

**Egoitza Nagusia / Sede Central**

Txatxarramendi Ugarte z/g

E-48395 Sukarrieta - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

Parque Tecnológico de Bizkaia

Astondo bidea - Edificio 609

E-48160 Derio - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

Herrera Kaia - Portu aldea z/g

E-20110 Pasaia - Gipuzkoa (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

[www.azti.es](http://www.azti.es)

[info@azti.es](mailto:info@azti.es)



## *FRAUTEC*

*Desarrollo de metodologías específicas para detección fiable de fraudes alimentarios y desarrollo de proyectos*

*Informe Final 2013*

*para:*

*Dirección de Innovación y Desarrollo Tecnológico,  
Viceconsejería de Política e Industria Alimentaria,  
Dpto. Agricultura, Pesca y Alimentación , Eusko  
Jaurlaritza - Gobierno Vasco*

*Derio, 17 de FEBRERO de 2014*

**Tipo documento** Informe Final

**Título documento** Desarrollo de metodologías específicas para detección fiable de fraudes alimentarios y desarrollo de proyectos

**Fecha** 20/07/2015

**Proyecto** Desarrollo de metodologías específicas para detección fiable de fraudes alimentarios y desarrollo de proyectos

**Código** EC2009FRAUTEC

**Cliente** Dirección de Innovación y Desarrollo Tecnológico,  
Viceconsejería de Política e Industria Alimentaria, Dpto.  
Agricultura, Pesca y Alimentación , Eusko Jaurlaritzza -  
Gobierno Vasco

**Equipo de proyecto** Eduardo Saitua Saavedra  
Elisa Jimenez  
Alejandro Barranco

**Responsable proyecto** Eduardo Saitua Saavedra

---

**Revisado por** Kepa Escuredo

**Fecha**

---

**Aprobado por** Leire Barañano

**Fecha**

---

## ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	4
2	METODOLOGÍA.....	6
3	FASES POR LABORATORIO.....	10
4	RESULTADOS POR LABORATORIO.....	11
	4.1. TAREAS REALIZADAS LABORATORIO GENÉTICA (2013).....	11
	4.2. TAREAS REALIZADAS LABORATORIO FISICOQUÍMICA (2013).....	13
	4.2.1. Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sedimentos por cromatografía de Gases-Masas.....	13
	4.2.2. Ácidos orgánicos , azúcares y polioles.....	16
	4.2.3. Análisis de posibles contaminantes de auxiliares empleados en fabricación de distintas masas comestibles.....	17
	4.2.4. Campaña analítica dirección de Fraudes.....	26
	4.3. OBTENCIÓN DE PERFILES QUÍMICOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (2013).....	32
	4.3.1. Sidra.....	32
	4.3.2. Leche de vaca.....	34
	4.3.3. Vino.....	35
	4.3.4. Conclusiones.....	36
5	INTERÉS DEL PROYECTO.....	37
6	ACCIONES DE FORMACIÓN Y TRANSFERENCIA.....	37

# 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Durante varios años AZTI viene dedicando un esfuerzo en desarrollar métodos analíticos que den respuesta a su actividad tanto en el desarrollo de los proyectos de investigación así como de los servicios que oferta, entre ellos, los análisis que se realizan para el DAPA en sus campañas para la Dirección de Calidad Alimentaria.

## 1. Desde su experiencia en biología molecular:

Las tecnologías de autenticación de productos alimentarios se han centrado mayoritariamente en el análisis de marcadores genéticos de especie. Estos marcadores moleculares, mayoritariamente mitocondriales, son muy estables y almacenan mucha información en forma de polimorfismos que pueden ser analizados mediante metodologías basadas en el análisis del ADN. Por otro lado, este tipo de marcadores moleculares permite incluso obtener información de muestras muy degradadas, lo que sucede muy frecuentemente en muchos alimentos procesados, de donde se puede extraer ADN lo suficientemente íntegro y de calidad como para ser posteriormente analizado.

Este tipo de metodologías tienen varias aplicaciones: (i) por un lado permiten a la industria poder controlar sus materias primas, (ii) proveen de un sistema de control de su sistema de trazabilidad y finalmente (iii) de herramientas para poder controlar y erradicar el fraude que incide negativamente en la industria y en la sociedad.

## 2. Desde su experiencia en control analítico general:

La participación continua en temas de medio ambiente y alimentación nos exige disponer de herramientas potentes y fiables de cara a resolver los problemas analíticos que se nos presentan.

Desde AZTI-Tecnalia se vienen realizando controles analíticos de distintas agrupaciones de alimentos para la Dirección de Calidad Alimentaria y Control de Fraudes y este proyecto pretende cubrir estos trabajos que se realizan de modo periódico durante todo el año.

El laboratorio Físico-Químico sirve como herramienta para el desarrollo de los proyectos de AZTI, para ello nos vemos en la necesidad de controlar parámetros relacionados con el medio ambiente marino. Para este año desarrollaremos dos métodos analíticos que nos permitan analizar y cuantificar los hidrocarburos poliaromáticos en sedimentos. Una vez puestos en marcha asumiremos el trabajo de acreditarlos en ENAC.

**3. Desde la experiencia en analítica de alimentos empleando detectores de última generación:**

Evaluar la aplicabilidad de la espectrometría de masas para la obtención de perfiles químicos o "huellas" que permitan la discriminación de alimentos según su origen, naturaleza y/o composición.

## 2 METODOLOGÍA

### DESARROLLO DE SISTEMAS DE DETECCIÓN DE MEZCLAS DE INGREDIENTES EN ALIMENTOS

Los sistemas de detección de mezclas de especies en alimentos se van a llevar a cabo con dos metodologías:

#### **Sistemas de detección de PCR a Tiempo Real**

El análisis de secuencias de las bases de datos de AZTI, GeneBank, FISH BOL etc... se realizará mediante programas informáticos. Las sondas fluorescentes TaqMan se diseñarán utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems) y finalmente serán validadas en un sistema de PCR a Tiempo Real. Los sistemas de detección serán optimizados tras la evaluación de su especificidad y eficiencia con muestras dopadas en el laboratorio.

