



MINISTERIO DE
AGRICULTURA, ALIMENTACION
Y MEDIO AMBIENTE

DIRECCION GENERAL DE LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA

SUBDIRECCION GENERAL DE CONTROL Y DE
LABORATORIOS ALIMENTARIOS

Laboratorio Arbitral Agroalimentario

**LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA
PARA METALES PESADOS EN ALIMENTOS Y PIENSOS**
(Lista de la Dirección General de Sanidad y Consumidores de la Comisión Europea)

**PROTOCOLO DE PREPARACION PREVIA DE MUESTRAS DE ALIMENTOS,
PIENSOS Y SUS MATERIAS PRIMAS PARA ANALISIS DE
CONTAMINANTES METALICOS**

Mayo 2012

1.- Introducción

Teniendo en cuenta la importancia que tiene la preparación de muestra en el resultado final de los análisis, en el seno del Grupo de Trabajo de Métodos de Análisis de Metales Pesados, el Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA) conjuntamente con la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y en colaboración con los laboratorios que intervienen en el control oficial de alimentos y piensos en España, han elaborado el presente documento, en el que se intenta armonizar las normativas legales y las recomendadas por los Organismos Internacionales sobre la preparación de muestras para análisis, con el fin de que sea de aplicación general para la metodología analítica de estos elementos en dichas matrices.

En la Decisión de la Comisión 2006/130/CE de 10 de febrero de 2006, que designa los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) para la detección de residuos en animales vivos y sus productos, se nombra como tal al LAA, para la detección de residuos de elementos químicos (grupo B3c).

Además, el LAA, ha sido designado LNR para la detección de metales pesados en alimentos de origen vegetal y piensos, según el listado de LNR de SANCO de la Comisión Europea y de acuerdo a lo establecido en el artículo 33 del Reglamento (CE) N° 882/2004 el Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, sobre las funciones y responsabilidades de los LNR.

Asimismo, en la Nota Técnica NT-55, elaborada por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) "*Laboratorios de Referencia en el sector agroalimentario: política sobre participación en el sistema de acreditación*", se destaca el papel que tienen los LNR en el proceso de acreditación de los laboratorios de control oficial, ya que ENAC considerará en todo momento como 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 LNR de cualquier Estado Miembro o el Laboratorio de la Unión Europea (EU-RL) respectivo, además los LNR asegurarán, en lo posible, la disponibilidad de materiales de referencia, organizarán ensayos intercomparativos y colaborarán en la formación adecuada del personal técnico responsable de los controles oficiales.

2. Objeto

Este protocolo describe las instrucciones necesarias para la preparación previa de las muestras de alimentos, piensos y sus materias primas.

3. Ámbito de aplicación

Este protocolo se aplica a las muestras de alimentos, piensos y sus materias primas que posteriormente se someterán al análisis de metales pesados.

4. Documentación de referencia

Reglamento (CE) N° 1881/2006, de 19 de diciembre, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios texto consolidado.

Reglamento (CE) Nº 333/2007 de 28 de marzo, por el que se fijan los métodos de toma de muestra y de análisis para el control oficial del contenido máximo de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios .

Norma UNE-EN 13804 "Determinación de elementos traza. Criterios de aptitud al uso, consideraciones generales y preparación de muestras".

Protocolo de muestreo, preparación de la muestra y análisis de metales pesados en productos pesqueros. Elaborado por la Agencia de Seguridad Alimentaria (AESAs) en colaboración con las CC.AA. MAPA, INC, IEO. Julio de 2011.

5. Desarrollo

5.1 Equipos:

- Baño de ultrasonidos
- Tamiz de 3 mm de apertura de malla
- Pipetas de 1 a 10 ml
- Frascos de plástico de diferentes tamaños
- Utensilios normales de cocina, preferentemente de plástico (tijeras, cuchillos, abrelatas, cucharas, etc.)
- Picadora de cocina
- Molinillo de café
- Batidora de cocina
- Mezcladora
- Agitador
- Liofilizador
- Molinos especiales para piensos

En general se aconsejan utilizar molinos o mezcladores con cuchillas de titanio o cerámica.

5.2 Reactivos

No se debe usar ningún reactivo químico en la preparación de la muestra. De manera general, se usa agua desionizada o destilada para lavar los productos vegetales, conforme con la práctica doméstica.

5.3. Procedimiento

5.3.1 Preparación inicial

Se recomienda disponer de una masa de muestra de al menos 200 g.

- *Productos frescos*

Las verduras, patatas y frutas se limpian de insectos, tierra, etc. y productos adheridos y después se lavan con agua desionizada o destilada. Las frutas y patatas se secan con un paño, y las verduras se ponen a escurrir en un escurridor de plástico. De acuerdo con cada tipo de producto se quitan las raíces, tronco, hojas, etc., eliminando cualquier parte no comestible. Si es necesario, se vuelve a lavar con agua desionizada o destilada y se vuelve a secar.

