

VALIDACIÓ DE LA DETERMINACIÓ DE SUBSTÀNCIES REDUCTORES EXPRESSADES COM SO₂ EN PEIXOS I PRODUCTES DE LA PESCA PER TITULACIÓ IODOMÈTRICA



AGROLAB GROUP



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI
Facultat de Química



Sarai Gordillo Aguilera

Treball de fi de grau
Agrolab Ibèrica S.L.U.
Departament de Bromatologia-
Tutor acadèmic: Rosa Maria Solé
Tutor professional: David Rull Ferré
Responsable de la gestió de pràctiques: Araceli Sánchez
Data: 3/04/2018 - 23/05/2018

Índex

1	Objectiu	2
2	Introducció	2
3	Fonaments.....	3
3.1	Antecedents	3
3.2	Definicions.....	3
3.3	Criteris de qualitat	4
3.4	Principi del mètode.....	5
4	Part experimental.....	7
4.1	Reactius	7
4.2	Procediment experimental	8
4.2.1	Procediment en el procés de validació	8
4.3	Càlculs realitzats	14
4.3.1	Contingut de SO ₂	14
4.3.2	Paràmetres de qualitat de la validació	15
5	Resultats i discussió	16
6	Conclusions	18
7	Summary	18
8	Bibliografia.....	19
9	Annexos.....	20
9.1	Certificats	20
9.2	Full de càlcul	22
9.3	Determinació de SO ₂ exercici interlaboratori Abril 2018	23
9.4	Taules de la normativa del contingut de SO ₂ màxim permès	23
9.5	Ampliació de la validació	25

1 Objectiu

El present treball de fi de grau, té com a objectiu la validació de la determinació de substàncies reductores expressades com a sulfits (SO_2 ¹) en peixos i productes de la pesca², per establir els criteris d'acceptació en termes d'exactitud, precisió, i incertesa del mètode analític.

Aquests criteris són necessaris per tal de poder acreditar el mètode d'anàlisi en un futur.

2 Introducció

Aquest treball s'ha realitzat al departament de bromatologia de l'empresa Agrolab Ibèrica S.L.U. Aquesta empresa té dos centres de treball, un situat a Burgos³ i l'altre aquí a Tarragona⁴. El laboratori dona resposta a diferents àrees de treball:

- Medi ambient i sòls contaminants
- Anàlisi d'aigües
- Anàlisi d'aliments
- Anàlisi de pinsos i matèries primes

Tots ells organitzats en els departaments de mediambient, cromatografia, microbiologia i bromatologia.

Agrolab Ibèrica S.L.U. disposa del certificat d'acreditació per l'Entitat Nacional d'Acreditació (ENAC) d'assajos fisicoquímics i microbiològics de productes d'alimentació humana i animal. [1]

ENAC és una organització privada, independent i sense ànim de lucre que coordina un sistema d'acreditacions seguint unes normes establertes internacionalment.

Actualment Agrolab Ibèrica S.L.U. disposa d'acreditació de SO_2 en peixos i productes de la pesca en el CTBU. En el CTTA aquest paràmetre s'analitza sense acreditació. Donat a la demanda d'aquest anàlisi, l'empresa veu la necessitat de tenir-lo també acreditat al CTTA.

¹ D'ara en endavant SO_2

² PPP

³ D'ara en endavant CTBU

⁴ D'ara en endavant CTTA

3 Fonaments

3.1 Antecedents

Els sulfits o bé anomenats diòxid de sofre (SO_2), són conservants molt utilitzats en els aliments i és conegut pel seu ús sobretot en els vins. Això és degut a les propietats antioxidants i antibacterianes que donen.

S'afegeix SO_2 en una ampla varietat d'aliments, s'afegeix com additiu en peixos ja que la propietat antioxidativa, prevé el enfosquiment d'aquests, i la propietat antibacteriana prevé el desenvolupament de microorganismes en els peixos utilitzats al consum.

Es poden trobar en una multitud d'aliments, sobretot en conserves. Aquestes es denominen: diòxid de sofre (E220), sulfit de sodi (E221), sulfit àcid de sodi (E222), metabisulfit de sodi (E223), metabisulfit de potassi (E224), sulfit de calci (E25), sulfit càlcic (E226) sulfit àcid de calci (E227) y sulfit àcid de potassi (E228). [2]

No obstant, els sulfits no són només additius sinó que també es generen i es troben de manera natural en aliments que han passat processos de fermentació, on les bactèries oxiden el sofre que tenen. [3]

D'aquesta manera, és important la determinació de SO_2 en els productes alimentaris ja que la presència poden provocar a nivells elevats una mala acció gàstrica i intestinal, que poden ser perjudicials per a la salut. D'aquesta manera s'obliga al etiquetatge d'aquests en segons quins productes, com el vi, quan els nivells de SO_2 superen els 10 mg/Kg han d'informar de la presència d'aquests. [4, 5]

L'etiquetatge d'aquest producte en els aliments és necessari ja que un petit percentatge de la població pot provocar problemes d'intolerància i/o al·lèrgies.

3.2 Definicions

Segons el procediment de la validació del mètodes fisicoquímics s'han de tenir en compte tots aquells paràmetres necessaris per a la comprovació apropiada per complir les necessitats de la determinació de manera adequada.

➤ Validació

Confirmació mitjançant la realització de exercicis al laboratori del compliment dels requisits establerts per a l'ús específic previst per al qual es pretén dur a terme l'anàlisi/determinació.

➤ Exactitud

Grau de concordança entre els resultats d'un assaig i el valor de referència acceptat

➤ Precisió

Grau de concordança entre els resultats obtinguts al aplicar el procediment experimental repetides vegades sota les condicions establertes.

➤ Repetibilitat

Precisió sota les condicions on es fan mesures amb el mateix mètode, operador, instruments i durant un període de temps establert.

➤ Incertesa

Estimació que dona un interval de valors en els que situa el valor vertader de la magnitud mitjana.

➤ Límit de quantificació⁵

Concentració mínima en la qual es pot determinar de manera acceptable d'exactitud i precisió.

➤ Interval de treball

Concentració mínima i màxima en la que es pot obtenir una exactitud i precisió adequades de l'objectiu del mètode.

➤ Material de referència certificat⁶

Material en el qual els valors de les propietats estan certificats per un procediment establert amb una incertesa determinada i nivell de confiança al qual es dona el valor certificat.

➤ Patró

Sistema de mesura destinat a definir, conservar o reproduir uns valors de magnitud per a que serveixin de referència.

