

**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**

ÍNDICE

1.- Introducción	2
2.- Objeto	2
3.- Ámbito de aplicación	2
4.- Desarrollo	3
4.1 Equipo	3
4.2 Reactivos	3
4.3 Procedimiento	3
4.3.1 Preparación inicial	3
4.3.2 Reducción del tamaño de partículas (molienda) y homogeneización	7
5.- Conservación y almacenaje	8
6.- Precauciones y advertencias	8
7.- Bibliografía y documentación de referencia	8
ANEXO I	10

1.- Introducción

Teniendo en cuenta la importancia que tiene la preparación de muestra en el resultado final de los análisis de los alimentos, piensos y sus materias primas, en el seno del Grupo de Trabajo de Métodos de Análisis de Metales Pesados, el Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA) conjuntamente con el Centro Nacional de Alimentación (CNA) y en colaboración con los laboratorios que intervienen en el control oficial de estos productos 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 de contaminantes metálicos, con el fin de que pueda servir de guía para la determinación analítica de estos elementos en las matrices antes citadas.

El Laboratorio Arbitral Agroalimentario, ha sido designado como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para la detección de residuos de elementos químicos (Grupo B3C), según la Decisión de Ejecución de la Comisión 2011/717/UE, de 27 de octubre de 2011, que designa los Laboratorios Nacionales de Referencia para la detección de residuos en animales vivos y sus productos.

Además, también 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.

Por otra parte, 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”*, destaca el papel que tienen los LNR en el proceso de acreditación de los laboratorios de control oficial, ya que ENAC considerará adecuadas las decisiones, prácticas y procedimientos de ensayo utilizados por los laboratorios que realizan el control oficial que sigan las instrucciones, directrices, recomendaciones o documentos publicados por el correspondiente LNR de cualquier Estado Miembro o del Laboratorio de la Unión Europea (EU-RL) respectivo, además los LNR facilitarán, en lo posible, la disponibilidad de materiales de referencia, organizarán ensayos intercomparativos y colaborarán en la formación adecuada del personal técnico responsable del control analítico oficial.

Por todo lo anterior, el LAA, publica este Documento, acordado previamente el Grupo de Trabajo anteriormente citado, para que pueda servir de orientación para los laboratorios que realizan el análisis de contaminantes metálicos en alimentos, piensos y sus materias primas.

2. Objeto

Este protocolo describe las instrucciones necesarias para la preparación previa de las muestras de alimentos, piensos y sus materias primas cuando se vayan a analizar contaminantes metálicos.

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 contaminantes metálicos.

4. Desarrollo

4.1 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 capaces de moler a un tamaño de partícula de 1mm o inferior, como un molino de cuchilla o equivalente
- Tamiz de tamaño de malla 0,5 o inferior mm.

En general, se aconseja utilizar molinos o mezcladores con cuchillas de materiales que no aporten contaminación de los elementos que se van a analizar. Para el análisis de concentraciones bajas de Fe, Cr, Ni, Mo y Mn, puede ser necesario utilizar equipos con cuchillas de titanio o cerámica.

4.2 Reactivos

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

4.3. Procedimiento

4.3.1 Preparación inicial

Alimentos: 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 patatas lavadas se secan con un paño y se pelan. Las frutas que no se consumen con piel, por ejemplo calabaza y melón, se pelan sin lavarse y se quitan las semillas. 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 (p.ej. calamares en salsa americana, con tomate, en tinta, etc.).

En aquellos alimentos en los que la salsa o el líquido de gobierno estén destinados al consumo, como por ejemplo, en el caso de salsa comestibles, se homogeneizará el contenido entero de la lata o envase.

En el caso de líquidos de gobierno no comestibles o de pescados conservados en aceite, 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 (p.ej. melocotones en almíbar, etc.) se incluye el líquido de gobierno.

- Salazones y ahumados

Se dividen en tres grupos:

- Productos secos-salados y salazones (p. ej. bacalao seco, arenques, anchoas en salmuera, 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.

- Productos desecados (p.ej. 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 homogeneiza.

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. Una vez escurrida se procede 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. Si el tamaño del cefalópodo es muy pequeño, como p.ej. chopitos, se trituran enteros, tal y como se consumen. 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 (p.ej. gambas, percebes, cigalas...)

Si la muestra se recibe congelada, proceder como con los Pescados y los Cefalópodos, a su descongelación no forzada (temperatura ambiente y/o refrigeración). Una vez totalmente descongelada, se eliminan caparazones u otras partes del exoesqueleto y tracto digestivo. 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 crustáceos similares (Brachyura y Anomura), se tomará exclusivamente la carne blanca de los apéndices.

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

- Bivalvos

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 en las siguientes excepciones:

Siguiendo las indicaciones del Reglamento (UE) N° 488/2014, en el caso de *Pecten maximus* (vieiras), el contenido máximo se aplica sólo al músculo abductor y las gónadas.

- Gasterópodos (p.ej. caracoles marinos, lapas, etc.)

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 (excepto si es un revestimiento comestible) por el procedimiento de molienda.

- Setas deshidratadas

Las muestras serán molturadas tal y como se reciben. En caso que se necesite el factor de hidratación para la expresión del resultado, se pesarán entre 5-10 g de muestra desecada (sin triturar), se sumergen en agua caliente recién hervida, durante unas dos horas (sin tapar). Posteriormente, se escurren durante 3 minutos a temperatura ambiente sobre un tamiz de 3 mm de malla. Una vez escurrida se pesa y se calcula el factor de hidratación (equivalencia entre seta desecada e hidratada).