- Conservas y semiconservas

Se consideran "al natural" los productos con líquido de gobierno acuoso. Los productos en conservas también se pueden presentar en aceite o con salsas y similares. (ejemplo: calamares en salsa americana, con tomate, en tinta, etc..etc). Para realizar el análisis, eliminar el líquido de gobierno escurriendo la muestra durante 3 minutos a temperatura ambiente sobre un tamiz de 3 mm de malla. Una vez escurrida, homogeneizar por el procedimiento habitual.

En las frutas procesadas (melocotones en almíbar, etc.) se incluye el líquido de gobierno.

- Salazones y ahumados

Se dividen en cuatro grupos:

- Productos secos-salados (bacalao seco, arenques, etc.)

Se raspa la sal que pueda contener. La muestra se eviscera evitando que contamine el músculo. Se eliminan las escamas, piel, espinas no comestibles, cola, aleta y cabeza. Después se sumerge la muestra en agua desionizada en proporción 1:10 durante aproximadamente 15 minutos en reposo, sin agitación y se escurre. Una vez escurrida la muestra, se procede a su homogeneización.

- Salazones (por ejemplo, anchoas en salmuera)

Se raspa la sal que pueda contener. La muestra se eviscera evitándose que contamine el músculo. Se eliminan las escamas, piel, espinas no comestibles, cola, aleta y cabeza. Sumergir la muestra en agua desionizada, en una proporción 1:10 (por ejemplo, 10 g de producto en 100 ml de agua), dejar 15 minutos en reposo, sin agitación y escurrir como en el párrafo anterior. Una vez escurrida, homogeneizar.

- Productos desecados (por ejemplo: mojama)

Se homogeneiza la muestra directamente.

- Productos ahumados

Se elimina la piel y se homogeneiza la muestra directamente.

- Pescados

En el caso de que la muestra se reciba congelada, proceder a su descongelación no forzada (temperatura ambiente y/o refrigeración). Una vez totalmente descongelada, escurrir como en el caso de conservas y semiconservas.

Se realiza una división en función del tamaño de las piezas:

- Piezas de tamaño medio inferior o igual a 7 cm.

La pieza entera se lava con agua destilada o desionizada, se escurre y se homogeniza.

En el caso de que la longitud de las unidades a analizar oscile por encima o por debajo de 7 cm, se hace la media de las medidas obtenidas, en al menos 100 g de muestra representativas y se consideran todas las unidades como el valor medio obtenido.

- Piezas de tamaño medio superior a 7 cm.

La muestra se eviscera, evitando que se contamine el músculo. Se eliminan, en la medida de lo posible, las escamas, piel, espinas no comestibles, cola, aletas y cabeza. Después se lava la muestra con agua desionizada o destilada y se escurre procediendo a su homogenización.

- Cefalópodos

En el caso de que la muestra se reciba congelada, se procederá a su descongelación no forzada (temperatura ambiente y/o refrigeración). Una vez totalmente descongelada, la muestra se eviscera, se elimina la piel del manto y la tinta hasta donde sea razonablemente posible (p.j. chopitos). Después se lava con agua desionizada o destilada, se escurre y se procede a su homogenización.

Los pulpos se analizan enteros sin quitar la piel.

- Crustáceos fresco y congelado (gambas, percebes, cigalas...)

Tratamiento previo: si la muestra se recibe congelada, proceder como con los Pescados y los Cefalópodos. Una vez totalmente descongelada, se eliminan caparazones u otras partes del exoesqueleto y tracto digestivo, a criterio del analista. Después se lava con agua desionizada o destilada, se escurre y se procede a su homogenización, para lo cual se tomará la carne blanca de los apéndices y del abdomen. En el caso de los cangrejos y crustaceos similares (*Brachyura* y *Anomura*), se tomará exclusivamente la carne blanca de los apéndices.

Los crustáceos pequeños que se consumen enteros (camarones, quisquillas, etc) se homogenizan completos.

- Bivalvos

Tratamiento previo: si la muestra se recibe congelada, se procede a su descongelación no forzada (temperatura ambiente y/o refrigeración). Una vez totalmente descongelada, la muestra se limpia externa e internamente, si fuera necesario. Después se lava con agua desionizada para eliminar los restos de arena. El líquido intervalvar se elimina dejando escurrir los bivalvos sobre los bordes ventrales durante 3 minutos. Se homogeniza todo el contenido de la concha, salvo determinadas excepciones (reflejadas en el protocolo de la AESAN).

- Gasterópodos (caracoles marinos, lapas, etc.)

Tratamiento previo: en el caso de que la muestra se recibe congelada, proceder a su descongelación no forzada (temperatura ambiente y/o refrigeración). Una vez totalmente descongelada se lava con agua desionizada y se escurre.

Se homogeneiza todo el contenido de la concha.

- Carnes y productos cárnicos

Preparar sólo la parte comestible, quitando los restos de piel, uñas, grasa, etc., procediendo posteriormente a su homogeneización por el procedimiento de molienda.