➤ Validació per addicions

Validació per repeticions amb addicions de substàncies pures sobre una matriu, a partir de materials de referència obtinguts mitjançant addicions de l'analit sobre matrius blanques o no blanques però de valor conegut.

3.3 Criteris de qualitat

Els criteris establerts per a la validació del mètode han sigut preestablerts amb el departament de qualitat del CTTA, tenint en compte el mètode validat al CTBU al 2014.

S'han establert els paràmetres a complir segons els rangs de la validació, descrits a la Taula 1 següent.

⁵ D'ara en endavant LQ

⁶ D'ara en endavant MRC

Taula 1. Criteris de qualitat

Rang a validar	mg/Kg SO ₂	Exactitud %
LQ	5	≤ 18
Rang mitjà ⁷	5 – 50	≤ 7
Rang alt ⁸	50 - 300	≤ 5

Aquests són els criteris previs establerts per a la validació, que es tindran en compte per poder determinar si el mètode pot ser acceptat o no, o per fer variacions i treure conclusions segons els resultats que s'obtinguin després de la repetició durant els dies establerts en el protocol de validació.

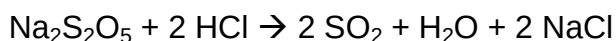
3.4 Principi del mètode

El principi del mètode és la determinació de SO₂ en aliments. Aquests s'utilitzen com a conservants, anomenats additius, que són substàncies que s'afegeixen per a modificar, conservar o afavorir les característiques dels aliments.

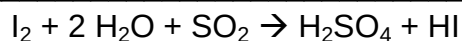
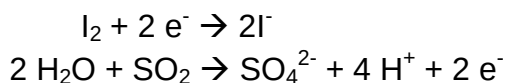
L'ús de sulfits en els aliments està regulat amb la finalitat de minimitzar els possibles efectes negatius que pot provocar a la salut. D'aquesta manera s'han desenvolupat mètodes per detectar la presència i la quantitat de sulfits en gran varietat d'aliments [6].

La determinació de SO₂ té una sèrie de reaccions per poder determinant-los.

La reacció global que té lloc en el procés de la determinació de SO₂ és la reacció del metabisulfit sòdic amb l'àcid clorhídric donant lloc al SO₂, aigua i la sal formada.



Tot i que la quantitat de sofre obtingut per determinar la seva quantitat es fa amb una titulació iodomètrica 0.1N en medi àcid afegint HCl al 37% per valorar . D'aquesta manera té lloc la reacció de oxidació – reducció següent:



⁷ D'ara en endavant RM

⁸ D'ara en endavant RA

D'aquesta manera afegint midó a la solució es pot observar quan el iode deixa de reaccionar amb el SO_2 lliure, i forma un complex el iode amb el midó de color blau, tenint en compte que quan apareix el color blau a la solució, vol dir que no hi ha més sofre a reaccionar i la reacció ha terminat. Així doncs, es calcula la quantitat de SO_2 que hi ha en la matriu valorada. El contingut de SO_2 és directament proporcional a àcid sulfúric generat.

Pel que fa al equip utilitzat en la determinació, és el que es mostra en la Figura 1. És un model Vapodest 45s de la marca Gerhardt.



Figura 1. Vapodest 45s

L'equip fa una destil·lació automàtica per mitjà d'un corrent de vapor que fa passar a través del tub del equip i que està en contacte amb la mostra a determinar. El destil·lat es recull en un cop refrigerat en un vas de precipitats amb NaOH 1N per evitar l'oxidació del SO_2 . Es recullen uns 200 mL de destil·lat que es valoren amb el iode de la manera detallada anteriorment.

Les condicions del programa guardats a l'equip, anomenat *M04-SULFITOS-SO2*, on hi ha detallat els paràmetres establerts de temps de destil·lació, aigua i del vapor que s'ha d'administrar per a completar la reacció es poden observar en la Taula 2:

Taula 2. Paràmetres del equip

Paràmetres del programa	CCTA
Addició H_2O	0mL
Addició NaOH	0mL
Temps de reacció	0mL
Temps de destil·lació	7min
Corrent de vapor	100%
Succió de la mostra	0%
Addició de H_3BO_3	0mL
Succió del recipient	manual
Valoració	manual
Càlculs	manual

A més, en aquest equip es disposa d'altres programes per a més determinacions fisicoquímiques que es fan al laboratori, com un programa de neteja, que s'ha d'utilitzar al acabar cada seguit d'anàlisi de mostres d'un mètode abans de passar a un altre mètode, per evitar interferències entre diferents determinacions.

4 Part experimental

4.1 Reactius

Els reactius utilitzats en la determinació són els següents, tenint en compte la seva manipulació apropiada amb els EPIs⁹ i la seva funció en el mètode.

- Metabisulfit sòdic [7]

Reactiu utilitzat per fer els patrons de les adicions en mostres blanques de peixos, per a les contaminacions a diferents concentracions de SO₂ prèviament calculades i preparades, per a la determinació del SO₂. Certificat al annex 9.1.

S'ha de tenir en compte que amb el contacte amb àcids pot alliberar gasos.

- Àcid clorhídric al 37% [8]

Obtingut comercialment per l'empresa. S'afegeix per convertir els sulfits en diòxid de sofre lliure i posteriorment a la destil·lació, per a l'acidificació del destil·lat previ a la titulació iodometria.

- Hidròxid sòdic 1N [9]

Obtingut comercialment per l'empresa. El SO₂ alliberat en el corrent de vapor que es recull en aquesta solució de NaOH per evitar l'oxidació d'aquest.

- Solució de iode 0,1N [10]

Obtingut comercialment per a la titulació iodomètrica del mètode. De la qual s'ha modificat la normalitat utilitzada pel CTBU per poder quantificar valors més baixos. Solució que donarà lloc a la formació del complex amb el indicador per al qual es veurà la coloració blava en acabar la valoració. Certificat al annex 9.1.

- Midó 0,5% [11]

Obtingut comercialment. Utilitzat com a indicador en la titulació iodomètrica, el midó en l'adsorció de iode amb la amilosa crea complexa que es de color blau.

- Aigua destil·lada grau HPLC

Obtinguda comercialment. S'utilitza aigua d'aquest grau ultrapur per a disminuir el LC del mètode i d'aquesta manera obtenir també menys quantitat de SO₂ en els blancs, per fer les addicions.

⁹ Equips de protecció individual

4.2 Procediment experimental

4.2.1 Procediment en el procés de validació

La validació es basa en el seguiment i l'adaptació del procediment normalitzat de treball¹⁰ de la validació al CTBU, tenint en compte la norma espanyola de la determinació de sulfits [6], per a realitzar-ho al CCTA amb el material i reactius disponibles i necessaris per a la validació del mètode.