#### *Sistemas de detección de mezclas mediante PCR a Tiempo Real*

El análisis de secuencias de las bases de datos del GeneBank, así como las que se obtengan de referencias bibliográficas, se realizará mediante programas informáticos. Las sondas fluorescentes TaqMan se diseñarán utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems) y finalmente serán validadas en un sistema de PCR a Tiempo Real. Los sistemas de detección serán optimizados tras la evaluación de su especificidad y eficiencia con muestras dopadas en el laboratorio. Además se evaluarán diferentes métodos de extracción de ADN con el objetivo de minimizar la presencia de componentes inhibidores de la PCR que incluso puede intercalarse entre el ADN impidiendo su correcta amplificación.

La metodología a seguir, si bien cada grupo de parámetros tiene sus especificaciones concretas seguirá un guion general que básicamente consiste en:

## **DESARROLLO DE METODOS PARA ANALÍTICA DE ALIMENTOS, MEDIO AMBIENTE MARINO Y DESARROLLO DE OTROS PROYECTOS.**

- 1) Búsqueda bibliográfica de las distintas sustancias y métodos a poner en marcha con apoyo elemental del servicio de documentación de Agilent Technologies, España.
- 2) Estudio de adaptación y mejora de las técnicas existentes.
- 3) Desarrollo de las técnicas con aplicación a las matrices y medios demandados.
- 4) Validación de los métodos desarrollados.
- 5) Oferta de servicios analíticos al exterior por medio del servicio de marketing de AZTI-Tecnalia.
- 6) Responder a los servicios analíticos demandados desde el departamento, de modo y manera que los trabajos habituales que se realizan periódicamente pasen a este proyecto.

Los trabajos demandados habitualmente son de las inspecciones que se realizan desde la Dirección de Calidad Alimentaria.

## **OBTENCIÓN DE PERFILES QUÍMICOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

### **Material y reactivos**

A lo largo de este trabajo se han utilizado los reactivos necesarios para llevar a cabo los análisis cromatográficos planteados. En este sentido se han utilizado metanol (para LC-MS, Romil) y Agua Milli Q. Con el fin de ajustar el pH de la fase móvil se han utilizado como modificadores ácido fórmico (para trabajar en modo positivo) e hidróxido amónico (para trabajar en modo negativo). Todas las muestras fueron filtradas a través de filtros de PVDF de 0.2um antes de su inyección en el equipo de

LC-MS. Para el fraccionamiento de las muestras se han utilizado cartuchos C18 (500 mg, Varian).

## **Instrumentación**

Para la obtención de los espectros de masas se ha empleado una trampa de iones (Agilent XCT plus) con dos fuentes de ionización: electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI). Este detector ha permitido la obtención de los espectros de masas y está acoplado a un sistema cromatográfico Agilent 1100 Series que se compone de una bomba binaria, un inyector, un compartimento termostatzado para la columna y un detector de diodos. Todo ello controlado mediante el software Chemstation.

## **Métodos**

A lo largo de este trabajo se han analizado muestras comerciales de sidra, leche de vaca y vino. Para cada uno de los productos se han optimizado sus condiciones más adecuadas. De modo general el proceso seguido se ha compuesto de las siguientes fases:

- Obtención de espectros. Las muestras diluidas fueron inyectadas (100uL) en el sistema cromatográfico (flujo 0.4mL/min) sin columna. Este estudio se llevó a cabo tanto en modo positivo (fase móvil con 0.1% ácido fórmico, pH 3) como en modo negativo (0.1% hidróxido amónico, pH 9.75). Así mismo se utilizaron las dos fuentes de ionización disponibles: ESI y APCI. En cada caso se optimizaron las diferentes variables que influyen en la ionización (nebulización, voltaje del capilar, octopolos...).
- Fraccionamiento de las muestras. 1 mL de muestra se aplicó sobre los cartuchos C18. Se recogieron los siguientes eluidos de 1 mL: aplicación, 25% metanol, 50% metanol, 100 % metanol. Cada una de estas fracciones se diluyeron 1:10 y fueron analizadas siguiendo la metodología del punto anterior.



- Análisis de los resultados. Los espectros fueron comparados y analizados mediante el software Unscrambler (Camo).

### **3 FASES POR LABORATORIO**

#### **Biología molecular:**

Fase 1. Desarrollar innovadores sistemas de detección de mezclas en alimentos de interés para la industria alimentaria de la CAPV.

#### **Fisico-Química:**

Fase 1 Desarrollo de métodos analíticos

Hidrocarburos poliaromáticos en sedimentos

Ácidos orgánicos y azúcares en alimentos.

Análisis de contaminantes en diversos alimentos.

Fase 2 Realizar los servicios analíticos para el Departamento de Calidad Alimentaria.

Se realizarán todas las determinaciones recogidas por la legislación en las campañas que se establezcan; tales como conservas, bebidas, harinas.....). Además, se desarrollarán los métodos necesarios para mantenimiento y ampliación de la oferta analítica.

#### **Detectores:**

Fase 1 Obtención de perfiles químicos por espectrometría de masas

Obtención de resultados en distintas matrices (Sidra, Vino, Leche de vaca)

## 4 RESULTADOS POR LABORATORIO

### 4.1. TAREAS REALIZADAS LABORATORIO GENÉTICA (2013)

En AZTI se ha trabajado en el desarrollo de un sistema de autenticación de queso con D.O Idiazabal basado en el análisis de SNPs mediante PCR tiempo real. El sistema desarrollado permite evidenciar la presencia de material genético procedente de determinadas razas de oveja no autorizadas por el Consejo Regulador Idiazabal tales como Assaf, Awassi y Lacaune.

Los SNPs empleados para el análisis discriminante fueron seleccionados tras llevar a cabo un análisis de genotipado masivo de más de 54.000 SNPs en muestras de sangre de ovejas de las razas de interés, escogiendo aquellos que permitían la discriminación de material genético de ovejas de las razas mencionadas.

El análisis de los marcadores SNP se ha optimizado en un sistema de PCR a tiempo real empleando sondas Taqman fluorescentes específicas de alelo. El análisis de seis marcadores tipo SNP permite asegurar que la leche empleada en la fabricación de quesos con D.O. Idiazabal procede exclusivamente de ovejas de raza Latxa y Carranzana, y que se no hay presencia de leche procedente de las razas Assaf, Awassi o Lacona. Durante el año 2013 se ha tratado de reducir el volumen de cebadores y sondas empleados, así como los tiempos de análisis con el objetivo de reducir los costes totales de cada procesamiento.

