Este documento es un instrumento de documentación y no compromete la responsabilidad de las instituciones

►**B**

TERCERA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 27 de abril de 1972

por la que se determinan métodos de análisis comunitario para el control oficial de los alimentos para animales

(72/199/CEE)

(DO L 123 de 29.5.1972, p. 6)

Modificada por:

		Diario Oficial		
		nº	página	fecha
►**M1**	Directiva 81/680/CEE de la Comisión de 30 de julio de 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Directiva 84/4/CEE de la Comisión de 20 de diciembre de 1983	L 15	28	18.1.1984
►**M3**	Directiva 93/28/CEE de la Comisión de 4 de junio de 1993	L 179	8	22.7.1993

▼B

TERCERA DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 27 de abril de 1972

por la que se determinan métodos de análisis comunitario para el control oficial de los alimentos para animales

(72/199/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva del Consejo, de 20 de julio de 1970, relativa a la introducción de métodos de toma de muestras y de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ([1]) y, en particular, su artículo 2,

Considerando que la Directiva antes mencionada prevé que los controles oficiales de los alimentos para animales dirigidos a comprobar si se respetan las condiciones establecidas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas relativas a la calidad y la composición de los alimentos para animales se efectuarán según métodos de toma de muestras y de análisis comunitarios;

Considerando que las Directivas nº 71/250/CEE y nº 71/393/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971 ([2]) y de 18 de noviembre de 1971 ([3]), han establecido ya determinados métodos de análisis comunitarios; que, habida cuenta del grado de avance de los trabajos efectuados desde entonces, es conveniente adoptar una tercera serie de medidas;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité Permanente de la Alimentación Animal;

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros dispondrán que los análisis para los controles oficiales de los alimentos para animales, en lo que se refiere a sus contenidos en almidón, proteínas brutas, proteínas brutas solubilizables mediante la pepsina y el ácido chlorhídrico, y en gosipol libre y total, así como la actividad de la pepsina, se efectúen según los métodos descritos en el Anexo I de la presente Directiva.

▼M1

▼B

Artículo 2

Los Estados miembros dispondrán que los análisis para los controles oficiales de los alimentos para animales destinados a la detección e identificación de los antibióticos del grupo de las tetraciclinas, así como los referidos al contenido de dichos alimentos en clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, oleandomicina, tilosina y virginiamicina, se efectúen según los métodos descritos en el Anexo II de la presente Directiva.

▼M1

▼B

Artículo 3

Los Estados miembros aplicarán, a más tardar el 1 de julio de 1973, las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas necesarias para cumplir las disposiciones de la presente Directiva. Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

([1]) DO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.
([2]) DO nº L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.
([3]) DO nº L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.

▼B

Artículo 4

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

▼B

ANEXO I

1. DETERMINACIÓN DEL ALMIDÓN

— Método polarimétrico —

1. Objetivos y campo de aplicación

El método permite determinar el contenido en almidón y en productos de degradación de alto peso molecular del almidón de la Alimentación Animal, excepto de aquellos que contienen peladuras, pulpas, hojas o cuellos secos de remolacha, pulpa de patata, levadura deshidratada, productos ricos en inulina (por ejemplo, peladuras y harina de topinambures) o chicharrones.

2. Principio

El método comprende una doble determinación. En la primera, la muestra se trata en caliente mediante ácido clorhídrico diluido. Previa defecación y filtración, se medirá mediante un polarímetro el poder rotatorio de la solución.

En el segundo, la muestra se extrae mediante el etanol al 40 %. Tras la acidificación del filtrado por el ácido clorídrico, defecación y filtración, se mide el poder rotatorio en las mismas condiciones que cuando la primera determinación.

La diferencia entre los dos multiplicada por un factor común da como resultado el contenido en almidón de la muestra.

3. Reactivos

3.1. Acido clorhídrico al 25 % (p/p), d: 1,126.

3.2. Ácido clorhídrico al 1,128 % (p/v).

La concentración debe comprobarse mediante trituración con la ayuda de una solución de hidróxido de sodio 0,1 N en presencia de rojo de metilo al 0,1 % (p/v) en el etanol al 94 % (v/v). 10 ml = 30,94 ml de NaOh 0,1 N.

3.3. Solución de Carrez I: Disolver en el agua 21,9 g. de acetato acético glacial. Completar a 100 ml con agua.

3.4. Solución de Carrez II: Disolver en el agua 10,6 g. de ferrocianuro de potasio K_4 [$Fe(CN)_6$]. $3H_2O$. Completar a 100 ml con agua.

3.5. Etanol al 40 % (v/v), d: 0,948 a 20 ºC.

4. Equipo

4.1. Erlenmeyer de 250 ml de esmerilado normalizado, con refrigerante de reflujo.

4.2. Polarímetro o sacarímetro.

5. Método operatorio

5.1. *Preparación de la muestra*

Triturar la muestra de forma que pase en su totalidad a través de un tamiz de malla redonda de 0,5 mm de diámetro.

5.2. *Determinación del poder rotatorio total (P o S) (v. observaciones 7.1)*

Pesar, con precisión de 1 mg, 2,5 g de la muestra triturada e introducirlos en un matraz aforado de 100 ml. Añadir 25 ml de ácido clorhídrico (3.2), agitar para obtener un buen reparto de la toma de muestras y añadir de nuevo 25 ml de ácido clorhídrico (3.2). Sumergir el matraz en un baño de agua hirviendo y, durante los 3 primeros minutos siguientes, agitar enérgicamente y con regularidad para evitar la formación de aglomerados. La cantidad de agua del baño debe ser suficiente para permitir mantener el baño en ebullición cuando el matraz esté sumergido en él. Este no podrá ser retirado del baño a lo largo de la agitación. Después de 15 minutos exactamente, retirar el matraz del baño, añadir a ello 30 ml de agua fría y refrigerar inmediatamente hasta 20 ºC.

Añadir a continuación 5 ml de solución de Carrez II (3.4) y agitar de nuevo durante un minuto. Completar el volumen con agua, homoge-

▼B

neizar y filtrar. Si el filtrado no está perfectamente límpido (lo que es poco frecuente), volver a comenzar el análisis empleando una cantidad mayor de las soluciones de Carrez I y II, por ejemplo 10 ml.

Medir a continuación el poder rotatorio de la solución en un tubo de 200 mm mediante un polarímetro o un sacarímetros.

5.3. *Determinación del poder rotatorio (P′ o S′) de las substancias solubles en el etanol al 40 %*

Pesar, con precisión de 1 mg, 5 g de la muestra, introducirlos en un matraz aforado de 100 ml y añadir 8 ml aproximadamente de etanol (3.5) (v. observaciones 7.2). Dejar el matraz en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente; a lo largo de este lapso de tiempo, proceder 5 veces a una agitación enérgica de forma que la toma de muestra esté bien mezclada con el etanol. Llevar después el volumen con el etanol (3.5), homogeneizar y filtrar.

Introducir mediante la pipeta 50 ml del filtrado (= 2,5 g de la muestra) en un erlenmeyer de 250 ml, añadir 2,1 ml de ácido clorhídrico (3,1) y agitar enérgicamente. Ajustar un refrigerante a reflujo al erlenmeyer y sumergirlo en un baño de agua hirviendo. Después del baño, retirar el erlenmeyer del baño, transvasar su contenido a un matraz aforado de 100 ml limpiando con un poco de agua fría, y refrigerar hasta 20 ºC. Defecar a continuación con ayuda de las soluciones de Carrez I (3.3) y II (3.4), completar al volúmen con agua, homogeneizar, filtrar y medir el poder rotatorio como se indica en 5.2, párrafos segundo y tercero.

6. **Cálculo de los resultados**

El contenido en almidón por ciento de la muestra se calcula de la siguiente manera:

6.1. *Mediciones efectuadas con polarímetro*

$$\text{porcentaje de almidón} = \frac{2000\ (P - P')}{[\alpha]_D^{20\,°}}$$

P = poder rotario total en grados de arco

P′ = poder dotatorio en grados de arco dado para las substancias solubles en el etanol al 40 %

$[\alpha]_D^{20\,°}$ = poder rotatorio específico del almidón puro. Los valores convencionalmente admitidos para dicho factor son los siguientes:

+ 185,9 º: almidón de arroz

+ 185,4 º: almidón de patata

+ 184,6 º: almidón de maíz

+ 182,7 º: almidón de trigo

+ 181,5 º: almidón de cebada

+ 181,3 º: almidón de avena

+ 184,0 º: otros tipos de almidón, así como mezclas de almidones de los piensos completos compuestos.

6.2. *Mediciones efectuadas mediante sacarímetro*

$$\text{porcentaje de almidón} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20\,°}} \cdot \frac{(2\ N \cdot 0,665)\ (S - S')}{100} = \frac{26,6\ N\ (S - S')}{[\alpha]_D^{20\,°}}$$

S = poder rotatorio total en grados sacarimétricos.

S′ = poder rotatorio en grados sacarimétricos dado por las substancias solubles en el etanol al 40 %.

N = peso en g de sacarosa en 100 ml de agua dando bajo un espesor de 200 mm un poder rotatorio de 100 º sacarimétricos.

16,29 g para los sacarímetros franceses,

26,00 g para los sacarímetros alemanes,

20,00 g para los sacarímetros mixtos.

$[\alpha]_D^{20\,°}$ = poder rotatorio específico del almidón puro (v. 6.1).

▼B

6.3. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe exceder del 0,4 en valor absoluto para los contenidos en almidón inferiores al 40 % 1,1 % en valor relativo para los contenidos en almidón iguales o superiores al 40 %.

7. **Observaciones**

7.1. Cuando la muestra contenga más del 6 % de los carbonatos, calculados en carbonato de calcio, éstos deben ser destruídos mediante un tratamiento con ayuda de una cantidad exactamente apropiada de ácido sulfúrico diluido, antes de la determinación del poder rotatorio total.

7.2. En el caso de los productos de elevado contenido en lactosa, tales como el polvo de suero láctico o de leche descremada, proceder como sigue según la adición de los 80 ml de etanol (3.5). Ajustar al matraz un refrigerante de reflujo, sumergir el matraz durante 30 minutos en un baño de agua a 50 ºC. Dejar a continuación refrigerar y seguir con el análisis tal como se indica en 5.3.