Prèviament a la validació, es va crear un full de càlcul¹¹ amb les fórmules pertinents i amb les dades necessàries per al càlcul de la quantitat de SO₂ de les mostres posant únicament el valor gastat de iode en la titulació iodomètrica.

Juntament amb el departament de qualitat de l'empresa es va elaborar un protocol de validació, dividit en tres etapes, com es pot veure a la figura 2, per procedir a fer la validació de la manera més adient, i anar avaluant els resultats obtinguts en cada una d'elles, per anar definint o variant cada etapa següent.

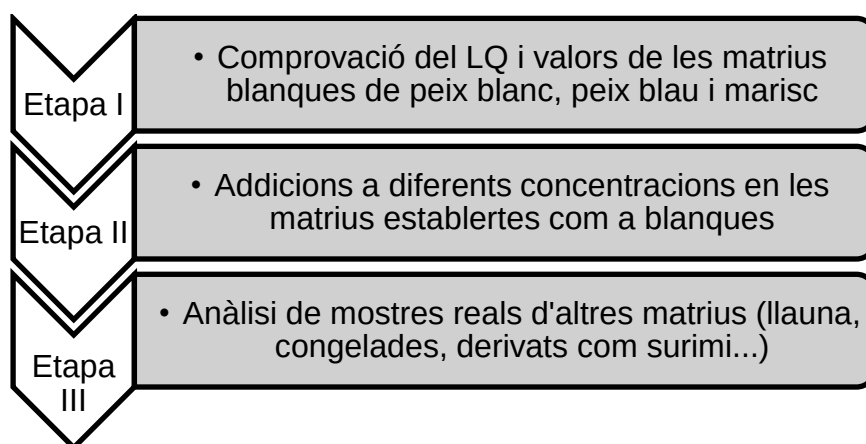


Figura 2. Etapes de validació

4.2.1.1 Etapa I

Etapa en la qual es fa la comprovació del LQ a 5 mg/Kg, per veure si es pot determinar i establir com a límit de quantificació. S'ha fet amb un patró preparat de metabisulfit sòdic amb aigua de grau HPLC.

Es fa la recerca de les matrius blanques en productes de peix i marisc fresc: com a peix blanc¹² un lluç, com a peix blau¹³ un verat i com a marisc¹⁴ una sípia.

¹⁰ D'ara en endavant PNT

¹¹ Annex apartat 9.2.

¹² D'ara en endavant PB

¹³ D'ara en endavant PA

¹⁴ D'ara en endavant MA

El protocol establert per verificar el LQ i les mostres considerades com a blanques es defineixen en la taula 3.

Taula 3. Anàlisi de l'etapa I

dies/repetició	1	2	3
LQ patró	X	X	X
PB blanc	X	X	X
PA blanc	X	X	X
MA blanc	X	X	X

Es verifica el valor de 5mg/Kg com a LQ, com els valors obtinguts són satisfactoris, es decideix baixar el LQ a 5mg/Kg ja que actualment al CTBU el té a 10 mg/Kg.

Les mostres trobades es va obtenir un contingut inferior a 3 mg/Kg de SO₂ i per tant es van considerar com a matrius blanques. Per tant, es va comprar la quantitat necessària per a tota la validació, i es va procedir a la seva divisió en 20 grams de mostra de la part comestible, per congelar i conservar de manera que s'utilitzarà durant tot el període de validació la mateixa mostra en les contaminacions.

4.2.1.2 Etapa II

A l'etapa II segons el protocol establert, es van realitzar les addicions de patró en els diferents rangs de concentració definits LQ, RM i RA (5mg/Kg, 50mg/Kg i 300mg/Kg respectivament) en les matrius indicades en la etapa anterior, durant 15 dies tal i com es pot observar a la taula 4.

També es va fer l'anàlisi d'un material de referència certificat¹⁵, tenint en compte que el proveïdor del MRC només entregava una mostra de 100 grams, per tant només es van fer quatre determinacions d'aquest.

El certificat del MRC es troba al annex 9.1.

Taula 4. Anàlisi de l'etapa II

dies/repetició	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
LQ patró	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PB blanc	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PA blanc	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MA blanc	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PB 5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PA 5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MA 5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PB 50	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PA 50	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MA 50	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PB 300	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PA 300	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MA 300	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MRC	X	X	X	X											

D'aquesta manera amb totes les dades obtingudes es va poder calcular l'exactitud, precisió i incertesa del mètode.

¹⁵ D'ara en endavant MRC

- Detall del procés experimental

Per a la determinació de SO_2 , primerament es van preparar patrons de la concentració indicada, dins del rang de la validació per a la contaminació de les mostres per addicions, com s'ha expressat anteriorment.

Al inici s'ha de treure les matrius del congelador i un cop descongelades, es pesen a cada tub de destil·lació Kjeldhal 20 grams de peix al qual s'afegeixen 20ml de patró amb una pipeta aforada de doble enràs i 100mL d'aigua del grau HPLC mesurats amb proveta. Hi ha tants tubs com peixos i patrons s'han d'analitzar. A més s'ha de preparar un tub pel blanc on només s'afegeix 100mL d'aigua HPLC i un del LC diari, que fa de verificació del mètode i dels patrons, on es pipetegen 20mL de patró i s'afegeix 100mL d'aigua HPLC.

A cada tub s'afegeixen 7ml d'àcid clorhídric de concentració del 37% i es posa a destil·lar amb el programa de SO_2 del aparell Vapodest 45s explicat al apartat 3.3. El destil·lat es recull en un vas de precipitat amb 20mL de NaOH 1N per evitar l'oxidació del SO_2 , aquest procés dura uns 7 minuts.

Un cop destil·lat, es treu el tub de manera acurada ja que crema pel corrent de vapor d'aigua al qual ha estat sotmès i al vas de precipitats on s'ha recollit el destil·lat s'afegeixen 5mL més de HCl al 37% per acidificar i fer la titulació iodomètrica per determinar el contingut de SO_2 . A aquest valor li restem el blanc, el qual es tracta com una mostra més, amb només aigua HPLC i els reactius.

A continuació es mostra en la figura 3 i 4 un esquema del procediment de l'etapa II amb els passos a seguir durant tot l'anàlisi descrit anteriorment.

