIBLIOGRAFÍA

1. FERMENTACIONES.

Desde el punto de vista bioquímico el término **fermentación** se refiere al mecanismo de obtención de energía a través del catabolismo de compuestos orgánicos ocurrido en ausencia de O₂, mientras que en Microbiología Industrial, se trata de un concepto mucho más amplio y se aplica a los procesos que emplean microorganismos para obtener un determinado producto. Para que una fermentación tenga lugar se necesita la presencia de un sustrato, unos microorganismos y unas condiciones físicas adecuadas.

Aplicada a los alimentos, la fermentación es una técnica de conservación utilizada desde antiguo, que permite obtener productos con características físicas, químicas y organolépticas totalmente distintas de las de la materia prima de la que proceden. Existen referencias que indican que en muchas civilizaciones antiguas se consumían alimentos obtenidos por fermentación como el vino, la cerveza, las leches fermentadas, el pan o los encurtidos. Con el paso del tiempo, cada país ha desarrollado su propia tradición en la preparación y producción de alimentos fermentados (Seseña Prieto, 2005).

Procesos tales como la fabricación de pan, queso y cerveza así como los de bebidas alcohólicas, se han desarrollado hasta satisfacer las exigencias modernas de producción a gran escala, calidad constante y elevada, costes competitivos y variedad de productos. Las preparaciones normalizadas de levaduras de panadería, cultivos “starter” o iniciadores para productos lácteos y el empleo de enzimas industriales han mejorado la eficacia así como la automatización y control de los modernos procesos de fabricación de pan y de fermentación de la leche.

Avances en la industria de la cerveza y las bebidas alcohólicas han permitido el paso de una elaboración artesanal a una industrial a gran escala. Algunas de estas innovaciones son el uso de procesos de fermentación continuos o el empleo de cereales no malteados y enzimas microbianas.

El proceso de fermentación se ha normalizado controlando determinados parámetros como la velocidad de inoculación, las concentraciones de oxígeno disuelto, la viabilidad del almacenamiento de las levaduras, los contenidos de nitrógeno soluble y azúcares fermentables de los mostos, así como su temperatura (Báñez Sanz, sf).

2. PRINCIPALES FERMENTACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

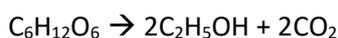
Las fermentaciones más ampliamente usadas en la industria alimentaria son:

- Alcohólica o etanólica
- Láctica
- Maloláctica
- Acética
- Propiónica
- Butírica

A continuación se expone cada una de ellas.

2.1. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA O ETANÓLICA

La fermentación alcohólica en mostos azucarados se origina por el metabolismo anaerobio de levaduras del género *Saccharomyces*, que da lugar a etanol y CO₂ como productos principales a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas y se debe a un complejo enzimático soluble, la zimasa. Esta fermentación puede representarse por la ecuación estequiométrica de Gay – Lussac:



La primera etapa de la fermentación es la glucólisis o glicolisis. Se caracteriza porque puede utilizar oxígeno, si este elemento está disponible (ruta aerobia) o, si es necesario, puede continuar en ausencia de éste (ruta anaerobia), aunque a costa de producir menos energía.

En condiciones anaerobias, la fermentación responde a la necesidad de la célula de regenerar la molécula de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), que ha sido consumida en el proceso energético de la glicolisis. Durante la glicolisis la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD⁺ que actúan como aceptores de electrones y pasan a la forma NADH + H⁺. Para que puedan tener lugar las reacciones de la glicolisis que producen energía es necesario restablecer el NAD⁺ por otra reacción.

El piruvato se descarboxila mediante la acción de la piruvato descarboxilasa para dar como producto final acetaldehído liberando dióxido de carbono (CO₂). Tras esta operación el NADH + H⁺ sintetizado en la glicolisis se vuelve a oxidar por la acción de la alcohol deshidrogenasa, regenerando NAD⁺ y sintetizando al mismo tiempo **etanol**.

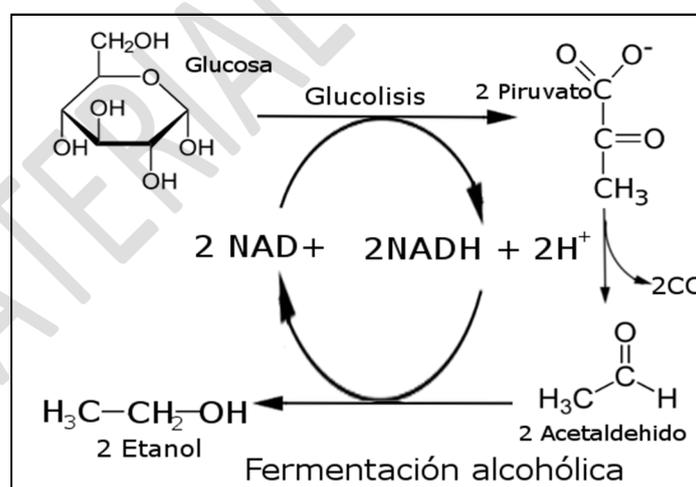


Figura 1: Esquema de la ruta de producción de etanol en la fermentación alcohólica

Fuente: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fermentacion-alcoholica.png>

La fermentación alcohólica es un proceso complejo donde intervienen un gran número de enzimas producidas por diversas clases de microorganismos. Tienen lugar una serie de descomposiciones de proteínas y otros compuestos presentes en el mosto con lo que, además

de los compuestos anteriores, producen una gran variedad de alcoholes, ácidos, aldehídos, ésteres, aminoácidos, amidas y sales orgánicas.

Se debe considerar que el etanol va aumentando de concentración durante el proceso de fermentación y debido a que es un compuesto tóxico, cuando su concentración alcanza aproximadamente un 12% de volumen las levaduras tienden a morir. Esta es una de las razones fundamentales por las que las bebidas alcohólicas no destiladas no alcanzan valores superiores a los 20% de concentración de etanol. (Fermentacionalcoholica.com, s.f.).

2.2. FERMENTACIÓN LÁCTICA

Las bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico (BAL) son bacterias grampositivas. Todas ellas tienen en común el hecho de producir ácido láctico a partir de azúcares debido a su metabolismo exclusivamente fermentativo. Por eso son anaerobias, si bien toleran el oxígeno. Son, por tanto, anaerobias aerotolerantes. Desde el punto de vista metabólico, tienen unos requerimientos nutritivos complejos (aminoácidos, vitaminas, etc.) (Bordons & Reguant).

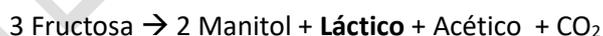
Las bacterias acidolácticas involucradas en las fermentaciones pueden metabolizar los azúcares siguiendo dos rutas importantes (Montano, de Castro, & Rejano, 1992):

1. Las bacterias **homofermentativas u homolácticas** metabolizan las hexosas a través de la ruta glucolítica o vía de Embden-Meyerhof-Parnas, para dar ácido láctico casi exclusivamente como producto final. La reacción global es:



2. Las bacterias **heterofermentativas o heterolácticas** carecen de la enzima aldolasa, por lo que producen un mol de ácido láctico, un mol de etanol (o ácido acético) y un mol de CO₂ a partir de un mol de glucosa.

La fructosa puede ser metabolizada a través de la ruta heterofermentativa de forma análoga a la glucosa, pero también puede funcionar como un aceptor de electrones adecuado llevando a cabo la oxidación del NADH; como resultado, una gran parte de la fructosa se reduce a manitol. Las posibles reacciones globales son:



2.3. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

El papel beneficioso más conocido de las bacterias lácticas en los vinos es la fermentación maloláctica (FML), que da lugar a una desacidificación del vino. El mosto de la mayoría de las uvas, excepto los de climas muy cálidos, contiene una cierta cantidad de ácido L-málico (1-5 g/L), que tiene un sabor fuerte y áspero. Normalmente, después de la fermentación alcohólica, si bien muy ocasionalmente de forma simultánea a esta, bacterias lácticas como *Oenococcus oeni* pueden realizar esta FML, que consiste en la descarboxilación del L-málico en L-láctico, con desprendimiento de CO₂ que aparece como pequeñas burbujas en el vino. Esta reacción es llevada a cabo porque dichas bacterias sintetizan la **enzima maloláctica**, que requiere Mn²⁺ y NAD⁺. Ya que el málico es dicarboxílico y el láctico es monocarboxílico, esto conlleva una reducción de la acidez, de 0,1 a 0,5 unidades de pH.

2.4. FERMENTACIÓN ACÉTICA

Esta fermentación la pueden realizar diversos microorganismos con capacidad para producir ácido acético a partir de varios sustratos que contienen **etanol**, pero a escala industrial, se emplean principalmente las bacterias del género *Acetobacter*, también conocidas como bacterias acéticas, por su alta capacidad de producción de metabolito. En la fermentación actúan varias especies de bacterias acéticas, las que se han detectado en mayor proporción son *Acetobacter aceti*, *A. rancens* y *A. oxydans*. Se trata de bacterias gramnegativas, bacilares o pleomórficas y estrictamente aerobias

La producción de ácido acético es una oxidación incompleta más que una auténtica fermentación, debido a que el poder reductor que se produce se transfiere al oxígeno. La primera etapa de oxidación a partir de etanol conduce a acetaldehído mediante una alcohol-deshidrogenasa específica de NAD⁺ o NADP⁺. Luego se da una hidratación a acetaldehído hidrato y una segunda oxidación con acetaldehído deshidrogenasa a ácido acético.

2.5. FERMENTACIÓN PROPIÓNICA

Las bacterias que presentan este tipo de fermentación pueden utilizar tanto azúcares como lactato como puntos de partida. La ruta es un proceso complejo en el que se genera ácido acético, ácido succínico, ácido propiónico y CO₂ como productos finales, generando una molécula más de ATP.

Esta ruta fermentativa la presentan las bacterias del tipo *Propionibacterium* y otras anaerobias estrictas presentes en el rumen de herbívoros, llevando a cabo una fermentación secundaria de los productos de las fermentaciones lácticas primarias.

Industrialmente *Propionibacterium* es importante en la fermentación del queso para producir el tipo suizo: la fermentación propiónica utiliza en este caso el lactato producido en las fermentaciones lácticas primarias produciendo CO₂, responsable de los «ojos» del queso suizo, y acumulación de ácidos orgánicos de cadena corta responsables de algunas características organolépticas (Grupo de Investigación de Genética y Microbiología, 1995).

2.6. FERMENTACIÓN BUTÍRICA

Las responsables de esta fermentación son las bacterias de la familia Bacillaceae, del género *Clostridium*, destacando entre ellas la especie *Clostridium tyrobutyricum*. Es una bacteria no patógena, cuya presencia en la leche o los productos lácteos no constituye un riesgo para el consumidor. Es anaerobia obligada y, por lo tanto, incapaz de desarrollarse en presencia del aire.

La fermentación butírica se produce a partir de la lactosa o del ácido láctico con formación de ácido butírico y gas. Se trata de un proceso no deseable ya que causa diversos defectos en los quesos.

3. ALIMENTOS IMPLICADOS.

Los efectos de la fermentación en los alimentos son variados, pero entre ellos destacan su efecto conservante, el aumento del valor nutritivo de los alimentos y el incremento de su digestibilidad, así como la modificación de sus características.

Algunos de los principales alimentos en los que intervienen procesos fermentativos son:

3.1. PAN

Durante la elaboración del pan se produce una fermentación alcohólica realizada por las levaduras del género *Saccharomyces*. A la masa se le añade una cierta cantidad de levadura que fermentará el almidón de la harina, generando burbujas de CO₂ y haciendo que el pan sea más esponjoso. El alcohol producido desaparece durante el proceso de cocción.

La fermentación de la masa de pan se acelera mediante el empleo de una mayor proporción de levaduras a temperaturas más elevadas. El uso de amilasas microbianas libera azúcares fermentables a partir de los granos de almidón, proporcionando así azúcares a las levaduras para que fermenten. La liberación de burbujas de dióxido de carbono, eleva la masa de pan y le da su textura característica. Las proteasas microbianas, además, hidrolizan parcialmente las proteínas del gluten de trigo, facilitando la manejabilidad de la masa, incrementando el volumen de la hogaza y mejorando su forma.

3.2. VINO Y OTRAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS:

La fermentación alcohólica se trata de un proceso de gran importancia industrial que, dependiendo del tipo de levadura y del sustrato, dará lugar a una gran variedad de bebidas alcohólicas: cerveza, vino, sidra, etc.

La fermentación es la parte principal del proceso de la elaboración del vino y tiene como principal efecto la conversión de los azúcares del mosto en alcohol etílico.

La principal fermentación del vino es la alcohólica, producida por las levaduras, pero como el mosto y los recipientes donde tiene lugar la vinificación no son estériles, además de las levaduras (autóctonas o inoculadas) también hay otros microorganismos, como las bacterias acéticas y las bacterias lácticas. El papel beneficioso más conocido de las bacterias lácticas en los vinos es la fermentación maloláctica, que da lugar a una desacidificación del vino (Bordons & Reguant).

3.3. VINAGRES

La producción de ácido acético a partir de líquidos alcohólicos se conoce desde hace tanto tiempo como la producción de vino (unos 10.000 años). Los primeros vinagres fabricados industrialmente seguían procesos lentos en los que flotaba una película de bacterias sobre la superficie del vino, pero ya en el siglo XIX se modificaron los procesos en superficie hacia procesos más rápidos. Uno de ellos, el proceso del generador de goteo, se utiliza todavía en la actualidad. El material de partida se rocía sobre la superficie de un biorreactor de madera lleno de virutas de haya y se deja gotear a través de dichas virutas (que contienen bacterias) hasta el fondo del recipiente donde la solución parcialmente convertida es enfriada y bombeada de vuelta a la parte superior. A medida que el alcohol pasa a través de las virutas, las bacterias acéticas (*Acetobacter* y *Gluconobacter*) oxidan parte del alcohol a ácido acético. Este proceso se

repite hasta que se obtiene el vinagre con la fuerza deseada. Al ser un proceso aeróbico se debe suministrar abundante aire a través de la cámara. Además, la temperatura se debe mantener entre 15°C y 34°C que es el rango óptimo de crecimiento de *Acetobacter* (Compositae, 2014).

3.4. PRODUCTOS LÁCTEOS

La leche tiene unos cultivos lácticos que permiten convertir sus azúcares en ácidos, permitiendo de esta forma que la leche pueda preservarse durante períodos mayores. Este proceso hace que las propiedades de la leche cambien sustancialmente dando lugar a una nueva gama de productos: productos fermentados de la leche gracias a la acción de las bacterias del ácido láctico (BAL).

Todos los productos lácteos contienen bacterias lácticas vivas, a menos que se haya procedido a su pasteurización tras la fermentación (Compositae, 2014).

En el caso del **yogur**, su proceso de fabricación comienza con la coagulación por la acción conjunta de cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. La adición de estas bacterias en la dosis adecuada inicia la fermentación. A continuación, se incubaba a 42-45°C durante 2 horas, con posterior enfriamiento.

La transformación más importante es la fermentación láctica, que transforma la lactosa de la leche en ácido láctico, lo que da lugar a una acidificación del producto. El descenso en el pH dificulta el desarrollo de microorganismos indeseables y conlleva una solubilización del calcio y fósforo asociado a las caseínas, de modo que estas caseínas libres precipitan formando un coágulo fino. Por su parte, las grasas sufren una predigestión, transformándose en sustancias más sencillas y digeribles por parte de nuestro organismo. Todos estos procesos, además de hacer que el yogur sea un producto más digerible que la leche líquida, también determinan su sabor, aroma y consistencia final.

Las enzimas proteolíticas de los microorganismos rompen las proteínas en péptidos y aminoácidos, manteniéndose la composición en aminoácidos con respecto a la leche y las enzimas lipolíticas de las bacterias lácticas hidrolizan la grasa en una pequeña proporción, dando lugar a ácidos grasos libres.

En el caso del **queso**, la transformación a partir de la leche comprende tres etapas. En la primera de ellas la leche se **coagula**, pasando de un estado líquido a sólido como resultado de la modificación físico-química de las proteínas de la leche gracias a la acción del ácido láctico y/o de enzimas proteolíticas. La etapa del **desuere** es la separación del lactosuero del coágulo, obteniéndose queso sin madurar o queso fresco. Por último, la etapa de **maduración** consiste en el conjunto de transformaciones bioquímicas de los componentes del queso por la acción de enzimas, en gran parte **de origen microbiano**. Se pueden emplear varias técnicas en el proceso de maduración. La maduración puede producirse desde el exterior al interior, por la acción de bacterias y levaduras superficiales, o bien puede producirse una maduración en toda la masa, por microorganismos internos. En esta fase se produce la rotura de la materia grasa (lipólisis), cuya principal consecuencia es la formación de compuestos aromáticos y ácidos grasos de cadena corta que poseen un gusto y aroma muy característicos.

En la industria quesera, las fermentaciones de mayor interés son la **láctica y la propiónica**, mientras que la butírica y la debida a microorganismos coliformes son no deseables y causan diversos defectos en los quesos.

3.5. PRODUCTOS VEGETALES. ENCURTIDOS

En diversas culturas se consumen vegetales fermentados a base de col, rábanos, pepinillos, nabos y remolachas, siendo las bacterias lácticas las responsables de esta acción. La adición de sal es indispensable para llevar a cabo el proceso de fermentación. La sal ayuda a que los alimentos pierdan agua por presión osmótica favoreciendo su conservación e inhibiendo el desarrollo de microorganismos indeseables. La sal penetra en los tejidos vegetales y salen carbohidratos, compuestos nitrogenados, minerales y otras sustancias que son utilizadas durante la fermentación. En la salmuera se desarrolla una microbiota mixta en la que predominan las bacterias lácticas. Éstas acidifican el medio y bajan el pH lo suficiente para prevenir el desarrollo de microorganismos patógenos y alteradores sin descomponer celulosa o proteína. Las bacterias lácticas producen metabolitos que mejoran considerablemente el sabor tales como ácidos láctico, acético y propiónico, así como diacetilo. La fermentación también mejora la calidad nutricional de los alimentos incrementando la digestibilidad, por ejemplo el ácido láctico puede mejorar la asimilación de calcio, hierro, fósforo y vitamina D, y eliminando compuestos tóxicos.

Las bacterias lácticas se encuentran en baja proporción en la microbiota autóctona de vegetales, pero puede fortalecerse con una apropiada inoculación. Los géneros más comúnmente encontrados son *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Las bacterias lácticas aisladas de vegetales son más resistentes a jugos gástricos y bilis que las derivadas de fuentes animales, por lo que estas bacterias se consideran una fuente de probióticos para consumo humano (Shirai Matsumoto & Malpica Sánchez, 2013).

3.6. EMBUTIDOS

Los embutidos son productos cárnicos fermentados. Como ejemplo el chorizo, tradicional en España, presenta una amplia gama de variedades en las distintas zonas del país. En el desarrollo de sus características finales participan de forma activa especies microbianas propias de estos productos fermentados, como son las bacterias lácticas y las micrococáceas.

Las bacterias lácticas crecen espontáneamente en el chorizo, y su desarrollo se favorece frente a otras bacterias indeseables por la adición de sal, azúcar y nitrito, por la utilización de bajas temperaturas, y por el descenso del potencial de óxido-reducción.

Debido a su capacidad para fermentar los azúcares, se produce ácido láctico como principal y a veces único metabolito final, que proporciona un pH ácido al medio favoreciendo la conservación del producto y permitiendo al mismo tiempo la gelificación de las proteínas cárnicas y por lo tanto la adquisición de una textura adecuada. Además, el pH ácido favorece la oxidación del nitrito a óxido nítrico, facilitando el desarrollo del color rojo de curado. Por otra parte, los micrococcos intervienen activamente en el desarrollo del color típico de estos productos, evitando enranciamiento y decoloraciones y favoreciendo también la aparición de su aroma y sabor característicos (González-Fernández, Santos, Jaime, & Rovira, 1997).

4. CULTIVOS INICIADORES

Un cultivo estárter consiste en una especie o combinación de especies microbianas que, una vez adicionados a un producto, originan un conjunto de transformaciones en los componentes básicos (glúcidos–proteínas–lípidos) con un resultado final que se manifiesta en el cambio de la textura, color y sabor del producto final, incrementando su poder de conservación y en ocasiones aportan efectos beneficiosos para la salud del consumidor (probióticos). Los microorganismos empleados como cultivos estárter pueden ser bacterias, levaduras y mohos individualmente o una mezcla de ellos (Cabeza Herrera).

La adición directa de cultivos iniciadores selectos para dirigir las fermentaciones alimentarias permite un buen control del proceso fermentativo y, además, favorece la estandarización de los productos finales. Sin embargo, los microorganismos aislados de ecosistemas tan complejos como los alimentos fermentados tradicionales suelen exhibir una gama de actividades metabólicas mucho más rica que la que poseen los cultivos industriales. En este contexto, existe una tendencia reciente que aboga por el aislamiento de cepas salvajes a partir de productos tradicionales para ser utilizadas como nuevos cultivos iniciadores funcionales en la fermentación de alimentos y bebidas evitando así la pérdida de ciertas características organolépticas singulares del producto (Probisearch, s.f.).

Los principales grupos empleados como cultivos estárter son:

1. **Bacterias de utilidad:** empleadas en industria láctea, cárnica, vegetales y cereales. Incluye:
 - 1.1. Bacterias ácido-lácticas homo y heterofermentativas (BAL) de las familias *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*
 - 1.2. Bacterias acéticas de la familia *Acetobacteriaceae* (Géneros *Acetobacter*, *Acetomonas* y *Gluconobacter*)
 - 1.3. Bacterias reductoras de nitratos de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* entre otras.
2. **Levaduras** empleadas en cervecería, vinificación, destilería, panificación y elaboración de alimentos orientales a base de cereales de los géneros:
 - 2.1. *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. boulardii*)
 - 2.2. *Cándida* (*C. utilis*)
 - 2.3. *Debaryomyces*
 - 2.4. *Kluyveromyces* (*K. fragilis*)
3. **Mohos** para elaboración de quesos, productos de charcutería y alimentos orientales a base de cereales (arroz y soja) de los géneros:
 - 3.1. *Penicillium*
 - 3.2. *Aspergillus*
 - 3.3. *Rhizopus*
 - 3.4. *Geotricium*

En el proceso general de elaboración y propagación de los cultivos estériles empleados a gran escala se emplean varios tipos de cultivo:

El *cultivo madre*, es el cultivo puro o mezcla de especies de cultivos que es propagado en volúmenes pequeños de 100 a 500 ml bajo condiciones controladas de temperatura y tiempo de incubación, puesto que serán utilizados para inocular en volúmenes más grandes.

El *cultivo intermedio* es aquel que se destina a aumentar la cantidad de inóculo contenido en el cultivo madre para la elaboración de productos fermentados a gran escala. En la pequeña industria este cultivo es sinónimo de cultivo industrial. La cantidad de inóculo se prepara de acuerdo a las necesidades de producción. La inoculación se hace a partir del último cultivo madre propagado.

El *cultivo industrial* es el que se adiciona directamente al sustrato destinado a un determinado producto fermentado. Su preparación se hace a partir del cultivo intermedio. El volumen que se va a preparar depende de las necesidades de producción.

Algunas aplicaciones de los cultivos estériles son:

1. La producción de alcohol para industria vinícola y cervecera:

En el caso del vino, a escala industrial el inicio de la fermentación se logra inoculando el zumo de la uva con un cultivo de *S. cerevisiae*. Posterior a la fermentación alcohólica, se puede desarrollar una fermentación maloláctica, llevada a cabo por *Leuconostoc* (BAL) o por sus enzimas, para transformar el ácido L-málico en ácido L-láctico y CO₂.

En el caso de la cerveza, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se sitúan en superficie y se emplea para la producción de cerveza tipo ALE (fermentación alta). Por otra parte *Saccharomyces uvarum* (o *Saccharomyces carlsbergensis*) caen al fondo de la cuba al final de la fermentación y se emplea para la obtención de cerveza tipo LAGER (de fermentación baja)

2. La producción de derivados lácteos como el yogurt y quesos.

Con respecto a estos últimos, es importantísimo el papel que desempeñan los mohos y otras bacterias, adicional al papel de las BAL (por ejemplo las propiónicas):

Penicillium camemberti (sinónimo de *P. caseicolum*) se emplea para la elaboración de quesos de pasta blanda y corteza florida como el Camembert o el Brie. Durante la maduración de estos quesos *Penicillium* consume el ácido láctico producido por las BAL desacidificando la cuajada y además producen sustancias que modifican el sabor y aroma de los diferentes quesos.

Penicillium roqueforti (sinónimo de *P. glaucum*) es empleado en la producción de los denominados quesos de pasta azul como el queso Roquefort o Gorgonzola. Estos mohos participan en la maduración de los quesos por medio de sus enzimas proteolíticas y, sobre todo, por sus enzimas lipolíticas. En su acción liberan ácidos grasos a partir de los lípidos, que posteriormente son oxidados a metil-cetonas, que a su vez se reducen a alcoholes secundarios. De esta forma se origina el particular aroma de los quesos de pasta azul.

Las bacterias propiónicas (*Propionibacterium schermanii*, *P. freudenreichii*, *P. pentosaceum*, *P. arabinosum*, etc.) son importantes para la producción de quesos de pasta cocida como Gruyère o Emmental. En este caso las bacterias transforman el ácido láctico y los lactatos resultantes de la fermentación por BAL en CO₂, acetato (ácido acético) y ácido propiónico (propionato), y menores cantidades de otros ácidos como el isovalérico, succínico y láctico.

3. La producción de embutidos:

Este tipo de derivados se obtiene por la acción principal de las BAL (principalmente lactobacilos y pediococos).

Se emplean algunas levaduras y mohos en la elaboración de salchichón y salamis para lograr la capa blanca que recubre la superficie de estos productos. Por otro lado, también aportan modificaciones del sabor y olor por actividad de sus enzimas lipolíticas y proteolíticas.

En embutidos fermentados se emplean bacterias de la familia Micrococcaceae (*Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus*, o *S. simulans*), que constituyen un grupo importante en los cultivos estarter empleados en esta industria, ya que reducen los nitros a nitritos (mejorando el color del producto e inhibiendo el crecimiento de *Clostridium botulinum*). También cumplen un importante papel en la lipólisis ya que sintetizan aromas esenciales para la calidad organoléptica del producto. Su catalasa destruye los peróxidos responsables de los defectos de coloración y de sabores rancios.

4. Elaboración de vegetales fermentados:

En este tipo de productos participan activamente las BAL (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus rhamnosus* y *Pediococcus cerevisiae*). Los principales productos vegetales obtenidos son las coles, pepinillos y aceitunas.

5. Producción de vinagre:

Las bacterias acéticas son importantes para la producción de vinagre. Sin embargo según la experiencia obtenida en la industria, para la producción de vinagre es mejor utilizar cepas que no se han obtenido de cultivos puros, ya que la conservación de la capacidad de estas cepas para la fermentación se ve reducida cuando se mantienen en cultivos. Las principales bacterias empleadas en esta industria pertenecen a la familia Acetobacteriaceae (Géneros *Acetobacter* spp., *Acetomonas* spp., *Gluconobacter* spp)

La funcionalidad de los cultivos estarter no radica solamente en la transformación y obtención de alimentos fermentados, otras importantes propiedades son:

1. La producción de sustancias antimicrobianas (por ejemplo bacteriocinas por BAL o lisostafina por cepas modificadas de *Penicillium nalgiovense* o BAL)
2. Mejoran de los procesos de producción y los hacen más robustos.
3. Ventajas tecnológicas
4. Obtención de productos beneficiosos para la salud

5. BIBLIOGRAFÍA

Báñez Sanz, J. M. (sf). *Tema 1. Biotecnología*. Universidad de Valladolid.

Bordons, A., & Reguant, C. (s.f.). *Bioquímica de las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica*. (R. d. (SESBE), Ed.) Obtenido de <https://revista.sebbm.es/articulo.php?id=214&url=bioquimica-de-las-bacterias-lacticas-del-vino-y-la-fermentacion-malolactica>

Cabeza Herrera, E. A. (s.f.). Cultivos estándar: seguridad funcionalidad y propiedades tecnológicas.

Compositae. (Abril de 2014). *Capítulo 3 Fermentación de productos industriales*. Obtenido de https://compositae.files.wordpress.com/2014/04/mt_procb03_unid.pdf

Fermentacionalcoholica.com. (s.f.). Obtenido de <https://sites.google.com/site/fermentacionalcoholica/quimica-de-la-fermentacion-alcoholica-glucolisis>

González-Fernández, C., Santos, I., Jaime, I., & Rovira, J. (1997). Utilización de cultivos iniciadores en la elaboración de chorizo y su influencia en las propiedades sensoriales. *Food Science and Technology International*, 3, 31-42.

Grupo de Investigación de Genética y Microbiología. (22 de Noviembre de 1995). *Universidad de Navarra*.

Montano, A., de Castro, A., & Rejano, L. (1992). Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Grasas y Aceites*, 43(6), 352-360.

Probisearch. (s.f.). Obtenido de <http://www.probisearch.com/>

Shirai Matsumoto, K., & Malpica Sánchez, F. P. (1 de Septiembre de 2013). *Manual de prácticas de laboratorio. Tecnología de Fermentaciones Alimentarias*. Recuperado el 09 de Octubre de 2016, de UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA: <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/fermentaciones.pdf>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 47

ADITIVOS ALIMENTARIOS I CONSERVANTES, AROMATIZANTES, EDULCORANTES. DEFINICIÓN. CLASIFICACIÓN. LISTAS POSITIVAS. 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

3. LISTAS POSITIVAS

4. NORMATIVA APLICABLE

5. MÉTODOS DE ANÁLISIS

5.1. Criterios de pureza

5.2. Análisis

MATERIAL NO OFICIAL

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”

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.

Según los Reglamentos (CE) nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios, define:

- **Conservantes o Conservadores:** 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.
- **Aromas:** El Reglamento (CE) nº 1334/2008 sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos define aromas como los productos no destinados al consumo como tales y que se añaden a los alimentos para darles un olor o un sabor o para modificar su olor o sabor.
- **Edulcorantes:** 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.

2. CLASIFICACIÓN

Conservantes

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 antimicrobiano 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.

Aromatizantes:

Las sustancias aromatizantes se pueden clasificar según lo establecido en el Reglamento (CE) nº 1334/2008 en:

- sustancias aromatizantes: sustancias químicas definidas que posean propiedades aromatizantes.
- sustancias aromatizantes naturales: aquellas sustancias aromatizantes que están presentes de manera natural y que han sido identificadas en la naturaleza. Se obtienen a partir de materias de origen vegetal, animal o microbiológicas, en estado natural o transformadas para el consumo humano (utilizando los procedimientos tradicionales de preparación de alimentos enumerados en el Anexo II), por medio de procedimientos físicos, enzimáticos o microbiológicos apropiados.
- preparaciones aromatizantes: productos, distintos de las sustancias aromatizantes, obtenidos mediante procedimientos físicos, enzimáticos o microbiológicos apropiados a partir de:
 - alimentos en estado natural o transformados para el consumo humano por procedimientos tradicionales de preparación de alimentos (Anexo II).

- materiales de origen vegetal, animal o microbiológico, distinto de los alimentos, tomados como tales o preparados mediante uno o varios de los procedimientos tradicionales de preparación de alimentos (Anexo II).
- aromas obtenidos por tratamiento térmico: productos obtenidos por calentamiento de una mezcla de ingredientes, que en sí mismos no posean necesariamente propiedades aromatizantes, entre los que se encuentren, al menos, una sustancia con un grupo amino y un azúcar reductor. Deben cumplir las condiciones que figuran en el Anexo V. Los ingredientes utilizados, que no tienen por qué tener propiedades aromatizantes por sí mismos, pueden ser:
 - alimentos.
 - materiales de base no alimentarios.
- aromas de humo: productos obtenidos mediante fraccionamiento y purificación de humo condensado que produce:
 - condensados de humo primarios: base acuosa purificada del humo condensado.
 - fracciones primarias de alquitrán: fracción purificada del alquitrán insoluble del humo condensado.
 - aromas de humo derivados: aromas obtenidos a partir del tratamiento de los productos primarios. Se destinan a su utilización en productos alimenticios o en la superficie de los mismos.
- precursores de aromas: productos que no tienen necesariamente propiedades aromatizantes por sí mismos, pero que se añaden a los alimentos para que, durante su transformación, den lugar a un aroma. Pueden obtenerse a partir de alimentos o de materiales de base no alimentarios.
- otros aromas: aromas no incluidos en las definiciones anteriores.

Edulcorantes

Los conservantes 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).

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:

- se pueda demostrar una necesidad tecnológica suficiente y cuando el objetivo que se busca no pueda alcanzarse por otros métodos económica y tecnológicamente utilizables.
- 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.
- 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** y del anexo I del **Reglamento (CE) 1334/2008** (en el caso de los aromas) podrán comercializarse como tales y utilizarse en alimentos, en las condiciones de utilización que en él se especifican.

4. 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 1334/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos.
3. 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).
4. 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.
5. 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

5.1. Criterios de pureza

El Reglamento (UE) 231/2012 establece especificaciones para los aditivos alimentarios indicando unos criterios de pureza determinados. En el caso de los conservantes basados en ácido sórbico los criterios de pureza son contenido en agua, cenizas sulfatadas,

contenido en aldehídos y contenido en arsénico, mercurio y plomo. En el caso de los derivados del ácido benzoico se determina además del contenido en arsénico, mercurio y plomo, el contenido en compuestos orgánicos clorados, ácidos policíclicos y sustancias fácilmente oxidables.

En la composición de los edulcorantes se debe controlar el contenido en las impurezas propias de cada tipo de edulcorante, que proviene de su método de síntesis y aislamiento.

No todos los aditivos tienen los mismos criterios de pureza. Los parámetros más frecuentemente controlados, entre otros, son:

- Humedad (determinación tras secado en estufa o método Karl Fischer)
- Cenizas sulfatadas (residuo tras incineración a 600°C en presencia de H₂SO₄)
- Pérdida por desecación (Secado a 105°C durante 4 horas)
- Acidez o Alcalinidad
- Cloruros
- Sulfuros
- Fluoruros
- Arsénico, Plomo, Mercurio (Espectrofotometría de Absorción Atómica)
- Metales pesados (Espectrofotometría de Absorción Atómica)

5.2. Análisis

El contenido máximo de los aditivos en los distintos alimentos está regulado por el Reglamento (CE) N° 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 SO₂ mediante reflujo con una solución de HCl. El SO₂ generado se arrastra con nitrógeno y reacciona con peróxido de hidrógeno que lo oxida a ácido sulfúrico. El H₂SO₄ 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.

Aromatizantes

El análisis de aromas en alimentos es complejo debido a que son sustancias volátiles que se encuentran en bajas concentraciones. Las técnicas empleadas para su determinación son la cromatografía de gases con detector FID y cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 48

ADITIVOS ALIMENTARIOS II OTROS ADITIVOS. MODIFICADORES DE PROPIEDADES FÍSICAS. POTENCIADORES DE SABOR. DEFINICIÓN. CLASIFICACIÓN. LISTAS POSITIVAS. 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. INTRODUCCIÓN

2. CLASIFICACIÓN

- 2.1. Sustancias que modifican características organolépticas
- 2.2. Sustancias que impiden que se produzca alteraciones de tipo químico o biológico
- 2.3. Sustancias estabilizadoras del aspecto y las características físicas
- 2.4. Sustancias correctoras de las cualidades plásticas

3. LISTAS POSITIVAS

4. NORMATIVA APLICABLE

5. MÉTODOS DE ANÁLISIS

- 5.1. Criterios de pureza
- 5.2. Análisis

MATERIAL NO OFICIAL

1. INTRODUCCIÓN

Cómo se señaló en el tema 47, los aditivos alimentarios están regulados por el El Reglamento (CE) nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios.

En este Reglamento se 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”.

En este tema nos centramos en los aditivos alimentarios que no incluyen a los conservantes, edulcorantes y aromatizantes. En este tema trataremos, pues, de los aditivos clasificados como colorantes, acidulantes, potenciadores del sabor, antioxidantes, antiaglomerantes, antiespumantes, emulgentes, espesantes, estabilizantes y humectantes.

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 se pueden clasificar atendiendo al efecto que producen sobre el alimento en:

2.1. Sustancias que modifican características organolépticas

Aparte de los edulcorantes y aromatizantes tendríamos:

Colorantes (E1xx)

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.

Según las leyes alimentarias, los alimentos con colorantes no se analizan únicamente para comprobar el tipo de colorante utilizado, sino principalmente, también para juzgar un posible engaño a los consumidores.

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.

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.

Potenciadores del sabor (E6xx)

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.

2.2. Sustancias que impiden que se produzca alteraciones de tipo químico o biológico

Aparte de los conservantes estudiados en el tema 47, existen otros aditivos que tienen funciones correctoras de la acidez y funciones antioxidantes. En muchos casos un mismo aditivo puede tener funciones conservantes, antioxidantes y/o acidulantes.

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.

Antioxidantes (E3xx)

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.

2.3. Sustancias estabilizadoras del aspecto y las características físicas

Antiaglomerantes

Son sustancias que reducen la tendencia de las partículas de un producto alimenticio a adherirse unas a otras.

Antiespumantes

Son sustancias que impiden o reducen la formación de espuma.

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.

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.

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.

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.

2.4. Sustancias correctoras de las cualidades plásticas

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.

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

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:

- se pueda demostrar una necesidad tecnológica suficiente y cuando el objetivo que se busca no pueda alcanzarse por otros métodos económica y tecnológicamente utilizables.
- 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.
- 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** y del anexo I del **Reglamento (CE) 1334/2008** (en el caso de los aromas) podrán comercializarse como tales y utilizarse en alimentos, en las condiciones de utilización que en él se especifican.

4. 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

5.1. Criterios de pureza

El Reglamento (UE) 231/2012 establece especificaciones para los aditivos alimentarios indicando unos criterios de pureza determinados.

En términos generales, los parámetros más frecuentemente controlados, entre otros, son:

- Humedad (determinación tras secado en estufa o método Karl Fischer)

- Cenizas sulfatadas (residuo tras incineración a 600°C en presencia de H₂SO₄)
- Pérdida por desecación (Secado a 105°C durante 4 horas)
- Acidez o Alcalinidad
- Cloruros
- Sulfuros
- Fluoruros
- Metales (Espectrofotometría de Absorción Atómica)
- Compuestos orgánicos clorados

Además, frecuentemente los aditivos contienen impurezas procedentes de su síntesis o del proceso de aislamiento que requieren ser controladas y por lo tanto analizadas. Normalmente debido a su baja concentración en las muestras, se debe acudir a las técnicas de cromatografía de líquidos o gases acopladas a detector de masas.

5.2. Análisis

El contenido máximo permitido de cada tipo de aditivos en distintos productos alimentarios está regulado por el Reglamento (CE) N° 1333/2008 por lo que es necesario realizar su análisis.

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.

De igual forma que en el caso de los conservantes, el análisis de muchos acidulantes y antioxidantes se puede realizar mediante cromatografía de gases o mediante cromatografía de líquidos con detección UV.

BIBLIOGRAFÍA

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 49

**MICROBIOLOGÍA APLICADA AL ANÁLISIS DE PRODUCTOS
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. 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 ALIMENTICIO.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 50

**CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. TIPOS. 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. TIPOS

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. TIPOS.