▼M3

2. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA BRUTA

1. **Objetivo y campo de aplicación**

Este método permite determinar el contenido en proteínas brutas de los piensos a partir del contenido en nitrógeno, determinado según el método de Kjeldahl.

2. **Principio**

La muestra se mineraliza con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador. La solución ácida se alcaliniza mediante una solución de hidróxido de sodio. El amoníaco es destilado y recogido en una cantidad medida de ácido sulfúrico, cuyo exceso es titulado por una solución valorada de hidróxido de sodio.

3. **Reactivos**

3.1. Sulfato potástico

3.2. Catalizador: óxido cúprico CuO o sulfato cúprico cristalizado pentalhidratado $CuSO_4.5H_2O$

3.3. Zinc granulado

3.4. Ácido sulfúrico ρ_{20} = 1,84 g/ml

3.5. Ácido sulfúrico C(½ H_2SO_4) = 0,5 mol/l

3.6. Ácido sulfúrico C(½ H_2SO_4) = 0,1 mol/l

3.7. Indicador de rojo de metilo: disolver 300 mg de rojo de metilo en 100 ml de etanol, σ = 95-96 % (v/v)

3.8. Solución de hidróxido de sodio (puede utilizarse el grado técnico) β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %)

3.9. Solución de hidróxido de sodio c = 0,25 mol/l

3.10. Solución de hidróxido de sodio c = 0,1 mol/l

3.11. Piedra pómez en gránulos, lavada con ácido clorhídrico y calcinada

3.12. Acetanilida (punto de fusión = 114 ºC, N = 10,36 %)

3.13. Sacarosa (libre de compuestos nitrogenados)

4. **Equipo**

Aparatos adecuados para mineralizar, destilar y titular según el procedimiento de Kjeldahl

5. **Método operatorio**

5.1. *Mineralización*

Pesar 1 g de muestra con una precisión de 0,001 g y transferir dicha cantidad al matraz del apartado mineralizador. Añadir 15 g de sulfato

▼M3

de potasio (3.1), una cantidad apropiada de catalizador (3.2) (0,3 a 0,4 g de óxido cúprico o 0,9 a 1,2 g de sulfato cúprico pentahidratado), 25 ml de ácido sulfúrico (3.4) y algunos gránulos de piedra pómez (3.11). Homogeneizar. Calentar el matraz primero con moderación y agitando de vez en cuando, si es necesario, hasta la carbonización de la masa y la desaparición de la espuma; después, más intensamente hasta la ebullición regular del líquido. El calentamiento es adecuado cuando el ácido en ebullición se condensa en las paredes del matraz. Evitar el recalentamiento de las paredes y la adhesión sobre ellas de partículas orgánicas. Cuando la solución se vuelva transparente de color verde claro, mantener la ebullición durante otras dos horas. Después dejar enfriar.

5.2. *Destilación*

Añadir con precaución agua suficiente para disolver completamente los sulfatos. Dejar enfriar y añadir a continuación algunos gránulos de zinc (3.3).

Introducir en el matraz colector del apartado destilador 25 ml, medidos con exactitud, de ácido sulfúrico (3.5 o 3.6) según el contenido supuesto de nitrógeno y algunas gotas del indicador de rojo de metilo (3.7).

Conectar el matraz de mineralización al refrigerante del aparato destilador y sumergir la extremidad del refrigerante en el líquido del matraz colector a una profundidad mínima de 1 cm (véase la observación 8.3). Introducir lentamente en el matraz de digestión 100 ml de solución de hidróxido de sodio (3.8) si pérdida de amoníaco (8.1).

Calentar el matraz hasta la destilación completa del amoníaco.

5.3. *Titulación*

Titular el exceso de ácido sulfúrico del frasco colector mediante la solución de hidróxido de sodio (3.9 o 3.10), según la concentración del ácido sulfúrico utilizado, hasta alcanzar el punto final.

5.4. *Prueba en blanco*

Para confirmar que los reactivos están exentos de nitrógeno, efectuar una prueba en blanco (mineralización, destilación y titulación) utilizando 1 g de sacarosa (3.13) en lugar de la muestra.

6. **Cálculo de los resultados**

El contenido en proteína bruta se calcula con arreglo a la siguiente fórmula:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

Donde:

V_o = volumen (ml) de NaOH (3.9 o 3.10) utilizado en la prueba en blanco

V_1 = volumen (ml) de NaOH (3.9 o 3.10) utilizados en la titulación de la muestra

c = concentración (mol/l) de hidróxido de sodio (3.9 o 3.10)

m = masa (g) de la muestra

7. **Comprobación del método**

7.1. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con una misma muestra no debe sobrepasar:

— 0,2 % en valor absoluto, para los contenidos en proteína bruta inferiores al 20 %,

— 1,0 % en valor relativo sobre el valor más alto, para los contenidos en proteína entre el 20 % y el 40 %,

— 0,4 % en valor absoluto, para los contenidos superiores al 40 %.

7.2. *Exactitud*

Efectuar el análisis (mineralización, destilación y titulación) en 1,5 a 2,0 g de acetanilida (3.12) en presencia de 1 g de sacarosa (3.13); 1 g

▼M3

de acetanilida consume 14,80 ml de ácido sulfúrico (3.5). La recuperación debe ser del 99 %, como mínimo.

8. **Observaciones**

8.1. El aparato puede ser manual, semiautomático o automático. Si el aparato exige un trasvase entre mineralización y destilación, dicho trasvase debe realizarse sin pérdida. Si el matraz del aparato de destilación no está provisto de un embudo con llave, añadir la solución de hidróxido de sodio inmediatamente antes de conectar el matraz al refrigerante, dejando deslizar el líquido lentamente por las paredes.

8.2. Si el producto de la mineralización se solidifica, empezar de nuevo la determinación utilizando una cantidad de ácido sulfúrico (3.4) mayor que la especificada más arriba.

8.3. Para los productos con un contenido bajo de nitrógeno, el volumen de ácido sulfúrico (3.6) que ha de introducirse en el frasco colector podrá reducirse, si fuera necesario, a 10 o 15 ml y completarse con agua hasta 25 ml.

▼B

3. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS BRUTAS SOLUBLES POR LA PEPSINA Y EL ÁCIDO CLORHÍDRICO

1. **Objetivo y campo de aplicación**

El método permite determinar la fracción de las proteínas brutas solubilizadas por la pepsina y el ácido clorhídrico en unas condiciones determinadas. Es aplicable a todos los alimentos.

2. **Principio**

La muestra se someterá a un tratamiento de 48 h a 40 ºC por una solución clorhídrica de pepsina. La suspensión se filtra y el contenido en nitrógeno del filtrado se determina según el método descrito para la determinación de las proteinas brutas.

3. **Reactivos**

3.1. Ácido clorhídrico, d: 1,125

3.2. Ácido clorhídrico 0,075 N.

3.3. Pepsina a 2,0 v/mg; dicha actividad se define y debe controlarse según el método objeto de la parte 4 del presente Anexo.

3.4. Solución recien preparada de aproximadamente 0,02 % (p/v) de pepsina en el ácido clorhídrico (3.2); actividad: 400 V/l.

3.5. Emulsión de antiespuma (silicona por ejemplo).

3.6. Todos los reactivos indicados en el punto 3 del método de determinación de las proteínas brutas.

4. **Equipo**

4.1. Baño de agua o estufa de incubación, regulada a 40 ºC ± 1 ºC.

4.2. Aparatos de mineralizar y de destilar según Kjeldahl.

5. **Método operatorio**

5.1. *Puesta en solución* (v. observaciones 7.2)

Pesar, con precisión de 1 mg, 2 g de la muestra. Introducir la toma de muestra en un matraz aforado de 500 ml y añadir 450 ml de solución clorhídrica de pepsina (3.4) previamente llevada a 40 ºC. Agitar de forma que se evite la formación de aglomerados. Comprobar que el pH de la suspensión sea inferior a 1,7. Llevar el matraz en el baño de agua o la estufa de incubación (4.1) y mantenerlo allí durante 48 h. Agitar después 8, 24 y 32 h. Después de 48 h, añadir 15 ml de ácido clorhídrico (3.1), refrigerar hasta 20 ºC, completar el volumen con agua y filtrar.

5.2. *Mineralización*

Tomar 250 ml del filtrado e introducirlos en el matraz del aparato de destilar (4.2). Añadir los reactivos necesarios para la mineralización

▼B

como se indica en el método de determinación de las proteínas brutas, en la segunda frase del punto 5.1.

Homogeneizar y calentar hasta ebullición. Si hay formación de espuma, añadir algunas gotas de emulsión de antiespuma (3.5). Mantener una ebullición viva hasta evaporación casi completa del agua. Eliminar los últimos resíduos de agua con precaución, reduciendo la intensidad del calentamiento. Cuando aparezca límpida e incolora la solución (verde claro en presencia de catalizador a base de cobre), continuar la ebullición durante 1 h más. Dejar refrigerar a continuación.

5.3. *Destilación y titulación*

Proceder como se indica en el método de determinación de las proteínas brutas, puntos 5.2 y 5.3.

5.4. *Prueba en blanco*

Efectuar una prueba en blanco aplicando el método operatorio en falta de muestra para analizar.

6. **Cálculo de los resultados**

Deducir el volumen de ácido sulfúrico consumido por la prueba en blanco del consumido por la toma de muestra. 1 ml de ácido sulfúrico 0,1 N corresponde a 1,4 mg de nitrógeno.

Multiplicar la cantidad de nitrógeno por el factor 6,25. Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de las dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe exceder de:

— 0,4 en valor absoluto, para los contenidos inferiores al 20 %;

— 2,0 %, en valor relativo, para los contenidos comprendidos entre el 20 y el 40 %;

— 0,8, en valor absoluto, para los contenidos superiores al 40 %.

7. **Observaciones**

7.1. Los valores obtenidos por el presente método no tienen relación directa con la digestibilidad en vivo.

7.2. Los productos cuyo contenido en materias grasas exceda del 10 % deben ser previamente desgrasados por extracción del éter de petróleo (éb. 40-60 ºC).

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PEPSINA

1. **Objetivo y ámbito de aplicación**

El método permite controlar la actividad de la pepsina empleada para la determinación de las proteínas brutas solubilizadas por la pepsina y el ácido clorhídrico.