Durante esta anualidad se ha elaborado el procedimiento de trabajo para llevar a cabo el análisis global desde la entrada de la muestra hasta la emisión del informe de resultados, con el objetivo de proceder a la transferencia de la metodología de autenticación al laboratorio de análisis rutinario de Biología Molecular de AZTI-Tecnalia.

Durante el año 2013 se han recopilado más de 300 muestras necesarias para llevar a cabo una validación exhaustiva en muestras reales de queso etiquetadas como Idiazabal, suministradas por el Consejo Regulador o procedentes de muestras en

puntos de venta al consumidor. La validación a llevar a cabo permitirá poder estimar el nivel de fraude real existente. Durante este periodo, se ha procedido a la extracción del DNA en estas muestras empleando el kit Invisorb (Invitex), así como a comprobación de la cantidad y calidad de los DNAs obtenidos mediante análisis en gel de agarosa y cuantificación en el sistema Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Asimismo, se han comenzado los análisis necesarios para determinar los niveles reales de sensibilidad y repetitividad, así como el umbral de detección.

En esta fase se ha llevado a cabo, junto al Consejo Regulador Denominación de Origen Idiazabal, el estudio de necesidades y costes necesario para poder proceder a la acreditación formal de la técnica en la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC).

Además, durante esta anualidad se ha participado en la jornada de difusión de la red AGRIPIR- Autenticidad de las producciones de montaña celebrada en Vitoria-Gasteiz el 17 de Octubre de 2013.

## 4.2. TAREAS REALIZADAS LABORATORIO FISICOQUÍMICA (2013)

### 4.2.1. Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sedimentos por cromatografía de Gases-Masas

#### 1.- OBJETO Y ALCANCE.

Método aplicable para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sedimentos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por impacto de electrones, en modo SIM (Monitorización de iones seleccionados).

Para las siguientes moléculas y sus respectivos rangos de medida:

Hidrocarburos poliaromáticos (PAHs)	Limite inferior µg/Kg
Fenantreno; CAS n° (85-01-8)	40
Antraceno; CAS n° (120-12-7)	40
Fluoranteno; CAS n° (206-44-0)	40
Pireno; CAS n° (129-00-0)	40
Benzo(a) antraceno; CAS n° (56-55-3)	40
Criseno; CAS n° (218-01-9)	40
Benzo (a) pireno; CAS n° (50-32-8)	40
Indeno (1,2,3-cd) pireno; CAS n° (193-39-5)	40
Benzo (g,h,i) perileno; CAS n° (191-24-2)	40

#### 2.- FUNDAMENTO.

Los PAHs presentes en los sedimentos son extraídos previa liofilización de la muestra, extracción del sedimento seco en un ASE (acelerador de extracción de

muestras), posterior purificación por GPC, eluidos y determinados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

### 3.- PROCEDIMIENTO DE ACTUACIÓN.

#### 3.1.- Preparación de las muestras.

Las muestras serán recibidas en el laboratorio en frascos de al menos 500 g de capacidad, estos serán de vidrio de color topáceo u otro tipo de material inerte que reserve a las muestras del efecto de la luz. Serán almacenadas un máximo de 15 días en nevera, previo al análisis, a una temperatura entre 1 a 5° C.

#### 3.2. Eliminación de la humedad:

Las muestras son congeladas, liofilizadas y tamizadas siguiendo procedimiento interno del laboratorio.

#### 3.3. Extracción:

En una celda del ASE se cierra la celda procurando que la rosca esté bien limpia. Colocamos la celda en el ASE y el vial de recolección en la misma posición que la celda. Cargamos el método de extracción.

Pasamos el contenido del vial de recogida a un tubo de evaporación limpiándolo con un pequeño volumen de diclorometano.

Separación de los componentes:

Se purifica el extracto en una GPC inyectando 2 ml de muestra a un flujo de 5 ml/min. recogiendo la fracción de los PAHs en un tubo de evaporación.

El extracto se evapora en un evaporador TurboVap en idénticas condiciones que antes. De aquí se pasa a vial y se inyectan en el cromatógrafo de gases (3.2.5.)

Los picos se identifican por su tiempo de retención y por la relación de las áreas del Ión Qualificador respecto a su Ión Target.

Los iones utilizados para la identificación son:

(PAHs)	Target	Qualificador
Fenantreno	178	176
Antraceno	178	176
Fluoranteno	202	200
Pireno	202	200
Benzo(a) antraceno	228	226
Criseno	228	226
Criseno deuterado	236	240
Benzo (a) pireno	252	253
Indeno (1,2,3-cd) pireno	276	278
Benzo (g,h,i) perileno	276	277

La elución de las especies sigue el orden de la tabla anterior.

Una vez inyectados los patrones se elige el cromatograma correspondiente al ión Target, se obtienen las rectas de calibrado de cada especie, para ello se obtienen las áreas correspondientes a cada concentración y se corrigen en relación al patrón interno del patrón S1.

Con las áreas corregidas se establecen las rectas de calibrado, representando concentraciones frente áreas.

### 3.4. Ácidos orgánicos , azúcares y polioles.

Determinación de azúcares solubles, polialcoholes y ácidos orgánicos en alimentos por CG/MS

Los glúcidos o también llamados azúcares, ácidos orgánicos y polioles son muy abundantes en la naturaleza, suele ser necesaria su determinación por cuestión de identificación de componentes y en muchas ocasiones por su utilización como ingredientes o aditivos utilizados en los productos elaborados para la alimentación.

Durante años se ha recurrido a métodos enzimáticos selectivos para determinar este tipo de sustancias, pero para la gran cantidad de componentes que hay nos vemos necesitados en agrupar estas familias de moléculas y analizarlas en su conjunto.

La resolución de este problema es una herramienta importante para la detección de fraudes con la identificación y cuantificación de estas sustancias en los alimentos, por lo que en AZTI desarrollamos este método.

Los azúcares, ácidos orgánicos y polioles son moléculas hidrosolubles, fuertemente polares y no volátiles, debido a que no son separados con facilidad por los métodos de rutina disponibles, recurrimos a la derivatización de estas moléculas para favorecer sus condiciones de separación en un método instrumental como la cromatografía GC/MS. Estos monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polialcoholes y ácidos orgánicos, son derivatizados a sus oximas y posteriormente a sus derivados trimetilsililados.