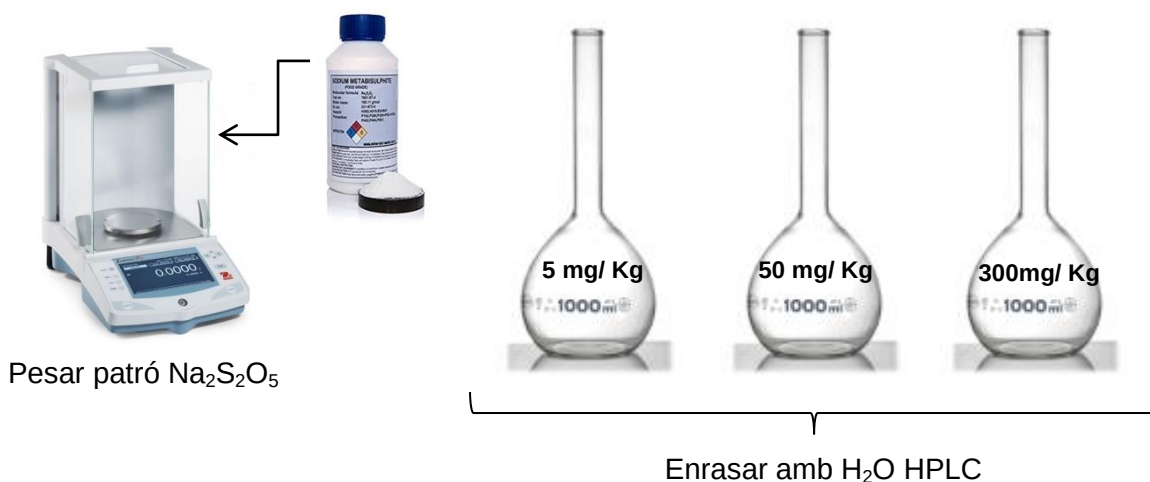


Figura 3. Esquema preparació de patrons

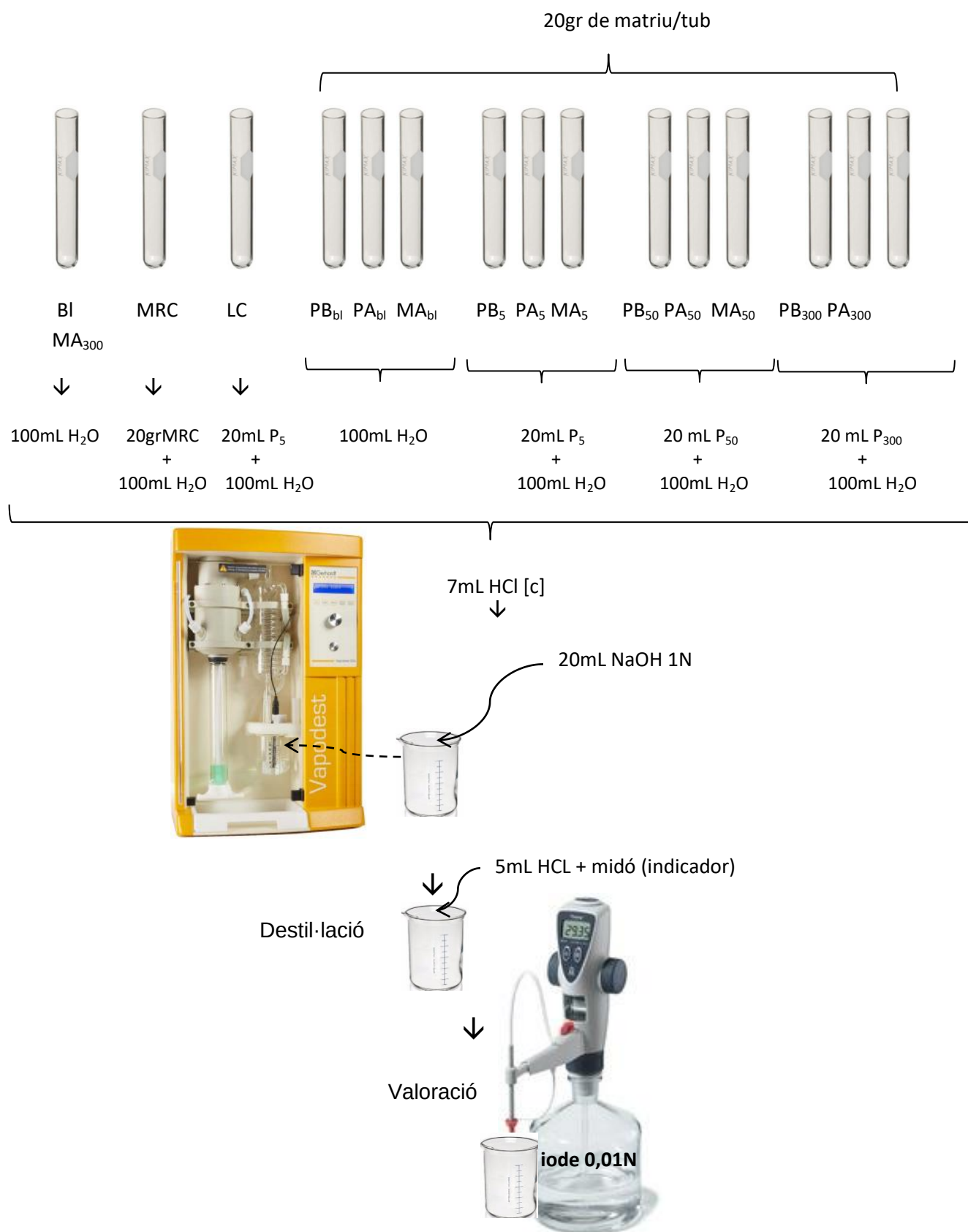


Figura 4. Esquema preparació d'addicions i de l'anàlisi

4.2.1.3 Etapa III

En l'etapa III es va plantejar fer una ampliació a altres matrius de derivats del peix per tal de completar tota la família de PPP, com peixos en conserva, congelats, derivats del peix com surimi o d'altre tipus. Fent la determinació de bacallà salat, tonyina en llauna, musclos en llauna, surimi congelat, escopinyes en llauna, gambes salades al buit i llagostins (amb closca i sense closca).

La recerca es basava en trobar matrius amb contingut de SO₂ en els tres rangs establerts (LC, RM, RA). Per fer aquesta recerca, s'ha tingut en compte les taules dels reglaments (Annexades en el apartat 9.2) ja que els valor màxims establerts donaven una idea de la quantitat de SO₂ que podrien tenir.