- Piensos

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

El Reglamento (UE) N° 691/2013, de la Comisión de 19 de julio de 2013, que modifica el Reglamento (CE) N° 152/2009, en cuanto a los métodos de muestreo y análisis, indica que la cantidad de muestra que llega al laboratorio no debe ser inferior a:

- Piensos sólidos: 500 g.
- Piensos líquidos: 500 mL.

Para asegurar que la muestra analizada sea representativa, se recomienda que, tras homogeneizar la muestra final que llega al laboratorio, se muele una cantidad de al menos 100 g.

- Vinos

Las muestras de vino se deben 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, durante aproximadamente 30 minutos.

- Zumos y bebidas refrescantes

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

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

Se toma una parte representativa de la muestra, preparada según los procedimientos descritos anteriormente y se somete, dependiendo de la naturaleza del producto, a distintos procesos de molienda. Si bien es cierto, que actualmente se comercializan diversos tipos de molinos y picadoras de laboratorio de diferentes potencias capaces de triturar diferentes tipos de productos, se describen a continuación de forma general los que podrían ser usados:

- Productos duros (p.ej. café, té, arroz, legumbres, etc.) se muelen en un molinillo de café.
- Productos menos duros (p.ej. 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 o picadora de cocina.

Para evitar la contaminación cruzada, se aconseja extremar la limpieza del molino y desechar la primera parte molida de la muestra.

En productos duros y en piensos y sus materias primas, durante la operación de molienda, se recomienda ir añadiendo la muestra lentamente (p.ej. utilizando un molino con alimentador automático) para evitar el calentamiento.

En productos que contienen grasas o son muy heterogéneos, puede ser necesario homogeneizarlos sometiéndolos a un proceso de liofilización. Para ello, 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 . En las muestras liofilizadas, se debe comprobar que durante el proceso no hay pérdida de elementos volátiles, como el mercurio. Moler después de liofilizar. En los productos fácilmente homogeneizables en estado fresco no se requiere la liofilización.

En piensos y sus materias primas, la molienda, la mezcla y el tamizado deberán efectuarse lo más rápidamente posible, a fin de minimizar la exposición de la muestra al aire y la luz. No se emplearán molinos ni molidoras que puedan calentar perceptiblemente la muestra. Para los piensos especialmente sensibles al calor se recomienda la molienda manual. Deberá cuidarse también de que el propio instrumental no sea fuente de contaminación.

En piensos y sus materias primas, se deberá moler la muestra en partículas que al menos el 50% pasen por un tamiz de malla de 0,5 mm y no dejen más de un 10% de desecho en un tamiz con malla redonda de 1 mm.

Se aconseja que los piensos que se reciban en el laboratorio ya molidos se sometan igualmente a una molienda breve con el fin de garantizar su homogeneidad.

Piensos que pueden molerse tal como se presentan

Mezclar la muestra tamizada y recogerla en un recipiente limpio y seco adecuado, provisto de tapón hermético. Volver a mezclar para asegurar la completa homogeneización, inmediatamente antes de pesar la cantidad para análisis (alícuota de la prueba).

Piensos líquidos o semilíquidos

Colocar la muestra en un recipiente limpio y seco adecuado, provisto de tapón hermético. Volver a mezclar para asegurar la completa homogeneización, inmediatamente antes de pesar la cantidad para análisis (alícuota de la prueba).

Se recomienda que para los piensos o materias primas que consistan en granos duros (p.ej. maíz) o que se presenten en pellets se haga una trituración previa en una trituradora de cuchillas para reducir el tamaño de partícula y evitar el calentamiento en la molienda posterior.

En el Anexo I 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.

5. Conservación y almacenaje

Las muestras se deben almacenar de tal forma que no se produzcan cambios en su composición. En general, todos los productos perecederos, pueden conservarse en refrigeración si su análisis se inicia antes de 3 días, o bien, conservarse en congelación, si el periodo de almacenaje antes del análisis es mayor.

6. 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 materiales como plástico, titanio, cerámica o morteros de agar.

7. Bibliografía y 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 y sus posteriores modificaciones.

Reglamento (CE) N° 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 y sus posteriores modificaciones .

Reglamento (CE) N° 152/2009, de la Comisión, de 27 de enero de 2009 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de piensos y sus posteriores modificaciones.

Reglamento (CE) N° 691/2013, de la Comisión, de 19 de julio de 2013 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 152/2009 en cuanto a los métodos de muestreo y análisis y sus posteriores modificaciones.

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.

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 y sus posteriores modificaciones.

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 y sus posteriores modificaciones .

Norma UNE-EN 13804:2013 “Productos alimenticios. Determinación de elementos y sus especies químicas. Consideraciones generales y requisitos específicos.” y sus posteriores modificaciones.

Nota Técnica 55 de ENAC: “*Laboratorios de referencia en el sector agroalimentario: Política sobre participación en el sistema de acreditación*”

Listado de Laboratorios Nacionales de Referencia y de la Unión Europea 2014.

ANEXO I

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	Ver 4.3.1	Batidora de cocina
Zumos de fruta	Agitar	
Queso	Eliminar la corteza , excepto si es comestible	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 y homogeneizar	
Pescados	Limpiar, filetear	Picadora de cocina
Crustáceos	Pelar.	Picadora de cocina
Vegetales	Lavar, pelar, secar	Batidora de cocina
Frutos secos		Molinillo de café
Bebidas	Agitar y, en caso necesario, desgasificar en el ultrasonido	
Conservas	Ver punto 4.3.1.	Picadora de cocina Batidora

10 de abril de 2018