2. **Principio**

La hemoglobina se trata en las condiciones definidas por la pepsina en medio clorhídrico. La fracción no hidrolizada de las proteínas y se precipita por el ácido tricloracético. Al filtrado se le añade hidróxido de sodio y reactivo según Folin-Ciocalteu. La densidad ofítica de esta solución se mide a 750 mm y la cantidad de tirosina que corresponda se lee sobre una curva de muestreo.

Definición: La unidad de pepsina se define como la cantidad de dicha encima que libera por minuto, en las condiciones del método, una cantidad de agrupaciones hidroxianil cuya coloración por el reactivo según Folin-Ciocalteu tiene una densidad óptica correspondiente a la de un mol de tirosina, en las mismas condiciones.

3. **Reactivos**

3.1. Ácido clorhídrico 0,2 N.

3.2. Ácido clorhídrico 0,06 N.

3.3. Ácido clorhídrico 0,025 N.

▼B

3.4. Solución al 5 % (p/v) de ácido tricloracético.

3.5. Solución de hidróxido de sodio.

3.6. Reactivo según Folin-Ciocalteu. Introducir 100 g de tungstato de sodio (Na_2WO_4. 2 H_2O), 25 g de molibdato de sodio (Na_2MO_4. 2 H_2O) y 700 ml de agua en un matraz de fondo redondo de 2 l de esmerilado normalizado. Añadir 50 ml de ácido fosfórico (d: 1,71) y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (d: 1,19), ajustar al matraz un refrigerante de reflujo, calentar hasta ebullición y mantener la solución en ebullición suave durante 10 h. Dejar refrigerar, separar el refrigerante de reflujo, añadir 175 g de sulfato de litio (Li_2SO_4. $2H_2O$), 50 ml de agua y 1 ml de bromo. Hacer hervir durante 15 minutos para eliminar el exceso de bromo.

Dejar refrigerar, transvasar la solución en un matraz aforado de 1 l, completar el volumen con agua, homogeneizar y filtrar. No puede subsistir coloración verduzca. Antes de su empleo, diluir 1 volumen del reactivo por dos volúmenes de agua.

3.7. Solución de hemoglobina: Pesar una cantidad de hemoglobina, sustrato proteíco según Anson (2 g aproximadamente) correspondiente a 354 mg de nitrógeno ([1]) e introducirla en un matraz de 200 ml de esmerilado normalizado. Añadir algunos ml de ácido clorhídrico (3.2), conectar el matraz a la bomba de vacío y agitar hasta disolución completa de hemoglobina. Cortar el vacío y añadir agitando constantemente el ácido clorhídrico (3.2) para completar a 100 ml. *Preparar inmediatamente antes de su empleo*.

3.8. Solución patrón de tirosina: Disolver 181,2 mg de tirosina en el ácido clorhídrico (3.1) y completar a 1 l con el mismo ácido (solución madre). Tomar 20,0 ml y diluir a 100 ml mediante ácido clorhidrico (3.1) 1 ml de dicha solución contiene 0,2 µmoles de tirosina.

4. **Equipo**

4.1. Baño de agua, regulado a 25 ºC ± 0,1 ºC por el ultratermostato.

4.2. Espectofotómetro.

4.3. Cronómetro, precisión: 1 segundo.

4.4. pH-metro.

5. **Método operatorio**

5.1. *Preparación de la solución* (v. observaciones 7.1)

Disolver 150 mg de pepsina en 100 ml de ácido clorhídrico (3.2). Tomar mediante la pipeta 2 ml de la solución, introducirlos en un matraz aforado de 50 ml y completar al volumen mediante ácido clorhídrico (3.3). El pH, controlado por el pH metro, debe ser de 1,6 ± 0,1. Sumergir el matraz en el baño de agua.

5.2. *Hidrólisis*

Introducir mediante la pipeta en un tubo de ensayo 5,0 ml de solución de hemoglobina (3.7), llevar a 25 ºC en el baño de agua (4.1), añadir 1,0 ml de la solución de pepsina obtenida en 5.1 y mezclar con ayuda de una varilla de cristal, espesada en una extremidad, mediante aproximadamente 10 movimientos de vaivén. Mantener el tubo de ensayo en el baño de agua a 25 ºC durante 10 minutos exactamente, contados desde el momento de la adición de la solución de pepsina (la duración y la temperatura deben ser perfectamente respetadas). Añadir a continuación 10,0 ml de solución de ácido tricloracético (3.4), previamente llevada a 25 ºC, homogeneizar y filtrar sobre un filtro seco.

5.3. *Desarrollo de la coloración y medición de la densidad óptica*

Tomar mediante la pipeta 5,0 ml del fitrado, introducirlos en un erlenmeyer de 50 ml, añadir 10,0 ml de solución de hidrócido de sodio (3.5) y, agitando constantemente, 3,0 ml de reactivo diluido de Folin-Ciocalteu (3.6). Tras 5 a 10 minutos, determinar la densidad óptica de la solución al espectofotómetro de 750 mm en las cubetas de 1 cm de espesor, en comparación con el agua.

([1]) Determinar el contenido en nitrógeno mediante un semi-microkjeldahl (contenido teórico: 17,7 % de nitrógeno).

▼B

5.4. *Prueba en blanco*

Para cada determinación, proceder a una prueba en blanco tal como se indica a continuación.

Introducir mediante la pipeta en un tubo de ensayo 5,0 ml de solución de hemoglobina (3.7), llevar a 25 ºC en el baño de agua (4.1), añadir 10,0 ml de solución de ácido tricloracético (3.4) previamente llevado a 25 ºC, homogeneizar y añadir a continuación 1,0 ml de la solución de pepsina obtenida en 5.1. Mezclar con la ayuda de una varilla de cristal y mantener el tubo de ensayo 10 minutos exactamente en el baño de agua (4.1) a 25 ºC. Homogeneizar y filtrar sobre un filtro seco. Continuar el método operativo tal como se indica en 5.3.

5.5. *Curva de calibrado*

Introducir en los erlenmeyers de 50 ml volúmenes de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 ml de solución patrón de tirosina (3.8), correspondientes respectivamente a unas cantidades de tirosina de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 µmoles. Completar la serie mediante un testigo exento de tirosina. Llevar los volúmenes a 5,0 ml con la ayuda de ácido clorhídrico (3.1). Añadir 10,0 ml de solución de hidróxido de sodio (3.5) y, agitando constantemente, 3,0 ml del reactivo diluido de Folin-Ciocalteu (3.6). Medir la densidad óptica tal como se indica en la última frase del punto 5.3. Trazar la curva de calibrado llevando las densidades ópticas en relación con las cantidades de tirosina.

6. **Cálculo de los resultados**

Leer sobre la curva de calibrado la cantidad de tirosina, en µmol, correspondiente a la densidad óptica de la solución coloreada, corregida de la prueba en blanco.

La actividad de la pepsina, en µmol de tirosina, por mg y por minuto, a 25 ºC, está dada por la fórmula.

$$\text{Unidades por mg } (V/mg) = \frac{0,32\ a}{p}$$

en la que:

a — cantidad de tirosina, en µmol, leída sobre la curva de calibrado;

b — peso en mg de la cantidad de pepsina añadida en 5.2.

7. **Observaciones**

7.1. La cantidad de pepsina que haya de ponerse en solución debe ser escogida de forma que se pueda obtener, cuando la medida fotométrica final, una densidad óptica de 0,35 ± 0,035.

7.2. Dos unidades por mg obtenidas por el presente método corresponden a: 3,64 unidades millonésimas Anson/mg (µmol de tirosina/mg) min a 35,5 ºC).

5. DETERMINACIÓN DEL GOSSIPOL LIBRE Y TOTAL

1. **Objetivo y campo de aplicación**

El método permite determinar el gossipol libre, el gossipol total y las substancias químicamente presentes en las semillas, harinas y tortas de algodón así como en los alimentos compuestos que los contengan. El límite inferior de la determinación es de 20 ppm.

2. **Principio**

El gossipol se extrae en presencia de 3-amino-l-propanol, ya sea mediante una mezcla de iso-propanol y de hexano para la determinación del gossipol libre, y sea por la dimetilformamida para la determinación del gossipol total. El gossipol se transforma mediante anilina en gossipol-dianilina, cuya densidad óptica se mide a 440 nm.

3. **Reactivos**

3.1. Mezcla isopropanol-lexano: mezclar 60 partes en volumen de isopropanol p.a. con 40 partes en volumen de lexano normal.

3.2. Disolvente A: Situar en un matraz aforado de 1 l, 500 ml aproximadamente de la mezcla de isopropanollexano (3.1), 2 ml de 3-amino-l-propanol, 8 ml de ácido acético glacial y 50 ml de agua. Completar al

▼B

volumen mediante la mezcla de isopropanol-lexano (3.1). Dicho reactivo es estable durante una semana.

3.3. Disolvente B: Situar mediante la pipeta en un matraz aforado de 100 ml, 2 ml de 3-amino-l-propanol y 10 ml de ácido acético glacial. Refrigerar a la temperatura ambiente y completar al volumen mediante la N, N-dimetilformamida. Dicho reactivo es estable durante una semana.

3.4. Anilina p.a.: *si la densidad óptica de la prueba en blanco excede de 0,022* destilar la anilina sobre polvo de cinc eliminando las fracciones primera y última del 10 % destilado. Este reactivo en frasco tapado de cristal pardo y en el refrigerador, se conserva varios meses.

3.5. Solución patrón A de gossipol: Colocar en un matraz aforado de 250 ml, 27,9 mg de aceite de gossipol. Disolver y completar al volumen por el disolvente A (3.2). Introducir mediante la pipeta 50 ml de dicha solución en un matraz aforado de 250 ml y completar al volumen por el disolvente A. La concentración en gossipol de dicha solución es de 0,02 mg/ml. Dejar reposar durante 1 h a la temperatura ambiente, antes de su empleo.

3.6. Solución patrón B de gossipol: Colocar en un matraz aforado de 50 ml, 27,9 mg de acetato de gossipol. Disolver y completar al volumen mediante el disolvente B (3.3). La concentración en gossipol de dicha solución es de 0,5 mg/ml.

Conservados al resguardo de la luz las soluciones patrón A y B de gossipol se mantienen estables durante 24 h.