Las moléculas a determinar son las siguientes:

Ácido oxálico, ácido succínico, Ácido fumárico, Ácido láctico, Ácido Málico, Ácido tartárico, ácido quínico, Ácido cítrico, Ácido ascórbico, Sorbitol, Fructosa, galactosa, Glucosa, Ácido galacturónico, sacarosa, Lactosa, Maltosa, Rafinosa.

Se derivatizan muestras y patrones y a partir de aquí vamos a su determinación por cromatografía de Gases-Masas.

Cromatografía de las muestras:

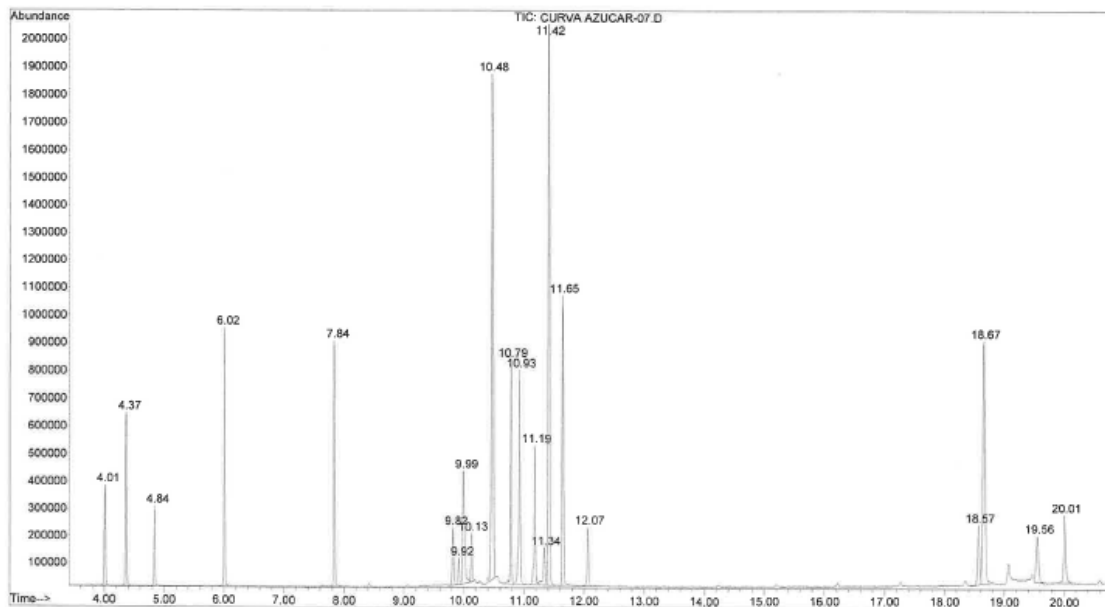
El equipo utilizado ha sido Cromatografo GC modelo 6890 Series GC series AGILENT con un detector de masas modelo 5873 Network AGILENT

Cromatograma:



Aparecen 3 zonas 1<sup>a</sup> ácidos orgánicos, 2<sup>a</sup> azúcares monosacáridos 3 trisacáridos

```
File       : C:\MSDCHEM\1\DATA\AZUCARES\CURVA AZUCAR-07.D
Operator  : EL VOLCAN DE MENDOZA
Acquired  : 4 Nov 2013 20:43      using AcqMethod AZUCARES.M
Instrument : Instrument #1
Sample Name: Patrón 7
Misc Info : 500 ppm
Vial Number: 7
```



### 3.5. Análisis de posibles contaminantes de auxiliares empleados en fabricación de distintas masas comestibles

El objeto es determinar si un líquido térmico refrigerante y una sustancia lubricante habían podido incorporarse en la fabricación de dos tipos de producto, Para ello, tomamos muestras con el posible problema y los posibles líquidos contaminantes.

Muestras:

Las muestras a ensayar son:

Muestra 1; Masa panadera.

Muestra 2; Masa panadera.

Muestra 3: Crema pastelera.

Muestra 4: Crema pastelera

Muestra 5: Líquido refrigerante, denominado Glicol.

Muestra 6: Aceite lubricante, derivado de olefinas.

## POSIBLE PRESENCIA DE GLICOL:

Queríamos detectar la presencia de este alcohol en las masas por lo que inicialmente se probaron distintas formas de extracción para poder posteriormente analizar el producto mediante Cromatografía de Gases. Destilaciones directas, otras por arrastre de vapor y por arrastre de N<sub>2</sub>.

Finalmente la mejor extracción obtenida fue mediante una dispersión con agua destilada caliente y varias filtraciones, la última por medio de filtros inertes de 0,2 µm, así se consiguieron muestras suficientemente clarificadas para llevar a cabo el análisis.

La técnica empleada ha sido la Cromatografía de Gases-FID.

La columna empleada ha sido una especial para alcoholes TR-Meta-WAX de 30 m, 0,25 mm. 0,5 µm. de la casa Teknokroma.

Se ha preparado una muestra del 2 % del líquido refrigerante, con ello se ha conseguido determinar una sustancia mayoritaria con tiempo de retención 10,70.

Posteriormente se ha contaminado una muestra de masa panadera con cantidades de 2 %, 0,5 %, y 0,1 %. Realizadas las extracciones observamos que el pico de 10,70 estaba presente en las muestras y sus áreas eran lineales versus las contaminaciones realizadas.

Finalmente se han contaminado las muestras a analizar con una cantidad de 0,1 % del refrigerante, analizándose las muestras contaminadas y sin contaminar.

Los resultados obtenidos se basan en los cromatogramas, que pueden observarse en los anexos.

## POSIBLE PRESENCIA DE DERIVADOS OLEFÍNICOS:

Según vimos por la ficha técnica el lubricante es el resultado de un monómero de olefina polimerizado linealmente, obteniéndose unas cadenas carbonadas que las hemos intentado analizar.

Lo hemos tratado como una grasa y lo hemos separado en distintos tamaños moleculares mediante permeación sobre gel. Posteriormente lo hemos llevado a un Cromatógrafo Gases-Masas, de tal manera que hemos elegido un pico mayoritario extraño a las grasas naturales, este pico lo hemos tomado como pico señal y hemos tratado de ver su presencia en las muestras a analizar.