En les matrius analitzades es va obtenir valors al LQ el bacallà i les gambes, al RM el llagostí al buit sense closca. La part més complicada va ser trobar un al RA, després de varis intents de comprar diferents matrius de PPP que a l'etiquetatge s'indicava que contenien sulfits, i després d'analitzar el valor obtingut era molt baix. Finalment, es va trobar al RA el llagostí amb closca (per fer l'anàlisi es va treure la closca manualment al laboratori per pesar la part comestible).

Tot els altres PPP anomenats anteriorment: les escopinyes en llauna, la tonyina en llauna, el surimi congelat i els musclos en llauna, es va obtenir un valor per sota del LQ per tant no es van tenir en compte per continuar analitzant en aquesta etapa.

Es va analitzar un patró diari amb concentració propera als valors obtinguts durant 10 dies en aquestes matrius: patró de RM 20 mg/Kg (llagostí sense closca) i patró de RA 100 mg/Kg (llagostí amb closca).

Com el del LQ ja es s'havia tingut en compte en la etapa I i II, no s'ha continuat analitzant en aquesta etapa.

A continuació s'observa la taula 5, on es pot veure detallades les repeticions i els dies en els quals s'ha fet cada determinació de les mostres reals.

Taula 5. Anàlisi de l'etapa III

dies/repetició	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Surimi	XX	XX	XX															
Bacallà					XX	XX	XX	XX										
Tonyina																		
Musclos				XX														
Escopinyes				XX														
Gambes salades					XX	XX	XX	XX										
Llagostí sense closca					XX	XX	XX	XX										
Llagostí amb closca								XX	XX	XX	XX							
P20						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
P100									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

D'aquesta manera poder calcular posteriorment la precisió amb les matrius reals i l'exactitud amb els patrons sense fer-li cap addició.

L'anàlisi d'aquestes matrius es fa pesant 20 grams de mostra i afegint els 100mL d'aigua HPLC i tot el procés anterior descrit sense cap altre canvi.

A continuació es mostra en les figures 5 i 6 uns esquemes del procediment de l'etapa III amb els passos a seguir durant tot l'anàlisi descrit anteriorment.

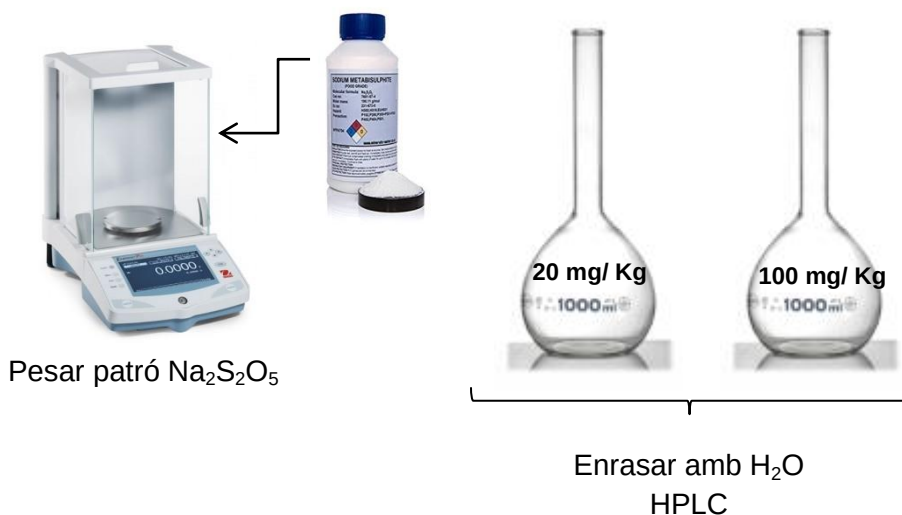


Figura 5. Esquema preparació patrons



Figura 6. Esquema preparació d'addicions i de l'anàlisi

4.3 Càlculs realitzats

4.3.1 Contingut de SO₂

Per a la preparació de patrons s'ha de calcular la quantitat de Na₂S₂O₅ que s'ha de pesar, preparant un litre de patró per a la seva utilització diària en les addicions.

$$\frac{X \text{ mg SO}_2}{l} \cdot \frac{1 \text{ g SO}_2}{1000 \text{ mg SO}_2} \cdot \frac{1 \text{ mol SO}_2}{64,1 \text{ g SO}_2} \cdot \frac{1 \text{ mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_5}{2 \text{ mol SO}_2} \cdot \frac{190,11 \text{ g Na}_2\text{S}_2\text{O}_5}{1 \text{ mol Na}_2\text{S}_2\text{O}_5} = 0,001483x \text{ mg/l}$$

On x: concentració a la qual es vol preparar el patró.

Tenint en compte aquest càlcul es prepararan tots els patrons de la determinació.

Per calcular el contingut de sulfits s'ha de tenir en compte la reacció que té lloc a la mostra, així com el blanc de l'aigua de grau HPLC utilitzada, com el pes molecular de SO₂ i la normalitat del iode 0,01N de la valoració.

D'aquesta manera, el contingut de SO₂ es calcula amb la següent fórmula:

$$\frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \text{SO}_2 = \frac{(V_{bl} - V_m) \cdot 32,03 \cdot N \cdot 1000}{P_m}$$

On:

V_{bl}: volum gastat en la valoració del blanc, en ml

V_m: volum gastat en la valoració de la mostra, en ml

N: normalitat real del iode 0,01N indicada en el certificat del reactiu.

P_m: pes de la mostra, en grams.

4.3.2 Paràmetres de qualitat de la validació

Per a la validació es fa un càlcul de la precisió, $U(Rw)$, i exactitud, $U(bias)$, de la determinació.

Els càlculs de la precisió es realitzaran amb les dades obtingudes per les repeticions diàries dels anàlisis per poder tenir en compte les possibles fonts de variabilitat. Amb un material de referència certificat (estable), amb matriu i sotmès a tots els passos analítics.

$$S_{Rw\%} = \frac{sRw}{n}$$

on:

n : és la mitjana de valors obtinguts i

sRw ; és la desviació estàndard, mesura de la dispersió dels valors respecte al valor promig

Per tant $U(Rw)$ és:

$$U(Rw) = \sqrt{SRw^2 + U(recovery)^2}$$

S'ha de tenir en compte la incertesa associada del certificat del patró, de la balança utilitzada i les toleràncies màximes del material volumètric utilitzat, $U(recovery)$.

L'exactitud es calcula tenint en compte les addicions de patró, important que les matrius en les addicions siguin blanques. També s'ha de tenir en compte que s'ha de calcular el valor de la concentració afegida tenint en compte el pes exacte i la puresa del reactiu (metabisulfit sòdic).