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 despiece 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 envoltorio 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:

- Especies 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, chópéd 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 chópéd, 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 P₂O₅, 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 α -nactilamina, se lee la intensidad de la coloración mediante colorimetría o espectrofotometría. El contenido en nitritos de la muestra se expresa en ppm de NO_2Ca .

- 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 glicina, 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

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 51

LECHE. 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

3. NORMAS DE CALIDAD

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.1. CONTROL DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LA LECHE

4.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA LECHE TRATADA TÉRMICAMENTE DESTINADA AL CONSUMO HUMANO DIRECTO

4.3. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS DE LECHE

4.4. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS DE DETERMINADOS TIPOS DE LECHE PARCIAL O TOTALMENTE DESHIDRATADA DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN HUMANA

5. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el *Reglamento (UE) 1308/2013*, 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**, entendida como leche que no haya sido calentada a más de 40°C, ni sometida a un 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 a un porcentaje comprendido entre un 1,5% (m/m) como mínimo 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.

La leche de consumo deberá tener las siguientes características:

- punto de congelación cercano al punto de congelación medio de la leche cruda en la zona de origen de la recogida.
- masa mayor o igual a 1,028 g/L en leche de 3,5% (m/m) de materia grasa a 20°C o el peso equivalente por litro cuando se trate de leche con contenido distinto de materia grasa.
- contenido mínimo de proteínas de 2,9%(m/m) en leche de 3,5%(m/m) de materia grasa, o concentración equivalente en caso de leche con contenido diferente de materia grasa.

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:
 - Leche concentrada. Son las privadas de parte de su agua de constitución hasta reducirlas a un cuarto o a un quinto de su volumen como máximo.
 - Leches desnatadas. Son las privadas parcial o totalmente de su contenido graso natural, con la modificación relativa de los demás componentes normales.
 - Leches fermentadas o acidificadas. Son aquellas modificadas por la acción microbiana o fermentos lácticos.

- Leches enriquecidas. Son las modificadas mediante la adición de determinados principios inmediatos, minerales y/o vitaminas.
- 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. Es la leche natural sometida a un proceso tecnológico que asegure la destrucción de los gérmenes y la inactividad de sus formas de resistencia.
- Leche evaporada. Leche esterilizada privada de parte de su agua de constitución.
- Leche condensada. Es la leche privada de parte de su agua de constitución y cuya conservación se consigue mediante la adición de sacarosa.
- Leche en polvo. Es el producto seco y pulverulento que se obtiene mediante la deshidratación de la leche natural, o de la total o parcialmente desnatada, higienizada.

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.

2. COMPOSICIÓN.

La leche cruda de los distintos mamíferos se compone de hidratos de carbono, grasas y proteínas, así como de vitaminas, sales minerales y otros componentes minoritarios. Esta mezcla es semejante en las diferentes especies, pero en distintas proporciones. La composición de la leche también varía en función de factores como la alimentación del animal. Puesto que las propiedades físico-químicas de la leche dependen de la composición de la misma, podemos encontrar diferencias entre la leche de vaca, oveja y cabra, sobre todo respecto a los valores de la densidad, punto de congelación y acidez, superiores en la leche de oveja al tener más sustancias sólidas y por tanto, más proteínas y menos agua.

En la leche cruda existen varias fases en las que se encuentran dispersos sus componentes:

- Emulsión de glóbulos grasos.
- Suspensión de caseína ligada a sales minerales.
- Solución acuosa (lactosuero) formada por lactosa, sales minerales y proteínas solubles.

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, siendo de alto valor biológico. Distinguimos varios grupos dentro de las proteínas que forman parte de la leche:
- **Caseínas**, que representan el 80% del total de las proteínas de la leche, están constituidas por gran número de aminoácidos esenciales como lisina o leucina. Existen cuatro tipos de caseínas: alfa (α), beta (β), kappa (κ) y gamma (γ). La caseína κ 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, que son agrupaciones en forma de pequeñas esferas.
 - **Proteínas del lactosuero o seroproteínas**, que suponen el 20% de las proteínas de la leche, como la α -lactoalbumina, la β -lactoglobulina o la lactoferrina. Se trata de proteínas solubles que se mantienen en disolución cuando las caseínas precipitan.
- c) **Hidrato de carbono.** El azúcar predominante en la leche, en torno al 5%, es la **lactosa**, un hidrato de carbono que sólo se encuentra en la leche. Se trata de un disacárido compuesto de glucosa y galactosa, de sabor dulce, sensible al calor, que puede ser fermentado por bacterias y que favorece la absorción del calcio a nivel intestinal.
- d) **Materia grasa.** Representa en torno al 4% de la leche y se encuentra en forma de pequeños glóbulos emulsionados en el suero. El tamaño de los glóbulos grasos de la leche varía con la especie. La leche de vaca es relativamente rica en ácidos grasos de cadena corta, lo que facilita su digestibilidad. Algunos de sus lípidos incluyen ácidos grasos que el ser humano no puede sintetizar, como linoleico y linoléico. También se observa una importante proporción de ácidos grasos saturados como mirístico, palmítico y esteárico.
- 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.** Algunas proceden de la propia leche mientras que otras son producidas por microorganismos que se hallan en la leche cuando se ordeña o por microorganismos que contaminan la leche después de su producción. Son indicadores del tratamiento térmico, de la calidad higiénica de la leche y de la especie de procedencia.
- g) **Vitaminas.** Contiene vitaminas del grupo B (riboflavina, B12, ácido fólico), vitamina A y D.

3. NORMAS DE CALIDAD.

- 1) **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.

- 2) **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.
- 3) **Real Decreto 1533/1991**, de 18 de octubre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos.
- 4) **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. El objeto de esta norma es regular la indicación obligatoria del origen de la leche utilizada como ingrediente en el etiquetado de la leche y de los productos lácteos elaborados en España que se comercializan en el territorio español. Incluye la leche procedente de todas las especies de animales de abasto. Se indicará el origen de la leche utilizada como ingrediente que represente un porcentaje superior al 50 por ciento, expresado en peso, 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, así como cuestiones relativas al etiquetado de estos productos. Define leche parcialmente deshidratada como el producto líquido, con o sin adición de azúcar, obtenido por eliminación parcial del agua de la leche, de la leche desnatada o parcialmente desnatada o de una mezcla de dichos productos, al que puede habersele añadido nata, leche totalmente deshidratada o ambos productos, sin que la cantidad de leche deshidratada adicionada supere en el producto final el 25% del extracto seco total procedente de la leche. La leche parcialmente deshidratada podrá ser de dos tipos: evaporada y condensada. Por su parte, la leche totalmente deshidratada (leche en polvo) se define como el producto sólido obtenido por eliminación del agua de la leche, de la leche desnatada o parcialmente desnatada, de la nata o de una mezcla de dichos productos, cuyo contenido de agua es igual o inferior al 5% en peso del producto final.
- 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. Esta norma tiene define las condiciones y características que debe reunir la leche de vaca concentrada para su comercialización y consumo en el mercado interior. Se entiende por leche concentrada la leche natural, entera, desnatada o semidesnatada, pasterizada y privada de parte de su agua de constitución. Se distinguen tres tipos: entera, desnatada y semidesnatada.

En cuanto a los factores de composición y calidad, debe cumplirse lo siguiente:

- a) **Características organolépticas.** El color será uniforme, ligeramente amarillento y tendrá un olor y sabor característicos.
- b) **Características físico-químicas intrínsecas.**
 - **Materia grasa de la leche.** Mínimo 11,75 por 100 m/m en leche concentrada entera, máximo 1,10 por 100 m/m en desnatada y entre 5,5 y 6,6 por 100 m/m en semidesnatada.

- Índices de la grasa de la leche: índice de refracción a 40°C (1,4540-1,4557), índice de Reichert (26-32), índice de Polenske (1-4) e índice de Kirchner (19-27).
- El límite mínimo de colesterol dentro de los esteroides será del 98 por 100 de la fracción esteróica del insaponificable, determinados por cromatografía gaseosa.
- Extracto seco magro. Valor mínimo de 30,15 por 100m/m en leche concentrada entera, 30,90 por 100 m/m en desnatada y 30,40 por 100 m/m en semidesnatada.
- Impurezas (prueba de filtración por disco de algodón): Grado 0.
- Prueba de fosfatasa: Negativa.

7) Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. El fin de esta normativa consiste en definir lo que se entiende por preparados para lactantes y preparados de continuación, destinados a los niños sanos y establecer los requisitos de composición y etiquetado de los mismos.

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

4.1. 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.

a) Antes de cargar la leche en la cisterna, se verificarán determinados parámetros a fin de comprobar que reúne las condiciones higiénico-sanitarias adecuadas. Consistirá en:

- Inspección visual para comprobar color, olor, apariencia de la leche y ausencia de contaminación macroscópica.
- Control de temperatura. La leche cruda en el tanque tendrá una temperatura máxima de 8°C en el caso de recogida diaria, y de 6°C si la recogida no se efectúa diariamente.
- Control de las condiciones de limpieza del tanque.
- En caso de sospecha de deterioro microbiológico se podrá realizar una prueba para determinar la acidez de la leche.
- Se analizará el punto crioscópico, grasa, proteína, extracto seco magro, células somáticas, colonias de gérmenes a 30°C y presencia de residuos de antibióticos. El laboratorio de análisis, que deberá estar acreditados según la versión en vigor de la ISO/IEC 17025, comunicará al titular de la explotación y al responsable del centro lácteo, los resultados analíticos del punto crioscópico, grasa, proteína y extracto seco magro y a la *base de datos letra Q*, los resultados del resto de determinaciones.

b) Controles en el centro lácteo en el que se descargue la cisterna. Consistirán en:

- Inspección visual para comprobar color, olor, apariencia de la leche y ausencia de contaminación macroscópica.

- Control de temperatura. La leche contenida en la cisterna no superará los 10°C.
- Control de las condiciones de limpieza de la cisterna.
- Determinación de la acidez de la leche o de su estabilidad al alcohol, con una gradación nunca inferior a 68°.
- Control de las condiciones de transporte hasta el centro lácteo de muestras de leche tomadas en la explotación. Una de las dos muestras tomadas de la cisterna se empleará en la determinación del punto crioscópico, grasa, proteína, extracto seco magro, células somáticas, colonias de gérmenes a 30°C y presencia de residuos de antibióticos. La otra muestra servirá para realizar in situ una prueba de detección de residuos de antibióticos. Cuando la primera prueba realizada resulte no conforme, se comunicará al responsable del centro lácteo y éste a la *base de datos Letra Q*.

4.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA LECHE TRATADA TÉRMICAMENTE DESTINADA AL CONSUMO HUMANO DIRECTO

La Decisión 92/608/CEE establece los métodos de referencia de análisis para la leche tratada térmicamente destinada al consumo humano directo, así como criterios de fidelidad que garanticen una interpretación uniforme de los resultados.

- 1) Materia seca.** Se entiende por contenido de sólidos totales de la leche el residuo, expresado en porcentaje en masa, obtenido después de la desecación por evaporación del agua de una porción de muestra en estufa de desecación a $102 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 2) Contenido en materia grasa.** Se entiende por contenido en materia grasa la relación en masa de las partes de materias grasas de la leche por cada 100 partes de la leche de que se trate, determinado por el método Roesse-Gottlieb, que consiste en la extracción de la materia grasa de una solución amoniacal-alcohólica de la muestra con ayuda de éter etílico y éter de petróleo, evaporación de los disolventes, pesada de los residuos solubles en éter de petróleo y cálculo en porcentaje de la muestra.
- 3) Contenido en materia seca no grasa total.** Este contenido 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.** Este procedimiento especifica el método de referencia para la determinación del contenido de nitrógeno total de la leche cruda y de la leche entera, parcialmente desnatada y desnatada. Se entiende por contenido de nitrógeno total de la leche el contenido de nitrógeno, expresado en porcentaje en masa, determinado mediante el método Kjeldahl que se especifica a continuación. Una cantidad pesada de la muestra de leche se digiere con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de sulfato de potasio y sulfato de cobre (II) como catalizador, con objeto de transformar el nitrógeno de los compuestos orgánicos en sulfato de amonio. El amoníaco se libera por la adición de solución de hidróxido de sodio, se destila y se absorbe en una solución de

ácido bórico. A continuación se valora con una solución ácida. Calcular el contenido de nitrógeno (WN), expresado en gramos de nitrógeno por 100 g de producto.

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, expresado en porcentaje en masa, determinado por el método anterior. De este modo, el contenido de proteínas de la leche, expresado en porcentaje en masa, es igual al 6,38 x contenido de N total de la leche en %.

6) Masa volúmica. Método de referencia para la determinación de la masa específica a 20°C de la leche cruda y de la leche entera, parcialmente desnatada y desnatada. El peso específico de la leche es la razón existente entre la masa de un volumen determinado de leche a 20°C y la masa del mismo volumen de agua a 20°C. El peso específico a 20°C se determina mediante un hidrómetro.

El resultado que figure en el informe del análisis será la media aritmética de los resultados de dos pruebas que satisfagan el criterio de repetibilidad establecido. Si no se satisface dicho criterio, la prueba deberá repetirse o su resultado quedará anulado. El informe del análisis debe indicar el método utilizado y los resultados obtenidos. Además, proporcionará toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.

4.3. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS DE LECHE.

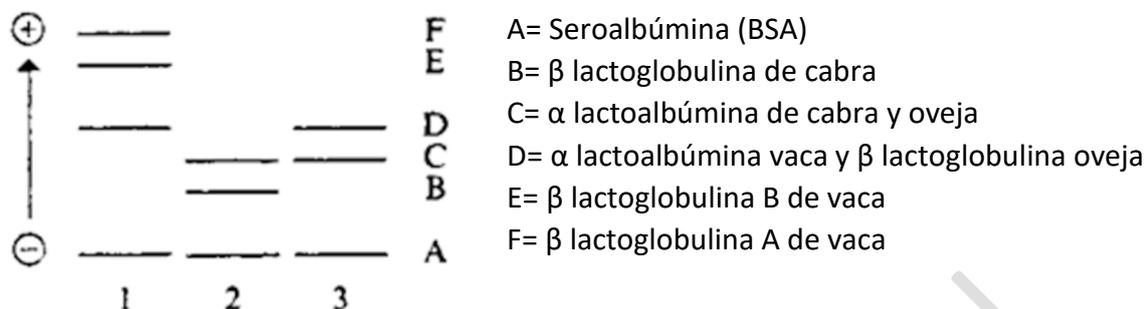
El Real Decreto 1533/1991 establece los métodos oficiales de análisis de leche.

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 α_1 de leche de vaca presenta mayor movilidad electroforética que las caseínas α_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.

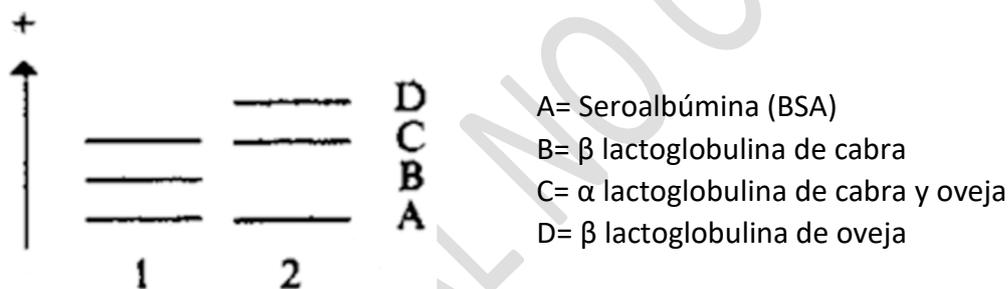
2) Determinación de leche de vaca en leche de oveja o de cabra por inmunodifusión radial (método inmunológico). Se basa en la precipitación de las inmunoglobulinas de la leche de vaca por la acción de un antisuero específico (inmunodifusión). Cuando la muestra contiene leche de vaca, se produce una reacción 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 β lactoglobulinas de leche de vaca presentan una mayor movilidad electroforética que las α lactoalbúminas y las β 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).



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 β lactoglobulina de leche de cabra presenta una menor movilidad electroforética que la α lactoalbúmina y la β 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).



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.

4.4. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS DE DETERMINADOS TIPOS DE LECHE PARCIAL O TOTALMENTE DESHIDRATADA DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN HUMANA.

La Orden de 26 de enero de 1989 establece métodos oficiales de análisis de determinados tipos de leche parcial o totalmente deshidratada destinados a la alimentación humana.

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.

- El extracto seco lácteo de los distintos tipos de leche condensada viene dado por el contenido en extracto seco total menos el contenido en sacarosa.

- El extracto seco lácteo no graso de los tipos de leche condensada viene dado por el contenido en extracto seco total menos el contenido en sacarosa y el de materia grasa.
 - El extracto seco no graso de los distintos tipos de leche evaporada y concentrada viene dado por el contenido en extracto seco total menos el contenido en materia grasa.
- 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).** El método se basa en el principio de inversión de Clerget: un tratamiento suave con un ácido hidroliza completamente la sacarosa. El contenido en sacarosa 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.** Se trata de una enzima que se encuentra adherida a la superficie de la membrana del glóbulo graso o asociada con lipoproteínas. El contenido de esta enzima aumenta de la fase calostrual en adelante. Al ser fuertemente 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 de la fosfatasa de la leche en polvo se puede determinar empleando el método de Sanders y Sager modificado o el método Aschaffenburg y Mullen.

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 deliberadamente 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 camosterol 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 β -lactoglobulinas de leche de vaca presentan una mayor movilidad electroforética que las α -lactoalbúminas y las β -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 poliacrilamina.
- *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.

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.

Real Decreto 1533/1991, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos.

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 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 1533/1991, de 18 de octubre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos.

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

<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 52

PRODUCTOS LÁCTEOS: QUESO, YOGUR, MANTEQUILLA. MÉTODOS DE ANÁLISIS. 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. PRODUCTOS LÁCTEOS

2.1. QUESO

2.1.1. Tipos de queso y denominaciones.

2.1.2. Ingredientes.

2.1.3. Normas de calidad.

2.2. YOGUR

2.2.1. Tipos de yogur y denominaciones.

2.2.2. Factores esenciales de composición y calidad.

2.3. MANTEQUILLA

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.1. QUESO

3.2. MANTEQUILLA

4. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES

1. INTRODUCCIÓN

Según el Reglamento (UE) 1308/2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios, se entenderá por *productos lácteos* los 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. PRODUCTOS LÁCTEOS.

2.1. QUESO.

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 CAE define cuajo como el extracto líquido, pastoso o en polvo procedente de la maceración de los cuajares de los rumiantes lactantes. En la elaboración del cuajo se permite la adición de sal mientras que se prohíbe adicionar productos que falseen el poder coagulante del mismo.

Todos los quesos elaborados en España deberán ajustarse a las disposiciones de esta norma. Aquellas variedades que tuvieran norma específica deberán, además, cumplir lo establecido en dicha norma. Como excepción, en los quesos amparados por Denominaciones de Origen Protegidas o Indicaciones Geográficas Protegidas prevalecerán las características establecidas en los pliegos de condiciones.

2.1.1. Tipos de queso y denominaciones.

La denominación de los quesos elaborados en España, a excepción de las variedades que tengan norma específica, los cuales utilizarán la denominación prevista en dicha norma, o los amparados por Denominaciones de Origen Protegidas o Indicaciones Geográficas Protegidas, en los que prevalecerán las características establecidas en los pliegos de condiciones, será *Queso* que deberá completarse, según corresponda, con las siguientes indicaciones:

a) Según el origen de la leche:

- Los quesos que se fabriquen con leche distinta de la de vaca, deberán incluir en su denominación la indicación de la especie que corresponda.
- Los quesos elaborados con mezcla de leche de dos o más especies, deberán incluir la indicación de las especies de las que proceda la leche en orden descendente de proporciones. Esta denominación podrá reemplazarse por *Queso de mezcla*.

b) Atendiendo a su maduración, los quesos se denominarán de la siguiente forma:

- **Queso fresco:** aquel dispuesto para el consumo al finalizar el proceso de fabricación.
- **Queso blanco pasteurizado:** aquel queso fresco en el que el coágulo obtenido se somete a un proceso de pasteurización, quedando dispuesto para el consumo al finalizar su proceso de fabricación.
- **Queso madurado:** aquel que, tras su fabricación, requiere cierto tiempo a temperatura y condiciones tales que se produzcan los cambios físicos y químicos característicos del mismo. La palabra madurado podrá sustituirse, según el grado de maduración alcanzado al salir de fábrica, por Tierno, Semicurado, Curado, Viejo y Añejo.
- **Queso madurado con mohos:** aquel en el que la maduración se produce como consecuencia del desarrollo de mohos en su interior, en la superficie o en ambas partes. Dicha denominación podrá sustituirse por la de *queso azul* o queso de *pasta azul*, cuando corresponda.

2.1.2. Ingredientes.

1) Ingredientes esenciales. Se incluyen en este grupo:

- Leche, leche total o parcialmente desnatada, nata y suero de mantequilla.
- Fermentos lácticos.
- Mohos, levaduras y cultivos microbianos adecuados para la maduración de quesos inoculados con ellos.

2) Ingredientes facultativos. Se incluyen en este segundo grupo:

- Cloruro sódico.
- Sustancias aromáticas autorizadas.
- Especies y condimentos, en proporción suficiente para caracterizar el producto, pero inferior al 30% m/m sobre el producto terminado.
- Sacarosa, y glucosa, solas o en combinación, exclusivamente en quesos frescos y quesos blancos pasteurizados, en dosis no superior al 17% m/m, quedando incluido este porcentaje en el 30% anterior.
- Gelatina en cantidad máxima de 5 g/Kg de queso y solamente en quesos frescos y quesos blancos pasteurizados.
- Leche en polvo, para el ajuste del extracto seco lácteo, en porcentaje máximo del 5% m/m sobre dicho extracto.

- Otros productos obtenidos de la leche y que sean propios de su composición, incluidos la caseína y los caseinatos, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche.

Queda expresamente 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.

Para el recubrimiento de los quesos podrán usarse, otros ingredientes utilizados en alimentación humana o, en su caso, aquellos autorizados de conformidad con el Reglamento (CE) 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. Exclusivamente para quesos madurados, en el tratamiento de la corteza podrán utilizarse ceras, parafinas, materiales poliméricos con o sin colorantes, aceites minerales especialmente preparados y otros materiales autorizados para tal fin.

2.1.3. Normas de calidad.

- a) 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".
- El contenido máximo de leche de vaca será de un 50%, mientras que el contenido mínimo de leche de cabra será del 15% y el mínimo de leche de oveja será del 15%.
 - Extracto seco mínimo del 55 por 100 m/m.
 - El contenido de cloruro sódico al final del proceso será como máximo del 2,5%.
- b) 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.
- 1. Queso Hispanico.** Se trata de un queso elaborado únicamente con leches de oveja y de vaca, pasterizadas o no.
- El contenido mínimo de leche de vaca será de un 50% en volumen y el contenido mínimo de leche de oveja será del 30% en volumen.
 - Materia grasa. Contenido mínimo en el extracto seco 45% m/m.
 - Extracto seco. Contenido mínimo 55% m/m.
- 2. Queso De la Mesta.** Se trata de un queso elaborado con leches de oveja, vaca y opcionalmente cabra, pasterizadas o no.
- El contenido mínimo de leche de oveja será de un 75% en volumen, el contenido mínimo de leche de vaca será del 15% en volumen y el contenido máximo de leche de cabra será del 5% en volumen.
 - Materia grasa. Contenido mínimo en el extracto seco 50% m/m.
 - Extracto seco. Contenido mínimo 55% m/m.

c) 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.

1. Queso Cheddar. Queso de tipo duro elaborado con leche de vaca que deberá estar pasteurizada. No debe presentar ojos debidos a la formación de gas, pero puede presentar algunos, ocasionados por el proceso mecánico de la cuajada. Puede dejarse madurar en almacén de tres a doce meses. Requisitos:

- Materia grasa en contenido mínimo del 48% en el extracto seco.
- Extracto seco mínimo del 6%.
- Cloruro cálcico en contenido máximo de 200 mg/kg de leche utilizada.
- Enzimas. Durante el proceso de fabricación, podrá añadirse un preparado de enzimas inocuas y adecuadas de origen animal o vegetal, capaz de facilitar el curado o el desarrollo del aroma, en una cantidad tal que el peso del extracto seco de dicho preparado no exceda de 1.000 mg/kg de leche utilizada.

2. Queso Edam. Queso de tipo semiduro elaborado con leche de vaca pasteurizada con escasos ojos distribuidos regular o irregularmente por el interior del queso.

- Materia grasa en contenido mínimo del 40% en el extracto seco.
- Humedad máxima del 48%.
- Cloruro cálcico en contenido máximo de 200 mg/kg de leche.

3. Queso Gouda. Queso semiduro elaborado con leche de vaca pasteurizada con escasos ojos distribuidos regular o irregularmente por el interior del queso.

- Materia grasa en contenido mínimo del 48% en el extracto seco.
- Humedad máxima del 43%.
- Cloruro cálcico en contenido máximo de 200 mg/kg de leche.

4. Queso Emmental. Queso de tipo duro elaborado con leche de vaca pasteurizada con ojos en número variable distribuidos regularmente.

- Materia grasa en contenido mínimo del 45% en el extracto seco.
- Humedad máxima del 40%.

5. Queso Gruyère. Queso de tipo duro elaborado con leche de vaca con ojos en número variable distribuidos regularmente.

- Materia grasa en contenido mínimo del 45% en el extracto seco.
- Humedad máxima del 38%.

2.2. YOGUR.

El Real Decreto 271/2014, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt, establece las normas de calidad para la elaboración y comercialización del yogur.

Define «Yogur» o «yoghourt» 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 en cantidad mínima de 1 por 10⁷ unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro.

En el yogur, los microorganismos transforman sus componentes nutritivos, es decir, la lactosa (azúcar propio de la leche) 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 y digeribles por parte de nuestro organismo. Todos estos procesos, además de hacer que el yogur sea un producto más digerible que la leche líquida, también determinan su sabor, aroma y consistencia final.

En general, la composición nutricional del yogur es muy similar a la de la leche, de la cual procede. Si bien existe una diferencia en cuanto a la presencia de lactosa, ya que este azúcar está presente en el yogur en cantidades mínimas, debido a que durante la fermentación se transforma en ácido láctico.

Los yogures son ricos en proteínas de alto valor biológico, calcio de fácil asimilación, fósforo, vitaminas del grupo B (especialmente, B2 o riboflavina) y vitamina B12.

2.2.1. Tipos de yogur y denominaciones.

Según los productos añadidos, antes o después de la fermentación o del tratamiento térmico después de la fermentación, en su caso, los yogures se clasifican en los siguientes tipos:

- a) **Yogur natural.** Corresponde a la definición general de yogur.
- b) **Yogur natural azucarado.** Es el yogur natural al que se han añadido azúcar o azúcares comestibles.
- c) **Yogur edulcorado.** Es el yogur natural al que se han añadido edulcorantes autorizados.
- d) **Yogur con fruta, zumos y/u otros alimentos.** Es el yogur natural al que se han añadido frutas, zumos y/u otros alimentos.
- e) **Yogur aromatizado.** Es el yogur natural al que se han añadido aromas y otros ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes autorizados.
- f) **Yogur pasterizado después de la fermentación.** Es el producto obtenido a partir del yogur que, como consecuencia de la aplicación de un tratamiento térmico posterior a la fermentación equivalente a una pasterización, ha perdido la viabilidad de las bacterias

lácticas específicas y cumple todos los requisitos establecidos para el yogur en esta norma, salvo las excepciones indicadas en ella.

2.2.2. Factores esenciales de composición y calidad.

- a) Todos los yogures deberán tener un **pH** igual o inferior a 4,6.
- b) El contenido mínimo de **materia grasa** de los yogures, en su parte láctea, será de 2% m/m, salvo para los semidesnatados, en los que será inferior a 2 y superior a 0,5% m/m, y para los yogures desnatados, en los que será igual o inferior a 0,5% m/m.
- c) Todos los yogures tendrán, en su parte láctea, un contenido mínimo de **extracto seco magro** de 8,5% m/m.
- d) **Contenido en yogur.**
 - Para los yogures con frutas, zumos y/u otros alimentos, la cantidad mínima de yogur en el producto terminado será del 70% m/m.
 - Para los yogures aromatizados, la cantidad mínima de yogur en el producto terminado será del 80% m/m.

2.3. MANTEQUILLA.

Según el Reglamento 1308/2013, las materias grasas lácteas se incluyen en dentro de las materias grasas para untar. Se definen como productos presentados en forma de emulsión sólida y maleable, principalmente del tipo agua en materia grasa, 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:

- a) **Mantequilla.** Producto con un 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%.
- b) **Mantequilla tres cuartos.** Producto con un contenido mínimo de materia grasa láctea del 60% y máximo del 62%.
- c) **Semimantequilla.** Producto con un contenido mínimo de materia grasa láctea del 39% y máximo del 41%.
- d) **Materia grasa láctea para untar.** Producto con contenidos de materia grasa láctea: inferior al 39%, superior al 41% e inferior al 60%, o superior al 62% e inferior al 80%.

Los requisitos recomendados para la comercialización de la mantequilla en el comercio internacional se encuentran recogidos en la norma del Codex Alimentarius Codex CXS 279-1971.

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.1. QUESO.

a) **Orden de 29 de noviembre de 1975.** En esta orden podemos encontrar

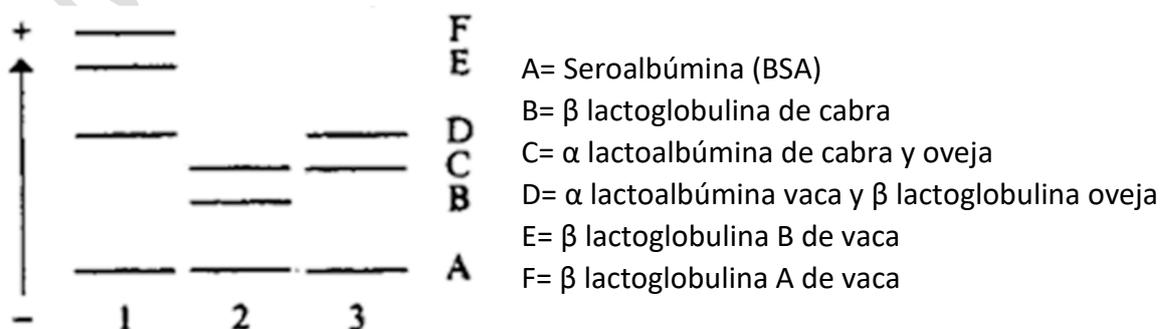
- **Extracción de la grasa** del queso mediante pentano o éter de petróleo.
- **Determinación del contenido en materia grasa.** El contenido de grasa, expresado en porcentaje, se determina gravimétricamente por digestión del queso con ácido clorhídrico y subsiguiente extracción de la grasa de una solución ácido-alcohólica con la ayuda de éter dietílico y éter de petróleo, evaporación de los disolventes y posterior pesada de los residuos.
- **Determinación del contenido de extracto seco.** El extracto seco del queso y de los quesos fundidos es la masa, expresada en porcentaje ponderal, que queda después del proceso de 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) **Real Decreto 1533/1991**, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos describe el método para la determinación de **nitratos y nitritos**. Tratamiento de la muestra con agua caliente, precipitación de la grasa y proteína y filtración. Reducción en una porción del filtrado del nitrato a nitrito, por medio de una columna de cadmio. Desarrollo de una reacción coloreada en alícuotas del filtrado no reducido, por adición de sulfanilamida y cloruro de N-1 naftiletildiamina. Medición de la absorbancia de la solución obtenida a 538 nm.

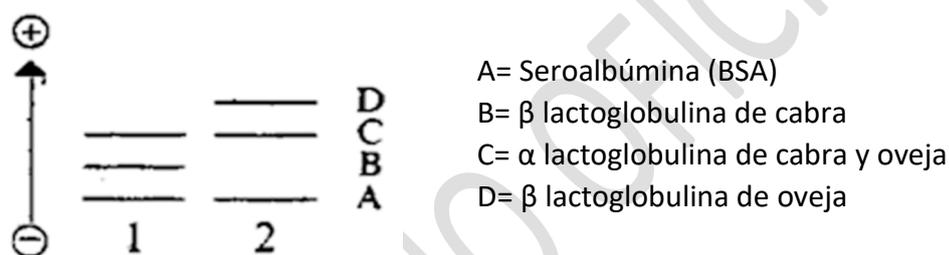
d) **El Real Decreto 1533/1991** describe métodos oficiales de análisis de productos lácteos.

- **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 β lactoglobulinas de leche de vaca presentan una mayor movilidad electroforética que las α lactoalbúminas y las β 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).



Se puede llevar a cabo una cuantificación mediante densitometría, midiendo la intensidad de las bandas con densitómetro a una longitud de onda de 560-600 nm en función del método empleado para la tinción. A medida que aumenta el porcentaje de leche de vaca en la muestra, aumenta la intensidad de las bandas correspondientes a dichas β lactoglobulinas y por tanto aumenta la altura de los picos obtenidos en el densitograma.

- **Determinación de leche de cabra en queso de oveja mediante método electroforético**, separando las proteínas del suero por electroforesis en gel de poliacrilamida. La β lactoglobulina de leche de cabra presenta una menor movilidad electroforética que la α lactoalbúmina y la β 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).



Se puede llevar a cabo una cuantificación mediante densitometría, midiendo la intensidad de las bandas con densitómetro a una longitud de onda de 560-600 nm en función del método empleado para la tinción. A medida que aumenta el porcentaje de leche de cabra presente en la muestra, aumenta la intensidad de la banda correspondiente a la β lactoglobulina de la leche de cabra y, por tanto, aumenta la altura del pico obtenido en el densitograma.

3.2. 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.

4. DETECCIÓN DE ADULTERACIONES.

El 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. Así, los fraudes suelen consistir en modificar la composición de un alimento y reemplazar parte de sus componentes por otros más baratos.

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

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 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".

Real Decreto 1533/1991, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos.

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 1533/1991, de 18 de octubre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de leche y productos lácteos.

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».

<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>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 53

**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 CO₂.

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 CO₂, 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 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) **Polioles 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 (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, α -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 (ρ_{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 Cu^{2+} , el cual es reducido a Cu^+ , y el 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 (SO_2), bisulfito (HSO_3^-) y sulfito (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 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 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.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 54

**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 ρ_{20} o ρ_{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 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}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C y ^{12}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}C en etanol.** Permite conocer si el origen del etanol de una muestra es biológico o fósil. El contenido en ^{14}C se determina por centelleo líquido en muestras cuyo contenido en alcohol es, al menos, 85%. Se emplea como valor de referencia el ^{14}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 CO₂ de la fase gaseosa se analiza mediante IRMS. La desviación isotópica del ¹⁸O (δ¹⁸O) 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 ¹³C/¹²C 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 CO₂ y H₂O. El dióxido de carbono es transportado mediante un flujo de helio a la fuente IRMS para el análisis ¹³C/¹²C.

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 α 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 α 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 CO₂ 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 55

ACEITES I. CLASIFICACIÓN. COMPOSICIÓN. CRITERIOS DE CALIDAD. 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. 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. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

5. 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 las semillas de colza (Brassica napus B. campestris), cuyo contenido en ácido erúxico 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 α -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 el aspecto, olor y sabor, color, grado de acidez, índice de peróxidos, perfil en ultravioleta, humedad y materias volátiles, impurezas insolubles en éter de petróleo, residuos de jabón, disolventes halogenados, ésteres etílicos.

4. Determinaciones analíticas

1. Aspecto

Debe ser límpido mantenido a 20°C+/-2°C durante 24 horas.

2. Olor y sabor

Normales con aromas propios y característicos, sin acusar síntomas de rancidez, alteración o contaminación.

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.

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%

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 O₂/ 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 libres 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 avanzadas. 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 el 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.

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%.

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.

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.

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.

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.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 56

ACEITES II. 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. CRITERIOS DE PUREZA

- 1.1 ÍNDICE DE IODO
- 1.2 ÍNDICE DE REFRACCIÓN
- 1.3 ÍNDICE DE BELLIER
- 1.4 ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN
- 1.5 DENSIDAD
- 1.6 PRUEBA DE HALPHEN
- 1.7 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS
- 1.8 ESTEROLES
- 1.9 ISÓMEROS TRANS
- 1.10 ÁCIDOS GRASOS SATURADOS EN POSICIÓN 2 DE LOS TG.
- 1.11 ÉSTERES NO GLICERÍDICOS
- 1.12 ESTIGMASTADIENOS
- 1.13 CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS CON NÚMERO EQUIVALENTE DE CARBONOS 42 (DIFERENCIA ENTRE EL CONTENIDO TEÓRICO Y EL CONTENIDO EXPERIMENTAL POR HPLC)
- 1.14 ERITRODIOL Y UVAOL
- 1.15 CONTENIDO DE CERAS

2. ADULTERACIONES EN ACEITE DE OLIVA

- 2.1 ADULTERACIÓN DE ACEITE DE OLIVA CON ACEITE REFINADO
- 2.2 ADULTERACIÓN DE ACEITE DE OLIVA CON ACEITES DE SEMILLAS
- 2.3. ADULTERACIÓN DE ACEITE DE OLIVA CON ACEITES ESTERIFICADOS
- 2.4 ADULTERACIÓN DE ACEITE DE OLIVA CON ACEITE DE ORUJO

3. BIBLIOGRAFÍA

1. 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

1.1. Índice de yodo: nos indica de forma aproximada el grado de insaturación de un aceite. Mide la cantidad de yodo necesaria para saturar los dobles enlaces. A menor índice de yodo más ácidos grasos saturados contiene.

1.2. 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.

1.3. 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.

1.4. 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.

1.5. Densidad. Se mide la densidad con un picnómetro. Está relacionada con el tipo de ácidos grasos que forman parte de la grasa.

1.6. 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 gósipol.

Aunque estos índices están legislados, hoy en día la composición de una grasa es identificada de forma mucho más precisa usando técnicas cromatográficas.

1.7. 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.

1.8. 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 α -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- metilencolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ -7-campesterol, Δ -5,23- estigmastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ -5-avenasterol, Δ -5,24- estigmastadienol, Δ -7-estigmastanol, Δ -7-avenasterol.

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.

1.9. 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.

1.10. 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 β 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 α y α' , de las moléculas de triglicéridos, lo cual implica la aparición de monoglicéridos en posición 2, ó β . 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 monoglicérica, 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:

$$\text{Monopalmitato 2 de glicerilo} = (\text{Amp} / \Sigma A) * 100$$

siendo: Amp = el área del pico correspondiente al monopalmitato de glicerilo

ΣA = la suma de las áreas de todos los picos de los monoglicéridos.

1.11. Ésteres no glicéricos

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 glicéricos aparece una mancha por encima de los triglicéridos. Se pueden usar patrones de etilenglicol o propilenglicol para identificación del alcohol.

1.12. 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

1.13. 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.

1.14. 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.