4. **Equipo**

4.1. Mezclador (balancín): alrededor de 35 revoluciones por minuto.

4.2. Espectofotómetro.

5. **Método operatorio**

5.1. *Toma de muestras*

La toma de muestras en relación con el supuesto contenido en gossipol de la muestra. Es preferible operar sobre una pequeña toma de muestras y sobre una parte alícuota del filtrado relativamente importante, de forma que se obtenga una cantidad de gossipol suficiente para efectuar una medición fotométrica precisa. Para la determinación del gossipol libre en las semillas, las harinas y la torta de algosón, la toma de muestras no debe exceder de 1 g; para los piensos completos compuestos podrá alcanzar los 5 g. Una parte alícuota de 10 ml de filtrado es conveniente en la mayoría de los casos; deberá contener de 50 a 100 µg de gossipol. Para la determinación del gossipol total, la toma de muestras podrá variar de 0,5 a 5 g con el fin de que una parte alícuota de 2 ml de filtrado contenga de 40 a 200 µg de gossipol.

El análisis debe efectuarse a una temperatura ambiente cercana a los 20 ºC.

5.2. *Determinación del gossipol libre*

Introducir la toma de muestras en un matraz de cuello esmerilado de 250 ml, cuyo fondo esté recubierto de cristal pulverizado. Añadir con la pipeta 50 ml de disolvente A (3.2), tapar el matraz y mezclar durante 1 h en el balancín. Filtrar en seco y recoger el filtrado en un pequeño matraz de cuello esmerilado. A lo largo de la filtración, recubrir el embudo con un cristal de reloj. Introducir con la pipeta respectivamente en dos matraces aforados de 25 ml (A y B) unas partes alícuotas idénticas de filtrado que contengan de 50 a 100 µg de gossipol. Completar si fuera necesario, el volumen a 10 ml con la ayuda del disolvente A (3.2). Completar seguidamente al volumen el contenido del matraz (A) mediante la mezcla isopropanol-hexano (3.1). Dicha solución se empleará como solución de referencia para la medición de la solución de la muestra.

Introducir con la pipeta 10 ml del disolvente A (3.2) respectivamente en otros dos matraces aforados de 5 ml (C y D). Completar al volumen el contenido del matraz (C) mediante la mezcla isopropanol-hexano (3.1). Dicha solución se empleará como solución de referencia para la medición de la solución de la prueba en blanco.

Añadir 2 ml de anilina (3.4) respectivamente en los matraces (D) y (B). Calentar durante 30 minutos sobre un baño de agua hirviendo para desarrollar la coloración. Refrigerar a la temperatura ambiente, completar al

▼B

volumen mediante la mezcla isopropanol-hexano (3.1), homogeneizar y dejar reposar durante 1 h.

Determinar mediante el espectómetro a 440 nm, en las cubetas de cristal de 1 cm, la densidad óptica de la solución de la prueba en blanco (D) en comparación con la solución de referencia (C) y la densidad óptica de la solución de la muestra (B) en comparación con la solución de referencia (A).

Sustraer la densidad óptica de la solución de prueba en blanco de la solución de la muestra (= densidad óptica corregida). Calcular a partir de dicho valor el contenido en gossipol libre tal como se indica en 6.

5.3. *Determinación del gossipol total*

Introducir una toma de muestras que contenga de 1 a 5 mg de gossipol en un matraz aforado de 50 ml y añadir 10 ml de disolvente B (3.3). Preparar simultáneamente una prueba en blanco introduciendo 10 ml de disolvente B (3.3), en otro matraz aforado de 50 ml. Calentar ambos matraces durante 30 minutos sobre un baño de agua hirviendo. Refrigerar a la temperatura ambiente y completar el contenido de cada matraz al volumen por la mezcla isopropanol-hexano (3.1). Homogeneizar y dejar reposar durante 10 a 15 minutos, filtrar a continuación y recoger los filtrados en matraces de cuello esmerilado.

Llevar mediante la pipeta 2 ml del filtrado de la muestra respectivamente a dos matraces aforados de 25 ml y 2 ml del filtrado de la prueba en blanco respectivamente a otros dos matraces de 25 ml. Tomar un matraz de cada serie y completar los contenidos respectivos a 25 ml mediante la mezcla isopropanol-hexano (3.1). Estas soluciones se emplearán como soluciones de referencia.

Añadir 2 ml de anilina (3.4) respectivamente en los otros dos matraces. Calentar durante 30 minutos sobre baño de agua hirviendo para desarrollar la coloración. Refrigerar a la temperatura ambiente, completar a 25 ml mediante la mezcla de isopropanol-hexano (3.1), homogeneizar y dejar reposar durante 1 h.

Determinar la densidad óptica tal como se indica en 5.2 para el gossipol libre. Calcular a partir de dicho valor el contenido en gossipol total como se indica en 6.

6. **Cálculo de los resultados**

El cálculo de los resultados puede hacerse ya sea a partir de la densidad óptica específica (6.1), ya sea refiriéndose a una curva de calibrado (6.2).

6.1. *A partir de la densidad óptica específica*

En las condiciones descritas, las densidades ópticas específicas son las siguientes:

gossipol libre: $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 625$

gossipol total: $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 600$

El contenido en gossipol libre o total de la muestra está dado por la siguiente fórmula:

$$\text{gossipol } \% = \frac{E \cdot 1250}{E^{1\,\%}_{1\,cm} \cdot p \cdot a}$$

en la que:

E = densidad óptica corregida, determinada como se indica en 5.2,

p = toma de muestras en g,

a — parte alícuota del filtrado en ml.

6.2. *A partir de una curva de calibrado*

6.2.1. *Gossipol libre*

Preparar 2 series de 5 matraces aforados de 25 ml. En cada serie, introducir mediante la pipeta en los matraces unos volúmenes respectivos de 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 y 10,0 ml de la solución patrón A de gossipol (3.5). Completar cada serie mediante un

▼B

testigo constituído por un matraz aforado de 25 ml que contenga únicamente 10 ml de disolvente A (3.2).

Completar a 25 ml el volumen de los matraces de la primera serie (incluido el testigo) mediante la mezcla isopropanol-hexano (3.1) (serie de referencia).

Añadir 2 ml de anilina (3.4) en cada matraz de la segunda serie (incluyendo el testigo). Calentar durante 30 minutos sobre un baño de agua hirviendo para desarrollar la coloración. Refrigerar a la temperatura ambiente, completar al volumen mediante la mezcla isopropanol-hexano (3.1), homogeneizar y dejar reposar durante 1 h (serie patrón).

Determinar en las condiciones indicadas en 5.2 la densidad óptica de las soluciones de la serie patrón en comparación con las soluciones correspondientes de la serie de referencia. Trazar gráficamente la curva de calibrado poniendo las densidades ópticas en relación con las cantidades de gossipol (en μg).

6.2.2. *Gossipol total*

Preparar 6 matraces aforados de 50 ml. Introducir en el primer matraz 10 ml de disolvente B (3.3) y en los otros, respectivamente 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 y 10,0 ml de la solución etalón B de gossipol (3.6). Completar el contenido de cada matraz de 10 ml con la ayuda del disolvente B (3.3). Calentar durante 30 minutos sobre un baño de agua hirviendo. Refrigerar a la temperatura ambiente, completar al volumen mediante la mezcla isopropanol-hexano (3.1) y homogeneizar.

Introducir 2,0 ml de dichas soluciones respectivamente en dos series de 6 matraces aforados de 25 ml. Completar a 25 ml el contenido de los matraces de la primera serie mediante la mezcla de isopropanol-hexano (3.1) (serie de referencia).

Añadir 2 ml de anilina (3.4) en cada matraz de la segunda serie. Calentar durante 30 minutos sobre un baño de agua hirviendo. Refrigerar a la temperatura ambiente, completar al volumen mediante la mezcla isopropanol-hexano (3.1), homogeneizar y dejar deposar durante 1 h (serie patrón).

Determinar en las condiciones indicadas en 5.2 la densidad óptica de las soluciones de la serie patrón en comparación con las soluciones correspondientes de la serie de referencia. Trazar gráficamente la curva de calibrado poniendo las densidades ópticas en relación con las cantidades de gossipol (en μg).

6.3. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre una misma muestra no debe exceder:

— del 15 %, en valor relativo, para los contenidos en gossipol inferiores a 500 ppm,

— de 75 ppm, en valor absoluto, para los contenidos comprendidos entre 500 y 750 ppm,

— del 10 %, en valor relativo, para los contenidos superiores a 750 ppm.

▼B

ANEXO II

1. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS DEL GRUPO DE LAS TETRACICLINAS

1. Objetivo y campo de aplicación

El método permite descubrir e identificar los antibióticos del grupo de las tetraciclinas en los alimentos que contengan al menos 0,1 ppm de ella, los concentrados y las premezclas.

2. Principio

La muestra está sometida a la extracción mediante una mezcla de metanol y de ácido clorhídrico. El extracto se cromatografía sobre papel por vía ascedente comparativamente a unas soluciones de referencia. Los antibióticos se descubren e identifican en comparación con sus valores Rf con los de las substancias patrón, y sea por fluorescencia de luz UV (elevados contenidos en antibióticos), ya sea por bioautografía sobre medio de gelosa inoculado con B. cereus.

3. Reactivos y medio de cultivo

3.1. *Tampón, pH 3,5*

Ácido cítrico monohidratado p.a.	10,256 g
Fosfato disódico NA_2HPO_4 $2H_2O$ p.a.	7,45 g
Acetona p.a.	300 ml
Agua destilada ad	1 000 ml

3.2. *Tampón fosfato, pH 5,5*

Fosfato monopotásico KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Fosfato disódico $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	6,947 g
Agua destilada ad	1 000 ml

3.3. Eluyente I: Mezcla nitrometano puro/cloroforma puro α-dicloricina: 20/10/1,5 en volumen. Preparar en el momento de su empleo.

3.4. Eluyente II: Mezcla nitrometano puro/cloroformo puro α-picolino: 20/10/3 en volumen. Preparar en el momento de su empleo.

3.5. Mezcla matanol puro/ácido clorhídrico (d: 1,19): 98/2 en volumen.

3.6. Ácido clorhídrico 0,1 N.

3.7. Amoníaco, d: 0,91.

3.8. Substancias patrón: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina cuya actividad se expresa en clorhidrato.