La columna de cromatografía utilizada ha sido una Meta-X% de 30 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ . En el minuto 30,67 hemos encontrado un pico correspondiente a una cadena carbonada de peso molecular 342. Aparte, hemos extraído las grasas de los dos productos mediante el método de Bligh Dyer. A continuación hemos contaminado parte de la grasa obtenida con el lubricante.

Hemos hecho una separación de fracciones por permeación sobre Gel a las grasas obtenidas y contaminadas por nosotros. La fracción dónde se encuentra el pico señal, que hemos indicado anteriormente, lo hemos inyectado en el cromatografo de Gases-Masas. Los cromatogramas se muestran a continuación. Los dos primeros cromatogramas corresponden: el primero a las muestras panadera, el segundo al de la crema pastelera, el tercero a la muestra contaminada y el cuarto a una dilución del patrón.

Con este tipo de aplicación podemos determinar contaminaciones de hasta 20 mg/Kg.

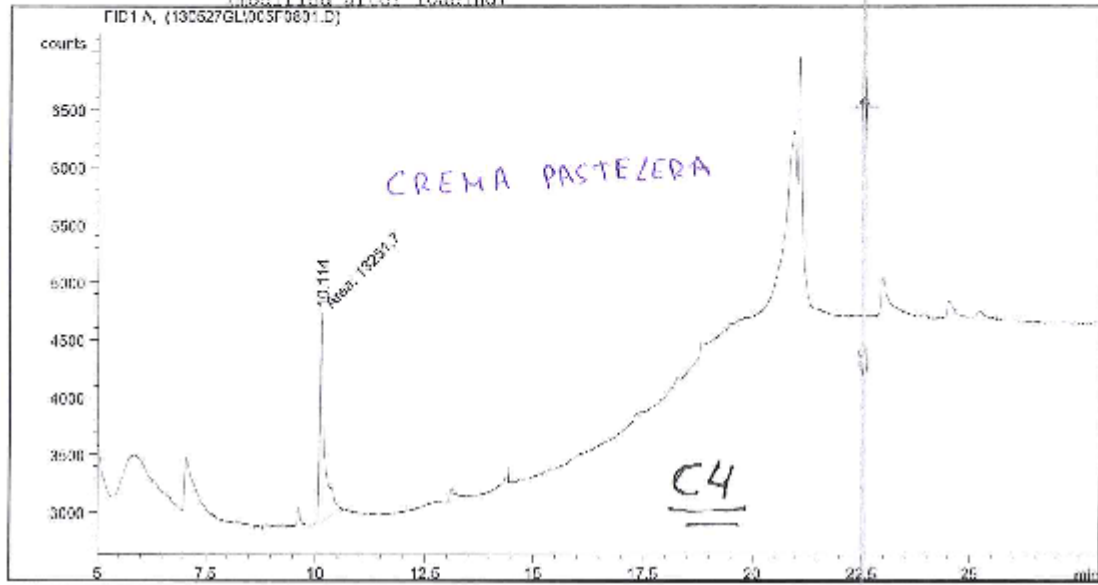
Cromatogramas de las muestras analizadas: C1 Cromatograma de crema pastelera sin contaminar. C2 Cromatograma de crema pastelera contaminada con 0,1 % de refrigerante.

Data File: C:\NFCHEM\2\DATA\130527GL005F0801.D

Sample Name: crema 3

```

=====
Injection Date : 5/27/2013 4:36:11 PM          Seq. Line :    8
Sample Name   : crema 3                        Location  : vial 5
Acc. Operator : EDUARDO                       Int       :    1
App. Instrument : L.GC.002                    Inj Volume: 2 µl
Different Inj Volume from Sequence !          Actual Inj Volume : 3 µl
App. Method   : C:\NFCHEM\2\MSDCHEM\MSDCHEM.M
Last changed  : 5/23/2013 5:05:52 PM by EDUARDO
Analysis Method : C:\NFCHEM\2\MSDCHEM\MSDCHEM.M
Last changed  : 5/28/2013 10:07:25 AM by EDUARDO
(modified after loading)
=====
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 A,

Peak	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [counts*s]	Height [counts]	Area %
1	10.114	MM	0.1196	1.32517e4	1846.70879	1.000e2

Totals : 1.32517e4 1846.70879

Results obtained with enhanced integrator!

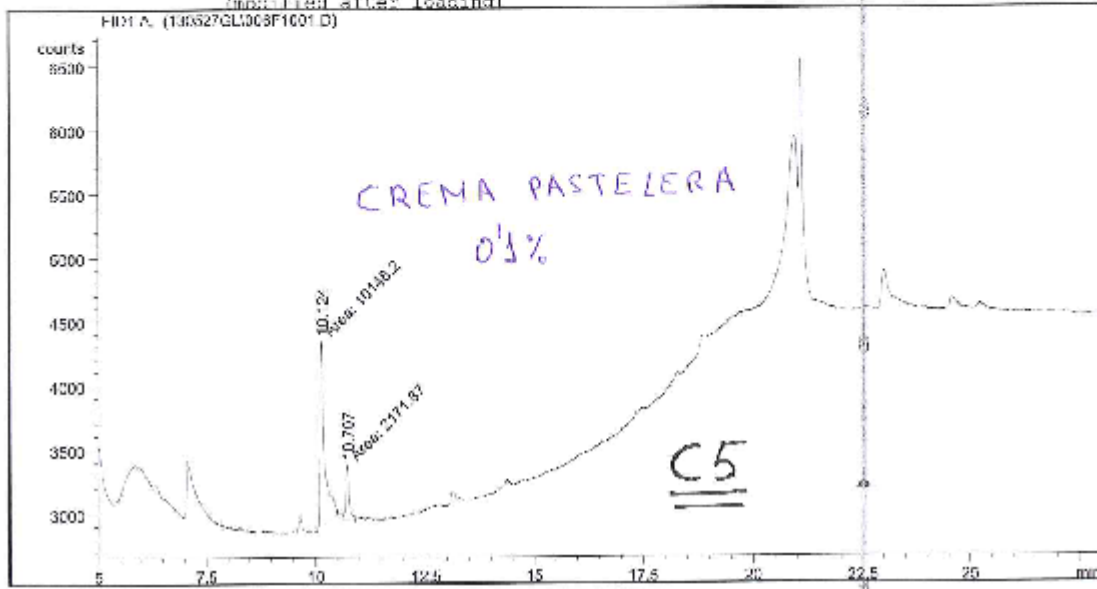
\*\*\* End of Report \*\*\*

Data File C:\MSDCHEM\2\DATA\130527GL\003F1001.D

Sample Name: cre. 3% cont.0,1