1.15 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

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 57

**ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO. SELECCIÓN DE PANELES DE CATA.
INSTALACIONES.**

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. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

1.1. PREMIOS ALIMENTOS DE ESPAÑA

2. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DEL ACEITE DE OLIVA

3. SELECCIÓN DE PANELES DE CATA DE ACEITES

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

3.1.1. TÉCNICA DE CATA

3.1.2. UTILIZACIÓN DE LA FICHA DE CATA POR LOS CATADORES

3.1.3. UTILIZACIÓN DE LOS DATOS POR LOS JEFES DE PANEL

3.1.4. CLASIFICACIÓN DEL ACEITE

3.1.5. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

3.1.6. CONTROL DE CALIDAD

4. GUÍA DE SELECCIÓN DE CATADORES DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN

5. INSTALACIONES

1. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

Las características son el conjunto de sensaciones percibidas por los sentidos: olor, sabor, color y aroma. Un análisis organoléptico es una valoración que un grupo de personas, con la experiencia y competencias necesarias, realiza sobre una muestra de un alimento o bebida. Dicho análisis se caracteriza por basarse exclusivamente en la sensación que el producto analizado produce sobre los sentidos

La evaluación de estas características sensoriales se realiza con un panel de cata. La forma y condiciones de realización de la cata, así como el análisis de los resultados, deben estar completamente establecidos.

El análisis sensorial es por tanto, la disciplina científica usada para evocar, analizar, medir, e interpretar las reacciones a los alimentos y materiales, percibidos por los sentidos de la vista, el olfato, el gusto, las sensaciones trigeminales y el oído.

Los alimentos destacan por sus propiedades organolépticas, que suponen particularidades que se miden a través de análisis sobre las sensaciones que producen al paladar de quien los consume. Este análisis sensorial se basa en cuatro parámetros básicos: color, sabor, textura y aroma.

Lo que siempre ha sido una cuestión rutinaria y a veces poco atendida, con los años, va adquiriendo una mayor importancia y tiene como principal objetivo favorecer las sensaciones que provoca un alimento ante el consumo humano.

Como veníamos diciendo, las propiedades organolépticas podrían resumirse en 4: color, sabor, textura y aroma. La función de estos cuatro parámetros básicos es aportar las condiciones óptimas y peculiares de cada alimento para aportar sus mejores cualidades.

-Sabor. Las papilas gustativas de la lengua son capaces de identificar cinco tipos de sabores: dulce, salado, amargo, ácido y umami. Cada una de las partes de la lengua es capaz de reconocer mejor uno u otro sabor, aunque todas las papilas pueden percibir todos los sabores. También se puede hablar de sabores inmediatos y de sabores lentos.

-Color. Este parámetro es un indicador de las reacciones químicas que se producen en los alimentos tras someterlos a algún proceso térmico. Muchas de las variaciones de color son normales y no afectan a la inocuidad.

-Textura. Es una de las particularidades más diferenciadoras entre alimentos clave en las preferencias de los consumidores. Esta propiedad la evalúan los estudios reológicos, que se centran en el análisis de aspectos como la viscosidad, el grosor, la dureza o la rigidez.

-Aroma. Esta propiedad, considerada una de las más difíciles de definir y caracterizar, viene dada por distintas sustancias volátiles presentes en los alimentos, bien de manera natural o procedente de su procesado.

Pero las propiedades organolépticas son todas aquellas descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, según puedan ser apreciadas por los sentidos, por lo

que también entrarían en este apartado características como la temperatura, el tamaño, la evocación de un momento, el sonido en boca...

Generalmente, se aplica la escala hedónica para llevar a cabo un análisis organoléptico. La más utilizada es la de 9 puntos, aunque también existen variantes de ésta, como son la de 7, 5 y 3 puntos. Es la prueba recomendada para la mayoría de estudios, donde el objetivo es simplemente determinar si existen diferencias entre los productos en la aceptación del consumidor. A los panelistas se les pide evaluar muestras codificadas de varios productos, indicando cuánto les agrada cada muestra, marcando una de las categorías en la escala, que va desde "me gusta extremadamente" hasta "me disgusta extremadamente".

Como ya se ha comentado, hoy en día la evaluación organoléptica de algunos alimentos es cada vez más demandada, llevándose a cabo la evaluación de productos como el aceite de oliva, vinos, quesos, mantequilla, café, etc.

-Aceite de oliva. Se habla más delante de él por ser el único producto cuyo análisis organoléptico está normalizado.

-Vinos. La cata de vinos es quizás el análisis sensorial más conocido. Sobre una copa de cristal fino, transparente e incoloro se evalúa el color y demás atributos del vino. La forma de la copa deberá ser diferente en función del tipo de vino, de la misma forma que la temperatura. Tras la fase visual, se procede a la fase olfativa, y por último, la fase gustativa.

-Quesos. La evaluación sensorial empieza por el análisis visual, atendiendo a la forma, color, corteza y brillo. Con el tacto, además de percibir la temperatura de la muestra, se evalúa la rugosidad o la humedad superficial. Con el olfato se perciben las sustancias volátiles (favorecido por el calentamiento de la muestra) estableciendo descriptores de familia láctica (yogur, nata, lactosuero), familia afrutada, familia animal o especias. Con el gusto, se lleva a cabo el análisis del sabor, y además, se lleva a cabo el análisis de gusto residual o regusto.

-Mantequilla. La mantequilla es la emulsión de agua en grasa, obtenida por batido y amasado de la nata de la leche. Es un alimento muy graso que puede obtenerse de diferentes fuentes animales. En el caso de la mantequilla, se evalúa la consistencia, sabor, textura y apariencia, y en algunos casos la comparación múltiple entre muestras.

-Café. El café posee sabores básicos cuya intensidad depende de factores como la zona de cultivo, suelo, recolección del fruto, procesamiento y nivel de tostado. En función de la región, la variedad botánica (arábica, robusta), proceso sufrido o cantidad de tueste, las características organolépticas serán diferentes. La evaluación sensorial nos permite evaluar las características que definen su calidad. El análisis se realiza sobre el grano de manera general. La evaluación visual hace referencia al aspecto del grano, con el olfato se analizan las sustancias volátiles, que son diferentes en función de un café verde, tostado o preparado. El aroma y el sabor también se analizan, evaluando los diferentes estímulos disueltos en las papilas gustativas.

1.1. PREMIOS ALIMENTOS DE ESPAÑA

Uno de los instrumentos de promoción y apoyo al sector agroalimentario que con mayor éxito desarrolla el Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación, por contribuir al reconocimiento del trabajo de entidades, empresarios y profesionales que se han distinguido por producir, elaborar, comercializar y ofrecer al consumidor alimentos de calidad, con métodos y tecnologías avanzadas y respetuosas con el medio ambiente, son los Premios Alimentos de España.

Estos premios que se iniciaron en 1987 y de forma ininterrumpida se han convocado anualmente, se han convertido a lo largo de sus XXXIII ediciones en un referente no solo para las empresas que optan a los galardones sino para todo el sector agroalimentario y pesquero español.

- PREMIO "ALIMENTOS DE ESPAÑA MEJORES ACEITES DE OLIVA VIRGEN EXTRA

Este premio se inició en 1997 y desde entonces se convoca anualmente. Tiene como finalidad promocionar y dar a conocer los aceites de oliva vírgenes extra españoles de mayor calidad y estimular a los productores a obtener y comercializar aceites de calidad.

Las 3 modalidades que incluye este premio son: Frutado verde amargo, Frutado verde dulce y Frutado maduro.

Se concederá el Premio al aceite que haya obtenido la mejor puntuación en la fase de cata y en la valoración físico-química de entre las tres modalidades establecidas. Para la selección se cuenta con la participación del Panel Oficial de Catadores del MAPA, que someterán los aceites a sucesivas evaluaciones sensoriales.

- PREMIO "ALIMENTOS DE ESPAÑA MEJORES QUESOS"

Se convoca cada dos años desde 2001. Su finalidad es promocionar y dar a conocer los quesos de mayor calidad y propiedades organolépticas y estimular a los productores a obtener y comercializar quesos de calidad, mejorando su imagen y posición en el mercado. Incluye distintas modalidades dependiendo de la especie animal de la que procede la leche (vaca, oveja, cabra y mezcla) y además el queso azul.

El jurado para este premio estará formado por catadores expertos que someterán los quesos participantes a sucesivas evaluaciones organolépticas.

- PREMIO "ALIMENTOS DE ESPAÑA AL MEJOR VINO"

El Premio "Alimentos de España al Mejor Vino" se convoca todos los años desde 2013 como medida de apoyo y promoción al sector vitivinícola, así como para dar a conocer los vinos españoles que pertenezcan a alguna de las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) reconocidas por la Unión Europea..

Este premio se fallará, tomando en consideración el resultado del Concurso Internacional de Vinos Bacchus, por un jurado que será designado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y estará integrado por un experto catador, una persona de reconocido prestigio en el sector vitivinícola y un representante del departamento. El jurado estará presidido por el Director General de la Industria Alimentaria.

- **PREMIO "ALIMENTOS DE ESPAÑA AL MEJOR JAMÓN"**

Este premio se convoca de forma bienal desde 2016. Su finalidad es contribuir a promocionar el jamón de calidad así como mejorar su imagen y posición en el mercado del jamón. Incluye 2 modalidades: Mejor Jamón Serrano u otras Figuras de Calidad Reconocidas y Mejor Jamón de Bellota Ibérico

Para la selección de los jamones se realizará una valoración sensorial que constará de dos fases, visual y olfato-gustativa. Se formarán paneles de cata, cada uno de ellos estará integrado por 5 expertos catadores que serán coordinados por uno de ellos y todos los paneles estarán dirigidos por un coordinador técnico de cata que fijará los criterios comunes y específicos de acuerdo con la modalidad del premio. Finalizada la valoración sensorial, el coordinador técnico de cata elaborará un informe técnico con el resultado de las pruebas realizadas que será elevado a la presidencia del jurado. Posteriormente, el jurado identificará las muestras de jamón finalistas con su codificación correspondiente y en base a todo lo anterior, emitirá un informe concretando el resultado de la evaluación.

2. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DEL ACEITE DE OLIVA

El aceite de oliva es el líquido que se extrae de la aceituna. Sin embargo, en función de la metodología de extracción y de las características de este líquido podemos tener diferentes clasificaciones, siendo los aceites de oliva vírgenes, los únicos tipos en los que está regulado el análisis sensorial.

Los aceites de oliva vírgenes, son aceites obtenidos del fruto del olivo exclusivamente por medios mecánicos u otros procedimientos físicos aplicados en condiciones que excluyan toda alteración del producto, y que no se han sometido a ningún otro tratamiento que no sea su lavado, decantación, centrifugado o filtración, excluidos los aceites obtenidos con el uso de disolventes o de coadyuvantes de acción química o bioquímica, por un procedimiento de reesterificación o como resultado de cualquier mezcla con aceites de otros tipos. Éstos, se clasifican a su vez en aceite de oliva virgen extra, virgen y lampante.

El Reglamento 2019/1604 establece en su ANEXO I las características de calidad y de pureza que deben presentar los aceites de oliva, incluyendo los criterios establecidos que deben presentar los aceites de oliva vírgenes en la evaluación organoléptica.

En la calidad del aceite influyen gran variedad de factores, desde factores agronómicos (variedad de la aceituna, tratamientos fitosanitarios o el riego), como la influencia del proceso de elaboración (recolección y momento de recolección, transporte y almacenamiento de la aceituna o la limpieza en el sistema de molienda), hasta la comercialización del producto final (almacenamiento y envases).

El panel de cata es el ensayo organoléptico realizado bajo condiciones controladas, por un grupo de catadores previamente seleccionados y entrenados de acuerdo con técnicas sensoriales preestablecidas por el Consejo Oleícola Internacional. Durante el desarrollo del panel de cata, los catadores deberán establecer qué atributos positivos y negativos encuentran en los aceites de oliva vírgenes:

-ATRIBUTOS NEGATIVOS

- **Atrojado/borras.** Flavor característico del aceite obtenido de aceitunas amontonadas o almacenadas en condiciones tales que han sufrido un avanzado grado de fermentación anaerobia o del aceite que ha permanecido en contacto con los lodos de decantación, que también han sufrido un proceso de fermentación anaerobia en trujales y depósitos.
- **Moho-humedad-tierra.** Flavor característico del aceite obtenido de aceitunas en las que se han desarrollado moho y levaduras por haber permanecido amontonadas con humedad varios días, o aceite obtenido de aceitunas que han sido recogidas con tierra o barro y que no han sido lavadas.
- **Avinado-avinagrado.** Flavor característico de algunos aceites que recuerda al vino o vinagre.
- **Ácido-agrio.** Este flavor es debido fundamentalmente a un proceso fermentativo aerobio de las aceitunas o de los restos de pasta de aceitunas en capachos que no han sido limpiados adecuadamente, que da lugar a la formación de ácido acético, acetato de etilo y etanol.
- **Rancio.** Flavor de los aceites que han sufrido un proceso oxidativo intenso.
- **Aceituna helada (madera húmeda).** Flavor característico de aceites que han sido extraídos de aceitunas que han sufrido un proceso de congelación en el árbol.

-OTROS ATRIBUTOS NEGATIVOS: Cocido o quemado, Heno-madera, Basto, Lubricante, Alpechín, Metálico, Salmuera, Esparto, Gusano o Pepino.

-ATRIBUTOS POSITIVOS

- **Frutado.** Conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de frutos sanos y frescos, verdes o maduros, y percibidas por vía directa y/o retronasal.
- **Amargo.** Sabor elemental característico del aceite obtenido de aceitunas verdes o en envero. Se percibe en las papilas circunvaladas de la uve lingual.
- **Picante.** Sensación táctil de picor, característica de los aceites obtenidos al comienzo de la campaña, principalmente de aceitunas todavía verdes. Puede ser percibido en toda la cavidad bucal, especialmente en la garganta.

3. SELECCIÓN DE PANELES DE CATA DE ACEITES

El panel de cata solo es aplicable a los aceites de oliva vírgenes, y a su clasificación en función de la intensidad de los defectos detectados y del atributo frutado, determinada por un grupo de catadores seleccionados, entrenados, examinados y constituidos en panel bajo las directrices de un jefe de panel.

La muestra de aceite que se vaya a analizar se presentará en las copas de cata normalizadas y codificadas con 14-16 ml de aceite (12.8-14.6 g) y estar tapada con un vidrio de reloj. Se deberá mantener la copa a una temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante todo el ensayo (temperatura adecuada para detectar con mayor facilidad las diferencias organolépticas).

La sala de cata deberá estar a una temperatura comprendida entre los 20° y los $25^{\circ}\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la hora óptima para el gusto y el olfato es entre las 10 y 12 de la mañana.

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

3.1.1. Técnica de cata

Los catadores procederán a tomar la copa, separarán el vidrio de reloj y procederán a oler la muestra, haciendo inspiraciones lentas e intensas para evaluar el aceite. El período de olfacción no debería superar los 30 segundos. Una vez realizado el ensayo olfativo, los catadores procederán a evaluar las sensaciones bucales (sensación conjunta olfato-gustativa por vía retronasal y táctil), tomando un pequeño sorbo de aceite y distribuirlo por toda la cavidad bucal lentamente, concentrando la atención en los estímulos amargo y picante.

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

3.1.2. Utilización de la ficha de cata por los catadores

La ficha de cata que deben utilizar los catadores es la siguiente:

FICHA DE CATA DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES
INTENSIDAD DE PERCEPCIÓN DE LOS DEFECTOS:

Atrojado/borras	_____
Moho-humedad-tierra	_____
Avinado/avinagrado Ácido/agrio	_____
Aceituna helada (madera húmeda)	_____
Rancio	_____
Otros atributos negativos	_____
	Metálico <input type="checkbox"/> Heno seco <input type="checkbox"/> Gusano <input type="checkbox"/> Basto <input type="checkbox"/>
Descriptor	Salmuera <input type="checkbox"/> Cocido o quemado <input type="checkbox"/> Alpechín <input type="checkbox"/>
	Esparto <input type="checkbox"/> Pepino <input type="checkbox"/> Lubricante <input type="checkbox"/>

INTENSIDAD DE PERCEPCIÓN DE LOS ATRIBUTOS POSITIVOS:

Frutado	_____
	Verde <input type="checkbox"/> Maduro <input type="checkbox"/>
Amargo	_____
Picante	_____

<u>Nombre del catador</u>	<u>Código del catador</u>
<u>Código de la muestra</u>	<u>Firma</u>
<u>Fecha</u>	
<u>Observaciones</u>	

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

En caso de que los catadores perciban atributos negativos no indicados, deberán consignarlos en el apartado «otros».

3.1.3. Utilización de los datos por los jefes de panel

El jefe de panel deberá recoger las fichas de cata cumplimentadas por cada uno de los catadores y revisar las intensidades asignadas a los diferentes atributos. El jefe de panel deberá introducir los datos de la valoración de cada catador con miras al cálculo estadístico de los resultados del análisis, basados en el cálculo de la mediana.

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

El valor del coeficiente de variación robusto que define la clasificación (defecto percibido con la mayor intensidad y frutado) deberá ser inferior o igual al 20,0 %. Cuando el valor del coeficiente de variación robusto sea superior a 20,0%, el jefe de panel deberá repetir la evaluación de la muestra específica en otra sesión de cata.

3.1.4. Clasificación del aceite

El aceite se clasifica en las categorías que se indican a continuación, en función de la mediana de los defectos y de la mediana del atributo frutado. Por mediana de los defectos se entiende la mediana del defecto percibido con mayor intensidad. Los límites de estos intervalos han sido establecidos teniendo en cuenta el error del método, por lo que son considerados como absolutos.

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

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

En el caso de análisis efectuados en el marco de controles de conformidad, se realizará un ensayo. En el caso de contraanálisis, el ensayo deberá realizarse por duplicado en sesiones de cata diferentes. Los resultados del análisis duplicado deberán ser estadísticamente homogéneos. En caso contrario, la muestra deberá someterse de nuevo a un análisis duplicado. El valor final de la mediana de los atributos clasificadores se calculará mediante la media de ambas medianas.

3.1.5. Criterios de aceptación

El resultado del análisis de una muestra será válido y aceptado en consecuencia cuando tanto el valor de la mediana del defecto clasificador como la del frutado, si ésta fuera necesaria, hayan sido obtenidas con un coeficiente de variación sólido igual o inferior al 20 %.

Se duplicará una muestra de cada 12 o al menos una diaria. Para poder dar como válidos los resultados de la sesión, los dos valores, (del duplicado, o del material de referencia analizado y su valor certificado o el valor obtenido de la repetición de una muestra ya analizada y su valor de entonces), deben de ser compatibles de acuerdo al error normalizado (En) ≤ 1.0

3.1.6. Control de calidad

El control de calidad del catador se realiza mediante el control de los duplicados diarios.

-Control de la precisión: Se realizará mediante el cálculo del Número de Precisión con el que se compara el resultado del catador respecto a sí mismo.

-Control de la desviación: Se realizará mediante el cálculo del Número de Desviación con el que se compara el resultado del catador respecto al panel.

El control de calidad del panel se realiza, por un lado, mediante el control de los duplicados diarios y mediante el análisis mensual de un MR con un valor de defecto o atributo determinado, obtenido de una fuente externa (MR o sobrante ensayo intercomparación).

El control de calidad externo se realiza mediante ensayos de intercomparación. Éstos deberán ser evaluados de acuerdo a la metodología general del laboratorio.

4. GUÍA DE SELECCIÓN DE CATADORES DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN

La selección de los candidatos está compuesta por una etapa de preselección, la selección y el entrenamiento y cualificación.

La preselección de los candidatos se hace por medio de entrevistas y encuestas en las que se explica cuáles son las funciones a realizar.

La fase de entrenamiento de los catadores consistirá inicialmente en una serie de sesiones, teóricas y prácticas, dirigidas por el jefe de panel o su sustituto, en las que se impartirán conocimientos del método de valoración organoléptica, así como sesiones prácticas abiertas de cata para familiarizar a los catadores con la metodología.

El umbral de reconocimiento es el primer dato que debe conocerse en el proceso de formación de un panel. Se define el umbral de reconocimiento como la mínima cantidad de un estímulo que un catador, o un panel, es capaz de reconocer. Puede ser olfativo o sávido, según la vía de reconocimiento utilizada. Para su determinación se eligen cuidadosamente cuatro aceites, de tal forma que cada uno de ellos sea considerado como un representante típico de los atributos atrojado, avinado, rancio y amargo, y tengan una intensidad tan marcada y clara como sea posible. A continuación se hacen diluciones sucesivas, y el candidato deberá compararlas. Se determinará el umbral de reconocimiento como la concentración que se corresponda con el 75% de respuestas correctas.

La concentración umbral obtenida será la que ocupe la décima posición, C10, en la serie de 12 necesarias que hay que preparar para el procedimiento de selección de catadores por el método de clasificación de intensidad que a continuación se expone.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 58

**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

MATERIAL NO OFICIAL

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 incorporarse 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 Ácido L-málico K, Mg, Ca, P Ácido D-isocítrico Prolina Sorbitol	Maltosa/isomaltosa Glucosa Fructosa Glucosa/fructosa Sacarosa Azúcares totales Sacarosa vs azúcares totales Sorbitol	Acidez total Ácido L-málico Ácido D-málico Ácido D-isocítrico Ácido cítrico Cítrico/isocítrico P Ácido ascórbico	Prolina Ácido cítrico Glucosa/fructosa Sacarosa Perfil carotenoides Carotenoides totales β -caroteno Sorbitol	Grado Brix/densidad Cl Sulfato Nitrato Na	Ca Peptinas solubles en agua Pulpa centrifugable

El siguiente cuadro ofrece un resumen de los métodos analíticos empleados en la actualidad y las cuestiones de autenticidad que abordan.

Técnica analítica	Datos indicativos/Analito/Parámetro	Información relacionada con la autenticidad
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 ¹ H-NMR (perfiles)	Perfil global a partir del espectro de ¹ 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 (¹H-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 59

**CONSERVAS VEGETALES. 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.
3. NORMAS TÉCNICAS GENERALES.

REAL DECRETO 2420/1978 POR EL QUE SE APRUEBA LA REGLAMENTACIÓN TÉCNICO SANITARIA PARA LA ELABORACIÓN Y VENTA DE CONSERVAS VEGETALES

ORDEN 21 DE NOVIEMBRE DE 1984 NORMAS DE CALIDAD PARA CONSERVAS VEGETALES

4. NORMAS ESPECÍFICAS.

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.

RD 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.

REAL DECRETO 679/2016, DE 16 DE DICIEMBRE (BOE DEL 17), POR EL QUE SE ESTABLECE LA NORMA DE CALIDAD DE LAS ACEITUNAS DE MESA.

CALIDAD DIFERENCIADA: DOP E IGP

5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS
6. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

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 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 (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967)

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 de utilización puede prolongarse almacenándolos en frigoríficos (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967)

En el siguiente tema se tratará qué normativa aplica a las conservas vegetales y los parámetros analíticos que se analizan en ellas.

2. CONSERVAS VEGETALES.

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.

El Real Decreto 2420/1978, que aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de conservas vegetales, 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.

Estos tratamientos técnicos autorizados pueden ser:

a) Térmico, por el que se garantice una esterilización industrial o técnica, con envasado en recipientes herméticos.

b) Congelación, por el que se garantice la estabilidad del producto hasta la venta al público, sometiendo a los alimentos a temperaturas inferiores a su punto de congelación. Durante el período de conservación la temperatura se mantendrá uniforme, de acuerdo con las exigencias de cada producto.

c) Deshidratación, por el que se garantice la eliminación de la humedad necesaria hasta conseguir una estabilidad del producto.

d) Encurtido, por el que se garantice la estabilidad del producto hasta la venta al público, al someter los alimentos frescos, tratados con salmuera o que han sufrido una fermentación láctica, a la acción del vinagre, o ácido acético de origen vínico, con o sin adición de sal, azúcares u otros condimentos.

Las materias primas utilizadas para la elaboración de semiconservas y conservas vegetales serán fundamentalmente:

- Los productos de origen vegetal: se considerarán como tal a las frutas, los cereales, las hortalizas, las legumbres, los tubérculos y los 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.

En la actualidad, la existencia de diferentes tipos de productos vegetales, según el tratamiento que hayan recibido, determinan lo que se conoce como **gamas**. Se distinguen 5 gamas, de las cuales solo se considera como conservas o semiconservas a los productos de II y III Gama:

- **I Gama: Productos vegetales frescos.** alimentos no transformados que no han sufrido ningún tratamiento higienizante ni de conservación. Son muy perecederos y precisan refrigeración. Incluyen productos frescos, frutas y hortalizas deshidratadas y encurtidas.
- **II Gama. Conservas y semiconservas vegetales.** Está constituida por alimentos que han sido sometidos a un tratamiento térmico para su conservación, normalmente una esterilización y que se han envasado en recipientes adecuados, herméticamente cerrados, ya sean latas o envases de vidrio. Son las llamadas conservas y semiconservas.
- **III Gama. Productos vegetales congelados y ultracongelados.** Los alimentos son sometidos a un proceso de congelación en crudo, por lo que es necesaria su descongelación para cocinarlo antes de ingerirlo.
- **IV Gama.** Según la Asociación Española de Frutas y Hortalizas Lavada, listas para su empleo, los alimentos de IV gama son vegetales, frutas y hortalizas frescas, sin tratamiento térmico, preparadas, lavadas y envasadas, que han podido ser objeto de troceado, corte o cualquier otra operación relativa a la integridad física del producto, listos para consumo o cocinar y destinados al consumo humano.

- **V Gama.** Son productos tratados por calor, listos para consumir y que se comercializan refrigerados. Incluyen desde verduras cocidas hasta platos preparados. Para su consumo sólo necesitan una mínima preparación o un calentamiento previo. Generalmente se envasan en material plástico, pudiendo ir también en atmósferas protectoras (vacío, atmósfera modificada, etc.).

3. NORMAS TÉCNICAS GENERALES.

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:

- a) El lavado de las materias primas, con agua potable, en instalaciones técnicas que aseguren una limpieza efectiva.
- b) El escaldado, en aquellos productos que lo necesiten, exclusivamente con vapor de agua o agua a temperatura de 80-100 grados centígrados.
- c) El tratamiento de aquellos productos que industrialmente lo precisen con anhídrido sulfuroso gaseoso o en disolución, pero nunca el residuo que quede de este último en las conservas será superior a 12,5 gramos por 1.000 en peso.
- d) El pelado de las frutas con soluciones alcalinas, temperaturas adecuadas o cualquier otro método autorizado.
- e) El vacío parcial en el espacio de cabeza de los envases por inyección de vapor, cerrador de vacío u otro procedimiento técnico adecuado.
- f) La esterilización de los envases cerrados se hará en autoclave o por cualquier otro método autorizado. Su enfriamiento posterior se realizará con agua higienizada.
- g) La comprobación de las materias primas, envases y lotes de fabricación, en cuanto a normas de calidad, cifras analíticas, exámenes microscópicos y microbiológicos y, en general, cuantas pruebas exijan una garantía de fabricación correcta y se establezcan en las reglamentaciones complementarias.

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.

REAL DECRETO 2420/1978 POR EL QUE SE APRUEBA LA REGLAMENTACIÓN TÉCNICO SANITARIA PARA LA ELABORACIÓN Y VENTA DE CONSERVAS VEGETALES

Cómo se ha indicado en el punto 2, el Real Decreto 2420/1978, que aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria 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 consideran productos de origen vegetal las frutas, cereales, hortalizas, legumbres, tubérculos y hongos comestibles, así como sus derivados. Además de conservas y semi-conservas, aplica a productos como:

- Triturados, purés, pastas y concentrados de tomates y hortalizas en general, hongos y setas
- Compota, definida como la conserva de frutas u hortalizas, enteras o partidas en trozos, a los que se les ha incorporado solución azucarada, con una graduación final inferior a 14° Brix.
- Pasta, carne o dulce de fruta: producto preparado con fruta tamizada y adición de azúcares, y llevada por cocción hasta consistencia sólida. Tendrá una graduación mínima final de 55° Brix
- Crema de frutas, hortalizas y tubérculos: producto obtenido mediante la cocción de la pulpa tamizada, con o sin adición de azúcares, especias y/o agentes aromáticos autorizados, hasta conseguir una masa de consistencia homogénea.
- Frutas en almíbar: productos obtenidos a partir de frutas enteras o divididas, a los que se ha adicionado un jarabe de cobertura. La graduación final del producto será, como mínimo, de 14° Brix.
- Macedonia o ensalada de frutas. Es la mezcla de frutas diferentes en almíbar.
- Cóctel de frutas. Es la mezcla de diferentes frutas, cortadas en cubos principalmente y envasadas con un jarabe de cobertura igual
- Fruta confitada: producto obtenido por cocción de los frutos en jarabes de concentraciones crecientes, hasta quedar impregnados de dicho jarabe. La concentración final del producto será, como mínimo, de 65° Brix.
- Fruta glaseada y/o escarchada. Fruta confitada recubierta de una capa exterior de azúcares de aspecto sólido.
- Mezcla de verduras: producto obtenido a partir de hortalizas, legumbres, tubérculos y/u hongos enteros o troceados. Su presentación puede variar desde la natural a la congelada, deshidratada y conservada por tratamiento térmico. Incluye las denominaciones comerciales: «menestra», «verdura para sopa», «sopa juliana», «macedonia de verduras»...

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 Noviembre de 1984 a través de la Orden las Normas de Calidad para Conservas Vegetales. Las Normas se establecen en los distintos anexos del documento y aplican 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. Sirva como ejemplo el Anejo 15 relativo a Conservas de Pimiento dónde se concreta que la norma aplica a las conservas obtenidas a partir de frutos de *Capsicum Annuum* al natural y en vinagre, cómo deben presentarse los frutos, las distintas denominaciones comerciales, qué se admite o no en las elaboraciones (por ejemplo no se admiten frutos con zonas de color distinto al declarado), leyendas específicas para ese producto (por ejemplo “En todas las denominaciones, a continuación de la palabra pimiento, y en el mismo tipo de letra es obligatorio hacer constar el color del pimiento, excepto en el rojo, en que es optativo”), y por último dos tablas con las categorías comerciales según la denominación comercial y con el cuadro de exigencias y tolerancias de calidad para las conservas de pimiento (por ejemplo en categoría “Extra” la consistencia debe ser “Firme” en el 90% del producto).

4. 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. Es de aplicación en diferentes productos, que quedan definidos en esta misma normativa, e incluye confituras, jaleas, “marmalades” y crema de castaña. Se enumeran y definen los productos, indicando la cantidad mínima de pulpa o puré empleada en la elaboración de 1.000 gramos de producto, las materias primas e ingredientes autorizados, el tratamiento de materias primas, etiquetado y normas relativas a la importación y exportación.

RD 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, DE 16 DE DICIEMBRE (BOE DEL 17), 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, que es el mayor productor y exportador del mundo. 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, “I” o Selecta y Segunda, “II”, o estándar, así como la información suministrada al consumidor.

Las características que presenten las aceitunas en los productos terminados tras su selección y procesado, deberán ser:

1. Sanas.
2. Limpias.

3. Exentas de olores y sabores extraños.
4. Exentas de defectos que puedan afectar su comestibilidad o adecuada conservación.
5. Sin síntomas de alteración en curso o de fermentación anormal.
6. Homogéneas en cuanto al tamaño dentro de su variedad, para las enteras, deshuesadas, rellenas y mitades. En el caso de que se empleen aceitunas de distinto tamaño para una misma variedad, deberá especificarse esta circunstancia en la información alimentaria facilitada al consumidor.
7. De color uniforme, excepto para las mezclas, cóctel o combinado de aceitunas.

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/>

5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Las determinaciones analíticas que se realizan a las conservas, así como sus criterios de aceptación, están estipulados en la reglamentación recogida en este tema. Las más importantes son:

- Peso neto y escurrido por gravimetría
- Acidez por volumetría
- Sólidos solubles por refractometría

La **RTS** (Boletín Oficial del Estado (BOE), 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 porcentaje en unidades de masa que contengan dicho 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. Para dichos 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.

Los **caracteres organolépticos** se clasifican en:

- **Típico:** corresponde al color, olor o sabor característicos de la elaboración, teniendo en cuenta el proceso a que ha sido sometida la materia prima.
- **Aceptable:** aquel que presenta el color, olor o sabor, que presenta diferencias respecto al típico, debidas a defectos de la materia prima empleada, o del proceso de fabricación, de escasa importancia.
- **Anormal o extraño:** defecto excluyente. Corresponde al color, olor o sabor, que difieren del típico lo suficiente como para considerar que sus características no se corresponden con las propias de la elaboración o pudiendo llegar a resultar desagradables.

Los defectos recogidos en la normativa son:

1. **Defectos superficiales:** aquellos que, localizados sobre la piel o la superficie del producto vegetal, afectan a la buena presentación del producto. Incluyen manchas o lesiones, defectos de pelado o lavado, etc.
2. **Textura:** un defecto de textura supone la carencia de las condiciones normales de comestibilidad que se manifiesta en el producto, como consecuencia de no haberse recolectado adecuadamente, no haber sido sometido a preparación correcta o proceder de variedades impropias para la conserva. La estimación de este parámetro podrá hacerse organolépticamente. La textura de un producto puede considerarse como:
 - Típica: textura característica del producto elaborado.
 - Aceptable: sin ser típica, conserva condiciones de comestibilidad normal.
 - Anormal: la textura es tan deficiente que hace desagradable su comestibilidad. Se considera defecto excluyente.
3. **Integridad:** la parte vegetal conserva su integridad cuando mantiene su forma y cierta consistencia en el producto terminado. Se aplica este término tanto a la fruta u hortaliza entera, como a las divisiones de éstas en partes regulares, cuando así sea la forma de presentación del producto. Se consideran defectuosas aquellas piezas que están malformadas, aplastadas, deformadas, con defectos de deshuesado, rotas, etc.
4. **Homogeneidad.** El contenido de un envase deberá presentar aspecto homogéneo en cuanto a coloración, grado de desarrollo, tamaño, consistencia y cualquier otro atributo que se utilice en la categorización del correspondiente producto. La uniformidad de tamaño se estimará mediante la relación entre los tamaños «medios máximos» y «medios mínimos». La uniformidad respecto al color, se estimará por el porcentaje, en masa, respecto al peso escurrido, de las piezas que discrepen del grado mínimo establecido o del color dominante de la muestra.
5. **Turbidez.** Es el grado de transparencia del líquido de gobierno. Se medirá con el turbidímetro de Kertes.

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.

El envasado deberá realizarse de tal forma que permita cumplir con la legislación vigente en cuanto al control del contenido efectivo de los productos alimenticios envasados:

- a) La masa o volumen medio del contenido de la muestra representativa deberá estar comprendido en el intervalo de confianza del sistema de muestreo utilizado.
- b) El número máximo de envases con un error por defecto superior el máximo tolerado será inferior al criterio de rechazo del sistema de muestreo utilizado.
- c) Ningún envase deberá tener un error por defecto superior al doble del error máximo por defecto tolerado.

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 norma de calidad de las aceitunas (**Real Decreto 679/2016**, de 16 de diciembre, por el que se establece la norma de calidad de las aceitunas de mesa) indica que el **peso neto escurrido** mínimo exigido en los envases no transparentes de aceitunas dependerá del tipo de producto, siendo diferente para las aceitunas enteras con hueso y para las aceitunas deshuesadas o rellenas.

La determinación del peso neto escurrido se realizará según se establece en el anexo II. (Boletín Oficial del Estado (BOE), 2016) Se realiza por gravimetría y supone dos pasos:

1. **Escurreo 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.

Los límites máximos de defectos están recogidos en el Anexo I, estableciéndose unas tolerancias diferentes para cada una de las categorías comerciales “Extra”, “Primera” o Segunda o estándar”. Los defectos incluyen desde frutos excesivamente blandos o arrugados hasta pedúnculos, frutos rotos o daños por insectos u hongos que penetran en el fruto. La evaluación de las tolerancias de defectos se realizará con una muestra mínima de 200 aceitunas para las presentaciones enteras, deshuesadas y rellenas. Para el resto de presentaciones los límites máximos de defectos suponen materias extrañas inocuas, huesos o fragmentos de hueso y piezas rotas sobre una muestra mínima de 300 gramos de peso neto escurrido.

6. 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). (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). (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 mermelada 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>

Curso Forum. (2015). *I+D+i en Industria Alimentaria*.

Infoalimentación.com. (s.f.). Recuperado el 27 de Abril de 2022, de https://www.infoalimentacion.com/documentos/l_gama_V_gama.htm#:~:text=Frutas%20y%20hortalizas%20de%20I%20Gama.&text=Est%C3%A1%20constituida%20por%20alimentos%20que,las%20llamadas%20conservas%20y%20semiconservas.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 60

PESCADO Y CONSERVAS DE PESCADO. NORMAS TÉCNICAS GENERALES. NORMAS ESPECÍFICAS. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. CONTROL DE GENUINIDAD DEL PRODUCTO

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. PESCADO Y CONSERVAS DE PESCADO.
2. NORMAS TÉCNICAS GENERALES.

REAL DECRETO 1521/1984, DE 1 DE AGOSTO, POR EL QUE SE APRUEBA LA REGLAMENTACIÓN TÉCNICO-SANITARIA DE LOS ESTABLECIMIENTOS Y PRODUCTOS DE LA PESCA Y ACUICULTURA CON DESTINO AL CONSUMO HUMANO.

3. 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.

REGLAMENTO (CEE) 2136/89, DE 21 DE JUNIO (DOCE L 212, DE 22.07.1989) POR EL QUE SE ESTABLECEN NORMAS COMUNES DE COMERCIALIZACIÓN PARA LAS CONSERVAS DE SARDINAS.

REGLAMENTO (CEE) 1536/92, DE 9 DE JUNIO (DOCE L 163, DE 17.06.1992) POR EL QUE SE APRUEBAN NORMAS COMUNES DE COMERCIALIZACIÓN PARA LAS CONSERVAS DE ATÚN Y BONITO.

CALIDAD DIFERENCIADA: DOP E IGP

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. CONTROL DE GENUINIDAD DEL PRODUCTO

DETERMINACIÓN DE PESO NETO Y ESCURRIDO POR GRAVIMETRÍA:

HISTAMINA EN PRODUCTOS DE LA PESCA:

ADITIVOS ALIMENTARIOS

CONTAMINANTES

CONTROL DE GENUINIDAD DEL PRODUCTO

5. BIBLIOGRAFÍA

1. PESCADO Y 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).

En 1963 la FAO y la OMS establecen la Comisión del Codex Alimentarius, (CAC), cuya misión es elaborar normas, directrices y códigos de prácticas alimentarias internacionales armonizadas destinadas a proteger la salud de los consumidores y garantizar la aplicación de prácticas leales en el comercio de alimentos. Asimismo promueve la coordinación de todos los trabajos sobre normas alimentarias emprendidos por las organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales.

Las actividades del Codex se desarrollan a través de Comités verticales. El **Comité de Pesca y Productos Pesqueros** (CCFFP-Codex Committee on Fish and Fishery Products), tiene como propósito elaborar normas internacionales para el pescado, crustáceos y moluscos frescos y congelados (incluidos los congelados rápidamente) o elaborados de cualquier otra forma. Las normas y códigos de prácticas que ha elaborado este Comité han servido para armonizar prácticas de higiene de muchas de las especies comercializadas internacionalmente. Destaca, por ejemplo, la norma para **pescados en conserva** (Ministerio de Agricultura, 2015).

Según el Código Alimentario Español, 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 (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1967).

En el siguiente tema se tratará la normativa que aplica a las conservas de pescado y los parámetros analíticos que se analizan en ellas.

2. NORMAS TÉCNICAS GENERALES.

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.

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.