140363.9.*Microorganismo: B. cereus ATCC nº 11.778*

Mantenimiento de la cepa, preparación de la suspensión de esporas e inoculación del medio de cultivo: aplicar las disposiciones 3.1 y 3.2 del método de determinación de la clortetraciclina, de la oxitetraciclina y de la tetraciclina, por difusión sobre gelosa, objeto de la parte 2 del presente Anexo.

3.10. *Medio de cultivo* ([1])

Glucosa	1 g
Peptona tripsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levadura	3 g

([1]) Cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados podrá ser empleado.

▼B

Gelosa	20 g
Agua destilada ad	1 000 ml

Ajustar el pH a 5,8 en el momento de su empleo.

3.11. Solución al 0,1 % (p/v) de cloruro de 2,3,5-tripeniltetrazolio y el 5 % (p/v) de glucosa.

4. **Equipo**

4.1. Equipo para cromatrografía ascendente sobre papel (altura del papel: 25 cm). Papeles Schleicher y Schüll 2040 b o 2043 b, o equivalentes.

4.2. Centrifugadora.

4.3. Estufa de incubación, regulada a 30 ºC.

4.4. Lámpara UV para detección de la fluorescencia.

4.5. Placas de vídrio de 20 × 30 cm aproximadamente, que permitan el montaje de una caja plana para la bioautografía.

5. **Soluciones de calibrado**

5.1. *Soluciones-madre*

Preparar, a partir de las substancias de calibrado (3.8) y con ayuda de ácido clorhídrico (3.6), unas soluciones cuya concentración corresponda respectivamente a 500 µg de clortetraciclina-HCl de oxitetraciclina-HCl y de tetraciclina-HCl por ml.

5.2. *Soluciones de referencia para la detección en luz UV*

Diluir las soluciones (5.1) por el tampón de fosfato (3.2) para obtner unas soluciones cuya concentración corresponda a 100 mg de clortetraciclina-HCl de oxitetraciclina-HCl y de tetraciclina-HCl por ml.

5.3. *Soluciones de referencia para la detección por bioautografía*

Diluir las soluciones (5.1) por el tampón fosfato (3.2) para obtener unas soluciones cuya concentración corresponda a 5 µg de clortetraciclina-HCl, de oxitetraciclina-HCl y de tetraciclina-HCl por ml.

6. **Extracción**

Cuando el contenido supuesto de antibiótico sea inferior a 10 ppm, se podrá emplear o la muestra homogeneizada, o la fracción más fina separada mediante tamizado, dado que los antibióticos se encontrarán preferentemente en dicha fracción.

Poner la muestra en suspensión en la mezcla (3.5) y centrifugar. Recoger el líquido sobrenadante para emplearlo tal como esté o diluirlo, si fuera necesario, por medio de la mezcla (3.5), para obtener unas concentraciones en antibiótico de 100 µg (6.1) y de 5 µg (6.2) aproximadamente por ml.

7. **Detección de identificación**

7.1. *Cromatografía*

Sumergir el papel en la solución tampón, pH 3,5 (3.1). Eliminar el exceso de líquido comprimiendo el papel entre unas hojas de papel de filtro seco. Depositar a continuación sobre el papel unosvolúmenes de 0,01 ml de las soluciones de referencia (5.2 y 5.3) y del extracto (6.1 y 6.2). Para obtener una buena separación, el contenido apropiado en humedad del papel es determinante; en su caso, dejar secar ligeramente.

Revelar por cromatografía ascendente. Emplear el aluyente (3.3) para la detección por bioautografía, el eluyente II (3.4) para la detección en luz UV. Cuando el frente del disolvente alcance de 15 a 20 cm de alto (aproximadamente 1 h 30), interrumpir la cromatografía y secar el papel.

7.2. *Detección en luz UV*

Cuando el contenido en antibiótico sea superior a 1 µg/cm^2, se pueden percibir manchas fluorescentes amarillo o por irradiación bajo la

▼B

lámpara UV (4.4) previo tratamiento del cromatograma mediante vapores amoniacales (3.7).

7.3 *Detección por bioautografía*

Verter el medio de cultivo (3.10), previamente inoculado por B cereus (3.9), sobre unas placas de vidrio (4.5) y colocar el papel sobre el medio de cultivo. Tras 5 minutos de contacto, apartar el papel y colocarlo sobre un lugar distinto del medio de cultivo, donde se le mantendrá durante el período de inoculación. Incubar durante una noche en la estufa a 30 ºC. La presencia de un antibiótico del grupo de las tetraciclinas se marca por zonas de inhibición claras en el medio de cultivo turbio.

Para fijar el cromatograma, vaporizar la solución (3.11) sobre el papel, previa incubación.

7.4. *Identificación*

Los valores Rf relativos de los antibióticos del grupo de las tetraciclinas se dan a continuación. Dichos valores podrán variar ligeramente según la calidad del papel y su contenido en humedad.

Clortetraciclina (CTC)	0,60
Tetraciclina (TC)	0,40
Oxitetraciclina (OTC)	0,20
4-epi-CTC	0,15
4-epi-TC	0,13
4-epi-OTC	0,10

Los compuestos «epi» tienen una actividad antibiótica inferior a la de los compuestos normales.

2. DETERMINACIÓN DE LA CLORTETRACICLINA, DE LA OXITETRACICLINA Y DE LA TETRACICLINA

A. POR DIFUSIÓN SOBRE GELOSA

1. **Objetivo y ámbito de aplicación**

El método permite determinar la cortetraciclina (CTC), la oxitetraciclina (OTC) y la tetraciclina (TC) en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 5 ppm. Los contenidos inferiores a 5 ppm pueden estimarse por interpolación gráfica.

2. **Principio**

Para los contenidos iguales o inferiores a 50 ppm, la muestra estará sometida a la extracción por la formamida diluida. Para los contenidos superiores a 50 ppm, se somete a extracción mediante una mezcla de acetona, de agua y de ácido clorhídrico para la determinación de la CTC y por una mezcla de metanol y de ácido clorhídrico para la determinación del UTC y de la TC.

Los extractos se diluirán a continuación y su actividad antibiótica se determinará por la medición de la difusión de la CTC, de la OTC y de la TC en un medio gelosificado inseminado con *B. cereus*. La difusión se indica por la formación de zonas de inhibición en presencia del microorganismo. El diámetro de dichas zonas es directamente proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico.

3. **Microorganismo: B. cereus ATCC nº 11.778**

3.1. *Mantenimiento de la cepa*

Inocular *B cereus* sobre gelosa inclinada en tubo constituído por el medio de cultivo (4.1), exento de azul de metileno y de ácido bórico. Incubar durante una noche a 30 ºC aproximadamente. Conservar el cultivo en refrigerador y repicar cada 14 días sobre gelosa inclinada.

3.2. *Preparación de la suspensión de esporas*

Recoger los gérmenes de un tubo de gelosa inclinada (3.1) con ayuda de 2 a 3 ml de suero fisiológico (4.5). Inseminar con dicha suspensión un frasco de Roux que contenga 300 ml del medio de cultivo (4.1), exento de azul de metileno y de ácido bórico, cuya concentración en gelosa es del 3 al 4 %. Incubar 3 a 5 días a 28-30 ºC, recoger a continuación las esporas en 15 ml de etanol (4.6), tras haber comprobado la esporulación

▼B

bajo el microscopio, y homogeneizar. Dicha suspensión puede conservarse en refrigerador durante 5 meses al menos.

Por unos ensayos preliminares sobre placas con el medio de base de la determinación (4.1), determinar la cantidad de inóculo que permita obtener para las diferentes concentraciones de antibiótico empleadas, unas zonas de inhibición tan extendidas como sea posible y que estén además claras. Dicha cantidad es generalmente de 0,2 a 0,3 ml/1 000 ml. La inoculación del medio de cultivo se hace entre 50 y 60 ºC.

4. **Medios de cultivo y reactivos**

4.1. *Medio de base de la determinación* ([1])

Glucosa	1 g
Peptone tripsica	10 g
Extracto de carne	1,4 g
Extracto de levadura	3 g
Gelosa, según la cantidad	10 a 20 g
Tween 80	1 ml
Tampón fosfato, pH 5,5 (4.2)	10 ml
Solución al 5 % (p/v) de ácido bórico	15 ml
Solución etanólica al 0,5 % de azul de metileno	4 ml
Agua destilada ad	1 000 ml

Ajustas a pH 5,8 antes del empleo

4.2. *Tampón fosfato, pH 5,5*

Fosfato monopotásico KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Fosfato disódico $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ p.a.	6,947 g
Agua destilada ad	1 000 ml

4.3. Tampón fosfato, pH 5,5 diluido a 1/10.

4.4 *Tampón fosfato, pH 8*

Fosfato monopotásico KH_2PO_4 p.a.	1,407 g
Fosfato disódico $Na_2HPO_4 \cdot 2H_4O$ p.a.	57,559 g
Agua destilada ad	1 000 ml

4.5. Suero fisiológico estéril

4.6. Etanol al 20 % (v/v).

4.7. Acido clorhídrico 0,1 N.

4.8. Formamida al 70 % (v/v): preparar en fresco antes del empleo y ajustar el pH 4,5 con ayuda de ácido sulfúrico 2 N aproximadamente.

4.9. Mezcla acetona pura/agua/ácido clorhídrico (d: 1,19): 65/33/2 en volumen.

4.10. Mezcla metanol puro/ácido clorhídrico (d: 1,19): 98/2 en volumen.

4.11. Substancias de calibrado: CTC, OTC, TC cuya actividad se expresa en clorhidrato.

5. **Soluciones de calibrado**

5.1. *Clortetraciclina*

Preparar, a partir de la substancia de calibrado (4.11) y con la ayuda de ácido clorhídrico (4.7), una solución madre cuya concentración corresponda a 500 µg de clortetraciclina-HCl por ml. Dicha solución se conserva una semana en refrigerador.

([1]) Podrá emplearse cualquier medio de cultivo comercial de análoga composición y que dé los mismos resultados, podrá emplearse.

▼B

A partir de dicha solución madre, preparar una solución de calibrado de trabajo S_8 cuya concetración corresponda a 0,2 µg de clortetraciclina-HCl por ml. La dilución se hace con la ayuda del tamón fosfato, pH 5,5 diluido a 1/10 (4.3), con adición del 0,01 % de negro amido ([1]).