$bias = 100 - recuperació$

$$Recuperació = \frac{\text{Concentració obtinguda} - \text{Concentració addicionada}}{\text{Concentració addicionada}}$$

Per tant la desviació estàndard, RMS:

$$RMS\ bias = \sqrt{\frac{\sum bias^2}{\sum n}} \quad \text{on } n \text{ són les repeticions que es fan.}$$

$$U(bias) = \sqrt{RMS^2 + U(recovery)^2}$$

D'aquesta manera es fa un càlcul de la incertesa combinada amb la precisió i exactitud utilitzant un interval de confiança del 95% amb un factor de $K=2$ per obtenir la incertesa total del mètode.

$$U = \left(\sqrt{U_{bias}^2 + S(Rw)^2} \right) \cdot K$$

5 Resultats i discussió

Un cop acabat el procediment experimental de validació (etapa I, etapa II i etapa III) es va procedir a fer càlculs indicats en l'apartat 4.3.2., obtenint uns valors d'exactitud, precisió i incertesa del mètode a validar per cada matriu i rang assajat. D'aquesta manera es pot observar com afecta la matriu, segons el tipus de peix a cada rang de concentració de patró addicionat.

En la taula 6, es representen les dades obtingudes després del càlcul de cadascun dels paràmetres per veure comparativament l'exactitud, precisió i incertesa de cada mostra treballada.

Taula 6. Dades Validació

Mostra	U(bias) exactitud	SRW precisió	Uc Incertesa combinada	U=k·Uc incertesa
PB 5	6,17%	4,60%	7,70%	15,39%
PA 5	14,52%	4,47%	15,20%	30,39%
MA 5	3,79%	3,70%	5,30%	10,59%
PB 50	2,18%	2,25%	3,14%	6,27%
PA 50	2,94%	2,23%	3,68%	7,37%
MA 50	2,00%	1,88%	2,75%	5,50%
PB 300	1,55%	0,63%	1,67%	3,35%
PA 300	2,09%	1,38%	2,50%	5,01%
MA 300	0,96%	0,94%	1,34%	2,68%
MRC	3,01%	0,7%	3,09%	6,18%
P5-GSB¹⁶	3,23%	7,27%	7,95%	15,90%
P20-LISC¹⁷	1,84%	7,26%	7,49%	14,98%
P100-LIAC¹⁸	1,33%	2,38%	2,72%	5,45%

¹⁶ Gambes salades al buit

¹⁷ Lagostí sense closca

¹⁸ Lagostí amb closca

La columna de la Uc, es l'anomenada incertesa combinada:

$$Uc = \sqrt{Ubias^2 + S(Rw)^2}$$

Com bé diu el nom, combina la incertesa associada a la precisió i l'exactitud del mètode. I amb aquesta incertesa i tenint en compte el factor de correcció K=2 s'obté la incertesa per a cadascuna de les addicions en les diferents matrius amb les qual s'ha treballat.

Un cop estudiada la contribució de la matriu blanca (sense les addicions), s'ha observat que els resultats són acceptables sense restar el valor del blanc, a més que es volia veure si afectava o no el tipus de matriu en el resultat de SO₂ sabent que té una aportació inicial ja del contingut en SO₂. En aquests càlculs no s'ha tingut en compte la resta de les matrius blanques, ja que inicialment es va decidir passar diàriament les matrius blanques per veure la quantitat de SO₂ que tenien i el que afecta al estar congelada la mostra durant tots els dies de la validació.

Veient les dades obtingudes a la taula 5, s'observa que les dades obtingudes amb la matriu del PA són sensiblement més altes que amb les matrius de PB i MA. D'aquesta manera es considera la possibilitat d'analitzar diverses matrius de PA, per veure si aquesta tendència és atribuïble a tota la família de PA o es pot associar al peix escollit (verat). Segons les dades que s'obtinguin, es podria considerar la possibilitat de separar valors de exactitud, precisió i incertesa per famílies de PPP o poder agrupar els criteris d'acceptació per rang de concentració de totes les famílies de PPP.

Amb aquests resultats com es pot veure a la taula 7, es pot dir que l'exactitud del mètode és acceptada i es compleix amb els criteris preestablerts, la precisió també ja que en totes les repeticions del procediment han sigut similars i no hi ha canvis significatius en els resultats obtinguts diàriament, i per tant la incertesa obtinguda del mètode també coherent i considerada com acceptable.

Taula 7. Resultats validació

Rang	mg/Kg SO₂	Exactitud %	Resultats obtinguts validació	Conclusió
LQ	5	≤ 18	≤ 15	Compleix
RM	5 – 50	≤ 7	≤ 3	Compleix
RA	50 - 300	≤ 5	≤ 3	compleix

Totes aquestes dades obtingudes en el procés de validació, les haurà de processar el departament de qualitat de l'empresa Agrolab-Ibérica S.L.U per tal de poder demanar l'acreditació a ENAC.

6 Conclusions

Tenint en compte el criteri establert inicialment a complir i els valors obtinguts d'exactitud, precisió i incertesa en la validació, es pot concloure que es compleixen els criteris en tots els rangs definits i en totes les matrius analitzades.

Com s'ha pogut veure, en cap de les matrius analitzades en tots tres rangs es supera el que s'ha establert.

Al límit de quantificació no es supera el 18%. En el rang mitjà tampoc s'igualarà ni supera el 7%, i finalment en el rang alt no es supera en cap cas el 5% de exactitud i es compleix amb els criteris establerts amb el departament de qualitat de l'empresa Agrolab Ibèrica S.L.U.

7 Summary

The process to implement the validation was learned, which required information research and comparison between different fishes samples.

The analysis took fifteen days of obtaining results and processing them in order to decide whether the validation was successful or not. Finally, the results were presented to the quality department, who will carry out the validation procedures, but it has been observed that the results meet the established values, as has been said in the conclusion.