En su Capítulo XII, sobre Pescados y derivados, se detalla en la sección primera 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:

- a) Pescados frescos.
- b) Pescados congelados.
- c) Pescados salados.
- d) Pescados ahumados.
- e) Pescados 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:

- a) Semiconservas.
- b) Conservas.
- c) Sopas de pescado y bullabesas.
- d) 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. Se clasificarán en:

- a) Semiconservas.
- b) Conservas.
- c) Sopas de marisco.
- d) 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. Todos los productos utilizados en las semiconservas de mariscos reunirán las condiciones sanitarias que garantizarán la atoxicidad y salubridad del producto acabado.

REAL DECRETO 1521/1984, DE 1 DE AGOSTO, 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.

3. NORMAS ESPECÍFICAS.

El Decreto 2519/1974, de 9 de agosto, sobre entrada en vigor, aplicación y desarrollo del Código Alimentario Español, prevé en su artículo 5 la posibilidad de desarrollar lo dispuesto en el mismo mediante las oportunas normas complementarias:

ORDEN DE 15 DE OCTUBRE DE 1985, POR LA QUE SE APRUEBA LA NORMA DE CALIDAD PARA EL MEJILLÓN, ALMEJA Y BERBERECHO EN CONSERVA.

La presente norma 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. Las **especies** de moluscos que comprenden esta norma son las siguientes:

Nombre vulgar oficial	Denominación científica	Denominación normalizada del producto comercial
Mejillón	<i>Mytilus edulis</i>	Mejillón
Mejillón	<i>M. gallo-provincialis</i>	Mejillón
Almeja fina	<i>Venerupis (Tapes) decussalus</i>	Almeja
Almeja babosa	<i>Venerupis (Tapes) pullastra.</i>	Almeja
Almeja rubia	<i>Venerupis (Tapes) rhomboides.</i>	Almeja
Almeja margarita	<i>Venerupis (Tapes) aureus (gmi).</i>	Almeja rubia
Almeja japónica	<i>Venerupis (Tapes) japónica o semidecussata o philippinarum.</i>	Almeja japónica
Almeja chilena	<i>Protothaca thaca (Mol.) y Amenoghinoya antigua (King).</i>	Almeja chilena
Berberecho	<i>Cerastoderma (Cardium) edule.</i>	Berberecho

Se definen además las **formas de presentación**, pudiendo presentarse el mejillón entero desprovisto de concha, en trozos o en pasta, las almejas enteras desprovistas de concha o en trozos y el berberecho únicamente entero y desprovisto de su concha. Se permitirán otras formas de presentación siempre que se distingan de las nombradas, cumplan los requisitos de la norma y esté suficientemente descrita en el etiquetado y rotulación del producto para evitar que se confunda o induzca a error al consumidor.

El artículo 7 establece los **medios de cobertura** permitidos para cada uno de los productos, que deberán ser aptos para el consumo humano, cumplir con sus normas específicas y las de sus componentes. Se permitirán otros medios de cobertura diferentes a los indicados siempre que estén autorizados y cumplan con esta norma y

esté suficientemente descrita en el etiquetado y rotulación del producto para evitar que se confunda o induzca a error al consumidor

Se establecen también 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, de 12 de agosto, por el que se aprueba la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios envasados. Entre la información que debe constar aparecen los ingredientes, el contenido neto o el marcado de fechas, dónde deberán llevar obligatoriamente la leyenda «consumir preferentemente antes de fin de...» seguida del año correspondiente, así como el modo de conservación, modo de empleo o identificación de la empresa.

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. Obligatoriamente todos los mejillones, almejas y berberechos empleados en la elaboración de las conservas objeto de esta norma cumplirán como molusco vivo la legislación vigente en cuanto a tallas de moluscos se refiere.

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 (DOCE L 212, DE 22.07.1989) POR EL QUE SE ESTABLECEN NORMAS COMUNES DE COMERCIALIZACIÓN PARA LAS CONSERVAS DE SARDINAS.

Este Reglamento define las normas a las que deberá 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 cumplan estas condiciones:

- haber sido envasados con cualquier medio de cobertura apropiado, en recipientes cerrados herméticamente.
- haber sido esterilizados mediante un tratamiento adecuado.

Las sardinas deberán estar convenientemente descabezadas, sin branquias, aleta caudal, vísceras distintas de los huevos, lechaza ni riñones, y, según las presentaciones comerciales de que se trate, sin la columna vertebral ni la piel.

El Reglamento establece también qué **presentaciones** pueden comercializarse (sardina, sardina sin espinas, sardina sin piel y sin espinas, filetes de sardinas, trozos de sardinas u otras presentaciones), qué **medios de cobertura** pueden emplearse (los medios de cobertura podrán mezclarse entre sí (aceites vegetales refinados, salsa de tomate, escabeches...), con la excepción del aceite de oliva que no podrá mezclarse con otros aceites), 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 (DOCE L 163, DE 17.06.1992) 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** (bloque entero, trozos, filetes...) 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/>

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. CONTROL DE GENUINIDAD DEL PRODUCTO

DETERMINACIÓN DE PESO NETO Y ESCURRIDO POR GRAVIMETRÍA:

Determinación del contenido neto. Para esta determinación, la temperatura del producto estará comprendida entre 19º y 25º C y las pesadas se realizarán con una aproximación de $\pm 0,5$ gramos (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1985).

El procedimiento es el siguiente: se pesa el envase cerrado. Se abre y se vierte el contenido, se lava el envase y se seca con papel o paño absorbente. Se pesa el envase, incluida la tapa y se resta la masa del envase vacío de la masa del envase lleno. La cifra resultante será el contenido neto. Para obtener la relación porcentual entre el contenido neto y la capacidad, se dividirá el contenido neto por la capacidad nominal normalizada del envase y se multiplicará por 100.

La determinación del **peso escurrido** en conservas de pescado se realizará del siguiente modo: el pescado se escurre durante tres minutos a 25 °C sobre un tamiz de malla de 3 mm y se determinará su masa por pesada; en el caso de las salsas pastosas, éstas deben ser separadas mediante chorro débil de agua a la misma temperatura indicada (Boletín Oficial del Estado (BOE), 1984)

En las distintas normas específicas de los productos de la pesca están establecidas la relación existente entre el peso del producto contenido en el recipiente, previa esterilización, y el peso neto, expresado en gramos. Dependiendo del producto, de la presentación y del medio de cobertura hay estipulados unos contenidos mínimos.

El Real Decreto 1801/2008 por el que se establecen normas relativas a las cantidades nominales para productos envasados y al control de su contenido efectivo, establece normas relativas a las cantidades nominales para productos introducidos en envases, fija las tolerancias del contenido de los productos envasados, así como los errores máximos permitidos en la medida del contenido efectivo y las modalidades de control

estadístico de los productos envasados, siendo el contenido efectivo la cantidad (masa o volumen) de producto que contiene realmente el envase.

HISTAMINA EN PRODUCTOS DE LA PESCA:

La histamina se produce en los alimentos por la acción de los microorganismos presentes en el mismo alimento. Las enzimas descarboxilasa de los microorganismos actúan sobre la histidina, uno de los aminoácidos que forman las proteínas de los seres vivos, y las transforman en histamina. La aparición de histamina está relacionada con una mala higiene en la manipulación de los alimentos y por una mala conservación del pescado (temperatura elevada por períodos prolongados de tiempo) (Generalitat de Catalunya, 2021).

El Reglamento (CE) 2073/2005, de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y las modificaciones posteriores, establece los criterios de seguridad alimentaria de histamina en productos pesqueros.

La determinación de histamina puede realizarse con HPLC con detector de fluorescencia o siguiendo métodos enzimáticos, por ejemplo, el formato de placa de microtitulación es adecuada para la determinación cuantitativa de histamina en pescado fresco o pescado enlatado.

ADITIVOS ALIMENTARIOS

Solo los aditivos alimentarios que estén incluidos en la lista comunitaria (anexo II del Reglamento 1333/2008) podrán utilizarse en los productos de la pesca y de la acuicultura, en las condiciones de uso que en él se especifican. Queda prohibida la comercialización de cualquier aditivo alimentario o de cualquier alimento en el que esté presente tal aditivo, si la utilización del aditivo alimentario no es conforme con el Reglamento 1333/2008.

CONTAMINANTES

A fin de proteger la salud pública, el Reglamento 1881/2006 establece los límites máximos para determinados contaminantes en productos alimenticios, incluidos los productos de la pesca y de la acuicultura, y el Reglamento 333/2007 incluye interpretaciones para la aceptación y rechazo de lotes y/o sublotos de productos cuando se efectúa un control oficial (Ministerio de Agricultura/CECOPESCA, 2012).

Existen multitud de factores en un proceso de elaboración que podrían provocar cambios en la concentración del contaminante. Estos factores son, entre otros: aporte de contaminantes a través de la incorporación de otros ingredientes, migración durante la descongelación de las vísceras al músculo, los tratamientos térmicos como la cocción, esterilización o pasteurización, el modo de cocción (agua o vapor), o la deshidratación. Por tanto, es posible que un producto elaborado con una materia prima conforme al

Reglamento 1881/2006, supere el límite máximo establecido en dicho Reglamento. Para evitar esto, se utilizan los factores de transformación. Para calcular el factor de transformación en un producto elaborado es necesario identificar las etapas de la producción en las que puede haberse producido concentración o dilución del contaminante. Para el cálculo del factor de transformación se utilizan los datos de concentración del contaminante en la materia prima y en el producto terminado (Ministerio de Agricultura/CECOPESCA, 2012).

El reglamento 333/2007 establece los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, y benzo(a)pireno en los productos alimenticios, estableciendo sus criterios de funcionamiento:

Metales pesados: principalmente **mercurio**, que se acumula en el músculo de los grandes predadores, como pez espada y túnidos de gran tamaño. La metilación de mercurio inorgánico se produce por reacción química directa o mediante la acción de bacterias dando lugar a **metilmercurio**. El metilmercurio (CH_3Hg^+) es el componente orgánico de mercurio más común en la cadena alimentaria y se absorbe en el cuerpo mucho más rápida y ampliamente que el mercurio inorgánico, dada su naturaleza lipofílica, que hace que pueda atravesar fácilmente la placenta y la barrera hematoencefálica (AESAN, 2016). La determinación de mercurio se realiza por espectrometría de absorción atómica con analizador directo (AAS-AMA), y la determinación de metilmercurio en productos de la pesca se realiza mediante extracción selectiva y cuantificación por espectrometría de absorción atómica con analizador directo (AAS-AMA).

Otros metales pesados, entre los que se incluyen el **cadmio** y el **plomo**, podrían estar presentes también en los productos de la pesca. La determinación de otros metales pesados se realiza con una técnica multielemental, por espectroscopía de plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas (ICP-MS)

Contaminantes orgánicos persistentes. Las **dioxinas** y los **PCBs** se incorporan a los productos de la pesca acumulándose en el tejido graso. Las especies más susceptibles de contener ciertos niveles de dioxinas son los peces de acuicultura, debido a su alimentación a base de piensos con aceite de pescado. Su análisis se realiza por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS).

Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Sería necesario fijar contenidos máximos para los alimentos expuestos a un alto nivel de contaminación medioambiental, especialmente el pescado y los productos de la pesca, contaminados a raíz de los vertidos de hidrocarburos de los barcos. La detección de los PAH a niveles bajos se puede llevar a cabo mediante GC/MS unido a un método de preparación de muestras con QuEChERS.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 61

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 ésteres 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-metilcafesol, 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 **teافلavininas** (estructuras diméricas) y a las **tearrubigininas** (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: α -amilasa, β -fructosidasa y β -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>

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>. 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 62

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 ^1H -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 melisopalinoología, 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}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}C -IRMS, ^{13}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 63

ESPECIAS. CLASIFICACIÓN. NORMAS DE CALIDAD. 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. CLASIFICACIÓN

2.1. Especies

2.2. Condimentos preparados o sazonadores

3. NORMAS DE CALIDAD

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.1. Humedad

4.2. Cenizas

4.3. Cenizas insolubles en ácido

4.4. Extracto etéreo no volátil

4.5. Fibra bruta

4.6. Nitrógeno

4.7. Aceite volátil (esencia)

4.8. Actividad del agua

4.9. Análisis microbiológico

MATERIAL NO OFICIAL

1. INTRODUCCIÓN

El CÓDIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL, aprobado por **DECRETO 2484/1967**, define en su CAPÍTULO XXIV ("CONDIMENTOS Y ESPECIAS") "las **especias** o condimentos aromáticos a las plantas, frescas o desecadas, enteras o molidas, que, por tener sabores u olores característicos, se destinan a la condimentación o a la preparación de ciertas bebidas".

A su vez, En el **REAL DECRETO 2242/1984**, de 26 de septiembre (BOE de 22 de diciembre) de Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de condimentos y especias se designa con "el nombre de **especia** o condimento aromático a las plantas o partes de las mismas, frescas o desecadas, enteras, troceadas o molidas, que por su color, aroma o sabor característicos se destinan a la preparación de alimentos y bebidas, con el fin de incorporarles estas características haciéndoles más apetecibles y sabrosos y, en consecuencia, consiguiendo un mejor aprovechamiento de los mismos".

Dentro de la normativa indicada también se regulan los **condimentos preparados** o **sazonadores**, considerados como el producto obtenido por la simple mezcla de varias especias o condimentos entre sí, y/o con otras sustancias alimenticias. En la elaboración de condimentos preparados se autoriza el empleo de especias naturales, vegetales deshidratadas, sal, azúcares, harinas, féculas, almidones, vinagre, grasas y aceites comestibles.

Se regulan también los **sucedáneos de especias**, definidos como "los productos elaborados con ingredientes distintos de la especia que marca su denominación, de propiedades parecidas, que adoptan la misma presentación y aspecto físico y usos que la especia genuina y están destinados a reemplazarla". Sólo están permitidos los de canela, pimienta negra, pimienta blanca y clavo.

En la elaboración de estos sucedáneos está permitido el uso de harinas, almidones, féculas, azúcares, aceite vegetal comestible y harinas de cáscara de (cacao, piñón, almendra y hueso de aceituna)

2. CLASIFICACIÓN.

2.1. Especias

Las especias se pueden clasificar de forma general, sin limitarse a los tipos indicados a continuación, en:

- Arilos: macis (desecado de la nuez moscada).
- Bulbos (desecados, deshidratados, pulverizados): ajo y cebolla
- Corteza: canela
- Flores y partes florales: alcaparra, azafrán y clavo

- Frutos (sanos, limpios, enteros o molidos, normalmente desecados): anís, apio, cardamomo, cilantro, comino, enebro, hinojo, pimentón, pimienta blanca, pimienta de Cayena, pimienta negra, vainilla, pimienta rosa
- Hojas y sumidades (floridas, limpias, frescas o desecadas): albahaca, artemisa, eneldo, espliego, estragón, hierbabuena, laurel, menta, orégano, perejil, poleo, romero, salvia, tomillo
- Rizomas y raíces (limpios, sanos y normalmente desecados): cálamo, cúrcuma, jengibre
- Semillas: ajonjolí o sésamo, mostaza, nuez moscada, eneldo, alholva

2.2. Condimentos preparados o sazonadores

- Mezclas entre especias para obtener un condimento que reúne las características apropiadas para el fin a que se destina.
- Mezclas entre especias y condimentos naturales para obtener otros condimentos preparados.
- Mezclas entre especias y sustancias autorizadas específicamente para estos productos y/o condimentos naturales.

3. NORMAS DE CALIDAD

El Real Decreto 2242/1984 recoge la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de condimentos y especias.

Las distintas especias o condimentos naturales deberán ajustarse a las especificaciones que se señalan en el cuadro indicado en el anexo del Real Decreto mientras no se redacten las normas específicas para cada una de las especias. En ese cuadro se señalan los porcentajes máximo o mínimo de humedad, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido, extracto etéreo, fibra bruta, nitrógeno, y esencia.

Algunas especias deben cumplir especificaciones complementarias. Por ejemplo, en la canela su aceite volátil deberá contener aldehído cinámico y eugenol y su extracto alcohólico se encontrará entre 4,5-12%. En el ajo su aceite volátil deberá contener disulfuro de dialilo y disulfuro de alilo y propilo.

En lo que se refiere a los condimentos preparados, deben ajustarse en su composición a las declaraciones que hagan los fabricantes, manipuladores o importadores.

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Las determinaciones analíticas que se realizan a las especias, con el fin de determinar si cumplen con las especificaciones generales establecidas en la normativa son:

4.1. Agua

Determinación de la cantidad de agua arrastrada por destilación azeotrópica, utilizando un disolvente orgánico inmiscible con agua, y recogida en un tubo graduado.

4.2. Cenizas

Determinación de masa de residuo tras calcinación en horno a 550°C.

4.3. Cenizas insolubles en ácido

Determinación de masa de residuo insoluble en ácido clorhídrico diluido en agua (1:5) tras calcinación en horno a 550°C.

4.5. Extracto etéreo no volátil

Se realiza extracción con dietil-éter. A continuación, se elimina el dietil-éter en rotavapor y se seca el producto a 110°C hasta tener pesada constante.

4.6. Fibra bruta

La muestra se trata sucesivamente con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido potásico de concentraciones conocidas. Separar el residuo por filtración, lavar, desecar y pesar el residuo insoluble, determinando posteriormente su pérdida de masa por calcinación a 550°C.

4.6. Nitrógeno

Se emplea método Kjeldahl. Ataque del producto por ácido sulfúrico 96%, catalizado con cobre II sulfato 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.

4.7. Aceite volátil (esencia)

Una suspensión acuosa del producto es destilada. El destilado es recogido en un tubo graduado que contiene un volumen determinado de xileno. Las fases orgánica y acuosa después son separadas y se determina el volumen de fase orgánica. El contenido en aceite volátil es calculado restando el volumen de xileno añadido.

4.8. Actividad del agua

La actividad del agua es un parámetro clave que afecta al crecimiento microbiológico. Por tanto, la ESA recomienda un valor máximo deseable de 0,65.

4.9. Análisis microbiológico

No deben aparecer microorganismos en el producto en niveles que puedan representar un peligro para la salud.

Si el producto ha sido tratado para reducir las cargas microbianas antes de ser importado al país de destino, el tratamiento deberá realizarse de manera que garantice la seguridad microbiológica de los consumidores.

Para determinar la composición específica de los aceites volátiles de las distintas especias se debe acudir a técnicas de análisis como la cromatografía de gases con detector de llama o con detector de masas.

BIBLIOGRAFÍA

- **Decreto 2484/1967**, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español
- **Real Decreto 2242/1984**, de 26 de septiembre de Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de condimentos y especias

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 64

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**

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.

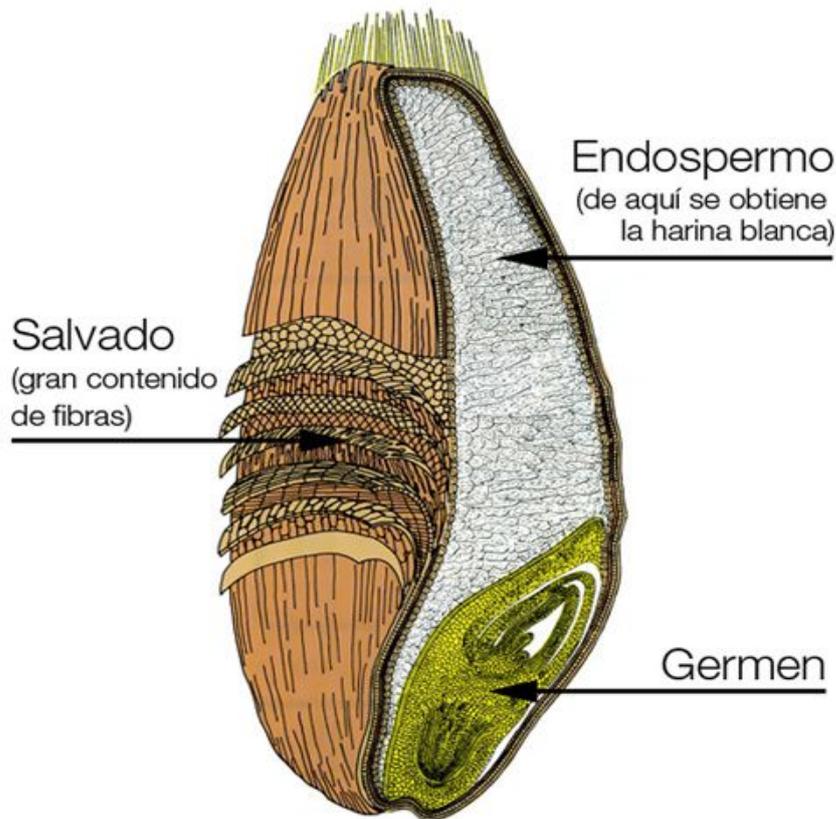
2-Semilla que contiene dos partes diferenciadas:

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. Predomina 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 género *Triticum*. Las dos especies de trigo más cultivadas en la actualidad son el denominado trigo panadero (*triticum aestivum*) que constituye el 90 y 95% del total y el 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 destinados a los celíacos y también los almidones modificados de más 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 una medida indirecta de la proteína. El gluten es el responsable de los alveolos del pan, ya que forma una red tridimensional que atrapa el CO₂ 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 CO₂ 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.

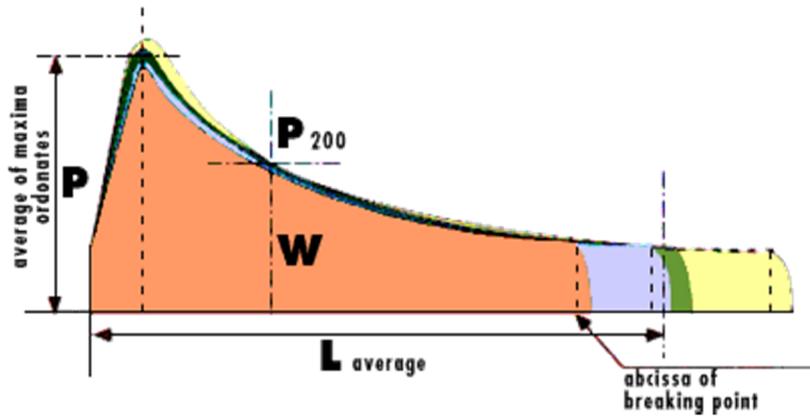
Con ello obtenemos un gráfico llamado alveograma y en él se encuentran los siguientes parámetros:

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.

Bibliografía.

R.D 679/2016 Norma de calidad de las harinas, sémolas y otros productos de la molienda 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 65

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 B₁ (tiamina), la B₂ (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 66

PROTEINAS ANIMALES TRANSFORMADAS. REGLAMENTACION. METODOS ANALITICOS

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. Proteínas animales transformadas**
- 3. Reglamentación**
- 4. Métodos de análisis**
 - 4.1. Microscopía óptica**
 - 4.2. PCR**
- 5. Anexo I**
- 6. Anexo II**
- 7. Anexo III**
- 8. Bibliografía**

MATERIAL NO OFICIAL

PROTEÍNAS ANIMALES TRANSFORMADAS. REGLAMENTACION. METODOS DE ANALISIS

1.-INTRODUCCION

La encefalopatía espongiforme bovina (EEB) conocida como enfermedad de las vacas locas, se diagnosticó por primera vez en Reino Unido en 1986 y alcanzó proporciones epidémicas en los años 90 debido a la alimentación del ganado con proteínas animales transformadas derivadas de rumiantes, algunos de los cuales estaban infectados.

La EEB es una enfermedad neurológica progresiva de las vacas, causada por una proteína llamada prion. Las personas pueden contraer una versión de la EEB llamada variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob.

2.-PROTEÍNAS ANIMALES TRANSFORMADAS (PAT, s).

Para entender que son las PAT, s debemos saber primeramente que son los subproductos de origen animal no destinados al consumo humano (SANDACH).

Los SANDACH se generan en la producción primaria ganadera y en la industria de transformación de alimentos de origen animal. El Reglamento (CE) 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (UE) 142/2011 de la Comisión constituyen el marco legal comunitario aplicable a los SANDACH.

Los SANDACH se definen como cuerpos enteros o partes de animales, productos de origen animal como los productos lácteos y la eliminación de animales muertos o la aplicación de medidas de control de enfermedades.

Se clasifican en tres categorías en función del riesgo, encontrándose las PAT, s en la categoría 3 que son los productos de origen animal que finalmente no se usan para el consumo humano no tienen riesgo para la salud.

El Reglamento (CE) 1774/ 2002 en el anexo I punto 42(modificado por el Reglamento (CE) 808/2003) establece las siguientes definiciones:

Proteínas animales transformadas (PAT,s) son las proteínas animales derivadas íntegramente de material de categoría 3, sometidas a un tratamiento conforme a lo dispuesto en la sección 1 del capítulo II del anexo X (incluidas las harinas de sangre y de pescado) que las haga aptas para su utilización directa como ingredientes para piensos o algún otro uso para piensos, incluidos los alimentos de animales de compañía o usos de abonos y enmiendas del suelo orgánico, no obstante no incluye los hemoderivados, la leche, los productos lácteos, el calostro, los productos a base de calostro, los lodos de centrifugado o de separación, gelatina, proteínas hidrolizadas, el fosfato dicálcico, los huevos incluida la cáscara de huevo, fosfato tricálcico y colágeno.

Se consideran PAT, s:

- Harinas cárnicas
- Harinas de pescado derivadas de animales acuáticos con excepción de los mamíferos marinos.
- Harinas de sangre.

Productos hemoderivados son los hematíes secos, congelados o líquidos así como el plasma seco no se consideran PAT,s.

En la actualidad está permitido alimentar a los animales de granja (excepto los rumiantes) y animales de acuicultura con PAT,s siempre y cuando no provengan de rumiantes y no se produzca canibalismo. Ver anexo I

Desde el año 2017 está permitido alimentar a los animales de granja (excluido los rumiantes) con insectos, tienen que estar bajo la denominación de insectos de granja.

La obtención de las PAT;s es por molturación, desecación, seguido de la cocción a 133º durante 20 minutos y 3 bares de presión para esterilizar el producto y fundir la grasa, sedimentación y separación de parte de la grasa.

Distinguir las PAT, s de las proteínas hidrolizadas estas últimas son péptidos de diferentes tamaños por la hidrólisis de las proteínas. La hidrólisis se lleva a cabo mediante agentes químicos o enzimáticos.

3-.REGLAMENTACION

- Reglamento (CE) 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías transmisibles.
- Reglamento (CE) 56/2013 modifica el anexo I y IV del Reglamento 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen las disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías transmisibles.
- Reglamento (UE) 2021/1372 por el que se modifica el anexo VI del Reglamento (CE) 999/2001 en lo que respecta a la prohibición de alimentar animales de granja no rumiantes, distintos de los animales de peletería, con proteínas derivadas de animales.
- Esta norma supone el levantamiento de algunas restricciones a la proteína animal en piensos en Europa. Autoriza el uso de PAT,s derivadas de cerdo,aves de corral, e insectos en aves y cerdos y gelatina y colágeno de origen rumiante en los animales de granja no rumiante.
- En el Reglamento se establecen condiciones estrictas para evitar la contaminación cruzada, garantizar el cumplimiento de la prohibición de reciclaje intraespecifico(es decir, canibalismo)y facilitar el control de la alimentación.
- Reglamento (CE) 152/2009 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos.

- Reglamento (CE) 56/2013 por el que se modifica el Reglamento (CE) 152/2009 referente a los métodos de análisis para la determinación de constituyentes de origen animal para el control oficial de piensos.
- Reglamento de ejecución de la Comisión 2020/1560 por el que se modifica el Reglamento (CE) 152/2009 referente a los métodos de análisis para la determinación de constituyentes de origen animal para el control oficial de piensos.

4-.MÉTODOS DE ANALISIS

Los métodos de análisis se realizan mediante

- Microscopia óptica.
- PCR

La aplicación de uno y/ u otro método se hará de acuerdo a lo establecido en los SOP,s (Procedimientos Normalizados de Trabajo) establecidos por el EURL-AP (Laboratorio de Referencia Europeo de PAT,s).Ver anexo II

4.1.-Microscopía óptica se realiza mediante la técnica de flotación diferencial , para ello se pesan 10 g de muestra a las que se añade 50 ml de tetracloroetileno y se deja reposar 5 minutos, pasado este tiempo se observan dos fracciones , que se separan.

La fracción que se encuentra por debajo es la fracción pesada y la fracción por encima del tetracloroetileno es la fracción ligera.

Una vez seca la muestra se procede a la identificación de los componentes en función de sus características morfológicas, que se encuentren en dichas fracciones.

- ✓ En la fracción pesada podemos encontrar huesos de animal terrestre, cartílago, espinas , escamas, agallas.
- ✓ En la fracción ligera sangre, sangre spray, plasma, plumas , músculo.

Ver anexo III fotografías de distintos componentes.

4.2. PCR

La metodología de análisis de PATs basada en la técnica de PCR se aplica en dos supuestos (ver Anexo II), bien cuando es necesario determinar el grupo de vertebrado terrestre al que pertenecen los fragmentos que se han visualizado previamente en el microscopio óptico, bien cuando por la información que se tiene de la muestra, se debe aplicar directamente la técnica de PCR.

4.2.1. Pre-PCR: Extracción de ADN

Para poder emplear la PCR de manera efectiva, en la muestra se ha de tener una mínima cantidad de ADN con un mínimo de pureza, por lo que es imprescindible realizar una etapa previa de obtención de ADN.

Esta etapa está recogida en un SOP propio, establecido por el EURL-AP, por lo que su empleo y la manera en que se aplica son obligatorios por normativa oficial.

La obtención del ADN se realiza mediante la técnica de las bolas magnéticas, que en resumen se basa en que pequeñas bolas magnéticas están recubiertas de una molécula que presenta afinidad por los ácidos nucleicos, pudiéndolos retener o liberar a conciencia según la necesidad del paso de obtención del ADN. Mediante la retención de las bolas por medio de magnetismo se retendrá el ADN en etapas en las que interesa la eliminación de otras moléculas.

Hay un paso inicial de *extracción del ácido nucleico* mediante el empleo de tampones y detergentes que provocan la rotura de las estructuras celulares y tisulares, liberando las moléculas de ADN junto con el resto de componentes en el medio tamponado. En este medio se van a añadir las bolas magnéticas que se unirán a las moléculas de ADN.

El siguiente paso es la *purificación del ácido nucleico* por el que se van a ir eliminando el resto de componentes no deseados como proteínas, grasas, hidratos de carbono y moléculas inorgánicas para dejar el ADN lo más puro posible.

Es importante la etapa de obtención de ADN para que la PCR tenga un buen rendimiento y no ocurran inhibiciones de la polimerasa de ADN que podrían dar falsos negativos.

4.2.2. Pre-PCR: Criterios de decisión de presencia o ausencia

Como paso necesario para la aplicación de la metodología de análisis por PCR, se ha de establecer cuando se decide que en una muestra hay presencia (se detecta) de ADN de vertebrado terrestre o hay ausencia (no se detecta). Por tanto se ha de determinar previamente un punto de corte o cut-off (P.C.) de acuerdo a un SOP específico que es obligatorio aplicar y seguir tal como viene descrito.

Para ello es necesario el uso de unos Calibrantes de ADN del grupo vertebrado de interés y mediante el empleo de estos en la PCR correspondiente, se obtendrá una intensidad de señal de ADN medida en ciclos de amplificación que se denomina punto de corte. Cuando se aplica la PCR a muestras de rutina, se establece que hay ausencia si la señal obtenida es más leve que la que corresponde al PC y hay presencia si la señal es más intensa.

En la aplicación de rutina de cada PCR, se han de cumplir determinados parámetros de calidad para aceptar los resultados obtenidos y que están descritos en los correspondientes SOPs. Estos son: homogeneidad de los resultados de los duplicados muestrales, ausencia de inhibición (control de falsos negativos) y ausencia de contaminación (control de falsos positivos).

4.2.3. Aplicación de la PCR

Una vez se tiene en la muestra el ADN de calidad y con la cantidad suficiente para su amplificación, se deberá seguir el protocolo del esquema operativo para análisis de proteínas animales (Anexo II, Fig. 1.B), que indica el empleo de las PCRs de detección de vertebrados terrestres. Cada una de las tres PCRs que están en vigor son del tipo PCR en tiempo real (RT-PCR) con utilización de sondas TaqMan.

La normativa actual indica que las PATs de Rumiante no se pueden emplear en animales destinados a alimentación humana, las PATs de Ave se pueden emplear en todos los animales para alimentación humana excepto Aves y las PATs de Cerdo en todos los animales para consumo humano excepto porcino. El itinerario analítico de PCR se basa en la anterior premisa y en el conocimiento que se tenga del tipo de muestra, bien por documentos o por etiquetas. Si no se sabe el destino del pienso del que proviene la muestra, se debe conocer el origen de las PATs presentes mediante las PCRs.

En cualquiera de los dos supuestos anteriores, la primera PCR a aplicar sería la de detección de ADN de Rumiante (Fig. 1.B del Anexo II). Si el resultado del análisis es positivo y la muestra cumple las condiciones de aplicación del test de PCR según el SOP, las proteínas animales presentes no cumplirían las normas de empleo indicadas en el Reglamento 152/2009 y se daría por concluido el análisis por PCR.

Si la muestra es negativa a PCR de Rumiante, se tendría que seguir analizando por PCR de manera que si estamos en el supuesto de no conocer el empleo del pienso se deben realizar las PCRs para Ave y para Cerdo. El resultado de cada una de ellas indicaría los animales de granja en los que se podrían utilizar el pienso.

Si se sabe el animal de destino, se haría la PCR de este grupo animal (ave o cerdo) para evitar el canibalismo. Es decir, si es pienso para ave, si la PCR de ADN de Ave es negativa, se puede emplear y si el resultado es positivo, no cumple la normativa (se daría canibalismo) y no se podría emplear.

De manera análoga se analizaría por PCR para ADN de Cerdo y según resultado se determinaría que cumple normativa si es PCR negativa o no cumple en caso contrario.

Para terminar, decir que en el informe de resultados del análisis por PCR, se deben expresar estos y acompañar determinada información de acuerdo con lo indicado en la normativa de aplicación recogida en el Reglamento 56/2013.