```

-----
Injection Date : 5/27/2013 5:42:41 PM          Sec. Line : 10
Sample Name    : cre. 3% cont.0,1              Location  : Vial 6
Acc. Operator  : EDUARDO                       Inj      : 1
Acc. Instrument: L.GC.002                      Inj Volume: 2 ul
Different Inj Volume from Sequence!          Actual Inj Volume: 3 ul
Acc. Method    : C:\MSDCHEM\2\METHODS\MSC003GL.M
Last changed   : 5/27/2013 5:05:52 PM by EDUARDO
Analysis Method: C:\MSDCHEM\2\METHODS\MSC003GL.M
Last changed   : 5/28/2013 10:07:25 AM by EDUARDO
              (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	10.124	MM	0.1155	1.01482e4	1464.30920	82.39126
2	10.707	MM	0.0852	2171.86914	424.72829	17.62874

Totals : 1.23200e4 1889.03849

Results obtained with enhanced integrator!

\*\*\* End of Report \*\*\*

L.GC.002 5/28/2013 10:14:40 AM EDUARDO

Page 1 of 1

### 3.6. – CAMPAÑAS ANALITICAS DIRECCIÓN CALIDAD ALIEMTARIA 2013.

Se han realizado las siguientes analíticas de las diferentes campañas para la Dirección de Seguridad Alimentaria:

#### **Campaña-producto: Salsas de mesa**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
pH	Electrodo de vidrio
Acidez	Valoración ácido base
Cloruro Sódico	Volhard
° Brix	Refractómetro
Extracto etéreo (éter etílico)	Soxhlet
Sorbico y Benzoico	HPLC

#### **Campaña-producto: Aguas envasadas.**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
Residuo seco	Gravimétrico 110°
pH	E. vidrio
Conductividad	Conductivímetro
Bicarbonato	Valoración ácido-base

## Campaña-producto: Aceites de Oliva y Girasol

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes para cada tipo de aceite.

OLIVA	Método
Grado de acidez	Reglamento CEE 2568/91 Anexo I
Índice de peróxidos	Reglamento CEE 2568/91 Anexo III
Espectrofotometría	Reglamento CEE 2568/91 Anexo IX
Composición ácidos grasos	Reglamento CEE 2568/91 Anexo X
Esteroles: Eritrodiol + Uvaol	Reglamento CEE 2568/91 Anexo VI
Estigmastadienos	Reglamento CE 2568/91 Anexo XII
Ceras Alifáticas por C.G.	Reglamento CE 2568/91 Anexo IV
Esteres Alquílicos de ácidos grasos metílicos y etílicos	Reglamento CE 2568/91 Anexo XX
A. Organoléptico	Reglamento CE 2568/91 Anexo XII (CE 640/08)

GIRASOL	Método
Grado de acidez	Reglamento CEE 2568/91 Anexo I
Índice de peróxidos	Reglamento CEE 2568/91 Anexo III
Espectrofotometría	Reglamento CEE 2568/91 Anexo IX
Composición ácidos grasos	Reglamento CEE 2568/91 Anexo X
Esteroles: Eritrodiol + Uvaol	Reglamento CEE 2568/91 Anexo VI
Esteres Alquílicos de ácidos grasos metílicos y etílicos	Reglamento CE 2568/91 Anexo XX
Hidrocarburos alifáticos	C Gases-Masas



### **Campaña-producto: Legumbres**

Parámetros: Humedad, materias extrañas, calibre inferior al mínimo. Identificación varietal\*, Genética.

\*Este análisis de identificación de especie se ha subcontratado a NEIKER-Tecnalia.

### **Campaña-producto: Confituras**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
Grado Brix	Refractométrico
SO <sub>2</sub>	Monier- Willians
Sorbico y sorbatos	HPLC
Benzoico y benzoatos	HPLC

### **Campaña-producto: Productos cárnicos, Chorizos (dos campañas).**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
Humedad	Gravimetría MALB31
Proteína	Proteína en cárnicos MALB22
Grasa	Materia grasa en cárnicos MALB32
Hidratos de carbono	Luff Choorl
Almidón	Cualitativo, solución Iodo-Iodurada

Hidroxiprolina	Espectrofotométrico
Fósforo	Espectrofotométrico
Nitratos y nitritos	HPLC
Presencia de especies animales	P.C.R.
Presencia de proteínas vegetales (soja)	P.C.R.

### **Campaña-producto: Pan y panes especiales**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
Humedad	Gravimétrico
Cenizas totales S. Seca.	Gravimetría
Grasa	Digestión ácida, Gravimetría
Ácido ascórbico	Enzimático
Proteínas	Kjendhal
Fibra alimentaria insoluble	Gravimetría, Digestión detergente neutro
Almidón	Espectrofotometría Antrona
Azúcar	Luff Schrooll

### **Campaña-producto: Conservas y semiconservas**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
Peso neto	Gravimétrico
Peso escurrido (Sobre líquido gobierno)	R.D.1521/84 (B.O.E. 22-8-84)
Ácidos grasos (Sobre líquido gobierno)	Reglamento CEE 2568/91 Anexo X
Esteroles, Eritrodiol + Uvaol (Sobre líquido gobierno)	Reglamento CEE 2568/91 Anexo VI
SO <sub>2</sub>	Monier-Willians

### **Campaña-producto: Cafés y aperitivos**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

CAFÉS	Método
Humedad	Método recomendado por C.I.C.C.
Ceniza	Método recomendado por C.I.C.C.
Cafeína	H.P.L.C
Sólidos solubles del extracto acuoso	Método recomendado por C.I.C.C.