Preparar a continuación por sucesivas diluciones (1 + 1) con ayuda del tampón (4.3), las concentraciones siguientes:

S_4 0,1 µg/ml

S_2 0,05 µg/ml

S_1 0,025 µg/ml

5.2. *Oxitetraciclina*

Procediendo como se indica en 5.1, preparar, a partir de una solución madre cuya concentración corresponde a 400 µg de oxitetraciclina-HCl por milímetro, una solución madre de trabajo S_8 de 1,6 µg de oxitetraciclina-HCl por ml y las concentraciones siguientes:

S_4 0,8 µg/ml

S_2 0,4 µg/ml

S_1 0,2 µg/ml

5.3. *Tetraciclina*

Procedimiento tal como se indica en 5.1, preparar, a partir de una solución madre cuya concentración corresponda a 500 µg de tetraciclina-HCl por ml, una solución de calibrado de trabajo S_8 de 1,0 µg de tetraciclina-HCl por ml y las siguientes concentraciones

S_4 0,5 µg/ml

S_2 0,25 µg/ml

S_1 0,125 µg/ml

6. **Extracción**

6.1. *Contenidos iguales o inferiores a 50 ppm*

Tratar la toma de muestras por la formamida (4.8), según las indicaciones que se den a continuación en el cuadro. Agitar durante 30 minutos sobre mesa de sacudidas. Diluir inmediatamente después con ayuda del tampón fosfato (4.3), según las indicaciones dadas a continuación en el cuadro, para obtener la concentración U_8. La concentración en formamida de dicha solución no debe exceder del 40 %. Centrifugar o dejar decantar de manera que se obtenga una solución límpida.

Preparar a continuación las concentraciones U_4, U_2 y U_1, por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda del tampón fosfato (4.3).

Antibiótico	CTC		OTC		TC	
Contenido supuesto en ppm	10	50	10	50	10	50
Toma de muestras en g	10	10	24	9,6	20	10
ml de formamida (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml de tampón fosfato (4.3)	dil. 1: 5 ([a])	dil. 1: 25 ([b])	70	200	120	dil. 1: 5 ([a])
Concentración U_8 en µg/ml	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

([1]) El negro amido sirve para caracterizar las zonas de inhibición de las soluciones de calibrado (anillos azules).

▼B

([a]) Tomar 20 ml de extracto y completar a 100 ml por el tampón en un matraz aforado.
([b]) Tomar 4 ml de extracto y completar a 100 ml por el tampón en un matraz aforado.

6.2. *Contenidos superiores a 50 ppm*

6.2.1. *Clortetraciclina*

Tratar, según el contenido supuesto en antibiótico de la muestra o su garantía de fabricación, una toma de muestras de 1 a 10 g por 20 veces su volumen de mezcla (4.9). Agitar durante 30 minutos sobre mesa de sacudidas. Comprobar que el pH permanece por debajo de 3 a lo largo de la extracción; si fuera necesario, ajustar a pH 3 (para los compuestos minerales, con ayuda de ácido acético al 10 %). Tomar una parte alícuota del extracto y ajustar el pH a 5,5 con ayuda del tampón fosfato, pH 8 (4.4) en presencia del verde de bromocresil (viraje del amarillo al azul). Diluir con ayuda del tampón fosfato, pH 5,5 diluido a 1/10 (4.3) para obtener la concentración U_6 (v. 6.1).

Preparar seguidamente las concentraciones U_4, U_2 y U_1 por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda del tampón fosfato (4.3).

6.2.2. *Oxitetraciclina y tetraciclina*

Proceder como se indica en 6.2.1 sustituyendo la mezcla (4.9) por la mezcla (4.10).

7. **Modalidades de la determinación**

7.1. *Inoculación del medio de cultivo*

Inocular a 50-60 ºC el medio de base de la determinación (4.1) por la suspensión de esporas (3.2).

7.2 *Preparación de las cajas*

La difusión sobre gelosa se efectúa en cajas con las 4 concentraciones de la solución de calibrado (S_8, S_4, S_2, S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada caja debe recibir necesariamente las 4 concentraciones de calibrado y del extracto.

Con tal fin, escoger las dimensiones de las cajas de tal forma que se puedan practicar en el medio gelosificado al menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diámetro. Calcular la cantidad de medio de cultivo inoculado (7.1) que habrá de utilizarse de forma que se pueda obtener un recubrimiento uniforme de 2 mm aproximadamente de espesor. Es preferible emplear como cajas unas placas de vidrio planas provistas de un anillo de aluminio o de material plástico perfectamente plano de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir mediante la pipeta en las cavidades unas cantidades exactamente medidas de solución de antibiótico comprendidas entre 0,10 y 0,15 ml, según el diámetro.

Para cada muestra, hacer al menos 4 repeticiones de difusión con cada concentración de forma que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

7.3. *Incubación*

Incubar las cajas durante 18 h aproximadamente a 28-30 ºC.

8. **Evaluación**

Medir el diámetro de las zonas de inhibición, preferentemente por proyección. Inscribir las mediciones sobre papel semilogarítmico llevando el logaritmo de las concentraciones en relación con los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas de la solución de calibrado y del extracto. A falta de interferencias, las dos rectas deberán ser paralelas.

El logaritmo de la actividad relativa se calcula por la siguiente fórmula:

$$\frac{U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

▼B

Actividad real = actividad supuesta × actividad relativa

9. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder del 10 % en valor relativo.

B. POR TURBIDIMETRIA

1. **Objetivo y ámbito de aplicación**

El método permite determinar la clortetraciclina (CTC), la oxitetraciclina (OTC), y la tetraciclina (TC) en las concentraciones superiores a 1 g/kg, en la medida en que ninguna otra substancia interfiera dando lugar a unos extractos turbios. Dicho método es más rápido que el método por difusión sobre gelosa.

2. **Principio**

La muestra está sometida a la extracción por una mezcla de acetona de agua y de ácido clorhídrico para la determinación de la CTC y por una mezcla de metanol y de ácido clorhídrico para la determinación del OTC y de la TC.

Los extractos se diluyen a continuación y su efecto antibiótico se determina por la medición de la transmisión luminosa de un medio de cultivo inseminado con Staphylococcus aureus y antibiótico añadido. La transmisión luminosa es función de la concentración del antibiótico.

3. **Microorganismo: Staphilococuccus aureus K 141** ([1])

3.1. *Mantenimiento de la cepa*

Inocular S. aureus sobre gelosa inclinada en tubo constituido por el medio de cultivo (4.1), un 1,5 a un 3 % de gelosa añadido (según la cantidad). Incubar durante una noche a 37 ºC. Conservar el cultivo en refrigerador y repicar cada 4 semanas sobre gelosa inclinada. Preparar simultáneamente unos subcultivos para el empleo de laboratorio.

3.2. *Preparación del Inóculo*

24 h antes de su empleo, repicar un subcultivo sobre gelosa inclinada e incubar durante una noche a 37 ºC. Poner en suspensión la totalidad del cultivo de un tubo de gelosa en 2 ml aproximadamente del medio de base (4.1) y transvasar a continuación la suspensión en unas condiciones estériles en 100 ml aproximadamente del mismo medio de base (4.1). Incubar en baño de agua a 37 ºC, hasta que el crecimiento de la cepa entre en su fase logarítmica (1 h 30 a 2 h).

4. **Medios de cultivo y reactivos**

4.1. *Medio de base de la determinación* ([2])

Peptona	5 g
Extracto de levadura	1,5 g
Extracto de carne	1,5 g
Cloruro de sodio	3,5 g
Glucosa	1,0 g
Fosfato monopotásico KH_2PO_4 p.a.	1,32 g
Fosfato bipotásico K_2HPO_4 p.a.	3,68 g
Agua destilada ad	1 000 ml

pH tras esterilización: 6,8 a 7,0

4.2. *Tampón fosfato, pH 4,5*

Fosfato monopotásico KH_2PO_4 p.a.	13,6 g
Agua destilada	1 000 ml

([1]) Esta deba, aislada por la LUFA en Kiel, acusa un crecimiento más rápido que el *S. aureus* ATCC 6538 P.

([2]) Podrá emplearse cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados.

▼B

4.3. Ácido clorhídrico 0,1 N.

4.4. Mezcla acetona pura/agua/ácido clorhídrico (d: 1,19): 65/33/2 en volumen.

4.5. Mezcla metanol puro/ácido clorhídrico (d: 1,19): 98/2 en volumen.

4.6. Solución al 10 % aproximadamente (p/v) de formaldehido.

4.7. Substancias de calibrado: OTC, CTC, TC cuya actividad se exprese en clorhidrato.

5. **Solución de calibrado**

Preparar, a partir de la substancia de calibrado (4.7) y con ayuda de ácido clorhídrico (4.3) una solución madre cuya concentración corresponda a 400 a 500 µg de CTC-HCl, OTC-HCl o TC-HCl por ml. Dicha solución se conserva una semana en refrigerador.

6. **Extracción**

6.1. *Clortetraciclina*

Introducir en un matraz aforado de 200 o 250 ml una toma de muestras de 1 a 2 g. Añadir 100 ml aproximadamente de la mezcla (4.4) y agitar durante 30 minutos sobre mesa de sacudidas. Completar al volumen por el tampón fosfato, pH 4,5 (4.2). Homogeneizar y dejar que se deposite.

6.2. *Oxitetraciclina y tetraciclina*

Introducir en un matraz aforado de 200 a 250 ml una toma de muestras de 1 a 2 g. Añadir 100 ml aproximadamente de la muestra (4.5) y agitar durante 30 minutos sobre mesa de sacudidas. Completar al volumen por el tampón de fosfato, pH 4,5 (4.2). Homogeneizar y dejar que se deposite.