ANEXO I

	Feed for farmed animals other than fur animals				
	Ruminants	Non ruminant herbivores (horses, rabbits...)	Pigs and poultry	Aquaculture	Pets and fur animals
Ruminant PAP (incl. ruminant blood meal)	U	U	U	U	A
Ruminant blood products	U	U	U	U	A
Non-ruminant blood products	U	A	A	A	A
Pig and poultry PAP (incl. pig and poultry blood meals)	U	U	A†	A	A
Non-ruminant PAP other than from pig and poultry	U	U	U	A	A
Non-ruminant blood meal other than from pig and poultry	U	U	U	A	A
Insect PAP	U	U	A	A	A
Fishmeal	U*	A	A	A	A
Ruminant collagen and gelatine	U	A	A	A	A
Non-ruminant collagen and gelatine	A	A	A	A	A
Hydrolysed proteins from ruminants other than those derived from hides and skins	U	U	U	U	A
Hydrolysed proteins from ruminants derived from hides and skins	A	A	A	A	A
Hydrolysed proteins from non-ruminants	A	A	A	A	A
Di and tricalcium phosphate of animal origin	U	A	A	A	A
Eggs and egg products, milk and milk products, colostrum and derivates	A	A	A	A	A
Animal proteins other than those mentioned ones	U	A	A	A	A

U: unauthorised

A: authorised

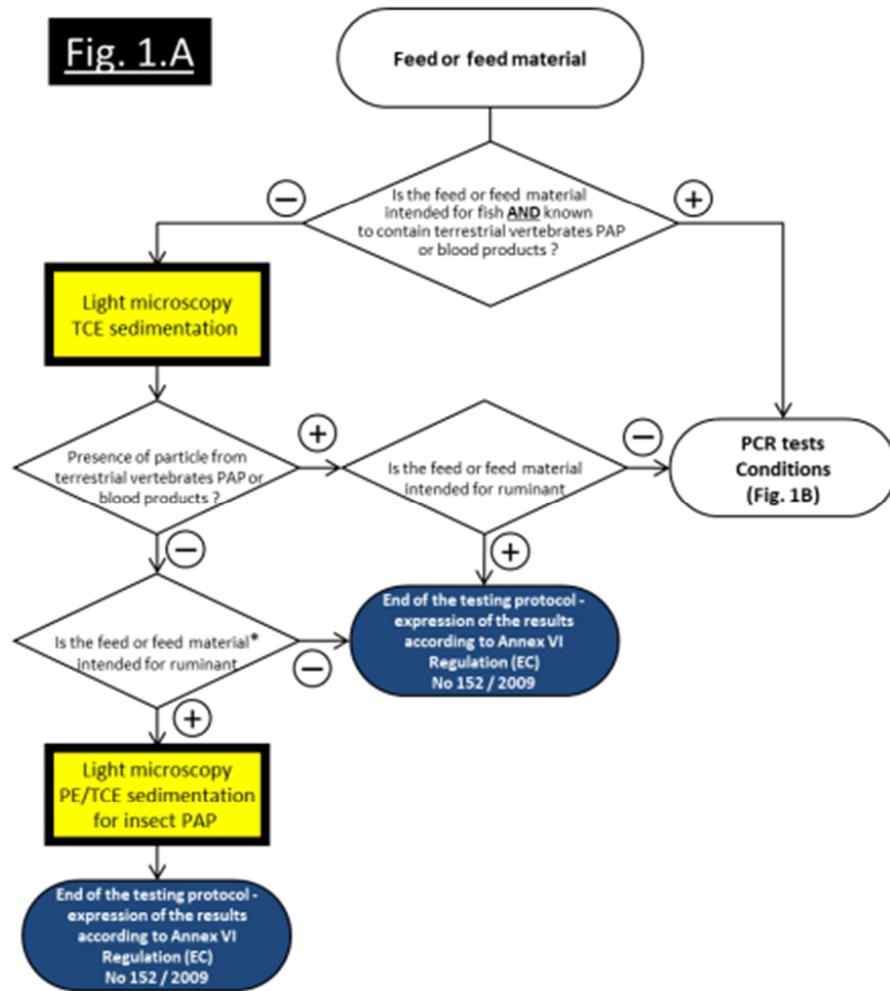
*: fishmeal is allowed for unweaned ruminants in milk replacers

†: intraspecies recycling is prohibited

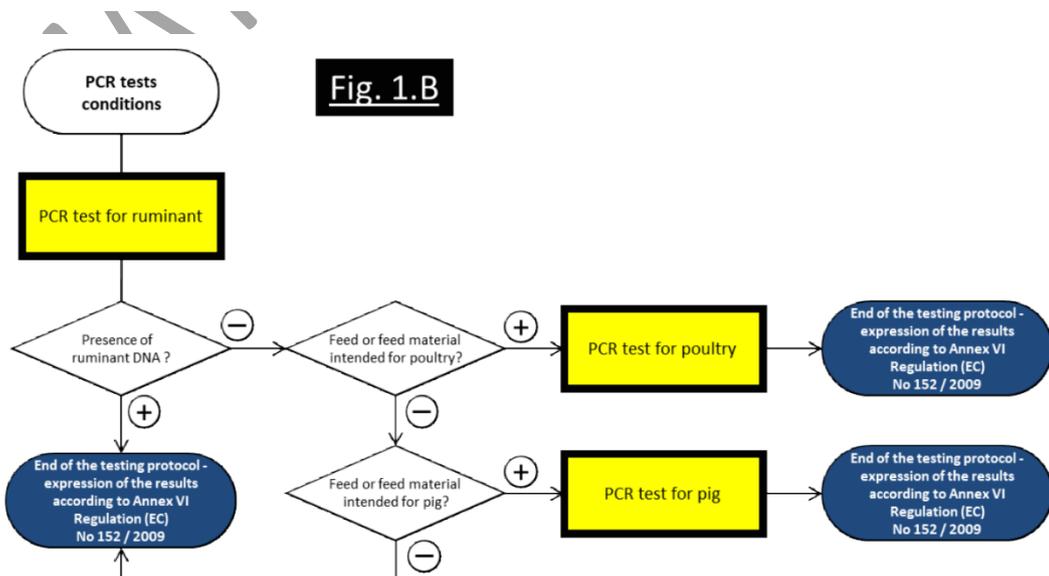
MATERIA

ANEXO II

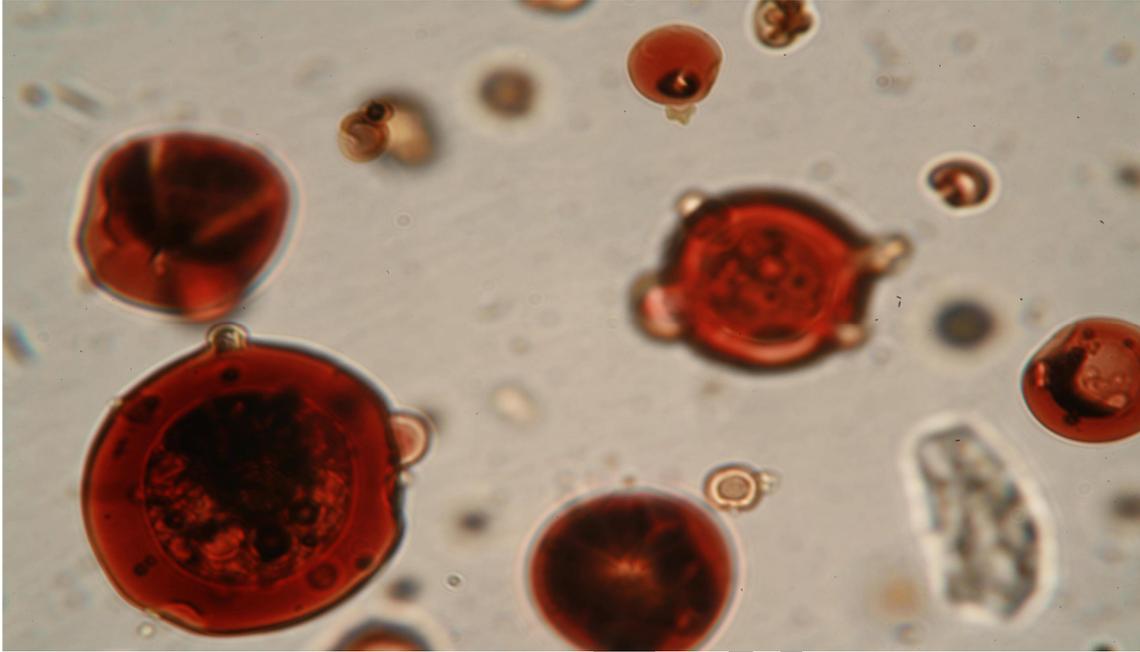
7.2. Protocol for the determination of animal constituents in feed or feed material



* On the exclusion of whole grains, kernels, oils and fats



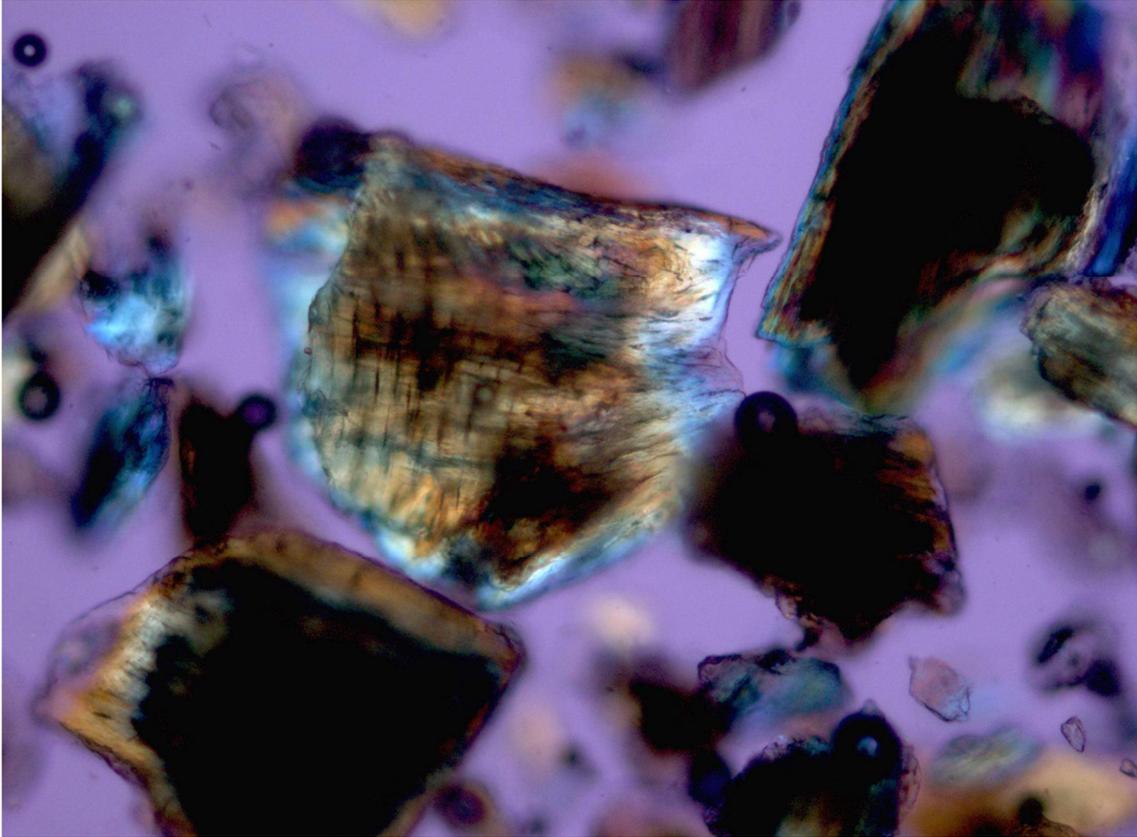
ANEXO III



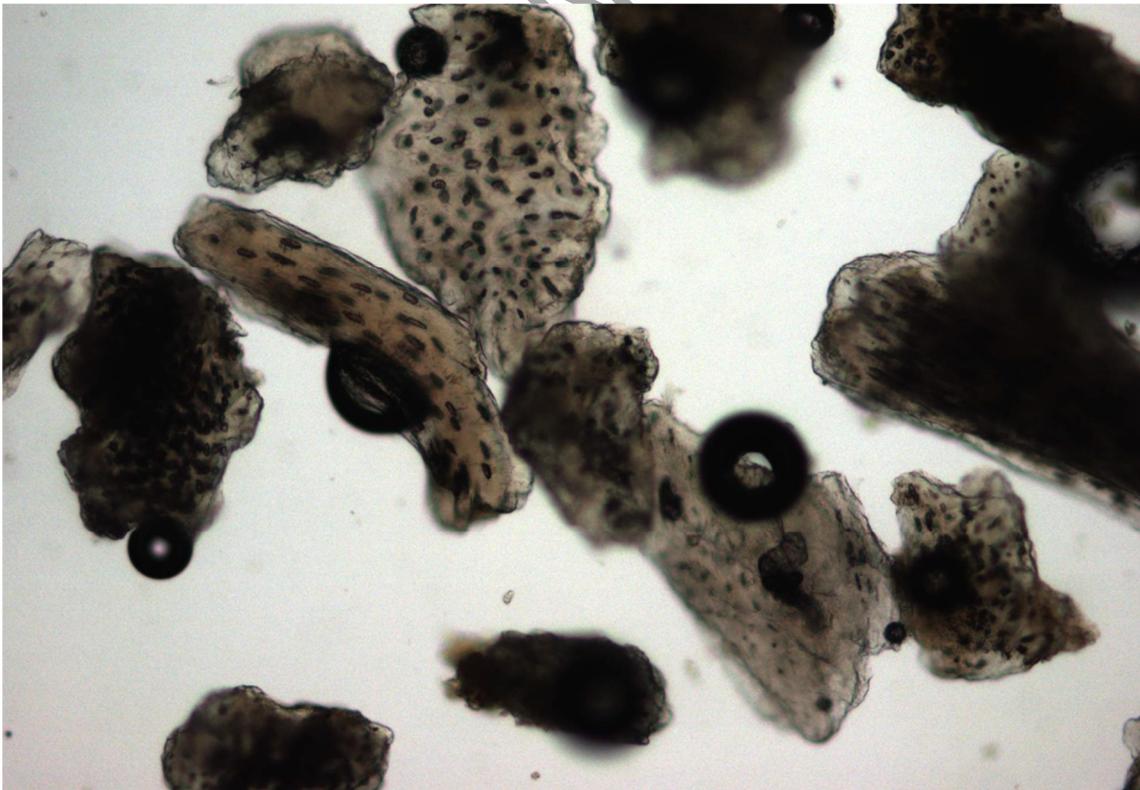
Sangre spray



Musculo



Espinass



Huesos de animal vertebrado terrestre

BIBLIOGRAFIA

Reglamento (CE) 1069/2009

Reglamento (CE)147/2011

Reglamento (CE) 1774/2002

Reglamento (CE) 152/2009.

SOPs publicados en el EURL_AP

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 67

SUSTANCIAS INDESEABLES EN ALIMENTACION ANIMAL. MARCO LEGAL. 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. Definición**
- 3. Clasificación**
- 4. Definición y características de las sustancias indeseables**
- 5. Métodos de análisis**
- 6. Marco legal.**
- 7. Bibliografía**

MATERIAL NO OFICIAL

SUSTANCIAS INDESEABLES EN ALIMENTACION ANIMAL. MARCO LEGAL. METODOS DE ANALISIS

1.-INTRODUCCION

La alimentación animal tiene cada vez más importancia en la cadena alimentaria ya que es un factor fundamental en la calidad en los alimentos de origen animal.

Por ello, legislación sobre etiquetado, comercialización, ingredientes y sustancias indeseables ha tenido un desarrollo notable en este siglo XXI, sobre todo tras la aparición de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB)

2.-DEFINICION

Sustancias indeseables : cualquier sustancia o producto, con excepción de los agentes patógenos ,que está presente en el producto destinado a la alimentación animal, y que constituye un peligro para la salud humana o animal o para el medio ambiente ,o que pueda afectar negativamente a la ganadería de producción

3.-CLASIFICACIÓN:

Se establece la clasificación de las sustancias indeseables por grupos:

- Sección I: Contaminantes inorgánicos y compuestos nitrogenados)
 - ✓ Arsénico,
 - ✓ Cadmio,
 - ✓ Plomo;
 - ✓ Mercurio
 - ✓ Flúor
 - ✓ Nitritos
 - ✓ Melamina
- Sección II: Micotoxinas
 - ✓ Aflatoxina B₁
 - ✓ Cornezuelo de centeno
- Sección III: Toxinas vegetales inherentes:
 - Por ej. Gósipol libre, ácido cianhídrico, teobromina, sustancia volátil de mostaza
- Sección IV Compuestos organoclorados (excepto dioxinas y PCB)
- Sección V : dioxinas y PCB
 - ✓ Dioxinas
 - ✓ Suma de dioxinas y de PCB similares a las dioxinas,
 - ✓ PCB no similares a las dioxinas
- Sección VI: Impurezas botánicas perjudiciales
 - Por ej. semillas de Ambrosia spp

- Sección VII: Aditivos autorizados para piensos en piensos a los que no están destinados como resultado de una transferencia inevitable

Por ej monensina sódica.

En esta clasificación se recogen los niveles máximos que marca la normativa en las materias primas, piensos y aditivos.

Dentro de cada una de las sustancias indeseables se encuentra la información relativa a

- Definición
- Procedencia
- Límites máximos expresados en ppm.

El muestreo para la determinación de sustancias indeseables con excepción de los residuos de plaguicidas y microorganismos se llevan de acuerdo con el anexo I del Reglamento (UE) 152/2009

4-.DEFINICION Y CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSTANCIAS INDESEABLES

Sección I: Contaminantes inorgánicos y compuestos nitrogenados

La mayoría de elementos que clasificamos dentro de este grupo se consideran esenciales, aunque, en general, sus requerimientos son muy bajo (elementos traza) ya que su presencia en el ambiente es ubicua por lo que las materias primas destinadas a la alimentación animal contienen cantidades suficientes para cubrir dichas necesidades. Sin embargo como es el caso de la mayoría de oligoelementos, estos iones y elementos son solo tolerados hasta ciertos límites por los animales y personas. Por encima de estos límites, dichos elementos pueden producir intoxicaciones clínicas o subclínicas que dependerán en gran medida de la forma química (orgánica o inorgánica) del elemento.

El origen de estos iones y elementos puede ser geológico (características particulares de ciertos terrenos) o antropogénico (industrias de fundición) y en general se caracterizan por su distribución irregular

Estos iones y elementos son considerados como sustancias indeseables en la alimentación animal no solo por sus efectos tóxicos sobre los animales, sino también por ser una posible vía de entrada en la cadena alimentaria, y fuente de exposición para los humanos, al ser consumidos y acumulados en los animales domésticos.

Sección II: Micotoxinas

Las micotoxinas son compuestos químicos de bajo peso molecular fruto del metabolismo secundario de los hongos productores de micotoxinas u hongos micotoxigenicos bajo condiciones de humedad y temperatura de determinadas Se han identificado mas de 200 tipos diferentes de micotoxinas ,las cuales presentan una gran diversidad tanto en su estructura química, como en las micotoxinas que producen.

Si bien, la presencia de un hongo no asegura que se produzcan ni que existan micotoxinas y una sola especie de hongo puede producir varios tipos de micotoxinas

Tradicionalmente, los hongos micotoxígenos se dividen en hongos de campo(o fitopatógenos) y hongos de almacenamiento(o saprofitos): Así, en el caso de las toxinas producidas por el género *Fusarium* la contaminación suele producirse en el campo. Como representantes de este grupo de micotoxinas encontramos las fumonisinas, la zearolenona y los tricotecenos (desoxinivalenol) entre otras. La contaminación de los granos después de la cosecha se da principalmente por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que se caracterizan por la producción de toxinas como las aflatoxinas y las ocratoxinas.

Las micotoxinas pueden infectar sistemas específicos del organismo pero generalmente dañan el hígado o los riñones por lo que alteran los procesos metabólicos del animal produciendo condiciones adversas que dan lugar a síntomas como el hígado pálido, inflamación de riñones, mala absorción de nutrientes.... El grado de lesión depende de las micotoxinas involucradas, de la edad, y salud del animal, del nivel de contaminación del alimento el tiempo de exposición de los alimentos contaminado.

La aflatoxina B₁ producida en los hongos de almacenamiento. La aflatoxina B₁ es la más frecuente y de sus metabolitos el M₁ es el más tóxico (leche y productos lácteos): Son hepatotóxicos y teratógenos.

Las únicas micotoxinas que tienen un límite legal en alimentación animal son la aflatoxina B₁ y el cornezuelo del centeno.

La Comisión europea ha publicado una recomendación de valores guía en los piensos para la presencia de deoxinivalenol, la zearaleonona, la ocratoxina A y las fumonisinas (Recomendación 2006/576/CE de la Comisión). El objetivo del establecimiento de estos valores guías, no es otro que el de concienciar a los operadores de empresas de pienso de la necesidad de un mayor control de estas toxinas, así como realizar un estudio de sus niveles de incidencia en los productos destinados al consumo animal.

Sección III: Toxinas vegetales inherentes

Las materias primas de origen vegetal pueden contaminarse con una gran variedad de materiales de origen botánico. En algunos casos, estas toxinas son sustancias inherentes a ciertas materias primas que alcanzan, bajo ciertas circunstancias, niveles causantes de toxicidad.

Tenemos el gossipol libre es un pigmento amarillo, es un compuesto polifenólico termoestable que se sintetiza y se concentra de forma natural en la semilla, hojas y raíces de la mayoría de las plantas de algodón como defensa de dichas plantas frente al ataque de insectos y plagas. El gossipol se puede encontrar en forma libre o ligada (enlace con proteínas) siendo la forma ligada menos tóxica en comparación con la libre. Los procesos con temperatura y humedad convierten la forma libre en una forma ligada menos tóxica.

Sección IV: Compuestos organoclorados (excepto dioxinas y PCB, s)

La mayoría de estos compuestos pertenecientes a este grupo fueron introducidos en los años 40 como insecticidas para las plantas (pre y post cosechado) y para la protección de

los animales .Sin embargo, ya en los años 70 empezó a aumentar la preocupación respecto a la posible toxicidad de estos productos, su elevada persistencia en el ambiente y su habilidad para acumularse en la cadena alimentaria. Esta preocupación desencadenó que se prohibieran la mayoría de usos de estos productos en el sector agrícola tanto a nivel de Europa como en los Estados Unidos. Sin embargo algunos de estos pesticidas organoclorados siguen siendo utilizados en terceros países.

- Los diez pesticidas organoclorados a los que se ha establecido un contenido máximo en los alimentos destinados a alimentación animal, comparten una serie de características comunes
- Pertencen a 4 categorías de estructuras cíclicas cloradas con baja polaridad(soluble en lípidos) y buena resistencia a la degradación físico-química
- Se acumulan en tejidos grasos de peces, aves y mamíferos, pero también en plantas (por transferencia desde el suelo)
- Son persistentes en el suelo y los sedimentos (contaminantes orgánicos persistentes, POP, S)
- Son tóxicos para los animales según el tipo de compuesto Químico
- Son fácilmente detectables como compuestos individuales así como en familia (métodos multiresiduos) a niveles muy bajos.

Por todo ello, se puede concluir que la situación en relación a la exposición de los animales y los humanos a los pesticidas organoclorados a través de productos de origen europeo parece estar actualmente controlado de manera satisfactoria. Sin embargo, su conocida toxicidad intrínseca junto con su uso aun permitido en terceros países, justifica, por el momento, el control de su presencia en alimentos para animales importados.

Sección V: Dioxinas y PCB, s

Dioxinas engloba a un amplio grupo de sustancias (policlorodibenzodioxinas,PCDD) que pertenecen a la familia de los Contaminantes Orgánicos Persistentes(POPs), los cuales se caracterizan por ser altamente estables frente a la degradación por lo que tienden a acumularse en el medio ambiente, persistiendo inalterados mucho tiempo.

La toxicidad de estos compuestos viene determinada por el número y posición de los átomos de cloro en su molécula. En este sentido, los congéneres que poseen de 4 a 6 átomos de cloro en su molécula, especialmente en las posiciones 2, 3,7 y 8(y muy particularmente la 2,3, 7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina o TCDD) son los más tóxicos.Asi de todas las dioxinas posibles, 17 tienen importancia toxicológica mientras que las 193 restantes contribuyen poco a la toxicidad de la mezcla. Para determinar la concentración de los PCDD verdaderamente tóxicos se ha establecido la unidad TEF (Toxic Equivalency factors) basada en referir a la potencia de la 2, 3, 7,8TCDD el valor máximo de toxicidad que es 1, de forma que los otros congéneres poseerán un valor inferior situado entre 0.1 y 0.0001. Esta nomenclatura ha sido adaptada a la nomenclatura española de forma que en la legislación vigente se habla de EQTo “Equivalente Tóxico “de una mezcla , que se calcula hallando el sumatorio de la concentración de los distintos isómeros encontrados para una muestra en concreto multiplicando por el factor de toxicidad relativa(TEF) de cada uno de los elementos.

Los animales más sensibles a la exposición por PCDD son las aves y los peces.

PCBs similares a las dioxinas los PCB pertenecen al grupo de hidrocarburos clorados que se sintetizan directamente a partir del bifenilo y como las dioxinas pertenecen a la familia de los POPs. Dependiendo del número de átomos de cloro (de 1 a 10) y su posición en los dos anillos hay 209 compuestos denominados también congéneres. De ellos 12 son tóxicos, los comúnmente llamados PCBs similares a las dioxinas, de hecho los efectos biológicos son muy parecidos al de las dioxinas

Sección VI Impurezas botánicas perjudiciales aquí se encuentran las semillas de malas hierbas que están presentes de manera generalizada en los cultivos y consecuentemente en las materias primas destinadas a la alimentación animal.

Sección VII Aditivos autorizados para piensos en piensos a los que no están destinados como resultado de una transferencia inevitable. Los coccidiostáticos y los histomonostatos son sustancias químicas, obtenidas bien por síntesis o bien producidas por microorganismos, que inhiben o destruyen los parásitos protozoarios que provocan coccidiosis o histomoniasis en animales de granja. Asimismo, los coccidiostáticos pueden tener una actividad secundaria y residual contra la microflora intestinal, pero son diferentes de los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento, que actúan principalmente sobre la microflora intestinal

5.-MÉTODOS DE ANÁLISIS

1-**Metales pesados** se determinan mediante ICP-masas, previamente se realiza una digestión ácida en microondas.

2-**Flúor** se determina mediante electrodo selectivo

3-**Nitritos** la extracción es casi siempre acuosa. A veces se adicionan álcalis (NH_4OH , NaOH o NH_4Cl) para evitar la alteración de los nitritos. La determinación se realiza mediante HPLC con detector PAR. El reglamento 574/2011 modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE con respecto a los contenidos máximos de nitritos, melanina y *Ambrosia* spp, y a la transferencia de determinados coccidiostáticos e histomonostatos, y por los que se consolidan sus anexos I y II.

4-**Micotoxinas** son métodos multietapas: Extracción, filtración, purificación, concentración.

La detección se puede realizar

- Métodos inmunoquímicos:
- ELISA
- RIA
- Columnas de inmunoafinidad
- Métodos cromatográficos:
 - Cromatografía Gases MS/MS es menos frecuente ya que las micotoxinas no son suficientemente volátiles
 - HPLC MS/MS mediante la adición de un patrón interno.

5-**Organoclorados** disponen de una serie de etapas:

Preparación de la muestra.

- Extracción los restos de pesticidas son separados de la mayor parte de los constituyentes utilizando los disolventes apropiados.
- Purificación es extracto se purifica eliminando aquellos coextractos que puedan interferir en las etapas posteriores.
- Separación de los componentes de extracto purificado.
- Detección y cuantificación

Se realiza mediante Cromatografía de gases MS/MS mediante patrón interno.

6-**Melamina** es rica en nitrógeno y esta característica ha llevado a su adición ilegal en los alimentos y piensos con el fin de aumentar el contenido aparente de proteínas de los alimentos y piensos

Se determina mediante HPLC MS/MS

7-**Dioxinas**; PCB, s similares a dioxinas y PCB, s no similares a dioxinas.

Se realizan dos tipos de métodos:

- Métodos de cribado en muestras con niveles significativos. Requisitos adecuados para el método de cribado, de modo que arroje menos del 5% de falsos negativos
- Métodos de confirmación deben basarse en métodos bioanalíticos o CG MS/MS.

8-**Gosipol** se determina mediante espectrofotometría UV-Visible.

6-MARCO LEGAL

Directiva 2002/32/CE

R.D 465/2003 sobre las sustancias indeseables en alimentación animal.

Reglamento (UE) 2019/1069 por la que se modifica y corrige el anexo I de la Directiva 2002/32/CE en lo que respecta a los contenidos máximos de algunas sustancias indeseables en la alimentación animal.

7-Bibliografía

Guía Cesfac para sustancias indeseables.

Directiva 2002/32/CE

Reglamento (CE) 401/2006 se establecen métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

Reglamento (CE) 333/2007 se establecen los métodos y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3MCPD y benzopiranos en los productos alimenticios.

Reglamento 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 68

**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 NADPH₂. 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 CO₂ 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 Na₂O):
- Azufre (expresado como SO₃): 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 P₂O₅)

ZZ: % en masa de Potasio (en forma de K₂O)

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 (Na₂O),
- 5% de trióxido de azufre (SO₃).

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 (P₂O₅) 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.

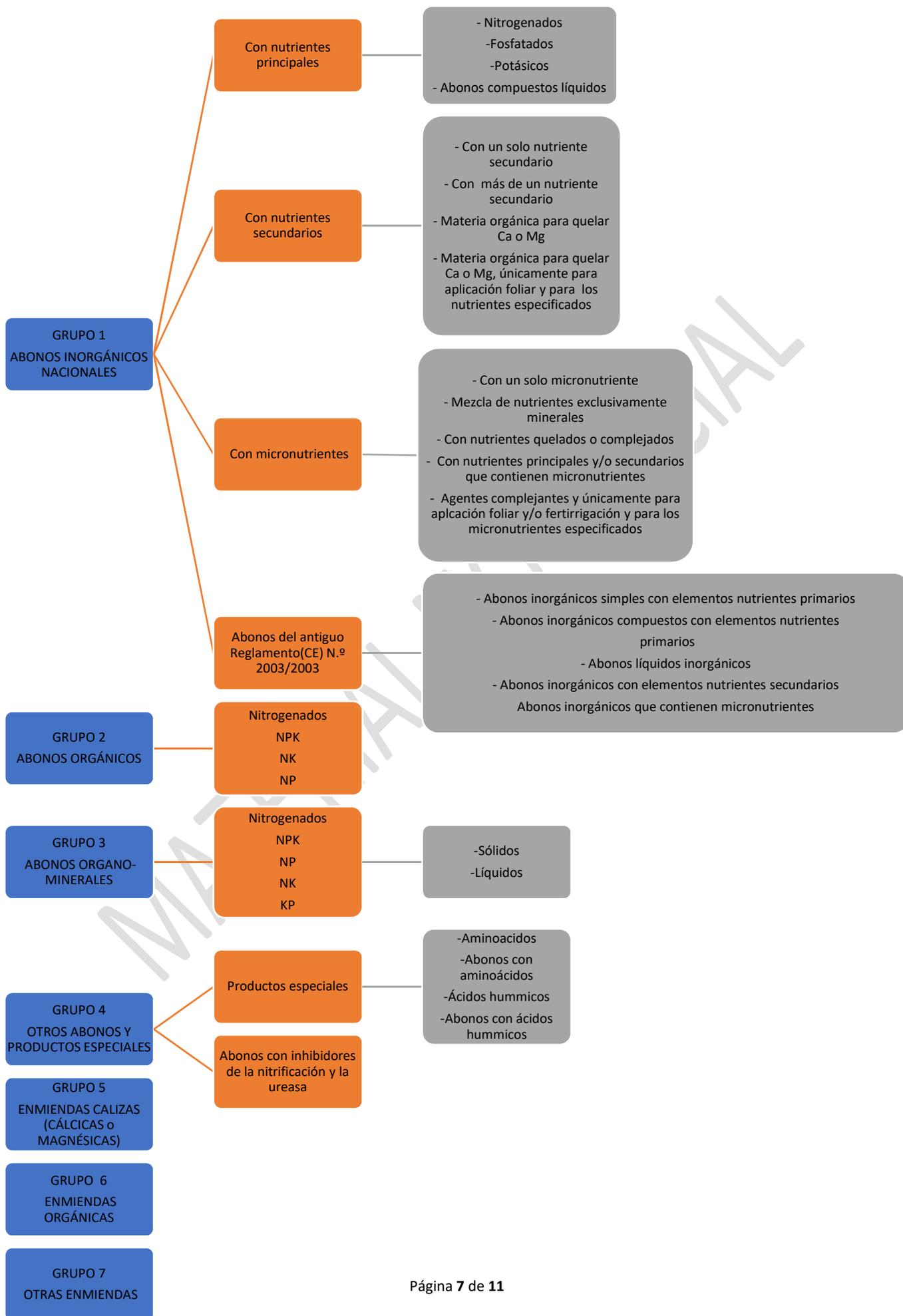
El fabricante no podrá beneficiarse sistemáticamente de los márgenes de tolerancia que figuran en la legislación

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 69

PRODUCTOS FITOSANITARIOS. MECANISMO DE ACCIÓN. CRITERIOS DE CALIDAD. 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 (PH₃), 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> ± 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
Nota 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 ± 2 °C; 8 semanas a 40 ± 2 °C; 12 semanas a 35 ± 2 °C ó 18 semanas a 30 ± 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 70

RESIDUOS DE PESTICIDAS I. LEGISLACIÓN EUROPEA Y NACIONAL. LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS. SEGUIMIENTO Y CONTROL.

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 PESTICIDAS I.
2. LEGISLACIÓN EUROPEA Y NACIONAL.
LEY 43/2002 DE SANIDAD VEGETAL
DIRECTIVA 2009/128/CE, DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO POR LA QUE SE ESTABLECE EL MARCO DE LA ACTUACIÓN COMUNITARIA PARA CONSEGUIR UN USO SOSTENIBLE DE LOS PLAGUICIDAS.
REGLAMENTO (CE) Nº 1107/2009, DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, RELATIVO A LA COMERCIALIZACIÓN DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS.
REGLAMENTO 396/2005, DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, RELATIVO A LOS LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS Y PIENSO DE ORIGEN VEGETAL O ANIMAL.
3. LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS.
LMR EN ALIMENTOS TRANSFORMADOS
4. SEGUIMIENTO Y CONTROL
5. BIBLIOGRAFÍA

1. RESIDUOS DE PESTICIDAS I.

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).

De acuerdo con el Reglamento 1107/2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, los fitosanitarios se definen como aquellos productos que contienen o están compuestos de sustancias activas, protectores o sinergistas, destinados a uno de los usos siguientes (AESAN, 2022):

- a) proteger los vegetales de organismos nocivos o evitar su acción.
- b) influir en los procesos vitales de los vegetales, como las sustancias que influyen en su crecimiento, pero de forma distinta de los nutrientes.
- c) mejorar la conservación de los productos vegetales.
- d) destruir y controlar o evitar el crecimiento de vegetales no deseados, excepto las algas.

En la Unión Europea no pueden autorizarse sustancias activas de productos fitosanitarios a menos que se haya probado científicamente antes que (AESAN, 2022):

- a) No producen efectos perjudiciales en los consumidores, los agricultores ni terceros
- b) No provocan efectos inaceptables en el medio ambiente
- c) Son suficientemente eficaces.

Sin embargo, la utilización de los plaguicidas en las cosechas puede conllevar la presencia de **residuos**, sustancias químicas resultantes de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus **metabolitos** y los **productos resultantes** de su **degradación** o reacción.

Según el Reglamento 1107/2009, 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:

- a) hay razones para suponer que posee propiedades intrínsecas comparables a las de la sustancia originaria en términos de su actividad biológica objetivo o
- b) plantea un riesgo superior o comparable al de la sustancia originaria para los organismos o
- c) presenta determinadas propiedades toxicológicas que se consideran inaceptables.

Este tipo de metabolito será relevante para la decisión de aprobación general o para la definición de medidas de mitigación de riesgos.

Por otro lado, una **sustancia preocupante** es toda sustancia con capacidad de producir efectos nocivos en los seres humanos, animales o el medio ambiente, y que esté presente o se produzca en un producto fitosanitario en concentración suficiente para representar un riesgo. Dichas sustancias incluyen, entre otras, las que cumplan los criterios para ser clasificadas como peligrosas de acuerdo con el Reglamento 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (Reglamento CLP).

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.

Los *productos fitosanitarios*, son imprescindibles para la producción agrícola bajo sistemas convencionales y bajo otros sistemas de agricultura, como la integrada o la ecológica. Los daños potenciales de las diferentes plagas determinarían la inviabilidad de muchos cultivos en las zonas de producción de mayor interés o la posibilidad de mantener almacenadas las cosechas. Sin embargo, la utilización de productos fitosanitarios puede tener efectos no deseables y es imprescindible que no sean peligrosos para la salud humana o el medio ambiente, incluidas la flora y la fauna silvestres (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), 2022).

Los productores han de tener en consideración los plazos de seguridad de las distintas materias activas (días que deben transcurrir entre la última aplicación del plaguicida y la recolección del producto vegetal), la dosificación del producto, el tiempo de vida residual media (días que tarda un residuo en llegar a un valor correspondiente al 50% del depósito inicial) y la persistencia del producto (tiempo para que el plaguicida pierda al menos el 95% de su actividad bajo condiciones ambientales y dosis de aplicaciones normales). La persistencia de un plaguicida determinará su capacidad contaminante. En la planta dependerá de la acción de diversos factores, como son el crecimiento vegetal, causas mecánicas y físicas y la degradación química, que van a influir en la disminución progresiva de los residuos (Simó Pereiró, 2018).

2. LEGISLACIÓN EUROPEA Y NACIONAL.

LEY 43/2002 DE SANIDAD VEGETAL

Esta ley tiene por objeto establecer la normativa básica y las normas de coordinación en materia de sanidad vegetal. Sus objetivos incluyen, entre otros proteger los vegetales y los productos vegetales de los daños ocasionados por las plagas, prevenir los riesgos que para la salud de las personas y animales y contra el medio ambiente puedan derivarse del uso de los productos fitosanitarios o garantizar que los medios de defensa fitosanitaria reúnan las debidas condiciones de utilidad, eficacia y seguridad.

Entre otros aspectos, en su Título III se recogen los medios de defensa fitosanitaria, entre los que se incluyen las sustancias activas y los productos fitosanitarios y su autorización. El Título IV está dedicado a la inspección y control indicándose que los controles *corresponden a los órganos competentes de las Comunidades Autónomas, serán coordinados por la Administración General del Estado, estableciendo, a tal efecto, los planes o programas nacionales de control.*

DIRECTIVA 2009/128/CE, DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO POR LA QUE SE ESTABLECE EL MARCO DE LA ACTUACIÓN COMUNITARIA PARA CONSEGUIR UN USO SOSTENIBLE DE LOS PLAGUICIDAS.

Esta directiva establece un marco para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. Se transpone a nuestro ordenamiento jurídico por **Real Decreto 1311/2012** por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios mediante dos aproximaciones:

- la reducción de los riesgos y efectos del uso de productos fitosanitarios en la salud humana y el medio ambiente.
- el fomento de la gestión integrada de plagas y de planteamientos o técnicas alternativos, tales como los métodos no químicos.

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación será el competente para la coordinación de dichas acciones. Se establece así el **Plan de Acción Nacional (PAN)**, donde se detallan los objetivos cuantitativos, metas, medidas y calendarios. El PAN se aplicará durante un periodo plurianual, como mínimo de 5 años, con el fin de disponer de datos comparativos que permitan evaluar la eficacia de las actuaciones.

El **Real Decreto 285/2021** por el que se establecen las condiciones de almacenamiento, comercialización, importación o exportación, **control oficial y autorización de ensayos con productos fitosanitarios**, y se modifica el Real Decreto 1311/2012, establece las disposiciones específicas para la aplicación del Reglamento sobre controles oficiales (Reglamento 625/20117) en lo referente a la realización de los controles oficiales en el este ámbito y la elaboración del **Programa de control oficial de la comercialización, importación o exportación, de productos fitosanitarios.**

REGLAMENTO (CE) Nº 1107/2009, DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, RELATIVO A LA COMERCIALIZACIÓN DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS.

Este Reglamento establece las normas aplicables a la autorización de productos fitosanitarios en su presentación comercial, y a su comercialización, utilización y control en la Unión Europea, así como las normas relativas a la aprobación de sustancias activas, protectores y sinergistas contenidos en los productos fitosanitarios o que son ingredientes de estos, y normas relativas a los adyuvantes y coformulantes. Su finalidad es garantizar un nivel elevado de protección de la salud humana y animal, del medio ambiente y mejorar el funcionamiento del mercado interior mediante la armonización de las normas, a la vez que se mejora la producción agrícola.

El **Reglamento 1107/2009** establece, en su artículo 28, que los productos fitosanitarios sólo podrán comercializarse y utilizarse si son conformes con lo recogido en él y si han sido **autorizados** en el Estado miembro de que se trate. Además, su artículo 68, establece que los Estados Miembros (EEMM) realizarán los **controles oficiales** con el fin de garantizar su cumplimiento (Gobierno Vasco, 2021).

La autorización para la comercialización y uso de los productos fitosanitarios en España es concedida por la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Establece varias condiciones que deben cumplirse para autorizar el uso de productos fitosanitarios en la UE (valoración de efectos medioambientales, ecotoxicológicos, seguridad del operador, seguridad alimentaria y eficacia) (AESAN, 2015)

El **Real Decreto 971/2014** regula el procedimiento de evaluación de productos fitosanitarios. Este real decreto tiene por objeto:

- a) Regular la participación de España en el procedimiento de aprobación de sustancias activas, protectores, y sinergistas, y de autorización de productos fitosanitarios, y adyuvantes, así como de renovación y revisión de los mismos.
- b) Dictar disposiciones específicas para la aplicación en España del Reglamento 396/2005 relativo a los LMR de plaguicidas.
- c) Regular el procedimiento de autorización de organismos independientes que lleven a cabo los trabajos de evaluación científico-técnica de las solicitudes presentadas por las empresas.

La Administración aplicará los mecanismos necesarios para que sólo puedan comercializarse aquellos productos fitosanitarios que sean útiles y eficaces para combatir las plagas, pero que no comporten otros riesgos colaterales. Para que un producto pueda comercializarse debe estar autorizado previamente e inscrito necesariamente en el **Registro Oficial de Productos Fitosanitarios** (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), 2022).

Para la autorización de un producto fitosanitario es necesario fijar previamente un LMR que cubra y asegure la inocuidad de dicho uso. El Real Decreto 971/2014, por el que se regula el procedimiento de evaluación de productos fitosanitarios, establece cómo se llevará a cabo la determinación del LMR.

REGLAMENTO 396/2005, DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, RELATIVO A LOS LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS Y PIENSO DE ORIGEN VEGETAL O ANIMAL.

El **Reglamento 396/2005** relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal es una norma de Salud Pública que recoge los LMRs de sustancias activas en los alimentos como consecuencia del uso de productos fitosanitarios. Esta es la norma que debe aplicarse para asegurar la protección de los consumidores de esos alimentos (AESAN, 2015)

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.

Dicho reglamento establece disposiciones comunitarias armonizadas relativas a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. Sus anexos son modificados periódicamente, en base a nuevas sustancias, nuevos datos obtenidos por el análisis de los alimentos, o modificaciones de los límites inicialmente determinados.

Será aplicable a los productos y partes de productos de origen vegetal y animal comprendidos en su anexo I que vayan a utilizarse como alimentos o piensos, frescos, transformados o compuestos en los que pueda haber residuos de plaguicidas. Estos productos se agruparán de forma que, en la medida de lo posible, puedan fijarse LMR para un grupo de productos similares. En sus Anexos II y III se establecen los LMRs, mientras que en su Anexo IV encontramos la lista de sustancias activas de productos fitosanitarios para los que no se exigen LMR.

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.

3. LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS.

Los residuos de plaguicidas son cantidades mensurables de sustancias activas (sustancias químicas utilizadas para proteger a las plantas contra enfermedades y plagas) y sus metabolitos o productos de degradación que se pueden encontrar en los cultivos cosechados o en los productos alimenticios de origen animal (EFSA, 2022).

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.