Parámetro SNAC	Producto	Método
Humedad	Aperitivo	Gravimétrico
ClNa	Aperitivo	Volhard

## Campaña-producto: Alcoholes y cervezas

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro ALCOHOLES	Método
Grado alcohólico	Destilación aerometria; AOAC.Edición 190-9015-9
Metanol	Reglamento CEE 2568/91 Anexo IX
Impurezas volátiles Esteres, Aldehidos, y Alcoholes superiores	Cromatografía Gases-FID
Furfural	Espectrofotometría
Ácidos	Destilacion-valoración
Azúcares	Inversión V.Oxido-reducción

Parámetro CERVEZAS	Método
Grado alcohólico	Destilación. Picnometria
Acidez total (exp. en ac.Láctico)	Valoración
Glicerina	Cromatografía de gases-Masas
Acido Fosfórico (exp. en P2O5)	Espectrofotométrico
Anhídrido sulfuroso total	Espectrofotometria DTNB
Cenizas	Gravimétrico
Extracto seco primitivo	Fórmula Balling
pH	Potenciométrico
Hidratos de Carbono	American Society of Brewing Chemist. Beer. Method. 6-D

### **Campaña-producto: Condimentos y especias**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
Humedad	Gravimétrico
Cenizas totales	Gravimetría 600° C
Cenizas insolubles CLH	Gravimetría previa sol..CLH 10 %
Extracto etéreo	Soxhlet
Fibra bruta	Digestión ácido base, gravimetría
Nitratos	HPLC
Nitritos	HPLC

### **Campaña-producto: Turrónes y polvorones**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
Humedad	Gravimétrico
Cenizas totales	Gravimétrico
Grasa	Digestión ácida Soxhlet
Proteína	Kjendhal
Almidón	Espectrofotométrico

### **Campaña-producto: Bacalao salado**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes

Parámetro	Método
Humedad	Gravimetría
Cloruro sódico	Volhard

\*Se subcontratan los análisis de identificación de especie a ANFACO.

### **Campaña-producto: Mieles**

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
Sólidos.insolubles en agua	Gravimétrico
Humedad	Índice de refracción
Conductividad. eléctrica	Conductivímetro
Glucosa	Test enzimático
Fructosa	Test enzimático
Sacarosa	Test enzimático
Hidroximetilfurfural	Espectrofotométrico
Acidez libre	Valoración
Índice diastásico	Espectrofotométrico
Análisis Melisopalinólogo	Polínico dominante

\*Se subcontratan los análisis de identificación de polen a APINEVADA.

## Campaña-producto: Conservas vegetales

Analizados los siguientes parámetros con sus métodos correspondientes.

Parámetro	Método
pH	E- Vidrio
SO <sub>2</sub>	Monier Willians
Ácido ascorbico	C. Gases-Masas
Ácido cítrico	C. Gases-Masas
Ácido sórbico	HPLC
Ácido benzoico	HPLC
Cloruro sódico	Volhard
Acidez libre	Valoración

## 4.1. OBTENCIÓN DE PERFILES QUÍMICOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (2013)

Los resultados obtenidos a lo largo del 2013 se presentan a continuación divididos en las diferentes matrices analizadas: sidra, leche y vino.

### 4.1.1 Sidra

A la luz de los resultados obtenidos en el 2012 se pudo concluir que la fuente APCI proporciona un mayor número de iones que facilitaría la elaboración de un modelo más robusto. En este sentido y después de realizar el fraccionamiento con cartuchos de C18 de las muestras de sidra se ha empleado la fuente APCI para la obtención de los espectros. El análisis de las muestras ha permitido establecer una lista de iones para ser utilizados para elaborar el modelo. Teniendo en cuenta la alta variabilidad observada en los espectros de las diferentes muestras, para llevar a cabo una primera selección de los iones objetivo, únicamente se escogieron aquellos que superaban el 10% de intensidad relativa. En la siguiente tabla se muestran los iones mayoritarios encontrados en modo negativo.

**Tabla 1.** Iones observados en las fracciones analizadas con una intensidad mayor al 10%. Fuente APCI, modo negativo

	m/z	Aplicación	25% MeOH	50% MeOH	100% MeOH
1	89.1	40.9	52.9		
2	175	5.2	12.4		
3	179.1		15.3		
4	181	31.9	72.5		
5	255.2	0.9	46	57.1	57.7
6	256.2			10	9.8
7	269.1	21.8	20		
8	271.1	100	100		
9	271.9	11.3			
10	283.1	1.5	96.6	100	100
11	284.1		17.3	21.1	18.3
12	293.1	3	11.4	2.2	4.8
13	343.1	5.3	14		



	<b>m/z</b>	<b>Aplicación</b>	<b>25% MeOH</b>	<b>50% MeOH</b>	<b>100% MeOH</b>
14	357.1	12.4	24.5		
15	362.1	0.4	21.6	15.2	13.4
16	390.2	0.6	39.1	24.6	23.4
17	391.2		10.2	7.2	6
18	403.1	13	25		
19	415.1	6.4	12		
20	417.1	1.1	11.5	0.7	0.8
21	431.1	5.2	11		
22	433.1	22.8	32.5		
23	437.2	2.2	29.4	1.1	
24	465.2	3	45.2		
25	466.2	0.6	11.3		
26	517.2			23.1	4.6
27	567.1			24	

En estas condiciones se han seleccionado 27 iones para los que, en algunos casos, se ha conseguido (mediante una búsqueda bibliográfica) proponer una estructura de la molécula.

El pico más intenso en las fracciones de aplicación y 25% de metanol se corresponde con un  $m/z$  271. En muchos estudios sobre polifenoles este ión es atribuido al naringenin, sin embargo esta sustancia no ha sido descrita en sidra. Por lo tanto, tiene que ser debido a otra molécula. Algunos iones para los que se han encontrado alguna referencia son: ácido cafeico ( $m/z$  179), conjugado de quercetin con una pentosa ( $m/z$  433) y phloretin-xylosylgluside ( $m/z$  567).

Los resultados obtenidos han mostrado una gran variabilidad que también es atribuible al instrumento de medida. Con el fin de minimizar estos errores se ha introducido un patrón interno y se ha seleccionado la lactosa ( $m/z$  341) ya que posee una masa intermedia y no aparece en la sidra. De esta manera se ha conseguido eliminar parte del ruido, pero se sigue observando una alta variabilidad. Para cumplir con el objetivo de elaborar un modelo, será necesario llevar a cabo un análisis de un mayor número de muestras- Además, habría que tener en cuenta que

la sidra puede cambiar en función de las condiciones climáticas de cada año, por lo que el modelo a establecer también deberá tenerlo en cuenta y seleccionar aquellos iones que mejor caractericen la sidra.