8 Bibliografía

- [1] Iberica, A. ACREDITACIÓN N° 258 / LE530. Ensayos físico-químicos y microbiológicos de productos para la alimentación humana y animal. UNE-EN ISO / IEC 17025 : 2005
- [2] REGLAMENTO (UE) N° 1129/2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. **2011.**
- [3] SaludBio. <https://saludbio.com/aditivos-de-alimentos/E220-E221-E222-E223-E224-E225-E226-E227-E228-Conservante> (data de consulta 15 abril 2018)
- [4] REGLAMENTO (CE) N° 853/2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. **2004.**
- [5] REGLAMENTO (UE) N° 231/2012 DE por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo. **2012.**
- [6] Productos alimenticios. Determinación de sulfitos. UNE-EN 1988-1.
- [7] Sodio metabisulfito; N°CAS. 7681-57-4; VWR International Eurolab S.L.:Bcn, Agost 7, **2014**
- [8] Àcido clorhídrico 37%; N° CAS. 7647-01-0; VWR International Eurolab S.L.:Bcn, Agost 7, **2014**
- [9] Sodio hidróxido 1N; N° CAS. 1310-73-2; VWR International Eurolab S.L.:Bcn, Oct 20, **2014**
- [10] Yodo 0.1N; N° CAS. 7553-56-2 ; VWR International Eurolab S.L.:Bcn, Nov 19, **2014**
- [11] Almidón 0.5%; N° CAS. 9005-25-8 ; VWR International Eurolab S.L.:Bcn, Agost 7, **2014**
- [12] Real Decreto 142/2002 por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE-A-2002-3366

9 Annexos

9.1 Certificats



a VWR Company

ISO 9001 CERTIFIED
ISO 13485 CERTIFIED

Corporate Headquarters
AMRESCO, LLC
28600 Fountain Parkway
Solon, OH 44139 USA
TEL: 440-349-1199 FAX: 440-349-1182
WWW.AMRESCO-INC.COM
Email: info@amresco-inc.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Sodium Metabisulfite

Code: 0827
Batch Number: 3487C356

Chemical Formula: Na₂S₂O₅
Molecular Weight: 190.1
CAS #: 7681-57-4
Appearance: White powder

Manufacture Date: 06/22/2016
Expiration Date: 06/21/2019
Storage: Room Temperature
Grade: ACS GRADE

TEST	SPECIFICATION	ANALYSIS	DISPOSITION
Chloride	<= 0.05 %	<=0.02 %	PASS
Heavy Metals (as Pb)	<= 0.001 %	<=0.001 %	PASS
Insolubles	<= 0.005 %	0.004 %	PASS
Iron	<= 0.002 %	<=0.001 %	PASS
Purity	>= 97.0 %	99.3 %	PASS
Thiosulfate	<= 0.05 %	<=0.04 %	PASS

Spec Set: 0827ACS

Analysis may have been rounded to significant digits in specification limits.
Product meets analytical specifications of the grades listed.

Figura 7. Certificat del metabisulfit sòdic



"Tailor made reagents"

CHEM LAB NV
Industrieterrein "De Arend" 2 B-8210 ZEDELGEM
Tel.: (32)-50-288320 Fax.: (32)-50-782654

PRODUCT ANALYSIS CERTIFICATE

<i>Date:</i>	15-01-18
<i>Kind:</i>	Iodine 0.005 mol/l
<i>Catalogue No.:</i>	CL05.1001
<i>Lot Nr.:</i>	26.2741501
<i>Measured value:</i>	0,0102 N
<i>Composition:</i>	1.269 g I ₂ / 1 H ₂ O = 0.01 N ($\pm 0.0002/20^{\circ}\text{C}$)
<i>Use:</i>	For laboratory use, Titrations - Calibrate before use.
<i>Traceability:</i>	Reference standards acc. NIST SRM 136e
<i>Exp. Date:</i>	07-2019

Figura 8. Certificat del iode 0,01N



Gabinete
de Servicios para la Calidad

CERTIFICADO MATERIAL DE CONTROL GSCCA/2017

CONSERVADORES EN ALIMENTOS

Material	M1 Responde a un producto de la Pesca (Gamba pelada)
Descripción	Muestras preparada mediante adición para conseguir las muestras de interés
Cantidad/envase	M1 100 gr aprox
Fechas de análisis	9 de mayo de 2017 – 29 de mayo 2017
Condiciones de conservación	Se aconseja mantener en condiciones de congelación
Fecha de uso preferente	Mayo 2018

MUESTRA	PARAMETROS	Nº LABORATORIOS ASIGNANTES	VA	I _{va} (95%)	Rango obtenido en la intercomparación para z≤2	
M1	METABISULFITO SODICO (mg/kg SO ₂) ₍₁₎	22	222	6	133	311

(1)Expresado como Dióxido de azufre

CARACTERÍSTICAS DE LOS MATERIALES

Estos materiales son fabricados y proceden de los ensayos de aptitud, como material sobrante. Pueden ser empleados como muestras de control, en la aplicación de cualquier método analítico, si no se indica lo contrario.

La naturaleza de las muestras se describe en este certificado, siendo éstas siempre materiales naturales, o adicionadas, cuando es necesario, para conseguir los niveles de uno o varios parámetros, de interés. La manipulación realizada, se detalla en la descripción de las muestras.

El valor de la incertidumbre estimada, corresponde a la calculada como error típico de la media, expresada de forma expandida con un factor de cobertura k (para un intervalo de confianza del 95%) calculado en función del número de participantes aceptados para la asignación del Valor de Referencia, como la media de consenso.

Los datos de estudios previos y los propios resultados del ensayo de aptitud aseguran una homogeneidad adecuada, si bien, antes del uso del material, el laboratorio debe asegurarse una homogenización del contenido del envase, antes de tomar una submuestra representativa. Si no se indican condiciones especiales, el material no requiere de condiciones de conservación en el laboratorio diferentes a las mencionadas en el certificado.

Aunque GSC ha realizado estudios de estabilidad a corto plazo, para asegurar la estabilidad de las características de interés en los materiales, durante la ejecución del ensayo de aptitud, no se realizan actividades particulares de verificación de estas propiedades a largo plazo. No obstante, la experiencia previa, el tipo de matriz y analitos, así como las condiciones de conservación permiten tener confianza en las mismas hasta la fecha establecida en este certificado.