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): la superación de un LMR no implica necesariamente la existencia de un riesgo para la salud y los LMRs son toxicológicamente aceptables porque su cumplimiento asegura que no producen efectos tóxicos en los individuos, ni a corto ni a largo plazo.

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:** Información acerca de la estructura química y propiedades de la sustancia química. Conlleva también la definición del residuo marcador que será analizado por los laboratorios.
- b) **Caracterización del factor de peligro:** Los ensayos toxicológicos de la sustancia activa en cuestión permiten fijar ciertos parámetros como la Ingesta diaria admisible (IDA) y, en su caso, la Dosis de referencia aguda (DRfA).
- c) **Determinación de la exposición:** Resulta de la combinación de la información de los ensayos de residuos que revelan la concentración de residuos que puede aparecer en un cultivo tratado con un plaguicida bajo determinadas condiciones de uso (Buena Práctica Agrícola crítica), con la utilización de apropiados modelos de dieta que determinan la ingesta diaria estimada del residuo fitosanitario de la población europea.

Se define la **Buena Práctica Agrícola Crítica** como aquella de la que se espera la mayor concentración de residuos en los alimentos (dosis máxima de aplicación, mayor número de aplicaciones...)

- d) **Caracterización del riesgo:** se cruzan los niveles de residuos resultantes de la aplicación solicitada con los parámetros toxicológicos de la sustancia activa, de manera que si no se supera la IDA (Ingesta diaria admisible) ni la DRfA (Dosis de referencia aguda), se podría admitir los LMRs propuestos y continuar el proceso de establecimiento de LMRs previsto en el Reglamento 396/2005.

A continuación, el informe de evaluación de riesgo al consumidor con la propuesta de LMR firmada por uno de los 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

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)

Este sistema es apropiado para evaluar el riesgo para los consumidores asociados al empleo de productos fitosanitarios y a la vez permite a las autoridades de control oficial verificar el cumplimiento de la legislación alimentaria.

Aunque las solicitudes de LMRs se tramitan mediante un procedimiento europeo, la autorización-registro de productos fitosanitarios continúa siendo competencia de los EEMM. Las autoridades competentes nacionales de los EEMM son responsables de:

- la evaluación del riesgo para el consumidor asociado a tal medida (AESAN)
- registro del uso del producto fitosanitario (MAPA).
- control y de la aplicación de estos LMRs (CCAA).

Por último, los fabricantes de los productos fitosanitarios tienen la responsabilidad de garantizar que los productos comercializados cumplen con las especificaciones marcadas en la autorización, que los agricultores tienen la obligación de cumplir con los

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 71

RESIDUOS DE PESTICIDAS II. 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 PESTICIDAS II.
2. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN
 - MÉTODOS DE MUESTREO
 - MÉTODOS DE EXTRACCIÓN
 - Extracción con disolventes orgánicos
 - Extracción en fase sólida (SPE)
 - ANÁLISIS INSTRUMENTAL
 - Cromatografía de gases
 - Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
 - Espectrometría de masas (MS)
 - Efecto matriz
 - INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
3. BIBLIOGRAFÍA

1. RESIDUOS DE PESTICIDAS II.

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).

Los *productos fitosanitarios* son imprescindibles para la producción agrícola bajo los sistemas convencionales de agricultura, y también bajo otros sistemas de agricultura, como la integrada o la ecológica, ya que los daños potenciales de las diferentes plagas determinarían la inviabilidad de muchos cultivos en las zonas de producción de mayor interés económico y social o la posibilidad de mantener almacenadas las cosechas. Sin embargo, la utilización de productos fitosanitarios puede tener otros efectos no deseables y es imprescindible que estos efectos no sean en ningún modo peligrosos para la salud humana o el medio ambiente, incluidas la flora y la fauna silvestres. En consecuencia la Administración aplica los mecanismos necesarios para que sólo puedan comercializarse aquellos productos fitosanitarios que sean útiles y eficaces para combatir las plagas, pero que no comporten otros riesgos colaterales. (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), 2022)

Aun así, la utilización de los plaguicidas en las cosechas puede conllevar la presencia de **residuos**, sustancias químicas resultantes de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus **metabolitos** y los **productos resultantes** de su **degradación** o reacción.

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)**: límite legal superior de concentración de un residuo de plaguicida en alimentos o piensos establecido de conformidad con el Reglamento (UE) Nº 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 (AESAN, 2015).

El Reglamento 625/2017 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, establece que las autoridades competentes solo podrán designar como laboratorio oficial un laboratorio que funcione de acuerdo con la norma UNE EN ISO/IEC 17025:2017 y esté acreditado. En el caso de los residuos de plaguicidas la acreditación de un laboratorio oficial podrá definirse de manera flexible: un **alcance flexible** es un sistema mediante el cual el laboratorio puede extender el alcance de su acreditación a nuevos ensayos dentro de una categoría de ensayos (por ejemplo matrices con alto contenido

en agua, con bajo contenido en agua, con alto contenido en grasa, etc.) ya que su competencia técnica ha sido evaluada tanto para la realización de ensayos de la categoría como para el desarrollo y validación de nuevos ensayos dentro de esa categoría (entendiéndose categoría de ensayo como un conjunto de ensayos realizados por una técnica o método de ensayo común para determinar un parámetro o familia de parámetros en un producto o familia de productos).

De este modo se valida un plaguicida con una técnica en matrices representativas, pudiendo emitirse resultados acreditados para otra matriz de la misma categoría y el mismo plaguicida. Para categorías nuevas o plaguicidas nuevos se requiere una validación completa.

La **Nota Técnica NT-19** de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) describe los criterios a tener en cuenta en la evaluación de laboratorios de ensayo que solicitan la acreditación flexible para análisis de residuos de plaguicidas en productos agroalimentarios como categoría de ensayos.

El laboratorio debe publicar una **Lista Pública de Ensayos (LPE)**, un documento público, elaborado, revisado y controlado por el laboratorio, en el que se incluyen concretamente las matrices y plaguicidas para los que el laboratorio ha validado el funcionamiento del método y dónde se indican los Límites de Cuantificación (LQ) para cada binomio matriz/plaguicida. El laboratorio debe establecer la sistemática de actualización de la LPE en función de las validaciones/comprobaciones realizadas.

El documento de referencia para la validación de métodos en plaguicidas es la Guía de la Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria (DG SANTE) de la Comisión Europea "*Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*". La versión actual de la guía es el documento SANTE/11312/2021 (aplicable desde el 1 de enero de 2022) y describe los métodos de validación y los criterios de calidad analíticos para respaldar la validación de los datos empleados para verificar el cumplimiento de los LMR.

Los LMR pueden ser de dos tipos:

- Relativos a la sustancia activa
- En los que aplica la definición de residuo.

En el último 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. Se determina la concentración de cada compuesto, se expresa cada uno de ellos como aldicarb teniendo en cuenta la relación entre sus pesos moleculares y se suma.

2. 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).

MÉTODOS DE MUESTREO

El **Real Decreto 290/2003**, por el que se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal, tiene por objeto establecer los métodos aplicables a los **muestreos de productos de origen vegetal y animal para determinar los niveles de residuos** de plaguicidas. Las muestras destinadas al control oficial de los niveles de residuos de plaguicidas en cereales, frutas y hortalizas y en productos de origen animal se tomarán con arreglo a los métodos en él descritos. El objetivo de estos procedimientos de muestreo es que se pueda obtener una muestra representativa de un lote para realizar un análisis, con el fin de determinar su conformidad con los LMR de plaguicidas. Este Real Decreto es resultado de la transposición a nuestro ordenamiento jurídico de la **Directiva 2002/63/CE** de la Comisión por la que se establecen los métodos comunitarios de muestreo para el control oficial de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal.

En el Anexo del RD 290/2003 se definen los distintos tipos de muestra (a granel, primaria, de laboratorio, analítica), se define como ha de tomarse la muestra, las precauciones que se deben tomar en el proceso de muestreo, número de muestras primarias por lote según el tipo de muestra, se clasifican los productos según su origen y tipología y se determina el tamaño de la muestra de laboratorio y la naturaleza de las muestras que deben tomarse (unidades enteras, tomadas con instrumento de muestreo, etc.)

Las partes del producto que deben ser analizados están estipulados en el Reglamento (CE) N° 396/2005 en su anexo I.

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 multiresiduo son los más usados puesto que permiten extraer, con relativa facilidad, gran cantidad de pesticidas 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 Na₂SO₄ para aumentar la fuerza iónica e incrementar la cantidad de analitos extraídos, separando mejor las fases.

Los métodos multiresiduos (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)**

En el análisis multiresiduo de plaguicidas en frutas y vegetales, uno de los métodos de extracción más utilizados es la extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS) por ser uno de los procedimientos más rápidos y sencillos. Este método combina dos etapas, una etapa de extracción de la muestra con acetonitrilo y diferentes sales, y una fase de dispersión en fase sólida donde se realiza una limpieza o "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).

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 (MgSO₄)** 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. Se elimina así el agua residual y los compuestos presentes en la matriz del alimento que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos. Las sales y sorbentes empleados en esta fase son (Fuentes López, García Martínez, & Fernández Segovia, 2015):

- **Sulfato de magnesio (MgSO₄):** 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”.

- **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. Estos analitos pueden ser adsorbidos por el sólido, o bien permanecer en la otra fase siendo en este caso los compuestos interferentes los que quedarían retenidos en la fase sólida. En el primer caso, posteriormente los analitos podrán ser recuperados empleando un disolvente adecuado para su elución. La selección del adsorbente es un factor muy importante, que dependerá del analito y de sus grupos funcionales, del tipo de muestra y de cómo interacciona esta con el adsorbente (Peña Badenas, 2011). La extracción en fase sólida consta principalmente de cuatro etapas: acondicionamiento del soporte, adición de la muestra, lavado de interferentes y finalmente elución del analito de interés mediante un disolvente selectivo.

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, incluso en combinación con columnas de diferente polaridad, no proporciona una identificación inequívoca. Estas limitaciones pueden ser aceptables para plaguicidas que se encuentran con frecuencia, especialmente si sus resultados también se confirman utilizando una técnica de detección más específica.

La cromatografía de gases (GC) y/o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) es la técnica más usada para la identificación y cuantificación de plaguicidas en muestras de alimentos y piensos. Se pueden emplear diversos métodos de detección de MS como un simple o triple cuadrupolo, trampa de iones, tiempo de vuelo u orbitrap. Las técnicas de ionización también son variadas e

incluyen impacto electrónico (EI), ionización química (CI), ionización química a presión atmosférica (APCI) e ionización por electroespray (ESI). 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. Son 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 que sus limitaciones (DG SANTE, 2021). Los más habituales son los siguientes:

- **Detectores termiónicos o de nitrógeno-fosforo (NPD):** son muy sensibles a los compuestos nitrogenados o fosforados. Incluyen un pequeño cilindro de cerámica, dopado de una sal alcalina al que se le aplica una tensión eléctrica para mantener un pequeño plasma (800°C) alimentado por una mezcla de aire/ hidrógeno (Simó Pereiró, 2018)
- **Detectores de captura electrónica (ECD):** altamente selectivos para derivados halogenados. Se emplean para organoclorados. En la matriz existen una gran cantidad de compuestos que pueden captar electrones, por lo que la selectividad es baja para otros compuestos. Una corriente de nitrógeno ionizada por un haz de electrones generados por de una fuente radiactiva β^- de energía débil, circula entre dos electrodos sometidos a una diferencia de potencial. Cuando las moléculas que contienen halógeno atraviesan la zona entre los dos electrodos captan parte de los electrones para formar iones más pesados y menos móviles (Simó Pereiró, 2018).
- **Fotométrico de llama (FPD):** sensible a los compuestos azufrados o fosforados. Tiene la capacidad de producir especies quimio-luminiscentes en la llama. Estas especies emiten luz a una determinada longitud de onda característica de las especies en la muestra, que pueden aislarse fácilmente con un filtro óptico de modo que la luz emitida se registra en un fotomultiplicador (Simó Pereiró, 2018).

El acoplamiento de la cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas (GC-MS) como la 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), supera los problemas de determinación de estos pesticidas, siendo además una técnica muy específica que permite obtener unos bajos límites de detección. Así, la combinación de ambas técnicas permite determinar un amplio número de pesticidas, con una elevada sensibilidad y especificidad, en un amplio número de muestras.

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.

Existen diferentes tipos de analizadores de espectrometría de masas, entre los que destacan por su relevancia el cuadrupolo (Q), la trampa de iones (IT, LIT), el analizador de tiempo de vuelo (TOF), el sector magnético y la resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (FTMS), aunque el más utilizado es el cuadrupolo.

Un **cuadrupolo** consiste en cuatro barras paralelas de sección circular o hiperbólica, equidistantes de un eje imaginario. Sobre cada pareja de barras opuestas se aplican voltajes variables de corriente continua y radiofrecuencia, de modo que los iones que viajan a lo largo del eje están sometidos a un campo eléctrico total y cambiante que resulta de la aplicación de distintos potenciales a las barras. Cuando los iones de determinada m/z atraviesan el cuadrupolo sufren aceleraciones a lo largo del eje horizontal y perpendicular a la trayectoria. La trayectoria para una determinada m/z se estabiliza y nunca toca las barras, llegando al detector. Los iones que no consiguen estabilizar la trayectoria, chocan contra las barras y no son detectados. Así, aplicando diferentes voltajes pueden seleccionarse los iones que llegan al detector (Peruga Minguez, 2015).

Los modos de trabajo de un cuadrupolo son full-scan o barrido completo de iones (realiza un espectro de masas continuo en un rango definido) y selected ion monitoring

(SIM), que es el modo de trabajo en el que se seleccionan los iones específicos de los analitos, midiendo únicamente éstos (Peruga Minguez, 2015).

El triple cuadrupolo (QqQ) consiste en el acoplamiento de dos cuadrupolos (Q1 y Q2) separados por un hexapolo u octopolo llamado **celda de colisión**. La espectroscopia de masas en tándem (MS/MS) presenta un aumento de sensibilidad, selectividad, mejora la relación señal/ruido, así como la eliminación de picos interferentes, mejorando su aplicabilidad en muestras complejas (Peruga Minguez, 2015).

En el caso del QqQ se introduce un gas inerte en la celda de colisión a una presión determinada que, junto a la aplicación de los voltajes adecuados, causa la colisión con los iones procedentes del primer cuadrupolo, generándose los iones producto. Estos iones se transfieren al segundo cuadrupolo y llegan al detector (Peruga Minguez, 2015).

Los modos de trabajo de un QqQ son variados, dependiendo de cómo trabaje cada cuadrupolo, pero el modo más adecuado es el selected reaction monitoring (SRM), donde ambos cuadrupolos trabajan en SIM. Se selecciona un ion precursor en el primer cuadrupolo y tras la fragmentación, se seleccionan los iones producto en el segundo cuadrupolo (Peruga Minguez, 2015).

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 y que se engloban bajo la denominación de **efecto matriz**. El efecto matriz es la influencia, normalmente no deseada, 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 como la fuente de ionización o la interfase, las características físico-químicas del analito, la matriz de la muestra y los interferentes que co-eluyen con el analito (Peruga Minguez, 2015).

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 72

**CONTAMINANTES AGRÍCOLAS. MARCO LEGAL. MICOTOXINAS.
NITRATOS. TOXINAS DE PLANTAS. 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 AGRÍCOLAS**
- 2. MARCO LEGAL**
- 3. MICOTOXINAS-MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**
- 4. NITRATOS- MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**
- 5. TOXINAS DE PLANTAS- MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**

MATERIAL NO OFICIAL

1. CONTAMINANTES AGRÍCOLAS

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 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).

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.

3. 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.

-**Aflatoxinas.** Producidas por mohos del género *Aspergillus*. Existen cuatro aflatoxinas principales, conocidas como: Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1 y Aflatoxina G2.

La letra B indica que estas aflatoxinas tienen fluorescencia azul (blue) frente a la luz ultravioleta (365 nm), mientras que la letra G indica la fluorescencia verde amarillenta (green).

Son compuestos cancerígenos y genotóxicos, ya que la B1 puede provocar cáncer de hígado. El grado de toxicidad y carcinogenicidad de las aflatoxinas sigue el orden siguiente: B1 > G1 > B2 > G2.

-**Fusarium.** Los hongos del género *Fusarium*, muy comunes en el suelo, producen varios tipos de toxinas con efecto toxicológico en el ser humano. Por una parte, la especie *Fusarium verticilloides* produce las denominadas fumonisinas, la especie *Fusarium graminearum* produce dos tipos de toxinas, las estrogénicas, como la zearalenona (ZEA) y el zearalenol (ZON), y las no estrogénicas, los tricotecenos, de las que la más importante es el deoxinivalenol (DON). En este segundo grupo se encuentran también el nivalenol, la toxina T-2 y el diacetoxiscirpenol.

Aunque se conocen casos de intoxicaciones en humanos, éstas son muchísimo más comunes entre los animales domésticos. Los hongos del género *Fusarium* son abundantes en cultivos cereales (trigo, maíz, cebada, avena y centeno) y en productos a base de grano (pan, malta y cerveza). De forma más específica, DON y ZEA son frecuentes en el trigo, T2 y HT2 en avena y fumonisinas en maíz. Estos hongos son los principales contaminantes de los alimentos en las regiones templadas del planeta.

-Ocratoxina A (OTA). Es una micotoxina producida por varias especies de hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, principalmente *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergilli* de la sección *Nigri*, especialmente *A. carbonarius*.

Las ocratoxinas se encuentran principalmente en cereales y legumbres de regiones geográficas húmedas, tanto templadas como frías, así como en productos de molienda como el café, cacao y derivados, vino y bebidas alcohólicas, frutos secos, pasas e higos secos y zumo de uva. Al ser una molécula relativamente estable que normalmente resiste en mayor o menor medida la mayoría de los procesos productivos, puede estar presente en los alimentos para consumo humano.

La OTA ha sido clasificada según la IARC como posible carcinógeno en humanos (Grupo 2B) por sus propiedades carcinógenas, nefrotóxicas, teratógenas, inmunotóxicas y, posiblemente, neurotóxicas.

-Patulina. La patulina es una micotoxina producida por diversas especies de hongos de las especies *Penicillium*, *Aspergillus* y *Byssochyllum*, que se encuentra con frecuencia en productos derivados de la manzana, especialmente en zumos de manzana y en sidra. Esta micotoxina no se acumula en el organismo, pero su consumo en elevada cantidad por la ingesta de zumos de manzana o sidra contaminados puede producir efectos agudos gastrointestinales (hiperemia, distensión, hemorragia y úlcera).

-Alcaloides ergóticos. Los alcaloides del cornezuelo del centeno, derivados del triptófano, denominados alcaloides ergóticos (AEs), son producidos por diferentes hongos de los órdenes *Hypocreales* y *Eurotiales*. Sus efectos se conocen desde tiempos inmemorables, de hecho, en la Edad Media causaron epidemias severas conocidas como “El fuego de San Antonio” por consumo de cereales, harina o pan contaminados con este hongo. Hoy en día, a esta intoxicación por *Claviceps purpurea* presente en los cereales se le denomina “ergotismo”, aunque su incidencia se ha visto disminuida en gran medida en las últimas décadas por el conocimiento científico sobre el origen y la mejora en las prácticas agronómicas.

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.

El enfoque basado en el margen de exposición (MOE) proporciona una indicación del nivel de peligro sanitario sobre la presencia de una sustancia en los alimentos sin cuantificar el riesgo.

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. La extracción de las micotoxinas de la muestra se lleva a cabo mediante columnas de inmunoafinidad que retienen el analito en cuestión, que posteriormente es eluido, consiguiendo así una elevada sensibilidad y selectividad, ya que la extracción es muy limpia y elimina una elevada cantidad de interferencias. El inconveniente de esta extracción es el precio.

En las columnas de inmunoafinidad 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 recuperará 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.

4. 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 si se utilizan en exceso ya que el nutriente sobrante puede contaminar las aguas, superficiales o subterráneas. 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. Por ello, los cultivos de hoja como las lechugas y espinacas suelen contener las mayores concentraciones de nitratos. Las aguas de bebida también pueden contener nitratos procedentes principalmente de los abonos nitrogenados, ya que los nitratos son muy solubles en agua y se acumulan en las capas freáticas. 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:

a) Efecto metahemoglobinizante: los nitritos en sangre oxidan el Fe^{2+} de la hemoglobina a Fe^{3+} , impidiendo que pueda transportar oxígeno. Este efecto es muy frecuente en bebés expuestos a altas concentraciones de nitratos en alimentos y se llama "síndrome del bebé azul".

b) Favorecen la formación de nitrosaminas y nitrosamidas que tienen efecto cancerígeno.

Por todo lo expuesto, la Unión Europea establece límites de nitratos en algunos tipos de alimentos. Por ello, los Estados miembros llevan a cabo controles en alimentos para garantizar que los niveles de estos compuestos en alimentos son seguros para la salud humana.

Determinación

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.

Se han desarrollado una gran cantidad de métodos para la cuantificación de estos analitos en aguas y en otro tipo de muestras como alimentos y fluidos biológicos. 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.

5. 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.

Algunas toxinas son producidas por las plantas como un mecanismo de defensa natural contra depredadores, insectos o microorganismos, o como consecuencia de la infestación con microorganismos, como los hongos, en respuesta al estrés climático (como la sequía, humedad y/o temperatura extrema).

Otras fuentes de toxinas naturales son las algas microscópicas y el plancton presentes en los océanos o en los lagos, que producen compuestos químicos, que no son tóxicos para los peces o mariscos que se alimentan de dichas algas o plancton productores de toxinas. Sin embargo, cuando las personas comen pescado o mariscos que contienen dichas toxinas, la toxicidad puede ser alta.

Destacan los alcaloides tropanicos, 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.

Entra en la cadena alimentaria, principalmente cuando se utiliza aceite de colza en el procesamiento industrial y casero de alimentos. Está presente en pasteles, preparados para lactantes y preparados de continuación y también en algunos alimentos para animales, como la harina de colza.

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. Las semillas de *Datura stramonium* no pueden eliminarse con facilidad del sorgo, el mijo y el alforfón mediante selección y limpieza, por lo que estos tres cereales y sus productos derivados, así como los alimentos elaborados a base de cereales que los contienen, pueden presentar contaminación por alcaloides tropánicos.

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). La amigdalina se encuentra también en muchas frutas con hueso, como melocotones, ciruelas, cerezas o albaricoques. En la fabricación de mazapán utilizando como ingrediente las almendras amargas, para conseguir un aroma característico, es necesario eliminar el cianuro producido a expensas de la amigdalina. El mazapán fabricado en España

no lleva almendras amargas, pero sí el fabricado de modo tradicional en los países del Mahgreb.

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. Existen diferentes variedades de *Papaver somniferum*. Las variedades con bajo contenido en alcaloides se cultivan principalmente para uso alimentario. Estas semillas de adormidera se utilizan tradicionalmente en algunos países para la fabricación de productos de panadería, en rellenos de tartas, en postres y en la producción de aceite comestible. Las semillas de amapola sin moler a veces se usan como condimento o decoración en los alimentos. En España el consumo de estas semillas es reducido y se cultiva principalmente la variedad de adormidera destinada a la obtención de morfina. Aunque las semillas de adormidera no contienen alcaloides opiáceos o presentan unos niveles muy reducidos, pueden resultar contaminadas con alcaloides como consecuencia de daños causados por algunos insectos o de una contaminación externa.

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. Se ha estimado que aproximadamente 6.000 especies de plantas en todo el mundo pueden contener PAs, lo que representa el 3% de todas las plantas con flores. El 95% de estos PAs se encuentran principalmente en cinco familias de plantas angiospermas: Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Orchidaceae y Apocynaceae. El contenido depende de un gran número de factores (especie, órgano de la planta, cosecha, almacenamiento, procedimientos de extracción). Se han encontrado contenidos de PAs variables desde un nivel traza hasta un 19% del peso en seco de la planta. 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 (Δ^9 - THC), es un compuesto psicoactivo natural derivado de la planta de cáñamo *Cannabis sativa*, cultivada con fines industriales. Hay cuatro estereoisómeros de Δ^9 - THC: (-) -trans- Δ^9 - THC y (+) -trans- Δ^9 - THC, (-) - cis- Δ^9 - THC y (+) - cis- Δ^9 - THC, de los cuales (-) -trans- Δ^9 - THC es el único que se encuentra naturalmente y es el compuesto psicoactivo primario derivado de *C. sativa*. Los precursores no psicoactivos son los ácidos delta-9-tetrahidrocannabinólicos A y B. Los precursores están predominantemente presentes en el cultivo y en la planta cosechada, mientras que el Δ^9 -THC generalmente se presenta en bajas concentraciones. Cuando se someten al calor, los precursores son convertidos rápidamente a Δ^9 -THC como resultado de la descarboxilación.

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) N° 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.

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 73

CONTAMINANTES INDUSTRIALES. MARCO LEGAL. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS. METALES PESADOS. MELAMINA. ACRILAMIDA. CARBAMATO DE ETILO. 3MCPD. 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 INDUSTRIALES**
- 2. MARCO LEGAL**
- 3. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (PAHs). MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**
- 4. METALES PESADOS. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**
- 5. MELAMINA. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**
- 6. ACRILAMIDA. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**
- 7. CARBAMATO DE ETILO. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**
- 8. 3-MCPD. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN**

1. CONTAMINANTES INDUSTRIALES

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 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).

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, establece qué sustancias y qué valores máximos se pueden encontrar de dichas sustancias en alimentación animal, expresado sobre un 12 % de humedad. Entre otros analitos, incluye algunos metales, nitritos, micotoxinas, o dioxinas.

3. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN.

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. Estas prácticas culinarias se pueden realizar tanto a nivel de industria como en el propio hogar de los consumidores.

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. Además, existen estudios que confirman que algunos HAPs pueden causar cáncer en animales de experimentación o incluso en humanos, como el benzopireno, que ha sido clasificado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) como agente carcinógeno para los humanos (Grupo 1).

No es posible establecer una TDI (Ingesta Diaria Tolerable) para los HAPs debido a los efectos cancerígenos que se les pueden atribuir a estos compuestos. En estos casos, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) utiliza la aproximación del margen de exposición (MOE) para la evaluación del riesgo.

El MOE es un parámetro que nos proporciona información acerca del nivel de peligro sanitario sobre la presencia de una sustancia en los alimentos sin cuantificar el riesgo. El Comité Científico de la EFSA declara que un MOE mayor o igual a 10.000 para las sustancias

genotóxicas y cancerígenas presenta un nivel bajo de peligro para la salud pública. En su evaluación sobre el riesgo de HAPs, EFSA ha concluido que:

Para los consumidores medios (aquellos que ingieren de vez en cuando alimentos que contienen HAPs), el MOE es superior a 10.000, por lo que no supone un peligro para la salud pública.

Para los consumidores altos (aquellos que ingieren muy frecuentemente alimentos que contienen HAPs), el MOE es igual o inferior a 10.000, por lo que no se puede descartar el riesgo.

Los cereales y productos a base de cereales, así como el pescado y productos de la pesca (sobre todo ahumados) son los principales alimentos que contribuyen a la exposición dietética total entre los grupos de población. Los alimentos ricos en grasas y proteínas preparados a la parrilla (barbacoas) también contribuyen a esta exposición.

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.

Determinación

Extracción líquido-líquido de la muestra y posterior purificación por SPE y determinación por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.

4. METALES PESADOS. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN.

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.

Mercurio. Puede liberarse a consecuencia de la actividad volcánica y también por actividad industrial. El mercurio inorgánico (Hg^+ y Hg^{2+}) se encuentra principalmente en el suelo procedente de la reducción del mercurio elemental y su depósito en sedimentos y agua, así como de la liberación natural de las rocas que forman parte de la composición de la corteza terrestre y de actividades antropogénicas.

El mercurio orgánico se encuentra en el agua, principalmente como metilmercurio (CH_3Hg^+) y como dimetilmercurio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$). La metilación de mercurio inorgánico se produce por reacción química directa o mediante la acción de bacterias. El metilmercurio (CH_3Hg^+) es el componente orgánico de mercurio más común en la cadena alimentaria.

La forma más tóxica del mercurio, y de mayor preocupación desde el punto de vista sanitario, es el metilmercurio.

Plomo. Es un contaminante medioambiental natural que rara vez se encuentra en su estado elemental. Su forma inorgánica es la más común en el medioambiente. También puede ser producto de actividades humanas como la minería y la fundición. El Pb inorgánico se absorbe con mucha facilidad en el organismo, y es el predominante en el medioambiente y en los alimentos.

Cadmio. Se presenta en el medio ambiente asociado a minerales de Zn, Cu o Pb, por lo que es un subproducto inevitable en las actividades mineras relacionadas con estos metales. Es cancerígeno.

Arsénico. Es un metaloide presente en la naturaleza y que se presenta en diferentes formas químicas (inorgánicas y orgánicas). Sus formas químicas inorgánicas, As (III) y As (V), o la combinación de ambos, son más tóxicas comparadas con el arsénico orgánico. La principal fuente de exposición humana al arsénico es la ingesta de alimentos y agua. En el agua, el arsénico se presenta normalmente en sus formas químicas inorgánicas, As (III) y As (V), o la combinación de ambas.

Estaño inorgánico. Se encuentra en los botes de conservas y en las latas de bebidas. Para los alimentos en conserva en general, que no sean bebidas, el contenido máximo se fija en 200 mg/kg y para las bebidas enlatadas, en 100 mg/kg. En cuanto a la presencia del estaño inorgánico en los alimentos en conserva y las bebidas enlatadas destinadas a los niños, el contenido máximo permitido es de 50 mg/kg.

Níquel. Es un metal abundante en la superficie terrestre que está presente en los alimentos y en el agua potable, debido a la actividad natural y humana. El control debe centrarse en los productos que establece la Recomendación, entre ellos están los cereales, semillas oleaginosas, frutas, hortalizas, productos a base de hortalizas, azúcar y productos de confitería, leche y productos lácteos, bebidas, tanto alcohólicas como no alcohólicas, entre otros.

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.

5. MELAMINA. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN.

La melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) 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 ciromazina 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. La EFSA aprobó un dictamen científico relacionado con la melamina en la alimentación humana y animal. Las conclusiones de dicho dictamen muestran que la exposición a la melamina puede provocar la formación de cristales en las vías urinarias. Dichos cristales causan lesiones tubulares proximales que se han observado en animales y niños debido a los incidentes provocados por la adulteración de piensos y de preparados para lactantes con melamina, en algunos casos con resultado de muerte.

A efectos de protección de la salud pública en la Unión Europea se ha incluido en el Reglamento (CE) 1881/2006 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

-CG-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.

6. ACRILAMIDA. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN.

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.

A nivel de industrias alimentarias, en la UE se consideró que la aplicación de buenas prácticas durante el procesado de determinados alimentos debería ser efectiva y reducir la formación de acrilamida en el producto final, de modo que la Comisión Europea avaló una serie de medidas voluntarias para la industria en este sentido de cara a tenerlas en cuenta en sus sistemas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC).

En línea con lo anterior, en noviembre del 2017 se publicó el Reglamento (UE) 2017/2158 de la Comisión, de la Comisión, por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos.

Además, la AECOSAN en el 2015 ya elaboró unas recomendaciones para el cocinado a nivel nacional destinadas a la reducción de acrilamida, que incluye alimentos del ámbito doméstico, entre ellos, las patatas fritas.

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.

7. CARBAMATO DE ETILO. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN.

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 (grupo 2A) por la IARC basándose en estudios toxicológicos en animales (consumición de bebidas alcohólicas y etilcarbamato). El consumo crónico de esta sustancia puede llegar a producir graves incidencias alveolares y bronquiolares, además de adenomas y carcinomas localizados en diferentes zonas del organismo.

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. Dado que el ácido cianhídrico es un importante precursor para la formación de etilcarbamato en aguardientes de frutas de hueso y aguardientes de hollejo de frutas de hueso, tales medidas deberían centrarse en el ácido cianhídrico y otros precursores del etilcarbamato, a fin de impedir la formación de este compuesto durante la vida útil de estos productos basándose en las buenas prácticas de obtención de estos productos.

Determinación

Extracción con éter y posterior determinación por GC-MS.

8. 3-MCPD. MÉTODOS APLICADOS A SU DETERMINACIÓN.

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.

Los animales de laboratorio expuestos al 3-MCPD han mostrado principalmente toxicidad renal, infertilidad, disminución en la actividad del sistema inmunológico y desarrollo de tumores benignos. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado al 3-MCPD como posible agente carcinógeno (Grupo 2B). No obstante, no existe evidencia científica suficiente en animales de experimentación y en humanos la evidencia es limitada, por lo que se requiere la realización de nuevos estudios.

Con respecto al glicidol y sus ésteres glicidílicos, existen estudios in vitro y algunos in vivo que evidencian su carácter genotóxico. Por este motivo han sido clasificados por la IARC como probables agentes carcinogénicos (Grupo 2A).

La margarina y derivados, así como las grasas y aceites vegetales (excepto el aceite de nuez) son los principales contribuyentes a la exposición dietética total entre los grupos de población, seguido del pan, productos de bollería y carne en conserva (ahumada).

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://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/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/3_MCPD.htm

https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/etilcarbamato.htm

MATERIAL NO OFICIAL

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 74

**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*[®], *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 transportando 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 secuenciacines 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 75

**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> <ul style="list-style-type: none"> a) jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa; b) maltodextrinas a base de trigo; c) jarabes de glucosa a base de cebada; d) cereales utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola
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> <ul style="list-style-type: none"> a) gelatina de pescado usada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides; b) gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino
5.	Cacahuets y productos a base de cacahuets.
6.	<p><u>Soja y productos a base de soja</u>, salvo:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados; 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; c) fitosteroles y ésteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja; d) ésteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja
7.	<p>Leche (procedente de la glándula mamaria de animales de granja) y sus derivados (incluida la lactosa), salvo:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) lactosuero usado para hacer destilados alcohólicos, incluido alcohol etílico agrícola; b) lactitol
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 ₂ 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 alergénicos 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
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.
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
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>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 76

**ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG) I:
CONCEPTO Y LEGISLACIÓN**

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

1.2. LEGISLACIÓN

BIBLIOGRAFIA

MATERIAL NO OFICIAL

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.

España y el resto de Estados Miembros como Unión Europea son Partes del Protocolo y se comprometen a tomar las medidas efectivas para tratar de impedir o minimizar los posibles efectos adversos que estos OVMs puedan tener sobre la fauna y la flora salvaje.

Por ello se establecen normas y procedimientos que permitan la transferencia segura, manipulación y uso de de los OVMs. También se tienen en cuenta los riesgos para la salud humana.

1.2. LEGISLACIÓN

- 1º. DIRECTIVA 2001/18/CE, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente.

Normativa fundamental, sobre el cultivo de OMGs. Define lo que se entiende como 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 periodo de validez de las autorizaciones a 10 años, renovables e introduce el seguimiento obligatorio de los OMGs tras su liberación deliberada y comercialización.

La Directiva prevé:

- un sistema de evaluación individual de los **riesgos para el medio ambiente** relacionados con la liberación de OMG

- objetivos comunes de **seguimiento** de los OMG tras su liberación deliberada o su comercialización
- un **mecanismo** que modifica, suspende o pone fin a la liberación intencional de OMG en caso de que llegue a estar disponible información sobre riesgos de la liberación.

Establece que el **etiquetado de OMG** y la **consulta al público** serán **obligatorios** de conformidad con los Reglamentos (CE) nºs 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 organismos modificados genéticamente (OMG) 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.

El Reglamento se aplica a:

- OMG destinados a la **alimentación humana o animal**
- los alimentos y piensos **que contengan o estén compuestos de OMG**
- los alimentos y piensos que se hayan **producido** a partir de OMG o que **contengan ingredientes** producidos a partir de estos organismos.

Para la solicitud de autorización

1. Los productores presentan una **solicitud única** que abarca *todos* los usos: **alimentos, piensos y cultivos**.
2. En un plazo de 2 **semanas**, la autoridad nacional competente del país de la Unión Europea pertinente **acusa recibo** e informa a la **Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)**.
3. Pondrá a disposición del público el resumen del expediente previsto en la letra l) del apartado 3.
4. Ésta dispone de **seis meses** para evaluar la solicitud y emitir su dictamen.
5. En el plazo de tres meses, la Comisión presentará al Comité un proyecto de la decisión que deberá adoptarse respecto de la solicitud.

A partir de este Reglamento, la normativa de Nuevos alimentos y de OMGs va separada.

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.

El presente Reglamento se aplicará, en todas las fases de su comercialización, a:

- a) los productos que contienen o están compuestos por OMG, comercializados con arreglo a la legislación comunitaria
- b) los alimentos producidos a partir de OMG, comercializados con arreglo a la legislación comunitaria
- c) los piensos producidos a partir de OMG, comercializados con arreglo a la legislación comunitaria.

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 organismos modificados genéticamente. Actualmente está adscrita a la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico.

Según lo dispuesto 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. El ámbito de aplicación son las actividades de utilización confinada, liberación voluntaria

con fines distintos a la comercialización y la comercialización en sí de OMGs o de productos que los contengan.

Además, establece las funciones, estructura y composición de

- **Registro Central de organismos genéticamente modificados** adscrito al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. El Registro central es único en todo el territorio nacional y tiene su sede en Madrid.
- **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).

Esta directiva establece medidas comunes para la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente con vistas a proteger la salud humana y el medio ambiente.

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 más amplia. Los **motivos** que pueden aludir los países de la UE incluyen la ordenación urbana y rural, el uso del suelo, las repercusiones socioeconómicas, la coexistencia o el orden público.

La Directiva de modificación también establece un conjunto de **plazos y responsabilidades** que rigen las decisiones adoptadas relativas a la adaptación al ámbito geográfico de la autorización, incluido el derecho de exclusión basado en circunstancias objetivas nuevas.

A partir del 3 de abril de 2017, los países de la UE en los que se cultivan OMG tenían que haber introducido medidas en las zonas fronterizas de su territorio con el objetivo de evitar la posible **contaminación transfronteriza** en países vecinos de la UE en los que está prohibido el cultivo de esos OMG, 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, más concretamente, las actuaciones a realizar en zonas fronterizas con otros Estados

miembros vecinos que hayan prohibido el cultivo con objeto de evitar una posible contaminación transfronteriza.

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). Su adecuación a España implica una revisión de la sistemática anterior, que ha sido actualizada por la Comisión Nacional de Bioseguridad, de acuerdo con los conocimientos actuales y los avances tecnológicos.

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, y se aplicará al cultivo comercial de las variedades de eventos de maíz modificado genéticamente autorizadas para este fin en la UE.

11º. SENTENCIA DEL TRIBUNAL DE JUSTICIA DE LA UE. ASUNTO C-528/16, DE 25 DE JULIO DE 2018

Aunque no es una normativa incluida en la legislación actual de la UE, al ser una sentencia dirigida a la normativa de la UE, en este caso sobre los OMGs, si 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.

Desde el pronunciamiento del Tribunal, la Comisión ha tratado de medir la influencia de la sentencia en la regulación y uso de los OMGs, realizando revisiones de las diferentes técnicas de mutagénesis dirigidas, especialmente la técnicas englobadas en las NGTs, para saber el posible impacto en la UE, tanto en su aspecto económico, sanitario y medioambiental. Se estima que la evaluación de riesgo ha de ser similar a la que se aplica a los OMGs, habiendo previsto una modificación de la legislación actual sobre OMGs para adaptarla a los nuevos productos obtenidos a través de estas tecnologías de mutagénesis dirigida y hacer posible su uso autorizado en los Estados Miembros.