- Cereales, legumbres, arroz, etc

Proceder a separar las posibles impurezas existentes y posteriormente moler.

- Leche y productos lácteos

Antes de efectuar la toma de muestra para el análisis se debe homogeneizar por agitación a una temperatura de 30° C, en los quesos proceder a su homogeneización, eliminando la corteza, por el procedimiento de molienda.

- Piensos

Las muestras de piensos se muelen en un molino adecuado a este tipo de muestra.

- Vinos

Las muestras de vino se deben de tomar con pipeta, y nunca verter. Hay que cerciorarse de que sobre el tapón de la botella no existe una cápsula de plomo, y en su caso, quitarla y limpiar la boca con un tissue humedecido en agua. Si se observa la presencia de un precipitado, decantarlo previamente a la toma de muestra.

Los vinos espumosos deben desgasificarse en el baño de ultrasonidos.

- Zumos y bebidas refrescantes

Las muestras que tienen gas se desgasifican en ultrasonidos, para posteriormente homogeneizar por agitación.

6. Reducción del tamaño de partículas (molienda) y homogeneización

Una parte representativa de la muestra, preparada según los procedimientos descritos anteriormente, se somete dependiendo de la naturaleza del producto a distintos procesos de molienda, que se describen a continuación.

- Productos bastante duros, como café, té, arroz, legumbres, se muelen en un molinillo de café.

- Productos menos duros (carne, salchichas, pescados, conservas, etc.) se cortan en piezas pequeñas y se muelen en una picadora de cocina.
- Vegetales, patatas y frutas se cortan en piezas pequeñas y se muelen en una batidora de cocina.
- Las mezcladoras de laboratorio existentes en el mercado con elementos inerte en todas las partes en contacto con la muestra son aconsejables su utilización en los grupos descritos anteriormente.

En productos que contienen grasas o son muy heterogéneos, puede ser necesario homogeneizarlos sometiéndolos a un proceso de liofilización. Las muestras se cortan en piezas pequeñas, y se congelan a -45°C , y se someten a un vacío $<10^{-2}$ mbar durante un mínimo de 20 h. La sublimación se detiene manteniendo las muestras a 20°C . Moler después de liofilizar. En los productos fácilmente homogeneizables en estado fresco no se requiere la liofilización.

En el Anexo 1 se presenta una tabla que describe los procesos de preparación de modo orientativo.

Una vez preparadas las muestras para el análisis se deben guardar en frascos limpios y secos, conservándolas en refrigeración, congelación o a temperatura ambiente, según sea necesario.

7. Conservación y almacenaje

Las muestras se deben almacenar de tal forma que no se produzcan cambios en su composición. Ciertos productos grasos (carnes, etc.) deben conservarse en congelación.

8. Precauciones y advertencias

Pueden aparecer problemas de contaminación al trabajar con equipos y material de acero inoxidable o de hierro, sobre todo en la determinación de elementos como cromo, molibdeno, hierro y níquel.

La posibilidad de contaminación de estos elementos por el equipo o material debe ser comprobado antes de su uso. En tales casos se deben usar aparatos especiales, tales como cuchillos de titanio y morteros de agar.

9. Bibliografía

Entidad Nacional de Acreditación ENAC: NT-55 sobre *laboratorios de referencia de la UE y nacionales dentro del sistema de acreditación de laboratorios agroalimentarios*.

Reglamento (CE) N° 882/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 *sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales*.

Directiva Comunitaria 96/23/CE de 29 de abril, donde se *especifican las medidas de control y organización relativas a las sustancias o a sus metabolitos y los grupos de residuos*

Decisión de la Comisión 2006/130/CE de 10 de febrero de 2006, *que designa los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) para la detección de residuos en animales vivos y sus productos*

Lista de Laboratorios Comunitarios de Referencia y Nacionales de Referencia de SANCO de la Comisión Europea de 2011.

ANEXO 1

Métodos de preparación de muestras según el tipo de alimentos

TIPO DE ALIMENTO	PREPARACIÓN PREVIA	MOLIENDA
Pan	Cortar en trozos pequeños	
Arroz		Molinillo de café
Patatas	Lavar, pelar, secar con un paño	Batidora de cocina
Frutas	Pelar	Batidora de cocina
Zumos de fruta	Agitar	
Queso	Eliminar la corteza	Picadora de cocina
Leche y productos lácteos	Agitar a 30°C	
Carne	Cortar en trozos pequeños	Picadora de cocina
Pollo	Cortar en trozos pequeños	Picadora de cocina
Huevos	Quitar la cáscara	
Pescados	Limpiar, filetear	Picadora de cocina
Crustáceos	Pelar.	Picadora de cocina
Vegetales	Lavar, pelar, secar	Batidora de cocina
Frutos secos		Molinillo de café
Café		Molinillo de café
Bebidas	Agitar y, en caso necesario, desgasificar en el ultrasonido	
Conservas	Ver punto 5.3.1.	Picadora de cocina