#### 4.1.2 Leche de vaca

Se ha seguido el mismo procedimiento con las muestras de leche de diferente origen. Como ya se vio el año pasado con la fuente APCI se han visto muchos iones a lo largo de todo el espectro. A modo de resumen, en la tabla 2 se muestran los iones más significativos encontrados en las muestras del 2013.

**Tabla 2.** Iones observados en las fracciones analizadas con una intensidad mayor al 10%. Fuente APCI, modo negativo

	m/z	Aplicación	0% MeOH	25% MeOH	50% MeOH	100% MeOH
1	284.2	0.3	2.9	11.6	26.4	23.4
2	377.6	25.3	23.4	0.0	0.0	1.2
3	439.4	11.9	5.7	0.0	0.0	0.0
4	467.6	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0
5	475.4	20.4	24.6	2.5	3.1	1.5
6	493.4	39.5	35.0	0.0	0.0	0.0
7	511.4	38.7	24.2	0.0	0.0	0.0
8	529.4	75.4	31.3	100.0	100.0	100.0
9	609.8	31.3	19.7	0.0	0.0	0.0
10	613.4	22.9	13.4	0.7	2.1	2.5
11	623.6	51.0	33.2	0.0	0.0	0.0
12	625.4	30.2	42.3	0.0	0.0	0.0
13	632.4	33.6	9.6	0.0	0.4	0.2
14	635.8	19.7	11.9	0.0	0.0	0.0
15	637.8	56.5	32.6	0.4	0.2	0.7
16	640.2	15.5	2.9	0.0	0.2	0.1
17	645.6	4.7	19.4	0.0	0.0	0.0
18	663.8	42.3	26.8	0.1	0.0	0.0
19	665.8	42.9	29.0	1.2	0.0	0.0
20	673.4	18.5	8.3	0.0	0.0	0.0
21	683.2	11.2	10.8	0.0	0.0	0.2
22	691.4	81.7	56.6	0.0	0.0	0.0

	m/z	Aplicación	0% MeOH	25% MeOH	50% MeOH	100% MeOH
23	693.6	21.1	15.3	2.4	0.1	0.0
24	697.8	12.8	4.1	2.7	1.1	1.4
25	699.4	38.4	17.5	1.3	1.3	1.3
26	701.6	61.2	17.8	0.0	0.0	0.5
27	714.6	15.5	11.4	2.3	0.9	1.8
28	719.8	19.5	15.9	0.7	0.0	0.0
29	721.8	21.4	15.9	0.5	0.1	0.2
30	742.6	50.9	6.7	1.0	0.8	0.7

Se han observado por APCI menor cantidad de iones y con una m/z diferente. La interpretación de estos espectros ha sido más compleja que en el caso de la sidra impidiendo proponer moléculas a excepción de la sialil lactosa ( $m/z$  632.4) y la propia lactosa ( $m/z$  341.2). Buscando estos iones en la bibliografía, muchos de ellos han sido identificados como oligosacáridos o derivados de ellos. Para poder confirmar esto sería necesario hacer una purificación mayor de la leche y así obtener un extracto más puro y un espectro más limpio de cada componente. Como la finalidad de esta tarea es llegar a un método capaz de discriminar entre leches de diferente naturaleza, se compararán los resultados observados con leche de vaca con otras de distinta naturaleza (oveja, cabra).

#### 4.1.3 Vino

En el caso del vino, los resultados han sido parecidos, es decir, han aparecido multitud de iones, fundamentalmente con la fuente ESI. Tal y como se vio en 2012, la fuente APCI proporcionó muy poca sensibilidad.

A modo de ejemplo en la tabla 3 se muestran los 16 iones que se han monitorizado en modo negativo, así como su intensidad relativa.

**Tabla 3.** Iones observados en las fracciones analizadas con una intensidad mayor al 10%. Fuente ESI, modo negativo.

	m/z	Aplicación	25% MeOH	50% MeOH	100% MeOH	100% MeOH-2
1	509.6	0.7	24.0	23.5	28.2	19
2	559.2	100.0	87.3	3.3	1.0	0
3	575.2	11.6	87.0	10.2	19.3	100
4	579.4	0.9	0.0	100.0	23.1	0
5	580.4	0.0	0.0	28.5	0.0	0
6	581.2	41.1	60.7	7.4	0.0	0
7	589.2	9.7	47.5	9.1	14.5	47
8	591.4	49.7	31.4	0.0	0.0	0
9	601.2	22.1	24.1	18.8	21.1	62
10	603.4	11.8	0.0	2.1	0.0	0
11	605.2	35.3	47.9	5.9	8.3	0
12	637.2	6.2	7.5	10.2	100.0	0
13	655.2	18.8	100.0	7.2	20.8	0
14	657.2	27.4	23.8	7.8	12.7	0
15	661.2	50.9	47.9	4.9	9.8	0
16	683.2	19.5	57.0	4.9	3.6	0

Algunos iones de esta tabla ya han sido mencionados en muestras vitivinícolas estando relacionados, entre otros, con derivados polímeros de procianidinas. Al igual que los casos anteriores (sidra y leche) los resultados han mostrado una alta variabilidad que hacen necesario el análisis de un mayor número de muestras con el fin de poder determinar una “huella molecular” adecuada.

#### 4.1.4 Conclusiones

- Se ha aplicado el equipo de espectrometría de masas para la recogida de espectros de tres alimentos de la CAPV: sidra, leche de vaca y vino.
- Se han conseguido identificar algunos de los iones mayoritarios presentes en las muestras analizadas.
- Es necesario analizar un mayor número de muestras para poder establecer una “huella molecular” de los productos bajo estudio.

## **4 INTERÉS DEL PROYECTO**

El principal interés del proyecto es el de desarrollar nuevas herramientas que permiten controlar la incidencia de fraudes en alimentos dentro de la CAPV. Para ello se van a desarrollar innovadores sistemas de identificación de mezclas y de nuevas especies de alimentos, fáciles de estandarizar y que finalmente beneficiará al sector en la CAPV. En definitiva, se podrá proteger los productos locales y luchar contra la sustitución fraudulenta de los mismos por estas nuevas especies provenientes de terceros países.

## **5 ACCIONES DE FORMACIÓN Y TRANSFERENCIA**

-Formación individualizada de los analistas de AZTI en las técnicas desarrolladas.