BIBLIOGRAFIA

1. 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>
2. 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>
3. 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>
4. 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>
5. 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>
6. 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>
7. 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>
8. Reglamento (CE) no 1831/2003 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>

9. 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>

10. 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>

11. 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>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 77

**ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG) II:
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) II
 - 1.1. INTRODUCCIÓN
 - 1.2. PROCESO DE DETECCIÓN DE OMGs.
 - 1.2.1. Extracción del ADN
 - 1.2.2. Cribado para la detección de los OMGs
 - 1.2.3. Identificación o detección específica de los OMGs presentes en la muestra
 - 1.2.4. Cuantificación de los OMGs identificados
 - 1.3. Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para alimentos y piensos modificados (EURL GMFF)
2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SU DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN
 - 2.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSGÉNICA
 - 2.1.1. Técnicas de inmunoensayo
 - 2.2. MÉTODOS DE ANALISIS BASADOS EN LA DETECCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO
 - 2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - 2.2.2. *Microarrays* de ADN
 - 2.2.3. Secuenciación de nueva generación (NGS)

BIBLIOGRAFIA

1. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG) II

1.1. 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)

En consecuencia, los métodos analíticos que detectan estos cambios genéticos en plantas, animales y microorganismos, requieren de conocimientos previos. Este requisito es especialmente necesario para identificar los productos de la **intragénesis** y la **cisgénesis** en las plantas, ya que hay genes similares o casi idénticos en el genoma. Los productos finales de las plantas que carecen de inserciones genéticas y que se obtienen mediante procedimientos de agroinoculación, metilación de ADN dirigida por ARN o reproducción inversa son indistinguibles a nivel de ADN de las líneas de cultivo naturales.

De igual manera, en caso de plantas, animales y microorganismos sin información previa alguna y cuando los cambios introducidos no pueden compararse con la información sobre los OMG registrados en las bases de datos, la detección se vuelve más difícil y la diferenciación entre eventos que ocurren naturalmente y la identificación de la técnica subyacente es generalmente imposible.

1.2. PROCESO DE DETECCIÓN DE OMGs

En la UE y por inclusión, en España, el enfoque actual de la normativa de uso de los Organismos Modificados Genéticamente para uso en alimentos y piensos y por lo tanto la metodología empleada por los laboratorios de control para analizar las muestras oficiales con el fin de 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.

1.2.1 Extracción del ADN

Al trabajar con el ácido desoxirribonucleico, es muy importante aplicar métodos de extracción y de purificación de ácidos nucleicos que permitan 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 que a continuación pueda 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, que no se acompañe de posibles moléculas inhibitoras de la polimerasa que disminuirían la eficiencia de la amplificación.
- c) En ADN de muestras tomadas de productos sometidos a transformaciones que amenacen la integridad de éste (principalmente altas temperaturas y altas presiones), el método ha de ser lo suficientemente respetuoso con las moléculas de ADN extraído para no someterlas a más estrés y preservar dicha integridad, especialmente en las zonas diana de amplificación, pues una excesiva fragmentación en dichos lugares darían lugar a falsos negativos al no ser amplificable el ADN aunque esté presente o dar una baja señal.

Aunque no siempre es requerido, sobre todo si no se van a hacer reacciones de cuantificación de OMGs, si es recomendable evaluar la cantidad y calidad del ADN obtenido, que normalmente se suele hacer de la siguiente manera:

Para determinar la cantidad de ADN obtenido (usualmente referido a nanogramos de ADN por microlitro de solvente, ng/ μ L) 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.

Como esto es un poco laborioso y requiere de bastante tiempo, se suele recurrir a otros métodos un poco menos precisos pero sí lo suficiente, basados en la absorción de luz por la muestra en espectrofotómetros. Estos espectrofotómetros pueden ser de fluorescencia o de luz ultravioleta.

En ambos casos el aparato va a medir la diferencia entre la intensidad de la luz que incide en la muestra y la intensidad de la luz que atraviesa la muestra. La diferencia es la luz absorbida y entre otros parámetros, es directamente proporcional a la cantidad de moléculas del medio que atraviesa la luz.

Para el ADN de doble hebra hay un máximo de absorción de luz a la longitud de onda de 260 nm (nanómetros). 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/ μ L.

Para evaluar la pureza de la solución del ADN extraído, se va a comparar mediante un cociente la cantidad de luz que se absorbe para el máximo de ADN (260 nm) y otras dos longitudes de onda. Una es 280 nm que es el máximo para proteínas y otra es 230 que correspondería a diversas moléculas orgánicas que pueden estar presentes en la solución.

Tenemos por tanto dos cocientes: 260/280 y 260/230. Se establece que el cociente 260/280 estima la proporción de proteínas y otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm o cercano a ello. Un cociente menor de 1,6 indica una alta proporción de alguna de estas moléculas coextraídas que estarían contaminando la muestra y que darían menos calidad al extracto de ADN. El cociente 260/230 es una segunda medida de la pureza del ADN. Valores de 1,6 o menores indican la presencia de otros contaminantes copurificados.

En el caso de que dichos cocientes no sean satisfactorios, se hace necesario un paso más de purificación de los ácidos nucleicos de la muestra.

1.2.2. Cribado para detección de OMGs.

Se lleva a cabo 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 al casete o construcción transgénica, como pueden ser genes marcadores de determinada proteína, por ejemplo los que dan resistencia a determinados antibióticos (**nptII**), los propios genes insertados con utilidad agronómica (**cry1Ab** de resistencia a insectos que son plaga de cultivos, **pat** de tolerancia a herbicidas para tratar las malas hierbas de los 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, bien porque esté en forma molida o porque sea un alimento o un pienso complejo, 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, que se encuentran comúnmente 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 tiene entonces un patrón de resultados positivos y negativos a las diferentes PCRs de cribado realizadas en la muestra. Los resultados negativos automáticamente van a eliminar aquellos OMGs que contengan el ADN diana de la PCR con valor negativo, mientras los resultados positivos nos harán sospechar la presencia de aquellos OGMs que sí porten el ADN diana. Esta segunda posibilidad se ha de confirmar en la siguiente etapa de análisis de los OMGs sospechosos.

1.2.3. Identificación o detección específica de los OMGs presentes en la muestra.

Debido a la legislación sobre uso de OMGs en la UE, estos han de estar autorizados. Dicha autorización requiere de la existencia de un método analítico de detección y de cuantificación del OMG a autorizar, que es validado por el Laboratorio Europeo de Referencia para OMGs en Alimentos y Piensos. Este método es público y es el que deben emplear los Laboratorios de Control Oficial de los diferentes 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).

Aunque en la actualidad no existe tolerancia hacia los OMG no autorizados en la UE, lo cierto es que 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.

1.2.4 Cuantificación de los OGMs identificados.

Finalmente, si se detecta la presencia de un OGMs de cualquiera de los tres grupos descritos en el punto anterior. y de acuerdo a 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:

- a.- por una parte obliga a informar al consumidor sobre alimentos o piensos que contengan, estén compuestos, o se hayan producido a partir de OGMs mediante declaración de su presencia en la etiqueta.
- b.- sin embargo, 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 OGM 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 OGM 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 OGM (calculado de la misma manera que en a)) tanto en alimentos como en piensos y durante el periodo transitorio de retirada del mercado.

1.3. 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 denominada "GMO-Matrix".

2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA SU DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

2.1 MÉTODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN EL ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA TRANSGÉNICA

La detección de proteínas puede realizarse en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a las proteínas de las muestras, por lo tanto estas técnicas son aplicadas en aquellos casos en los cuales se dispone de muestras con un contenido proteico en cantidad suficiente y con la 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. Además, hay que tener en cuenta que el procesamiento de alimentos puede alterar la estructura de las proteínas al ser más inestables que el contenido en ácidos nucleicos, lo que puede perjudicar el reconocimiento antígeno-anticuerpo.

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.

2.1.1. 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 ensayo de inmunodetección ligado a enzimas 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 acción capilar 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 (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
- Son útiles para el cribado de plántulas de vegetales
- Se utilizan para el análisis de muestras de grano en las que las proteínas no están cizalladas

2.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS BASADOS EN LA DETECCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

Se fundamentan en la detección de una secuencia de ADN concreta y 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.

2.2.1. 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*)**, son métodos cualitativos que amplifican secuencias que son comunes a ciertos grupos de transgénicos como los promotores o terminadores. La mayoría de las plantas GM en el mercado comparten algunos elementos reguladores que forman parte de su construcción. 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 pueden ser utilizados para determinar de una manera inequívoca si el OMG es autorizado o no.
- 3) **Métodos específicos de construcción**, que permiten identificar el promotor usado y el propio transgén. Asimismo, posibilitan confirmar la presencia de material MG.
- 4) **Métodos específicos de evento**, que permiten identificar simultáneamente 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, sobre todo, en aquellos casos en que es necesario cuantificarlos.

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 generada a medida que el proceso avanza y que, en la mayoría de los casos, es una señal de fluorescencia. De este modo, el aumento de la señal en cada ciclo se corresponde con un incremento de la concentración del producto amplificado. Esta técnica proporciona una amplificación mayor de un millón de veces de una secuencia de ADN diana seleccionada de, por lo general, 70-150 pares de bases, localizada a través de una de las uniones de inserción a la planta.

Ventajas: se trata de una técnica rápida y sencilla, que disminuye las posibilidades de contaminación cruzada al eliminar el análisis postamplificación de la PCR convencional. Además, puede proporcionar una alta sensibilidad para la cuantificación precisa del material transgénico, incluso en niveles bajos, en los alimentos y los piensos, para poder determinar si cumplen con los requisitos legales.

RTPCR Multiplex

Debido a la capacidad de los equipos de detectar fluorescencia a diferentes longitudes de onda, se pueden diseñar las denominadas **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 poder realizar la detección simultánea, cada reacción individual de PCR va a llevar su sonda específica, marcada con un emisor (reporter) diferente, que emite fluorescencia a diferente longitud de onda de los demás. El sistema de captación del equipo va a ser capaz de leer la cantidad de luz emitida por cada emisor 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 correspondientes

Desventajas: Se necesita ajustar las reacciones de amplificación, tanto en la proporción de los diferentes reactivos empleados en cada reacción simple y se necesita también un fluoróforo diferente para cada diana, lo que normalmente reduce la sensibilidad de cada determinación si se realizara por separado. Requiere un ajuste de las reacciones de cada analito y del programa de amplificación para reunirlos en una sola y seguir manteniendo una buena sensibilidad.

Combinatory SYBR® Green Qpcr (CoSYPS)

La técnica CoSYPS es un enfoque particular al análisis de OMGs en el que con un conjunto limitado de pruebas de qPCR permiten al usuario comprobar la posible presencia de eventos GM autorizados para fines comerciales en la Unión Europea. Se empezó a emplear en 2010.

Se basa en el empleo, no de sondas marcadas, sino del agente intercalante de ácidos nucleicos de doble hebra SYBR Green, que como su nombre indica emite fluorescencia en la longitud de onda 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

Se han desarrollado métodos SYBR®GREEN qPCR dirigidos a cuatro tipos diferentes de elementos de ADN:

- 1) un denominador genérico de ADN vegetal
- 2) elementos específicos de cada especie vegetal
- 3) elementos genéricos de ADN recombinante
- 4) elementos recombinantes específicos de un rasgo GM (trait)

B. PCR digital (dPCR)

La PCR digital se considera como una tecnología de tercera generación. La técnica se basa en la división de las muestras en miles de pequeñas particiones, que actúan como una reacción individual de una RTPCR estándar y que van a puntuar 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 obtenidos con la dPCR 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.
- La partición de la muestra también 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).

2.2.2. Microarrays de ADN

Los *microarrays*, también conocidos como chips de ADN, permiten la detección paralela de un gran número de 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 llamada chip con un punto individual que tiene muchos duplicados de la sonda. A continuación, el ADN aislado de la muestra que se está hibridando se marca con fluorescencia. En la etapa de hibridación, 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 que aplica a los productos derivados de organismos modificados genéticamente ha permitido el desarrollo de tecnología de arrays de ADN para la identificación de transgénicos autorizados y no autorizados. El sistema, DualChip[®] GMO Kit, permite 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 y laborioso y por su baja utilización, más caro que otros métodos por RTPCR.

2.2.3. Secuenciación de nueva generación (NGS)

La tecnología NGS constituye un método alternativo para la detección de OMG autorizados y no autorizados en las cadenas de producción y de distribución de alimentos y piensos. Existen diferentes enfoques para la detección de OMG con NGS. 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 de una manera asequible y 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.

Para aumentar la sensibilidad, los enfoques de enriquecimiento previo del ADN de la muestra pueden combinarse con las NGS, permitiendo una identificación fiable de los mismos.

Con la NGS también se podría dilucidar si dos o más OMG 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.

BIBLIOGRAFÍA

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. Elizarda Terrazas Montecinos, 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].
4. Envirologix (2022). Immunoassays. Disponible en <https://www.envirologix.com/technology/gmo-protein-detection/>
5. European Commission, Directorate-General for Research and Innovation, (2017). New techniques in agricultural biotechnology, Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2777/574498>
6. European Network of GMO Laboratories (ENGL), Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques, 26 March 2019 (JRC116289)
7. 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. 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 (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2011. JRC6729
8. López Andreo, M. (2013). *Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid].
9. Martínez, S., & Corona, B. (2007). Algunos conceptos relacionados con los organismos genéticamente modificados (OGMs). *Revista de Salud Animal* 29.
10. 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
11. 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.
12. 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 78

CALIDAD Y SEGURIDAD EN LOS ALIMENTOS. DIFERENCIAS. DEFINICIÓN Y PRINCIPIOS. EL CONTROL EN LOS ALIMENTOS. EL CONTROL OFICIAL. EL CONTROL VOLUNTARIO: ENTIDADES DE INSPECCIÓN Y DE CERTIFICACIÓN. TRAZABILIDAD Y AUTOCONTROL. LEGISLACIÓN DE LA UNIÓN EUROPEA

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. CALIDAD Y SEGURIDAD EN LOS ALIMENTOS. DIFERENCIAS. DEFINICIÓN Y PRINCIPIOS.

2. EL CONTROL EN LOS ALIMENTOS

2.1. EL CONTROL OFICIAL

2.2. TRAZABILIDAD Y AUTOCONTROL

2.3. EL CONTROL VOLUNTARIO: ENTIDADES DE INSPECCIÓN Y DE CERTIFICACIÓN

2.4. LEGISLACIÓN DE LA UNIÓN EUROPEA

MATERIAL NO OFICIAL

1. CALIDAD Y SEGURIDAD EN LOS ALIMENTOS. DIFERENCIAS. DEFINICIÓN Y PRINCIPIOS.

La Ley 28/2015, para la defensa de la calidad alimentaria, define la **calidad alimentaria** como el conjunto de propiedades y características de un alimento, recogidas en la normativa de calidad alimentaria, relativas a las materias primas o ingredientes utilizados en su elaboración, a su naturaleza, composición, pureza, identificación, origen, y trazabilidad, así como a los procesos de elaboración, almacenamiento, envasado y comercialización utilizados y a la presentación del producto final, incluyendo su contenido efectivo y la información al consumidor final especialmente el etiquetado.

Para la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimentarias y sus preferencias en cuanto a los alimentos, a fin de llevar una vida activa y sana.

Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición, parte de la idea de que la protección efectiva del derecho a la seguridad alimentaria requiere de un enfoque integral que contemple los riesgos asociados a la alimentación *desde la granja a la mesa*, y que considere todas las perspectivas posibles. El objeto de esta ley es el reconocimiento y la protección efectiva del derecho a la seguridad alimentaria, entendiendo como tal el derecho a conocer los riesgos potenciales que pudieran estar asociados a un alimento y/o a alguno de sus componentes; el derecho a conocer la incidencia de los riesgos emergentes en la seguridad alimentaria y a que las administraciones competentes garanticen la mayor protección posible frente a dichos riesgos. Las medidas preventivas y de gestión adoptadas para la prevención de los riesgos derivados del consumo de alimentos para la salud humana deberán atender a los siguientes principios:

- a) **Principio de necesidad:** las actuaciones y limitaciones sanitarias deberán estar justificadas por una razón de interés general que deberá acreditarse.
- b) **Principio de proporcionalidad:** las actuaciones y limitaciones sanitarias deberán ser proporcionadas a los fines que en cada caso se persigan.
- c) **Principio de no discriminación:** las actuaciones y limitaciones sanitarias no deberán introducir diferencias de trato por razón de nacionalidad o forma empresarial.
- d) **Principio de mínima afección a la competencia:** se deberán utilizar las medidas que menos perjudiquen.

Por su parte, el Reglamento 178/2002 establece los requisitos de la seguridad alimentaria: no se comercializarán los alimentos que no sean seguros. Se considerará que un alimento no es seguro cuando sea nocivo para la salud o no sea apto para el consumo humano.

De todo lo anterior se extrae que la misión básica del sector alimentario es proporcionar al ciudadano unos alimentos sanos, seguros y además que respondan a sus expectativas de calidad. Esto supone que a los consumidores se les debe aportar toda la información necesaria sobre los productos que están disponibles en el mercado a través del etiquetado,

para que puedan elegir de una manera adecuada de acuerdo a sus preferencias y expectativas. Cuando la información que se proporciona sobre un alimento no coincide con la realidad, se está cometiendo un fraude o engaño al consumidor.

Además, las empresas alimentarias pueden, de forma voluntaria, cumplir otros requisitos o características superiores de calidad (por su origen, sistema de elaboración, etc.) que aportan al consumidor un valor añadido o una calidad diferenciada respecto a otros. Estos requerimientos se materializan en las llamadas figuras de calidad como son: Denominación de Origen Protegida (DOP), Indicación Geográfica Protegida (IGP), Especialidad Tradicional Garantizada (ETG) y Agricultura Ecológica.

De este modo, la principal diferencia entre seguridad y calidad alimentaria se encuentra en el hecho de que la seguridad es de obligatorio cumplimiento, garantizando la inocuidad de los alimentos, mientras que la calidad es de aplicación voluntaria, garantizando que el producto reúna determinadas características que le aportan un valor añadido.

2. EL CONTROL EN LOS ALIMENTOS.

Se entenderá por **controles oficiales**, de acuerdo con el *Reglamento (UE) 2017/625*, las actividades realizadas por las autoridades competentes, los organismos delegados o las personas físicas en las que se hayan delegado funciones de control oficial para comprobar el cumplimiento de las normas, independientemente de que hayan sido establecidas a nivel de la Unión o bien por los Estados miembros para aplicar la legislación de la Unión, en los siguientes ámbitos:

- a) los alimentos y la seguridad alimentaria, la integridad y la salubridad a lo largo de la producción, transformación y distribución
- b) la utilización de organismos modificados genéticamente para producir alimentos y piensos
- c) los piensos y la seguridad de los piensos a lo largo de la producción, la transformación, la distribución y el uso
- d) la sanidad y el bienestar de los animales
- e) la producción y el etiquetado de productos ecológicos.

Las autoridades competentes realizarán los controles oficiales con regularidad, con una frecuencia adecuada determinada en función del riesgo, para identificar posibles infracciones intencionadas de las normas mediante prácticas fraudulentas o engañosas.

El *Reglamento (UE) 2017/625* establece las normas comunes para los controles oficiales de la Unión Europea con el fin de garantizar que la legislación relativa a la cadena agroalimentaria para proteger la salud humana, la salud y el bienestar animal, así como la sanidad vegetal, se aplica y se cumple correctamente.

Dicho reglamento introduce un sistema más armonizado y coherente de los controles oficiales y las medidas de ejecución a lo largo de la cadena agroalimentaria y refuerza el principio de los controles basados en el riesgo. Además, incluye normas sobre los controles

oficiales llevados a cabo en todas las empresas alimentarias y de piensos, desde productores primarios hasta minoristas y proveedores, incluidos obtentores y criadores de animales, cultivadores y comerciantes.

Sin perjuicio del control oficial establecido en el ámbito de la Unión Europea, el control de la calidad se realizará, según la Ley 28/2015, siguiendo las siguientes modalidades:

- a) Control oficial realizado por la autoridad competente.
- b) Autocontrol del operador, que podrá ser verificado por entidades de inspección y certificación acreditadas.
- c) Autocontrol establecido por una asociación sectorial concreta, en su caso, sobre los operadores de su ámbito sectorial.
- d) Autocontrol establecido por una cooperativa, en su caso, sobre sus asociados.

2.1. EL CONTROL OFICIAL.

El control oficial se realizará por las autoridades competentes en cada una de las fases de la cadena alimentaria que comprende las instalaciones de manipulación, clasificación, fábricas, plantas de envasado, almacenes de los mayoristas o de los distribuidores mayoristas incluidos los denominados almacenes de logística pertenecientes a la moderna distribución, almacenes de los importadores de productos alimenticios, oficinas de intermediarios mercantiles con o sin almacén, así como en el transporte entre todos ellos, y en cada una de las actividades siguientes: la recepción, la manipulación, la clasificación, la obtención, la elaboración, transformación, el envasado, almacenamiento y el transporte de alimentos.

Las actuaciones de inspección se realizarán por funcionarios públicos que en el ejercicio de sus funciones, tendrán la condición de agentes de la autoridad y podrán solicitar el apoyo de cualquier otra autoridad pública, así como de las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad. Los inspectores están obligados de modo estricto a cumplir el deber de sigilo profesional. El incumplimiento de este deber será sancionado.

Podrán recabar cuantos documentos consideren necesarios de las empresas que inspeccionen de acuerdo con el objetivo perseguido en el curso de sus actuaciones que, en todo caso, tendrán carácter confidencial.

Los servicios de inspección podrán solicitar la información que precisen a los órganos de las Administraciones públicas y sus organismos y entidades vinculadas o dependientes, los cuales prestarán la información que se les solicite.

En las actuaciones de inspección, el inspector levantará acta en la que constarán los datos relativos a la identificación de la empresa y de la persona ante la que se realiza la inspección, detallando los hechos que constituyen el control oficial y las medidas que se hubiesen ordenado. Los hechos constatados por funcionarios a los que se reconoce la condición de autoridad, y que se formalicen en las actas observando los requisitos legales, tendrán valor probatorio, sin perjuicio de las pruebas aportadas por los propios administrados.

Las personas físicas y jurídicas estarán obligadas, a requerimiento de los inspectores a:

- Consentir la realización de las visitas de inspección y dar toda clase de facilidades.
- Suministrar toda clase de información pertinente sobre instalaciones, productos o servicios, permitiendo su comprobación directa por los inspectores.
- Facilitar que se obtenga copia o reproducción de la referida documentación.
- Permitir que se practique la oportuna toma de muestras de los productos o mercancías que elaboren, distribuyan o comercialicen.

Cuando a requerimiento de la Administración pública competente o espontáneamente se aporten declaraciones o documentación de la empresa de cualquier índole, deberán ir firmados por una persona que represente y obligue a la empresa. La falsedad, así como la constancia en dichos documentos de datos inexactos o incompletos, se sancionará.

Los inspectores podrán inmovilizar de manera cautelar las mercancías, productos, envases, etiquetas u otros elementos que incumplan los preceptos relacionados con las infracciones, haciendo constar en acta tanto el objeto como los motivos de la intervención cautelar así como, en su caso, las medidas adoptadas para evitar su deterioro y asegurar su integridad. Las medidas cautelares deberán ser confirmadas, modificadas o levantadas, en un plazo no superior a quince días por la autoridad competente. En caso de alimentos perecederos, el inspector deberá tener en cuenta la caducidad de los mismos. Transcurrido el citado plazo habrán de levantarse si no se ha acordado ya la iniciación de procedimiento sancionador.

2.2. TRAZABILIDAD Y AUTOCONTROL.

El Reglamento (CE) 178/2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria define **trazabilidad** como la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución, de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinada a ser incorporada en un alimento o un pienso o con probabilidad de serlo.

En todas las etapas de la producción, la transformación y la distribución, los explotadores de empresas alimentarias y de piensos deberán asegurar la trazabilidad de los alimentos, los piensos, los animales destinados a la producción de alimentos y de cualquier otra sustancia destinada a ser incorporada en un alimento o un pienso, por lo que deberán poder identificar a cualquier persona que les haya suministrado un alimento, un pienso, un animal.

El Reglamento (CE) 853/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios, establece normas generales destinadas a los operadores de empresa alimentaria en materia de higiene de los productos alimenticios, teniendo en cuenta la necesidad de garantizar la seguridad alimentaria a lo largo de la cadena alimentaria, empezando en la producción primaria y la aplicación general de procedimientos basados en los principios de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) que, junto con la aplicación de prácticas higiénicas correctas, debería reforzar la responsabilidad de los operadores de empresa alimentaria.

En relación al sistema APPCC, los operadores de empresa alimentaria deberán crear, aplicar y mantener un procedimiento permanente basado en los principios del APPCC que son:

- a) detectar cualquier peligro que deba evitarse, eliminarse o reducirse a niveles aceptables
- b) detectar los puntos de control crítico en la fase o fases en las que el control sea esencial para evitar o eliminar un peligro o reducirlo a niveles aceptables
- c) establecer, en los puntos de control crítico, límites críticos que diferencien la aceptabilidad de la inaceptabilidad para la prevención, eliminación o reducción de los peligros detectados
- d) establecer y aplicar procedimientos de vigilancia efectivos en los puntos de control crítico
- e) establecer medidas correctivas cuando la vigilancia indique que un punto de control crítico no está controlado
- f) establecer procedimientos, que se aplicarán regularmente, para verificar que las medidas anteriores son eficaces
- g) elaborar documentos y registros en función de la naturaleza y el tamaño de la empresa para demostrar la aplicación efectiva de las medidas citadas previamente.

Por su parte, la Ley 28/2015 establece que los operadores incluidos en el ámbito de aplicación de esta ley deberán establecer un sistema de autocontrol de las operaciones del proceso productivo bajo su responsabilidad, con el fin de cumplir lo establecido en la legislación específica correspondiente y asegurar la calidad alimentaria de los productos. El sistema de autocontrol dispondrá, al menos, de los siguientes elementos:

- 1) Procedimientos documentados de los procesos que se lleven a cabo en la empresa.
- 2) Un plan de muestreo y análisis.
- 3) Un procedimiento de trazabilidad según los requisitos establecidos por el Reglamento (CE) 178/2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria. Además, cuando la legislación sectorial específica así lo disponga, los operadores dispondrán del procedimiento de trazabilidad interna que ésta describa.

Los operadores deben poner a disposición de las autoridades competentes toda la información relativa al propio sistema de autocontrol y trazabilidad, así como la información derivada o producida por el mismo. Deberán conservar la referida información y en su caso la documentación correspondiente al menos los seis meses siguientes a la fecha de duración mínima de los productos o fecha de caducidad. Cuando los productos tengan una fecha de caducidad inferior a tres meses o sin fecha especificada, y se destinen directamente al consumidor final, la información deberá conservarse durante los seis meses siguientes a la fecha de fabricación del producto en la industria o de entrega en almacén.

2.3. EL CONTROL VOLUNTARIO: ENTIDADES DE INSPECCIÓN Y DE CERTIFICACIÓN.

Los operadores deberán contratar los servicios de una entidad de inspección o certificación, según corresponda, para verificar sistema de autocontrol de las operaciones que se realicen bajo su responsabilidad.

De acuerdo con la Ley 28/2015, en el caso de que una norma de calidad o disposición legal exija una comprobación del autocontrol por entidades de inspección o certificación, excluidos los pliegos de condiciones de las figuras de calidad que se rigen por su propia normativa, las citadas entidades deberán presentar una declaración responsable ante la

autoridad competente del ámbito territorial donde inicien su actividad. Se informará de este hecho al resto de autoridades competentes de otras demarcaciones territoriales cuando desarrollen su actividad en su territorio. La declaración responsable presentada será válida para operar en todo el territorio nacional.

Las entidades de inspección o certificación deberán cumplir los siguientes requisitos:

- a)** Cumplir con las normas que establezca la legislación sectorial correspondiente.
- b)** Estar acreditada para la actividad específica que vaya a realizar por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) de acuerdo a lo establecido en el Reglamento (CE) 765/2008, por el que se establecen los requisitos de acreditación y vigilancia del mercado relativos a la comercialización de los productos, y que se haya sometido con éxito al sistema de evaluación por pares previsto en dicho reglamento.
- c)** Comunicar a las autoridades competentes de control oficial los posibles incumplimientos detectados en el marco de las actividades de inspección o certificación.

Asimismo, deberán mantener puntualmente informada a la autoridad competente de toda suspensión y retirada de acreditación o cualquier incidencia al respecto de su actividad.

Las entidades de inspección o certificación, según su actividad, deberán cumplir las siguientes normas:

- Para las entidades de inspección, la norma UNE EN ISO/IEC 17020, con un alcance que incluya lo establecido en el presente real decreto y normas de desarrollo.
- Para las entidades de certificación de producto, la norma EN 45011 o norma que la sustituya, con un alcance que incluya lo establecido en el presente real decreto y normas de desarrollo.

Las entidades de inspección y certificación entidades serán supervisadas por las autoridades competentes de las comunidades autónomas para verificar que reúnen los requisitos necesarios para realizar la actividad declarada y la realizan de manera correcta. Si como consecuencia de esta supervisión se detectaran anomalías, lo comunicarán inmediatamente a ENAC para que ésta adopte las medidas oportunas. La suspensión o retirada de la acreditación implicará el cese automático de toda actividad, relacionada con esta norma, en tanto en cuanto no se reinstaure la acreditación.

2.4. LEGISLACIÓN DE LA UNIÓN EUROPEA.

En el Libro Blanco de la Comisión Europea, adoptado el 12 de enero de 2000, sobre Seguridad Alimentaria se diseña una nueva concepción comunitaria de la regulación alimentaria describiendo un conjunto de acciones necesarias para completar y modernizar la legislación de la Unión Europea en el ámbito de la alimentación, organizando la seguridad alimentaria de una manera coordinada e integrada y tomando en consideración todos los aspectos de la producción alimentaria entendida como un todo, desde la producción primaria hasta la venta o el suministro de alimentos al consumidor. Su mejor exponente es el Reglamento (CE) 178/2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Este Reglamento define **legislación alimentaria**, como las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas aplicables en la Comunidad Europea o a nivel nacional a los alimentos en general, y a la seguridad de los alimentos en particular.

A su vez, este Reglamento se ha visto complementado por un conjunto de reglamentos de higiene y control oficial que viene a establecer la regulación básica que en esta materia es de aplicación a todas las etapas de la cadena alimentaria y muy en particular a los de origen animal, como el Reglamento (CE) 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios y el Reglamento (UE) 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales.

El sector alimentario, por su trascendencia en términos sociales, económicos y medio ambientales, tiene un carácter estratégico tanto en España como en toda la Unión Europea. Su misión básica es proporcionar al ciudadano unos alimentos sanos, seguros y que además respondan a sus expectativas de calidad. Esta situación demanda un modelo de calidad alimentaria que incluya un conjunto básico de disposiciones legales y vele por el respeto a la competencia leal entre operadores.

En este sentido, resulta necesario revisar tanto los aspectos generales como los particulares de la calidad alimentaria en el ámbito de la competencia de la Administración General del Estado, para tener en cuenta las nuevas tendencias en esta materia que, de modo específico, afectan a la alimentación; recogiendo y respetando, en el ámbito económico, los principios básicos y requisitos de la legislación alimentaria establecidos en el Reglamento (CE) n.º 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, teniendo en cuenta, asimismo, los principios recogidos en la materia sobre trazabilidad, autocontrol, y responsabilidad de los operadores.

Estos sistemas de la evaluación de la conformidad de los alimentos en el ámbito voluntario de la calidad, y la naturaleza, características y principios de funcionamiento de la acreditación en el sector alimentario, se establecen en el Reglamento (CE) 765/2008, por el que se establecen los requisitos de acreditación y vigilancia del mercado relativos a la comercialización de los productos.

BIBLIOGRAFÍA

Ley 28/2015, de 30 de julio, para la defensa de la calidad alimentaria.

Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición.

Reglamento (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios.

Reglamento (CE) 765/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de julio de 2008, por el que se establecen los requisitos de acreditación y vigilancia del mercado relativos a la comercialización de los productos

Reglamento (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios.

Reglamento (CE) 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria, teniendo en cuenta, asimismo, los principios recogidos en la materia sobre trazabilidad, autocontrol, y responsabilidad de los operadores.

Reglamento (UE) 2017/625 Del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2017 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, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n. o 999/2001, (CE) n. o 396/2005, (CE) n. o 1069/2009, (CE) n. o 1107/2009, (UE) n. o 1151/2012, (UE) n. o 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n. o 1/2005 y (CE) n. o 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n. o 854/2004 y (CE) n. o 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo.

<https://www.comunidad.madrid/servicios/salud/>

<https://www.euroinnova.us/blog/calidad-y-seguridad-alimentaria>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 79

LA LEGISLACIÓN ALIMENTARIA: EL CODEX ALIMENTARIUS MUNDI Y EL CÓDIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL. LAS NORMAS DE CALIDAD EN LA ACTUALIDAD.

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 LEGISLACIÓN ALIMENTARIA

1.1. PRINCIPIOS GENERALES DE LA LEGISLACIÓN ALIMENTARIA

- 1.1.1. Objetivos generales
- 1.1.5. Análisis del Riesgo
- 1.1.3. Principio de cautela
- 1.1.4. Protección de los intereses de los consumidores
- 1.1.5. Comunicación del Riesgo
- 1.1.6. Principios de Transparencia

1.2. REQUISITOS GENERALES DE LA LEGISLACIÓN ALIMENTARIA

- 1.2.1. Requisitos de seguridad alimentaria
- 1.2.2. Requisitos de inocuidad de los piensos
- 1.2.3. Presentación
- 1.2.4. Trazabilidad
- 1.2.5. Responsabilidades respecto a los alimentos y piensos: explotadores de empresas alimentarias o de piensos
- 1.2.6. Responsabilidad civil

2. EL CODEX ALIMENTARIUS MUNDI

2.1. NORMAS DEL CODEX

2.2. COMITÉS DEL CODEX

3. EL CÓDIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL

4. LAS NORMAS DE CALIDAD EN LA ACTUALIDAD

1. LA LEGISLACIÓN ALIMENTARIA

La legislación alimentaria incluye las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas, aplicables en la Comunidad Europea o a nivel nacional a los alimentos en general, y a la seguridad de los alimentos en particular. Se aplica a cualquiera de las etapas de la producción, transformación y distribución de alimentos así como de piensos producidos para alimentar a los animales destinados a la producción de alimentos o suministrados a dichos animales.

Los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria aplicables a los alimentos y piensos en la Comunidad y a nivel nacional, se establecieron mediante el Reglamento (CE) 178/2002. Esta norma proporciona la base para asegurar un nivel elevado de protección de la salud de las personas y de los intereses de los consumidores en relación con los alimentos, teniendo en cuenta la diversidad del suministro de alimentos, incluidos los productos tradicionales, al tiempo que se garantiza el funcionamiento eficaz del mercado interior. Establece principios y responsabilidades comunes, los medios para proporcionar una base científica sólida y disposiciones y procedimientos organizativos eficientes en los que basar la toma de decisiones en cuestiones referentes a la seguridad de los alimentos y los piensos.

Por *alimento* se entiende cualquier sustancia o producto destinados a ser ingeridos por los seres humanos o con probabilidad razonable de serlo, tanto si han sido transformados entera o parcialmente como si no. Así, alimento incluye bebidas, goma de mascar y cualquier sustancia, incluida el agua, incorporada voluntariamente al alimento durante su fabricación, preparación o tratamiento

1.1. PRINCIPIOS GENERALES DE LA LEGISLACIÓN ALIMENTARIA

Los principios generales constituirán un marco general de carácter horizontal al que habrá que ajustarse cuando se adopten medidas.

1.1.1. Objetivos generales.

- a) lograr un nivel elevado de protección de la vida y la salud de las personas, así como proteger los intereses de los consumidores, incluidas unas prácticas justas en el comercio de alimentos, teniendo en cuenta la protección de la salud y el bienestar de los animales, los aspectos fitosanitarios y el medio ambiente.
- b) lograr la libre circulación en la Comunidad de alimentos y piensos fabricados o comercializados de acuerdo con los principios y requisitos generales.
- c) cuando existan normas internacionales o su formulación sea inminente, se tendrán en cuenta a la hora de elaborar o adaptar la legislación alimentaria, salvo que exista una justificación científica, o que el nivel de protección que ofrezcan sea diferente al determinado como apropiado en la Comunidad.

1.1.2. Análisis del riesgo. Con el fin de lograr el objetivo general de un nivel elevado de protección de la salud y la vida de las personas, la legislación alimentaria se basará en el análisis del riesgo, salvo que esto no convenga a las circunstancias o la naturaleza de la medida legislativa. La determinación del riesgo se basará en las pruebas científicas disponibles y se efectuará de una manera independiente, objetiva y transparente.

La gestión del riesgo tendrá en cuenta los resultados de la determinación del riesgo y, en particular, los dictámenes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, así como otros factores relevantes para el tema de que se trate.

1.1.3. Principio de cautela. Cuando, tras evaluar la información disponible, se observe la posibilidad de que haya efectos nocivos para la salud, pero exista incertidumbre científica, podrán adoptarse medidas provisionales de gestión del riesgo para asegurar el nivel elevado de protección de la salud, en espera de disponer de información científica adicional. Las medidas adoptadas serán proporcionadas y no restringirán el comercio más de lo requerido para alcanzar la protección de la salud, teniendo en cuenta la viabilidad técnica y económica. Estas medidas se revisarán en un plazo de tiempo razonable.

1.1.4. Protección de los intereses de los consumidores. La legislación alimentaria tendrá como objetivo proteger los intereses de los consumidores y ofrecerles una base para elegir con conocimiento de causa los alimentos que consumen. Tendrá asimismo como objetivo prevenir las prácticas fraudulentas o engañosas, la adulteración de alimentos y cualquier otra práctica que pueda inducir a engaño al consumidor.

1.1.5. Comunicación del Riesgo

a) Objetivos de la comunicación del riesgo

- mejorar el conocimiento y comprensión del problema, en particular en caso de divergencias en la evaluación científica.
- garantizar la coherencia, la transparencia y la claridad en la formulación de recomendaciones y decisiones para la gestión del riesgo.
- proporcionar una base sólida y, cuando proceda, una base científica, para entender las decisiones de gestión del riesgo.
- mejorar la eficacia y eficiencia en todo el análisis del riesgo.
- fomentar la comprensión pública del análisis del riesgo.
- garantizar una adecuada participación de los consumidores, empresas alimentarias y de piensos, la comunidad académica y todas las demás partes interesadas.
- garantizar un intercambio adecuado y transparente de información con las partes interesadas en relación con los riesgos asociados a la cadena alimentaria.
- garantizar que consumidores reciban información de estrategias para evitar riesgo.
- contribuir a la lucha contra la divulgación de información falsa y contra sus fuentes.

b) Principios generales de comunicación del riesgo. La comunicación del riesgo deberá:

- propiciar el intercambio de información con todas las partes interesadas, sobre la base de los principios de transparencia, apertura y capacidad de respuesta.
- dar información transparente en cada fase del proceso de análisis del riesgo.
- tener en cuenta las percepciones del riesgo de todas las partes interesadas.