7. **Modalidades de la determinación**

7.1. *Preparación de series de calibrado y del extracto*

Diluir de forma apropiada con ayuda del tampón de fosfato, pH 4,5 (4.2) la solución de calibrado ([5]) y el extracto ([6]) de forma que se obtenga una serie de concentraciones que permita establecer, para cada determinación, una curva de calibrado y la interpolación sobre dicha curva de al menos dos valores relativos al extracto. Las diluciones deben escogerse en función de las condiciones de crecimiento de la cepa, que pueden variar de un laboratorio a otro. Se procede generalmente de la siguiente forma:

7.1.1. *Clortetraciclina*

Diluir la solución de calibrado ([5]) con ayuda del tampón de fosfato (4.2) para obtener una solución de calibrado cuya concentración corresponde a 0,2 µg de CTC-HCl por ml. Preparar a continuación con ayuda de un tampón de fosfato (4.2), como se indica a continuación y en unos tubos destinados a la determinación, 6 diluciones con una repetición de cada dilución.

ml de solución de calibrado de trabajo	ml de tampón fosfato (4.2)	Concentración en CTC-HCl (µg/ml)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Diluir el extracto (6.1) con ayuda del tampón de fosfato (4.2) para obtener una concentración supuesta en CTC-HCl de 0,12 µg/l. Introducir 1 ml de dicha solución en 2 tubos de 0,75 ml (= 0,09 µg) en otros 2 tubos. Completar el volumen de los 2 últimos tubos a 1 ml mediante el tampón de fosfato (4.2).

▼B

7.1.2. *Oxitetraciclina y tetraciclina*

Diluir la solución de calibrado ([5]) con ayuda del tampón de fosfato (4.2) para obtener una solución de calibrado de trabajo cuya concentración corresponda a 0,6 µg de OTC-HCl o de TC-HCl por ml. Preparar a continuación con ayuda el tampón de fosfato (4.2) como se indica a continuación y en los tubos destinados a la determinación, 7 diluciones con una repetición de cada dilución.

ml de solución de calibrado de trabajo	ml de tampón fosfato (4.2)	Concentración en OTC-HCl o CT-HCl (1µg/ml)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Diluir el extracto (6.2) por el tampón de fosfato (4.2) para obtener una cocentración supuesta en OTC-HCl o TC-HCl de 0,48 µg/ml. Introducir 1 ml de dicha solución en 2 tubos y 0,5 ml (= 0,24 µg) en otros dos tubos. Completar el volumen de los 2 últimos tubos a 1 ml por el tampón de fosfato (4.2).

7.2. *Inoculación del medio de cultivo*

Inocular el medio de base de la determinación (4.1) por el inóculo (3.2) de forma que se pueda obtener mediante el fotómetro a 590 nm una transmisión luminosa del 85 % en una cubeta de 5 cm o del 92 % en una cubeta de 2 cm, estando el aparato regulado al 100 % de transmisión sobre el medio de base (4.1) no inoculado.

7.3. *Inseminación*

Introducir cada tubo (7.1.1 o 7.1.2) 9 ml del medio de cultivo inoculado (7.2). La operación de relleno de los tubos deberá hacerse con limpieza, pero no necesariamente en condiciones estériles.

7.4. *Incubación*

La incubación debe hacerse obligatoriamente en un baño de agua cuya temperatura se mantenga homogénea a 37 ºC ± 0,1 ºC por agitación. El tiempo de incubación debe ser escogido de forma que se puedan trazar unas curvas de transmisión cuya inclinación sea apropiada a unas medidas precisas (generalmente 2 h 30 a 3 h). Bloquear a continuación el crecimiento inyectando rápidamente 1 ml de solución de formaldehido (4.6) en cada tubo.

7.5. *Medición del crecimiento*

Medir las transmisiones mediante el fotómetro a 590 nm, regulando el aparato al 100 % de transmisión cobre la solución de calibrado más límpida (la que corresponda al contenido más elevado de antibiótico). Debido a las pequeñas diferencias de turbiedad presentadas por los distintos tubos, se recomienda utilizar cubetas de 2 cm al menos y, preferiblemente, de 5 cm.

8. **Cálculo de los resultados**

Trazar gráficamente la curva de calibrado sobre papel milimetrado poniendo las transmisiones fotométricas en relación con las concentraciones en antibiótico. Interpolar sobre la curva las transmisiones relativas al extracto. Calcular el contenido en antibiótico de la muestra.

9. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos terminaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder del 10 %, en valor relativo.

▼B

3. DETERMINACIÓN DE LA OLEANDOMICINA

— por difusión de gelosa —

1. Objetivo y ámbito de aplicación

El método permite determinar la oleandomicina en los alimentos, los concentrados y las premezclas, incluso en presencia de tetraciclinas. El límite inferior de la determinación es 0,5 ppm.

2. Principio

La muestra se somete a la extracción por una solución metanólica diluida de tris (hidroximetil) aminometano. Previa centrifugación, el extracto se diluye y su actividad antibiótica se determina por la medición de la difusión de la oleandomicina en un medio gelosificado inseminado con *B. cereus*. La difusión estará indicada por la formación de zonas de inhibición en presencia del microorganismo. El diámetro de dichas zonas es directamente proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico.

3. Microorganismo: B. cereus K 205 TR ([1]) (resistente a las tetraciclinas)

3.1. *Mantenimiento de la cepa*

Inocular *B. cereus* sobre gelosa inclinada en tubo constituído por el medio de cultivo (4.1) con la adición de 100 µg de oxitetraciclina por 5 ml. Incubar durante una noche a 30 ºC aproximadamente. Conservar el cultivo en el refrigerador y repicar cada 4 semanas sobre gelosa inclinada.

3.2. *Preparación de la suspensión de las esporas*

Recoger los gérmenes en un tubo de gelosa inclinado (3.1) con ayuda de 3 ml aproximadamente del suero fisiológico (4.3). Inseminar con dicha suspensión un frasco de Roux que contenga 300 ml del medio de cultivo (4.1) *cuya concentración de gelosa es del 3 al 4 %.* Incubar 3 a 5 días a 28-30 ºC, recoger a continuación las esporas en 15 ml de etanol (4.4), después de haber comprobado la esporulación bajo el microscopio, y homoegeneizar. Dichas suspensión puede conservarse en el refrigerador durante 5 meses al menos.

Mediante ensayos previos sobre placas con el medio de base de la determinación (4.2), determinar la cantidad de inóculo que permita obtener para las diferentes concentraciones de oleandomicina empleadas, unas zonas de inhibición tan extendidas como sea posible y que además sean claras. Dicha cantidad es generalmente de 0,1 a 0,2 ml/1 000 ml. La inoculación del medio de cultivo se hará a 60 ºC.

4. Medios de cultivo y reactivos

4.1. *Medio de mantenimiento de la cepa* ([2])

Glucosa	1 g
Peptona tripsica	10 g
Extracto de varne	1,5 g
Extracto de levadura	3 g
Gelosa, según la calidad	10 a 20 g
Agua destilada ad	1 000 ml

Ajustar el pH a 6,5 en el momento de su empleo

([1]) Cepa aislada por la LUFA en Kiel.
([2]) Cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismo resultados puede ser utilizado.

▼B

4.2. *Medio de base de la determinación* (1)

Medio (4.1) ajustado a pH 8,8

4.5. Suero fisiológico estéril

4.4. Etanol al 20 % (v/v)

4.5. Metanol, puro

4.6. Solución al 0,5 % (p/v) de tris (hidroximetil) amino-metano p.a.

4.7. *Solución de extracción*

Metanol puro	50 ml
Agua destilada	50 ml
Tris (hidroximetil)	
amino-metano p.a.	0,5 g

4.8. Substancia de calibrado: oleandomicina de actividad conocida.

5. **Solución de calibrado**

Disolver algo de la substancia de calibrado (4.8) en 5 ml de metanol (4.5) y diluir por la solución (4.6) para obtener una concentración en oleandomicina de 100 µg/ml.

A partir de dicha solución-madre, preparar diluyendo mediante la solución (4.6) una solución de calibrado de trabajo S_8 que contenga 0,1 µg de oleandomicina por ml. Preparar a continuación por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda de la solución (4.6) las siguientes concentraciones:

S_4	0,05 µg/ml
S_2	0,025 µg/ml
S_1	0,0125 µg/ml

6. **Extracción**

Tomar, según el contenido supuesto en oleandomicina de la muestra, una toma de muestras de 2 a 10 g, añadir 100 ml de la solución (4.7) y agitar durante 30 minutos sobre mesa de sacudidas.

Centrifugar, tomar una parte alícuota del extracto y diluir mediante la solución (4.6) para obtener una concentración supuesta en oleandomicina de 0,1 g/ml (= U_8). Preparar a continuación las concentraciones U_4, U_2 y U_1 por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda de la solución (4.6).

7. **Modalidades de la determinación**

7.1. *Inoculación del medio de cultivo*

Inocular a 60 ºC del medio de base de las determinación (4.2) por la suspensión de esporas (3.2).

7.2. *Preparación de las cajas*

La difusión sobre gelosa se efectúa en una cajas con las cuatro concentraciones de la solución de calibrado (S_8, S_4, S_2, S_1) y las 4 concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada caja deberá recibir necesariamente las 4 concentraciones de calibrado y del extracto.

Con tal fin, escoger las dimensiones de las cajas de tal forma que se puedan efectuar en el medio gelosificado al menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diámetro. Calcular la cantidad del medio de cultivo inoculado (7.1) que debe emplearse para obtener un recubrimiento uniforme de 2 mm aproximadamente de espesor. Es preferible emplear como cajas unas placas de vidrio planas provistas de un anillo de aluminio o de material plástico perfectamente plano de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

(1) Cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismo resultados puede ser utilizado.

▼B

Introducir con la pipeta en las cavidades unas cantidades exactamente medidas de solución antibiótica comprendidas entre 0,10 y 0,15 ml según el diámetro.

Para cada muestra, hacer al menos 4 repeticiones de difusión con cada concentración, de forma que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

7.3. *Incubación*

Incubar las cajas durante 18 h aproximadamente a 28-30 ºC.

8. **Evaluación**

Medir el diámetro de las zonas de inhibición, preferiblemente, por proyección. Describir las mediciones sobre papel semilogarítmico, llevando el logaritmo de los concentrados en relación con los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas de la solución de calibrado y del extracto. A falta de interferencias, las dos rectas habrán de ser paralelas.

El logaritmo de la actividad relativa se calculará por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - V_1 - V_2 - S_1 - S_2}$$

Actividad real = actividad supuesta × actividad relativa.

9. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas sobre la misma muestra no debe exceder del 10 % m, en valor relativo.

4. DETERMINACIÓN DE LA TILOSINA

— por difusión sobre gelosa —

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

El método permite determinar la tilosina en los alimentos, los concentrados y las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 2 ppm.