Más detalles sobre el tratamiento estadístico puede ser extraído de los programas publicados en la página web www.intercomparativos.com

GABINETE DE SERVICIOS PARA LA CALIDAD, SAL C/ CARIDAD 32, 28007 MADRID TEL. 91 551 92 52 FAX. 91 501 8898 gscsal@gscsal.com

Figura 9. Certificat del material de referència

9.2 Full de càlcul

El tipus de full de càlcul utilitzat per a la determinació de SO₂ de la manera més ràpida i efectiva per treballar al laboratori és el que es mostra a la figura 10.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1											
2	HOJA DE CÁLCULO SO₂										
3	AGROLAB IBÉRICA S.L.U.										
4											
5											
6	ID muestra	Ref Material	Peso Muestra (PM)	Volumen Blanco	Volumen Muestra	Normalidad	SO ₂	Analista	Fecha	Observaciones	Comentarios
7			g	mL	mL		mg/kg				
23	Blanco	Bl	20	0	0,15	0,0102	2,45	SG	22-03-18	LOTE: 26,27411501	Etapa I Día 1
24	Patrón 5	P5	20	0,15	0,46	0,0102	5,06	SG	22-03-18	Pipeteamos 20mL patrón +	
25	Patrón 5rep	P5rep	20	0,15	0,45	0,0102	4,90	SG	22-03-18	Pipeteamos 20mL patrón +	
26	PB Blanco	PBbl	20,1	0,15	0,19	0,0102	0,65	SG	22-03-18		
27	PA Blanco	PAbI	19,92	0,15	0,28	0,0102	2,13	SG	22-03-18	20g muestra + 100mL agua +	
28	MAR Blanco	MARbl	20,04	0,15	0,21	0,0102	0,98	SG	22-03-18		

Figura 10. Full de càlcul

En aquest full de càlcul hi ha tota la informació diària de la matriu analitzada, el pes, el volums que ha donat i la columna de SO₂ (en blanc) dona el resultat automàtic (amb la fórmula ja introduïda) de la quantitat de sulfits que té la matriu.

9.3 Determinació de SO₂ exercici interlaboratori Abril 2018

Al mes d'abril es va participar a un exercici interlaboratori de la determinació de SO₂ en una mostra rebuda al laboratori. La mostra porta una sèrie d'instruccions de pretractament per a que tothom realitzi de la manera més similar la determinació, en quan al tractament d'emmagatzematge de la mostra abans de la seva utilització.

Un cop està previst el seu anàlisi s'ha de procedir de la mateixa manera que el laboratori té el mètode establert.

L'organització i el proveïdor del programa intercomparatiu va ser *EL GABINETE DE SERVICIOS PARA LA CALIDAD S.A.L.*

Un cop fet l'anàlisi els resultats obtinguts s'introdueixen en una plana web intercomparatiu durant el període de temps que marquen les instruccions.

I uns vint dies després es penjen els resultats obtingut dels laboratoris participants i del valor del anàlisi real previst.

9.4 Taules de la normativa del contingut de SO₂ màxim permès

A les taules 8, 9 i 10 es poden veure la quantitat màxima permesa de SO₂ en els peixos. Taules de les quals s'ha tingut una guia alhora de buscar matrius per al anàlisi de la determinació de SO₂ en productes de la pesca. [12]

La dosi màxima permesa en els productes de SO₂ no s'ha trobat en cap anàlisi realitzat.

Taula 8. Dosi màxima permesa de SO₂ (1)

PRODUCTOS ALIMENTICIOS	ADITIVOS	DOSIS MÁXIMA mg/Kg ó mg/l
PRODUCTOS DE LA PESCA		
Crustáceos frescos, congelados y ultracongelados de las familias Peneidae, Solenoceridae, Aristeidae:		
• Hasta 80 unidades	SO ₂	150 (en las partes comestibles)
• Entre 80 y 120 unidades	SO ₂	200 (en las partes comestibles)
• Más de 120 unidades	SO ₂	300 (en las partes comestibles)
Crangon crangon y Crangon vulgaris cocido	Sa + Ba SO ₂	6.000 50 (en las partes comestibles)
Cefalópodos frescos, congelados y ultracongelados	SO ₂	150 (en las partes comestibles)
Pescados de la especie Gadidae desecados salados	Sa + Ba SO ₂	200 200
Crustáceos frescos congelados y ultracongelados	SO ₂ E-586	150 (en las partes comestibles) 2 (como residuo en la carne de crustáceos).
Crustáceos y moluscos cocidos	SO ₂	50 (en las partes comestibles). Sólo aplicable a crustáceos y cefalópodos cocidos.
	Ba	1000
	Sa + Ba	2000
Crustáceos cocidos de las familias Penaeidae, Solenoceridae y Aristeidae	SO ₂	135 (en las partes comestibles)
-hasta 80 unidades/kg		180 (en las partes comestibles)
-entre 80 y 120 unidades/kg		270 (en las partes comestibles)
-más de 120 unidades/kg		

Taula 9. Dosi màxima permesa de SO₂ (2)

PRODUCTOS ALIMENTICIOS	ADITIVOS	DOSIS MÁXIMA mg/Kg ó mg/l
PRODUCTOS VEGETALES ELABORADOS		
Confituras, jaleas, mermeladas y marmalades de frutas como se menciona en el R.D. 670/1990 de 25 de mayo (excepto la confitura extra y	SO ₂	50

Taula 10. Dosi màxima permesa de SO₂ (3)

PRODUCTOS ALIMENTICIOS	ADITIVOS	DOSIS MÁXIMA mg/Kg ó mg/l
SUCEDÁNEOS		
Sucedáneos: de carne, pescado y crustáceos y cefalópodos a base de proteínas	Sa SO ₂ (1)	2.000 200

9.5 Ampliació de la validació

Durant el temps de l'estada per realitzar el TFG, també s'ha plantejat que en un futur pròxim l'empresa també s'ampliaria la acreditació de la determinació de SO₂ en la matriu de Carns i derivats de carns.

Per aquest motiu, s'ha iniciat un treball d'estudi previ al protocol de validació en aquesta nova matriu que ha estat: la recerca de la legislació per establir el rang de treball a validar, recerca de matrius blanques per poder estudiar la possibilitat de fer la validació per addicions, recerca de MRC en aquesta matriu.

- Recerca de legislació

S'hauria de tenir en compte que les carns són tractades i per tant els valors que donen són molt més elevats i això voldrà dir que probablement el interval de treball ara establert de 5 – 300 mg/Kg s'hauria d'ampliar, fins pot ser aproximadament 500 mg/Kg. Els valors màxims permesos per tot el tractament al qual són sotmeses les carns, és molt superior.

- Recerca de matrius blanques

S'ha analitzat matrius de hamburguesa, botifarra i carn picada, durant 10 dies, on s'ha observat que trobar mostres blanques pot ser complicat ja que la majoria de carns tenen una quantitat elevada de SO₂, per tant s'hauria d'estudiar el tipus de validació a plantejar en el protocol, ja que per el mètode d'addicions potser no seria el més adient.

- Recerca d'un MRC

Per avaluar l'exactitud en aquest tipus de matriu, s'ha fet la recerca d'un MRC, trobant així:

Fapas Test material T20145QC
Food ingredients
Meat

Material demanat per a l'ampliació que és farà en un futur al laboratori.