- facilitar la comprensión y el diálogo entre las partes interesadas.
- ser clara y accesible, observando las disposiciones jurídicas aplicables en materia de confidencialidad y protección de los datos personales.

c) Plan general de comunicación del riesgo. La Comisión adoptará, mediante actos de ejecución, un plan general de comunicación del riesgo para alcanzar los objetivos, de conformidad con los principios generales de la comunicación del riesgo. Dicho plan se mantendrá actualizado, teniendo en cuenta los avances científicos y técnicos y la experiencia adquirida. Este plan promoverá un marco integrado de comunicación del riesgo que seguirán los evaluadores y los gestores del riesgo de forma coherente y sistemática, tanto a escala de la Unión como nacional. Deberá:

- determinar los principales factores a tener en cuenta al considerar el tipo y el nivel de las actividades de comunicación del riesgo que se necesitan.
- determinar los diferentes tipos y niveles de actividades de comunicación del riesgo, y cuáles son los principales instrumentos y canales adecuados para la comunicación del riesgo, teniendo en cuenta las necesidades de los destinatarios.
- establecer mecanismos de coordinación y cooperación para reforzar la coherencia de la comunicación del riesgo por parte de evaluadores y gestores del riesgo.
- establecer mecanismos para garantizar un diálogo abierto entre consumidores, empresas alimentarias y de piensos, la comunidad académica y demás partes interesadas, así como su adecuada participación.

1.1.6. Principios de Transparencia

a) Consulta pública. En el proceso de elaboración, evaluación y revisión de la legislación alimentaria se procederá a una consulta pública, abierta y transparente, excepto cuando no sea posible debido a la urgencia del asunto.

b) Información al público. Cuando existan motivos razonables para sospechar que un alimento o pienso puede presentar un riesgo para la salud de personas o animales, las autoridades adoptarán las medidas apropiadas para informar al público de la naturaleza del riesgo, indicando el alimento o el pienso, el riesgo que puede presentar y las medidas vayan a adoptarse para prevenir, reducir o eliminar ese riesgo.

1.2. REQUISITOS GENERALES DE LA LEGISLACIÓN ALIMENTARIA

1.2.1. Requisitos de seguridad alimentaria.

a) No se comercializarán los alimentos que no sean seguros.

b) Se considerará que un alimento no es seguro cuando sea nocivo para la salud o no sea apto para el consumo humano.

c) A la hora de determinar si un alimento no es seguro, se tendrán en cuenta:

- condiciones normales de uso del alimento por los consumidores.
- información ofrecida al consumidor sobre prevención de efectos perjudiciales para la salud derivados de un alimento o categoría de estos.

- d)** Al determinar si un alimento es nocivo para la salud, se tendrán en cuenta:
- los probables efectos inmediatos y a corto y largo plazo del alimento, no sólo para la salud de la persona que lo consume y la de sus descendientes.
 - los posibles efectos tóxicos acumulativos.
 - la sensibilidad particular de orden orgánico de una categoría específica de consumidores, cuando el alimento esté destinado a ella.
- e)** Al determinar si un alimento no es apto para el consumo humano, se tendrá en cuenta si el alimento resulta inaceptable para el consumo humano de acuerdo con el uso para el que está destinado, por estar contaminado por una materia extraña o de otra forma, o estar putrefacto, deteriorado o descompuesto.
- f)** Cuando un alimento que no sea seguro pertenezca a un lote o a una remesa de alimentos de la misma clase o descripción, se presupondrá que todos los alimentos contenidos en ese lote o remesa tampoco son seguros, salvo que una evaluación detallada demuestre lo contrario.
- g)** El alimento que cumpla las disposiciones comunitarias específicas que regulen la inocuidad de los alimentos se considerará seguro.
- h)** La conformidad de un alimento con las disposiciones específicas que le sean aplicables no impedirá que las autoridades competentes puedan imponer restricciones a su comercialización o exigir su retirada del mercado cuando existan motivos para pensar que, a pesar de su conformidad, el alimento no es seguro.
- i)** A falta de disposiciones comunitarias específicas, se considerará seguro un alimento si es conforme a las disposiciones específicas de la legislación alimentaria nacional del Estado miembro donde se comercialice ese alimento.

1.2.2. Requisitos de inocuidad de los piensos.

- a)** No se comercializarán ni se darán a ningún animal destinado a la producción de alimentos piensos que no sean seguros.
- b)** Se considerará que un pienso no es seguro para el uso al que esté destinado cuando tenga un efecto perjudicial para la salud humana o de los animales o haga que el alimento obtenido a partir de animales destinados a la producción de alimentos no sea seguro para el consumo humano.
- c)** Cuando un pienso que no cumple la obligación de inocuidad pertenezca a un lote o remesa de piensos de la misma clase o descripción, se presupondrá que ninguno de los contenidos en ese lote o remesa la cumplen, salvo que una evaluación detallada demuestre lo contrario.
- d)** El pienso que cumpla las disposiciones comunitarias específicas por las que se rige la inocuidad de los piensos se considerará seguro.
- e)** La conformidad de un pienso con las disposiciones específicas aplicables no impedirá que las autoridades competentes puedan tomar medidas para imponer restricciones a su comercialización o exigir su retirada del mercado cuando existan motivos para sospechar que, a pesar de su conformidad, no es seguro.
- f)** En ausencia de disposiciones comunitarias específicas, se considerará seguro un pienso si es conforme a las disposiciones específicas de la legislación nacional relativa a inocuidad del pienso del Estado donde ese pienso está en circulación.

1.2.3. Presentación. El etiquetado, publicidad y presentación de alimentos o piensos, incluidos su forma, apariencia o envasado, los materiales de envasado utilizados, la forma en que se disponen y el lugar en que se muestran, así como la información que se ofrece sobre ellos a través de cualquier medio, no deberán inducir a error a los consumidores.

1.2.4. Responsabilidades.

- a) Los explotadores de empresas alimentarias y de empresas de piensos se asegurarán que los alimentos o piensos cumplen los requisitos de la legislación alimentaria pertinentes a los efectos de sus actividades.
- b) Los Estados miembros velarán por el cumplimiento de la legislación alimentaria, y controlarán y verificarán que los explotadores de empresas alimentarias y de piensos cumplen los requisitos de la legislación alimentaria en todas las etapas de la producción, la transformación y la distribución. Para tal fin, llevarán a cabo un sistema de controles oficiales y otras actividades como vigilar la inocuidad de alimentos y piensos. Los Estados miembros regularán asimismo las medidas y las sanciones aplicables a las infracciones de la legislación alimentaria y de la legislación relativa a los piensos, que deberán ser efectivas, proporcionadas y disuasorias.

1.2.4. Trazabilidad.

- a) En todas las etapas de la producción, la transformación y la distribución deberá asegurarse la trazabilidad de los alimentos, los piensos, los animales destinados a la producción de alimentos y de cualquier otra sustancia destinada a ser incorporada en un alimento o un pienso, o con probabilidad de serlo.
- b) Los explotadores de empresas alimentarias y de piensos deberán poder identificar a cualquier persona que les haya suministrado un alimento, pienso, animal destinado a la producción de alimentos, o cualquier sustancia destinada a ser incorporada en un alimento o un pienso, o con probabilidad de serlo. Para tal fin, dichos explotadores pondrán en práctica sistemas y procedimientos que permitan poner esta información a disposición de las autoridades competentes si éstas así lo solicitan.
- c) Los explotadores de empresas alimentarias y de empresas de piensos deberán poner en práctica sistemas y procedimientos para identificar a las empresas a las que hayan suministrado sus productos. Pondrán esta información a disposición de las autoridades competentes si éstas así lo solicitan.
- d) Los alimentos o los piensos comercializados o con probabilidad de comercializarse en la Comunidad deberán estar adecuadamente etiquetados o identificados para facilitar su trazabilidad mediante documentación o información pertinentes, de acuerdo con los requisitos pertinentes de disposiciones más específicas.
- e) Podrán adoptarse disposiciones para la aplicación de lo dispuesto en el presente artículo en relación con sectores específicos de acuerdo con el procedimiento contemplado en el apartado 2 del artículo 58.

1.2.5. Responsabilidades respecto a los alimentos y piensos: explotadores de empresas alimentarias o de piensos

- a) Si un explotador de empresa alimentaria o de piensos tiene motivos para pensar que alguno de los alimentos o piensos que ha importado, producido, transformado, fabricado o distribuido no cumple los requisitos de seguridad o inocuidad, procederá a su retirada del mercado e informará a las autoridades competentes. En caso de alimentos que puedan haber llegado a los consumidores, el explotador informará a los consumidores de las razones de esa retirada y, si es necesario, recuperará los productos suministrados. En el caso de los piensos, estos serán destruidos.
- b) El explotador de empresa alimentaria o de piensos responsable de las actividades de venta al por menor o distribución que no afecten al envasado, etiquetado, inocuidad o a la integridad del alimento o pienso procederá, dentro de los límites de las actividades que lleve a cabo, a la retirada de los productos que no se ajusten a los requisitos de seguridad y contribuirá a la inocuidad del alimento comunicando la información pertinente para su trazabilidad y cooperando en las medidas que adopten los productores, los transformadores, los fabricantes o las autoridades competentes.
- c) El explotador de empresa alimentaria o de piensos que tenga motivos para pensar que uno de los alimentos o piensos que ha comercializado es nocivo para la salud de las personas o incumple los requisitos de inocuidad de los piensos, deberá informar a las autoridades competentes, así como de las medidas adoptadas para prevenir los riesgos para el consumidor final o derivados del empleo de dicho pienso.
- d) Los explotadores de empresas alimentarias o empresa de piensos colaborarán con las autoridades competentes en lo que se refiere a las medidas adoptadas para evitar o reducir los riesgos que presente un alimento o pienso que hayan suministrado.

1.2.6. Responsabilidad civil. Las disposiciones del presente capítulo se aplicarán sin perjuicio de la Directiva 85/374/CEE, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros en materia de responsabilidad por los daños causados por productos defectuosos.

2. EL CODEX ALIMENTARIUS MUNDI.

El **Codex Alimentarius** es una colección de normas alimentarias y textos afines aceptados internacionalmente y presentados de modo uniforme. La finalidad del Codex es garantizar alimentos inocuos y de calidad a todas las personas, en cualquier lugar. Así, las normas del Codex garantizan que los alimentos sean saludables y puedan comercializarse.

En 1943, 44 gobiernos se comprometen a fundar una organización permanente para la alimentación y la agricultura y en 1945, la Conferencia de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en su primer período de sesiones, crea la FAO como organismo especializado de las Naciones Unidas. Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) inició su actividad en 1948. Su Constitución fue aprobada en 1946 por los representantes de 61 Estados, entrando en vigor en 1948.

El Codex Alimentarius es un conjunto de normas, directrices y códigos de prácticas aprobados por la Comisión del Codex Alimentarius. La Comisión constituye el elemento central del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias y fue establecida por la FAO y la OMS con la finalidad de proteger la salud de los consumidores y promover prácticas leales en el comercio alimentario. La Comisión celebró su primer período de sesiones en 1963.

Actualmente, la Comisión del Codex Alimentarius está integrada por 189 Miembros: 188 Estados Miembros, entre los que se encuentra España, y 1 Organización Miembro, la Unión Europea. Los 188 miembros del Codex han negociado recomendaciones de base científica en todos los ámbitos relacionados con la inocuidad y calidad de los alimentos. Los textos del Codex sobre inocuidad de los alimentos son una referencia para la solución de diferencias comerciales en la OMC.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), como punto de contacto del Codex en España, realiza la función de enlace directo con la Secretaría del Codex Alimentarius conforme establece su manual de procedimiento. Asimismo, constituye un enlace con la Secretaría del Consejo de la UE en temas relacionados con el Codex, ya que la Unión Europea es miembro del Codex y España como miembro de la Unión Europea, debe coordinarse con la Comisión UE y el resto de Estados Miembros.

2.1. NORMAS DEL CODEX

Los textos básicos del Codex son las Normas generales, directrices y los códigos de prácticas, los cuales se aplican a todos los productos y categorías de productos. Estos textos tratan normalmente sobre prácticas de higiene, etiquetado, aditivos, inspección y certificación, nutrición y residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas.

Las normas del Codex pueden ser generales o específicas. Las normas del Codex para productos se refieren a un producto específico, si bien ahora el Codex elabora cada vez más normas para grupos de productos, por ejemplo, una norma general para zumos y néctares de frutas en lugar de una para cada fruta.

En cuanto a la elaboración de las normas del Codex, normalmente es un gobierno nacional o un comité auxiliar de la Comisión el que formula la propuesta de elaboración de dicha norma. A continuación, se prepara un documento de debate, en el que se esboza el objetivo a alcanzar con la norma propuesta, y un documento de proyecto en el que se indica el plazo para llevar a cabo los trabajos así como la prioridad relativa.

Para la puesta en marcha del proceso, la Comisión examina el documento del proyecto y decide si la norma debe elaborarse como se propone. A continuación, la Secretaría de la Comisión organiza la preparación de un anteproyecto de norma y lo distribuye a los gobiernos de los Estados Miembros, las organizaciones observadoras y otros comités del Codex con vistas a la realización de dos rondas de presentación de observaciones y asesoramiento especial. Las normas pueden tardar varios años en elaborarse. Una vez

aprobada por la Comisión, la nueva norma del Codex se añade al Codex Alimentarius y se publica en el sitio web.

Las normas del Codex y textos afines tienen carácter voluntario de modo que, para ser aplicables, deben ser transpuestos a la legislación o reglamentos nacionales. Aunque se trata de recomendaciones para la aplicación voluntaria por parte de los miembros, las normas del Codex sirven en muchas ocasiones como base para la legislación nacional.

La finalidad de su publicación es orientar y fomentar la elaboración y el establecimiento de definiciones y requisitos aplicables a los alimentos para favorecer su armonización puesto que dicha armonización de las normas alimentarias contribuye a la protección de la salud del consumidor y a la mayor facilitación posible del comercio internacional.

Las normas del Codex se basan en sólidos datos científicos proporcionados por órganos internacionales independientes de evaluación de riesgos o consultas ad hoc organizadas por la FAO y la OMS.

Su misión es contribuir a la inocuidad, calidad y equidad en el comercio internacional de alimentos. Así, entre sus objetivos, destacan:

- a) Protección de la salud de los consumidores.** Los consumidores pueden confiar en que los productos alimentarios que compran son saludables y de calidad, y los importadores, en que los alimentos que han encargado se ajustan a sus especificaciones.
- b) Eliminación de barreras al comercio.** El Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio (Acuerdo MSF) y el Acuerdo sobre Obstáculos Técnicos al Comercio reconocieron formalmente las normas y directrices del Codex Alimentarius como puntos de referencia para la facilitación del comercio internacional y la resolución de conflictos comerciales en el Derecho internacional. Si los miembros de la OMC desean aplicar medidas más estrictas que las establecidas por el Codex en lo relativo a la inocuidad de los alimentos, se les puede exigir una justificación científica de esas medidas.

2.2. COMITÉS DEL CODEX.

La Conferencia Conjunta FAO/OMS sobre Normas Alimentarias reconoció la importancia de realizar evaluaciones basadas en datos científicos sólidos y principios de evaluación de riesgos. Por ello, el Codex recibe asesoramiento científico independiente de órganos de expertos establecidos por la FAO y la OMS. Los procedimientos de selección de expertos para que formen parte de estos órganos garantizan la excelencia, independencia y transparencia. De este modo, los comités del Codex se encargan de analizar los riesgos al elaborar las normas.

Cuatro órganos de expertos pueden proporcionar asesoramiento científico al Codex:

- 1) JECFA - Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.** Es un comité científico internacional de expertos administrado conjuntamente por la FAO y la OMS

que realiza evaluaciones del riesgo y proporciona asesoramiento a la FAO, la OMS y los Estados Miembros de ambas organizaciones. Las solicitudes de asesoramiento científico se canalizan a través de la Comisión del Codex mediante su tarea de elaboración de normas y directrices alimentarias internacionales en el marco del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias.

- 2) JMPR - Reuniones conjuntas FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas.** Proporciona asesoramiento científico independiente de expertos a la Comisión y su comité especializado en residuos de plaguicidas.
- 3) JEMRA - Reuniones Conjuntas de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de Riesgos Microbiológicos.** Proporciona asesoramiento científico independiente a la Comisión y sus comités especializados.
- 4) JEMNU - Reuniones conjuntas de expertos FAO/OMS sobre nutrición.** Refuerzan el papel de la FAO y de la OMS en cuanto a brindar asesoramiento científico sobre nutrición a los Estados Miembros y a órganos como la Comisión del Codex, en particular al Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales (CCNFSDU). Las JEMNU se convocan en respuesta a una petición específica del CCNFSDU o de otro órgano del Codex.

3. EL CÓDIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL

El Código Alimentario es el cuerpo orgánico de normas básicas y sistematizadas relativas a alimentos, condimentos, estimulantes y bebidas, sus primeras materias correspondientes, utensilios y enseres de uso y consumo doméstico, establecido mediante el Decreto 2484/1967, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.

Tiene como finalidad:

- 1)** Definir qué ha de entenderse por alimentos, condimentos estimulantes, bebidas y demás productos y materias a que alcanza esta codificación.
- 2)** Determinar las condiciones mínimas que han de reunir aquéllos.
- 3)** Establecer las condiciones básicas de los distintos procedimientos de preparación, conservación, envasado, distribución, transporte, publicidad y consumo de alimentos.

Las disposiciones de este Código son de estricta aplicación en todo el territorio nacional.

- a)** En cuanto a lo que en éste se consuma o pretenda consumir, cualquiera que sea el país o territorio de su origen.
- b)** En cuanto a los que en éste se obtenga, elabore o manipule cualquiera que sea el país o territorio donde haya de consumirse, si bien podrán tenerse en cuenta a efectos de exportación las legislaciones de los países de destino, con las correspondientes indicaciones en los envases.

A su acatamiento y observancia están obligadas todas las personas físicas y jurídicas, cualquiera que sea su nacionalidad, en tanto en cuanto se hallen en territorio español, incluso en forma transitoria o accidental.

4. LAS NORMAS DE CALIDAD EN LA ACTUALIDAD

El objetivo de la política de seguridad alimentaria de la UE es proteger a los consumidores, al tiempo que se garantiza el buen funcionamiento del mercado interior. La legislación de la UE abarca toda la cadena alimentaria «de la granja a la mesa» de forma integrada y aplicando el concepto «Una sola salud».

La UE ha establecido determinadas normas para garantizar la higiene de los alimentos, la salud y el bienestar de los animales, la fitosanidad y la prevención de los riesgos de contaminación por sustancias externas, como por ejemplo los plaguicidas. Se realizan estrictas comprobaciones en cada fase, y las importaciones (por ejemplo, carne) procedentes de fuera de la UE deben cumplir las mismas normas y someterse a las mismas comprobaciones que los alimentos producidos en la UE.

A fin de facilitar el acceso a la normativa aplicable en materia de calidad alimentaria, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación elabora diversas recopilaciones legislativas.

Dichas disposiciones vienen además a dar cumplimiento a lo dispuesto en la Ley 28/2015, para la defensa de la calidad alimentaria, en la que se prevé que el Ministerio facilitará el conocimiento de la normativa de calidad alimentaria de obligado cumplimiento y articulará un sistema para elaborar periódicamente y con carácter informativo, una relación de la mencionada normativa.

BIBLIOGRAFÍA

Reglamento (CE) 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.

<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/legislacion/recopilaciones-legislativas-monograficas/default.aspx>

<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>

MATERIAL PARA LA PREPARACIÓN DEL TEMA 80

**EL REGLAMENTO 1169/2011 SOBRE LA INFORMACIÓN ALIMENTARIA
FACILITADA AL CONSUMIDOR.**

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

EL REGLAMENTO 1169/2011 SOBRE LA INFORMACIÓN ALIMENTARIA FACILITADA AL CONSUMIDOR

1. INTRODUCCIÓN

2. REQUISITOS GENERALES DE INFORMACIÓN ALIMENTARIA

3. INFORMACIÓN ALIMENTARIA OBLIGATORIA

3.1. PRINCIPIOS QUE RIGEN LA INFORMACIÓN ALIMENTARIA OBLIGATORIA

3.2. DISPONIBILIDAD, COLOCACIÓN Y PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN ALIMENTARIA OBLIGATORIA

3.3 REQUISITOS LINGÜÍSTICOS

3.4. LISTA DE MENCIONES OBLIGATORIAS

3.5. OMISIÓN DE DETERMINADAS MENCIONES OBLIGATORIAS

1. INTRODUCCIÓN.

Este Reglamento establece la base para garantizar un alto nivel de protección de los consumidores en relación con la información alimentaria, teniendo en cuenta las necesidades de información del consumidor, al mismo tiempo que asegura un funcionamiento correcto del mercado interior. En el reglamento se establecen los principios generales, requisitos y las responsabilidades que rigen la información alimentaria y, en particular, el etiquetado de los alimentos.

Se entiende por **información alimentaria** la información relativa a un alimento y puesta a disposición del consumidor final por medio de una etiqueta, otro material de acompañamiento, o cualquier otro medio, incluyendo herramientas tecnológicas modernas o la comunicación verbal. La **información alimentaria obligatoria** incluye las menciones cuya comunicación al consumidor final es exigida por las disposiciones de la Unión.

Se aplicará a todos los alimentos destinados al consumidor final, incluidos los entregados por las colectividades y los destinados al suministro de las colectividades y será aplicable sin perjuicio de los requisitos de etiquetado previstos en las disposiciones de la Unión aplicables a alimentos concretos.

El **etiquetado** incluye todas las menciones, indicaciones, marcas de fábrica o comerciales, dibujos o signos relacionados con un alimento y que figuren en cualquier envase, documento, rótulo, etiqueta, faja o collarín, que acompañen o se refieran a dicho alimento. Por su parte, la **etiqueta** incluye letreros, marcas comerciales o de fábrica, signos, dibujos u otras descripciones, escritos, impresos, estarcidos, marcados, grabados o estampados en un embalaje o envase alimentario, o que acompañe al mismo.

La información alimentaria facilitada perseguirá un nivel de protección elevado de la salud y los intereses de los consumidores, proporcionando una base para que el consumidor final tome decisiones con conocimiento de causa y utilice los alimentos de forma segura, teniendo especialmente en cuenta consideraciones sanitarias, económicas, medioambientales, sociales y éticas.

La legislación sobre información alimentaria aspirará a lograr la libre circulación de alimentos producidos y comercializados legalmente en la Unión, teniendo en cuenta la necesidad de proteger los intereses de los productores y de promover la producción de productos de calidad.

En caso de que la legislación sobre información alimentaria establezca nuevos requisitos, se concederá un período transitorio tras su entrada en vigor durante el cual podrán comercializarse los alimentos cuyo etiquetado no sea conforme con los nuevos requisitos y podrán seguir comercializándose hasta que se agoten las existencias de los alimentos que se hayan introducido en el mercado antes del final del período transitorio.

2. REQUISITOS GENERALES DE INFORMACIÓN ALIMENTARIA

Los alimentos destinados a ser suministrados al consumidor final o a las colectividades irán acompañados de información alimentaria, la cual deberá cumplir una serie de requisitos relacionados con prácticas informativas leales:

a) La información alimentaria **no inducirá a error**:

- sobre las características del alimento y, en particular, sobre la naturaleza, identidad, cualidades, composición, cantidad, duración, país de origen o lugar de procedencia, y modo de fabricación o de obtención.
- al atribuir al alimento efectos o propiedades que no posee.
- al insinuar que el alimento posee características especiales, en particular al poner de relieve la presencia o ausencia de determinados ingredientes o nutrientes, cuando en realidad, todos los alimentos similares poseen esas mismas características.
- al sugerir, mediante la apariencia, descripción o representaciones pictóricas, la presencia de un determinado alimento o ingrediente, cuando en realidad un componente presente de forma natural o un ingrediente utilizado normalmente en dicho alimento se ha sustituido por un componente o un ingrediente distinto.

b) La información alimentaria será **precisa, clara y fácil de comprender** para el consumidor.

c) Salvo excepciones previstas por la legislación de la Unión aplicable a las aguas minerales y productos alimenticios destinados a una alimentación especial, la información alimentaria **no atribuirá a ningún alimento las propiedades de prevenir, tratar o curar ninguna enfermedad humana**, ni hará referencia a tales propiedades.

En cuanto a las responsabilidades, el operador de empresa alimentaria responsable de la información alimentaria será el operador con cuyo nombre o razón social se comercialice el alimento o, en caso de que no esté establecido en la Unión, el importador del alimento al mercado de la Unión.

3. INFORMACIÓN ALIMENTARIA OBLIGATORIA

3.1. Principios que rigen la información alimentaria obligatoria.

- 1) En caso de que se requiera información obligatoria, esta se referirá a información que entre en una de las categorías siguientes:
 - información sobre la identidad y la composición, las propiedades u otras características de los alimentos.
 - información sobre la protección de la salud de los consumidores y el uso seguro de un alimento. En particular, se referirá a la información sobre:
 - » las propiedades relacionadas con la composición que puedan ser perjudiciales para la salud de determinados grupos de consumidores.
 - » duración, almacenamiento y uso seguro.
 - » riesgos y efectos sobre la salud consecuencia relativa al consumo perjudicial y peligroso de un alimento.

- información sobre las características nutricionales para permitir que los consumidores, incluidos los que tienen necesidades dietéticas especiales, tomen sus decisiones con conocimiento de causa.

2) En caso de que se considere la necesidad de información alimentaria obligatoria y permitir que los consumidores decidan con conocimiento de causa, se tendrá en cuenta la necesidad expresada por la mayoría de los consumidores de que se les facilite determinada información.

Cualquier medida de la Unión en el ámbito de la información alimentaria que pueda tener efectos sobre la salud pública se adoptará previa consulta a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

3.2. Disponibilidad, colocación y presentación de la información alimentaria obligatoria.

Para todos los alimentos, la información alimentaria obligatoria estará disponible y será fácilmente accesible.

En el caso de los alimentos envasados, la información alimentaria obligatoria figurará directamente en el envase o en una etiqueta sujeta al mismo.

En el caso de alimentos que se presenten sin envasar o de los alimentos envasados en los lugares de venta a petición del comprador o envasados para su venta inmediata, sólo será obligatoria la indicación de todo ingrediente o coadyuvante tecnológico que cause alergias o intolerancias y se utilice en la fabricación o la elaboración de un alimento, permaneciendo presente en el producto acabado, aunque sea en una forma modificada.

La información alimentaria obligatoria se indicará en un lugar destacado, de manera que sea fácilmente visible, claramente legible e indeleble. No debe estar disimulada, tapada o separada por ninguna otra indicación o imagen, ni por ningún otro material interpuesto.

3.3 Requisitos lingüísticos.

La información alimentaria obligatoria figurará en una lengua que comprendan fácilmente los consumidores de los Estados miembros donde se comercializa el alimento.

En su propio territorio, los Estados miembros en que se comercializa un alimento podrán estipular que las menciones se faciliten en una o más lenguas de entre las lenguas oficiales de la Unión Europea.

3.4. Lista de menciones obligatorias

Será obligatorio mencionar las siguientes indicaciones:

a) **Denominación del alimento.** Esta será su denominación legal. A falta de tal denominación, la denominación del alimento será la habitual, o, en caso de que esta no exista o no se use, se facilitará una denominación descriptiva del alimento. La

denominación del alimento no se sustituirá por ninguna denominación protegida como propiedad intelectual, marca comercial o denominación de fantasía.

b) Lista de ingredientes. Estará encabezada o precedida por un título que incluya la palabra *ingredientes*. En ella se incluirán todos los ingredientes del alimento, en orden decreciente de peso, según se incorporen en el momento de su uso para la fabricación del alimento.

Se define *ingrediente primario* como aquel ingrediente o ingredientes de un alimento que representen más del 50% del mismo o que el consumidor asocia con su denominación y respecto al cual se requiere normalmente una indicación cuantitativa.

En determinadas ocasiones, no se exigirá que los alimentos vayan provistos de una lista de ingredientes:

- frutas y hortalizas frescas, incluidas las patatas, que no hayan sido peladas, cortadas o sometidas a cualquier otro tratamiento similar.
- las aguas carbónicas, en cuya denominación aparezca esta última característica.
- los vinagres de fermentación, si proceden exclusivamente de un solo producto básico y siempre que no se les haya añadido ningún otro ingrediente.
- el queso, la mantequilla, la leche y la nata fermentadas, a los que no se ha añadido ningún ingrediente aparte de los productos lácteos, enzimas alimentarias y cultivos de microorganismos necesarios para la fabricación o, en el caso de los quesos que no son frescos o fundidos, la sal necesaria para su fabricación;
- los alimentos que consten de un único ingrediente, en los que la denominación del alimento sea idéntica a la del ingrediente, o la denominación del alimento permita determinar la naturaleza del ingrediente sin riesgo de confusión.

No se exigirá la inclusión en la lista de ingredientes de los siguientes componentes:

- los componentes de un ingrediente que, durante el proceso de fabricación, hubieran sido separados provisionalmente para ser reincorporados a continuación en una cantidad que no sobrepase el contenido inicial.
- los aditivos y enzimas alimentarias cuya presencia en un alimento se deba únicamente al hecho de que estaban contenidos en uno o varios ingredientes del mismo o que se utilicen como coadyuvantes tecnológicos.
- los soportes y sustancias que no son aditivos pero se utilizan del mismo modo y con el mismo fin que los soportes, y se emplean en las dosis estrictamente necesarias.
- las sustancias que no sean aditivos alimentarios, pero que se utilicen del mismo modo y para los mismos fines que los coadyuvantes tecnológicos y que todavía se encuentren presentes en el producto acabado, aunque sea en forma modificada.
- el agua, cuando esta se utilice en el proceso de fabricación solo para reconstituir un ingrediente concentrado o deshidratado, o en el caso del líquido de cobertura que normalmente no se consume.

c) ingrediente o coadyuvante tecnológico 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. La denominación de estas sustancias se destacará mediante una composición tipográfica que la diferencie claramente del resto

de la lista de ingredientes, por ejemplo mediante el tipo de letra, el estilo o el color de fondo. Si no hay lista de ingredientes, se incluirá la palabra «contiene» seguida del nombre de la sustancia o el producto. Entre las sustancias o productos que causan alergias o intolerancias se incluyen:

- Cereales que contengan gluten: trigo, centeno, cebada, avena.
- Crustáceos y productos a base de crustáceos.
- Huevos y productos a base de huevo.
- Pescado y productos a base de pescado.
- Cacahuets y productos a base de cacahuets.
- Soja y productos a base de soja.
- Leche y sus derivados (incluida la lactosa).
- Frutos de cáscara: almendras, avellanas, nueces, anacardos, pacanas, pistachos.
- Apio y productos derivados.
- Mostaza y productos derivados.
- Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo.
- Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro en términos de SO₂ total.
- Altramuces y productos a base de altramuces.
- Moluscos y productos a base de moluscos.

d) cantidad de determinados ingredientes o categorías de ingredientes. Se indicará en caso de que el ingrediente o la categoría de que se trate:

- figure en la denominación del alimento o el consumidor lo asocie con dicha denominación.
- destaque en el etiquetado por medio de palabras, imágenes o representación gráfica.
- sea esencial para definir un alimento y para distinguirlo de los productos con los que se pudiera confundir a causa de su denominación o de su aspecto.

e) cantidad neta del alimento. Se expresará en litros, centilitros, mililitros, kilogramos o gramos en unidades de volumen en el caso de los productos líquidos y en unidades de peso en el caso de los demás productos. La declaración de la cantidad neta no será obligatoria en el caso de los alimentos:

- sujetos a pérdidas considerables de volumen o masa y que se vendan por unidades o se pesen ante el comprador.
- cuya cantidad neta sea inferior a 5g o 5ml (no aplicable a especias/ plantas aromáticas)
- que normalmente se venden por unidades.

f) fecha de duración mínima o fecha de caducidad. La *fecha de duración mínima de un alimento* se define como la fecha hasta la que el alimento conserva sus propiedades específicas cuando se almacena correctamente. En el caso de alimentos microbiológicamente muy perecederos, y que por ello puedan suponer un peligro para la salud humana después de un corto período de tiempo, la fecha de duración mínima se cambiará por la *fecha de caducidad*. Después de su fecha de caducidad, el alimento no se considerará seguro.

Fecha de duración mínima. Se indicará del siguiente modo:

- La fecha deberá ir precedida por las palabras:
«consumir preferentemente antes del...» cuando la fecha incluya indicación del día
«consumir preferentemente antes del fin de ...» en los demás casos;
- las indicaciones anteriores irán acompañadas de la propia fecha o de una referencia al lugar donde se indica la fecha en la etiqueta.
- la fecha se indicará en este orden: día, mes y año. En el caso de alimentos:
 - » cuya duración sea inferior a tres meses, bastará con indicar el día y el mes
 - » cuya duración sea superior a tres meses, pero sin sobrepasar los dieciocho meses, bastará con indicar el mes y el año.
 - » cuya duración sea superior a dieciocho meses, bastará con indicar el año.
- No se requerirá indicar la fecha de duración mínima en el caso de:
 - » frutas y hortalizas frescas, incluidas las patatas sin pelar ni cortar.
 - » vinos, vinos de licor, vinos espumosos, vinos aromatizados y productos similares obtenidos a partir de frutas distintas de la uva.
 - » bebidas con una graduación de un 10% o más en volumen de alcohol.
 - » productos de panadería o repostería que se consumen en un plazo de 24 horas.
 - » Vinagres.
 - » sal de cocina.
 - » azúcares en estado sólido.
 - » productos de confitería consistentes en azúcares aromatizados o coloreados.
 - » gomitas de mascar.

Fecha de caducidad. Se indicará del siguiente modo:

- irá precedida de la indicación «fecha de caducidad» acompañada de la propia fecha o de una referencia al lugar donde se indica la fecha en la etiqueta. Dichas menciones se completarán con una descripción de las condiciones de conservación.
- la fecha consistirá en la indicación según este orden: día, mes y, eventualmente, año.
- la fecha de caducidad se indicará en cada porción individual envasada.

Fecha de congelación o de primera congelación. Se indicará del siguiente modo:

- irá precedida de la indicación «fecha de congelación: ...» acompañada de la propia fecha o de una referencia al lugar donde se indica la fecha en la etiqueta.
- la fecha consistirá en la indicación según este orden: día, mes y año en forma no codificada.

g) condiciones especiales de conservación y/o las condiciones de utilización, cuando los alimentos las requieran. Con el fin de permitir la conservación o utilización adecuadas de los alimentos una vez abierto el envase, se indicarán, cuando proceda, las condiciones y/o la fecha límite de consumo.

h) nombre o la razón social y la dirección del operador de la empresa alimentaria.

i) país de origen o lugar de procedencia. La indicación del país de origen o el lugar de procedencia será obligatoria cuando su omisión pudiera inducir a error al consumidor.

j) modo de empleo. Deberá indicarse de forma que permita un uso apropiado del alimento.

k) grado alcohólico volumétrico adquirido. Se especificará en las bebidas que tengan más de un 1,2% en volumen de alcohol. El grado alcohólico volumétrico adquirido de las bebidas que contengan más de un 1,2% en volumen de alcohol incluirá un decimal como máximo. Irá seguido del símbolo «% vol» y podrá estar precedido de la palabra «alcohol» o de la abreviatura «alc.».

Se establecen una serie de tolerancias positivas y negativas en relación a la indicación del grado alcohólico:

- Cervezas del código NC 2203 00 de un grado alcohólico inferior a 5,5 %vol y bebidas no espumosas del código NC 2206 00 obtenidas a partir de uvas. Tolerancia del 0,5 %vol.
- Cervezas de grado alcohólico superior a 5,5 %vol y bebidas espumosas del código NC 2206 00 obtenidas a partir de uvas, sidras, peradas y otras bebidas fermentadas similares procedentes de frutas distintas de la uva, independientemente de que sean con gas o espumosas y aguamiel. Tolerancia del 1 vol.
- Bebidas con frutas o partes de plantas en maceración. Tolerancia del 1,5 %vol.
- Otras bebidas con grado alcohólico superior a 1,2%. Tolerancia del 0,3 %vol.

l) información nutricional. Incluirá el valor energético y las cantidades de grasas, ácidos grasos saturados, hidratos de carbono, azúcares, proteínas y sal.

La información nutricional obligatoria podrá completarse con la indicación de la cantidad de una o varias de las siguientes sustancias: ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, polialcoholes, almidón, fibra alimentaria, vitaminas o minerales que se encuentren en cantidades significativas.

El valor energético y las cantidades de nutrientes podrán expresarse por porción o por unidad de consumo a condición de que la porción o la unidad que se utilicen se exprese cuantitativamente en la etiqueta y se indique el número de porciones o de unidades que contiene el envase. Cuando las cantidades de nutrientes se expresen solo por porción o por unidad de consumo, el valor energético se expresará por 100 g o por 100 ml y por porción o por unidad de consumo.

Estas menciones figurarán en el mismo campo visual y se presentarán juntas en un formato claro y, si el espacio lo permite, en formato de tabla con las cifras en columna.

En los casos en que el valor energético o la cantidad de nutrientes en un producto sea insignificante, la información sobre dichos elementos podrá sustituirse por una declaración del tipo: «*Contiene cantidades insignificantes de ...*» que aparecerá indicada al lado de la información nutricional, cuando esta exista.

Algunos alimentos quedan exentos del requisito de información nutricional obligatoria

- Productos sin transformar que incluyen un solo ingrediente o una sola categoría de ingredientes.
- Productos transformados cuya única transformación ha consistido en ser curados y que incluyen un solo ingrediente o una sola categoría de ingredientes.
- Agua destinada al consumo humano.
- Una planta aromática, una especia o mezclas de ellas.
- Sal y sucedáneos de la sal.

- Edulcorantes de mesa.
- Extractos de café y de achicoria, granos de café enteros o molidos y granos de café descafeinado enteros o molidos.
- Infusiones de hierbas y frutas y té.
- Vinagres fermentados y sus sucedáneo.
- Aromas.
- Aditivos alimentarios.
- Coadyuvantes tecnológicos.
- Enzimas alimentarias.
- Gelatina.
- Compuestos para espesar mermelada.
- Levadura.
- Gomas de mascar.
- Alimentos en envases o recipientes cuya superficie mayor es inferior a 25 cm².
- Alimentos directamente suministrados por el fabricante en pequeñas cantidades.

3.5. Omisión de determinadas menciones obligatorias.

Las menciones obligatorias podrán omitirse en los siguientes casos:

- a) En el caso de botellas de vidrio destinadas a la reutilización que estén marcadas indeleblemente y, por tanto, no lleven ninguna etiqueta, faja o collarín, solo serán obligatorias la denominación del alimento, los ingrediente o coadyuvante tecnológico que cause alergias o intolerancias, la cantidad neta del alimento, la fecha de duración mínima o de caducidad y la información nutricional.
- b) En el caso del envase o recipientes cuya superficie mayor sea inferior a 10 cm², solo serán obligatorias en el envase o en la etiqueta la denominación del alimento, los ingrediente o coadyuvante tecnológico que cause alergias o intolerancias, la cantidad neta del alimento y la fecha de duración mínima o de caducidad.
- c) la lista de ingredientes y la información nutricional no serán obligatorias en el caso de las bebidas con un grado alcohólico volumétrico superior a 1,2 %.

BIBLIOGRAFÍA

Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.