2. **Principio**

La muestra se trata mediante una solución tampón de fosfato de pH 8, previamente llevada a 80 ºC, y se la someterá a continuación a la extracción por metanol. Previa centrifugación, el extracto se diluye y su actividad antibiótica se determina por la medición de la difusión de la tilosina en un medio gelosificado inseminado con Sarcina lutea. La difusión está indicada por la formación de zonas de inhibición en presencia del microorganismo. El diámetro de dichas zonas es directamente proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico.

3. **Microorganismo: Sarcina lutea ATCC nº 9341**

3.1. *Mantenimiento de la cepa*

Inocular Sarcina lutea sobre gelosa inclinada en tubo constituída por medio de cultivo (4.1), ajustado a pH 7,0. Incubar durante una noche a 35 ºC aproximadamente. Conservar el cultivo en refrigerador y repicar todos los meses sobre glucosa inclinada.

3.2. *Preparación de la suspensión de gérmenes*

Recoger los gérmenes de un tubo de gelosa inclinada (3.1) de reciente preparación, por 2 a 3 ml de suelo fisiológico (4.4). Inseminar con dicha suspensión un frasco de Roux que contenga 250 ml del medio de cultivo (4.1), ajustado a pH 7,0. Incubar durante 24 h a 35 ºC, recoger los gérmenes con ayuda de 25 ml de suero fisiológico (4.4). Homogeneizar y diluir dicha suspensión para obtener una transformación luminosa del 75 % aproximadamente a 65 mm.

Conservar en refrigerador, dicha suspensión es utilizable durante una semana.

▼B

Mediante unos ensayos preliminares sobre placas con el medio de base de la determinación (4.1), determinar la cantidad de inóculo que permita obtener para las diferentes concentraciones de tilosina empleada en la zonas de inhibición tan extendidas como sea posible y que además estén claras. La inoculación del medio de cultivo se hace a 48-50 ºC.

4. **Medios de cultivo y reactivos**

4.1. *Medio de base de la determinación* ([1])

Glucosa	1 g
Peptona tripsica	10 g
Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levadura	3 g
Gelosa, según la calidad	10 a 20 g
Agua destilada ad	1 000 ml

Ajustar en el momento del empleo a pH 7,0 para el mantenimiento de la cepa y la preparación de la suspensión de gérmenes y a pH 2,0 para la determinación.

4.2. *Tampón fosfato, pH 8*

Fosfato monopotásico KH_2PO_4 p.a.	0,523 g
Fosfato bipotásico K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Agua destilada ad	1 000 ml

4.3. *Tampón fosfato, pH 7*

Fosfato monopotásico KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
Fosfato bipotásico K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Agua destilada ad	1 000 ml

4.4. Suero fisiológico estéril

4.5. Metanol puro

4.6. Metanol al 10 % (v/v)

4.7. Mezcla tampón fosfato (4.2.)/metanol puro: 60/40 en volumen.

4.8. Substancia de calibrado: tilosina conocida.

5. **Soluciones de calibrado**

Secar la substancia de calibrado (4.8) durante 3 h a 60 ºC en una estufa de vacío (5 mm de mercurio). Pasar 10 a 50 mg en un matraz aforado, disolverlos en 5 ml de metanol (4.5) y diluir la solución mediante el tampón fosfato, pH 7 (4.3) para obtener una concentración en tilosina-base de 1 000 µg/ml.

A partir de dicha solución-madre, preparar diluyendo mediante la mezcla (4.7) una solución de calibrado de trabajo S_8 que contenga 2 µg de tilosina-base por ml.

Preparar a continuación por diluciones sucesivas (1 +) con ayuda de la mezcla (4.7), las concentraciones siguientes:

S_4	1 µg/ml
S_2	0,5 µg/ml
S_1	0,25 µg/ml

([1]) Cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismo resultados puede ser utilizado.

▼B

6. **Extracción**

Tomar para los concentrados una toma de muestras de 10 g; para las premezclas y los alimentos una toma de muestras de 20 g. Añadir 60 ml de tampón fosfato, pH 8 (4.2), previamente llevado a 80 ºC, y homogeneizar durante 2 minutos (electrodoméstico, Ultra-turrax, etc.)

Dejar reposar durante diez minutos, añadir 40 ml de metanol (4.5) y homogeneizar durante 5 minutos. Centrifugar, tomar una parte alícuota de extracto y diluir mediante la solución (4.7) para obtener una concentración supuesta en tilosina de 2 µg/ml (= U_8). Preparar a continuación las concentraciones U_4, U_2 y U_1 por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda de la solución (4.7).

Para los contenidos inferiores a 10 ppm, evaporar el extracto en seco en un evaporador rotativo a 35 ºC y recoger el residuo mediante metanol al 40 % (4.6).

7. **Modalidades de la determinación**

7.1. *Inoculación del medio de cultivo*

Inocular a 48-50 ºC el medio de base de la determinación (4.1), ajustado a pH 8,0, por la suspensión de gérmenes (3.2).

7.2. *Preparación de las cajas*

La difusión sobre gelosa se efectúa en unas cajas con las 4 concentraciones de la solución de calibrado (S_8, S_4, S_2, S_1) y las 4 concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada caja deberá recibir necesariamente las 4 concentraciones de calibrado o del extracto.

Con tal fin, escoger las dimensiones de las cajas de tal forma que se puedan practicar en el medio gelosificado al menos 8 unidades de 10 a 13 mm de diámetro. Calcular la cantidad del medio de cultivo inoculado (7.1) que habrá de emplearse de forma que se pueda obtener un recubrimiento uniforme de 2 mm aproximadamente de espesor. Es preferible emplear como cajas placas de vidrio planas previstas de un anillo de aluminio o de material plástico perfectamente plano de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir mediante la pipeta en las cavidades unas cantidades exactamente medidas de solución de antibiótico comprendidas entre 0,10 y 0,15 ml, según el diámetro.

Para cada muestra, hacer al menos 4 repeticiones de difusión con cada concentración, de forma que cada determinación sea objeto de una evaluación de 32 zonas de inhibición.

7.3. *Incubación*

Incubar las cajas durante una noche a 35-37 ºC.

8. **Evaluación**

Medir el diámetro de las zonas de inhibición, de preferencia, por proyección. Inscribir las medidas sobre papel semilogarítmico, llevando el logaritmo de las concentraciones en relación con los diámetros de zonas de inhibición. Trazar las rectas de la solución de calibrado y del extracto. A falta de interferencias, las dos rectas deberán ser paralelas.

El logaritmo de la actividad relativa está calculado por la siguiente fórmula:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Actividad real = actividad supuesta × actividad relativa.

9. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectudas sobre la misma muestra no debe sobrepasar el 10 %, en valor relativo.

▼M2

5. DETERMINACIÓN DE LA VIRGINIAMICINA

— por difusión en gelosa —

1. Objeto y ámbito de aplicación

El método permite determinar la virginiamicina en los alimentos y en las premezclas. El límite inferior de la determinación es de 2 mg/kg (2 ppm) ([1]).

2. Principio

Se somete la muestra a una extracción mediante una solución metanólica de Tween 80. El extracto se decanta o centrifuga, y se diluye después. Su actividad antibiótica se determina por medición de la difusión de la virginiamicina en un medio de gelosa, sembrado con *Micrococcus luteus*. La difusión se manifiesta por la formación de zonas de inhibición del microorganismo. El diámetro de dichas zonas se considera directamente proporcional al logaritmo de la concentración de antibiótico para la gama de concentraciones utilizades.

3. Microorganismos: «Micrococcus luteus» ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. Mantenimiento de la cepa

Sembrar el medio de cultivo (4.1), en tubos inclinados, con *Micrococcus luteus*. Incubar durante venticuatro horas a 30 ºC, conservar en frigorífico a unos 4 ºC y renovar la siembra cada quince días.

3.2. *Preparación de la suspensión bacteriana* ([a])

Recoger los gérmenes en un tubo de gelosa (3.1), de preparación reciente, con ayuda de 2 a 3 ml de solución de cloruro sódico (4.3). Sembrar con esta suspensión 250 ml del medio de cultivo (4.1) en un matraz de Roux e incubar durante dieciocho a veinte horas a 30 ºC. Recoger los gérmenes en 25 ml. de solución de cloruro sódico (4.3) y homogeneizar.

Diluir la suspensión a $^{1}/_{10}$ con ayuda de la solución de cloruro sódico (4.3). La transmisión luminosa de la suspensión, medida a 650 nm bajo un espesor de 1 cm por comparación con la solución de cloruro sódico (4.3), debe ser de alrededor del 75 %. Esta suspensión puede conservarse una semana a unos 4 ºC.

4. Medios de cultivo y reactivos

4.1. *Medio de mantenimiento de la cepa y de base de la determinación* ([b])

Peptona de carne	6,0 g
Triptona	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Gelosa	10,0 a 20,0 g
Agua	1 000 ml
pH 6,5 (tras esterilización)	

4.2. *Tampón fosfato, pH 6*

Hidrogenofosfato de potasio K_2HPO_4	2,0 g
Dihidrogenofosfato de potasio, KH_2PO_4	8,0 g
Agua hasta	1 000 ml

4.3. Solución a 0,8 % (p/v) de cloruro sódico: disolver en agua 8 g de cloruro sódico, diluir hasta 1 000 ml y esterilizar.

4.4. Matanol.

4.5. Mezcla de tampón fosfato (4.2) y de metanol (4.4): 80/20 (v/v).

([1]) 1 mg de virginiamicina equivale a 1 000 unidades «UK».
([a]) Pueden utilizarse otros métodos, siempre que esté demostrado que producen suspensiones bacterianas análogas.
([b]) Puede utilizarse cualquier medio de cultivo comercial de composición análoga y que dé los mismos resultados.

▼M2

4.6. Solución en metanol al 0,5 % (p/v) de Tween 80: disolver 5 g de Tween 80 en metanol (4.4) y diluir hasta 1 000 ml con metanol.

4.7. Sustancia de referencia: virginiamicina de actividad conocida.

5. **Soluciones de referencia**

Disolver una cantidad pesada exactamente de la sustancia de referencia (4.7) en el metanol (4.4) y diluir con metanol (4.4) para obtener una solución madre a 1 000 µg de virginiamicina/ml. Conservada en un matraz tapado a 4 ºC, esta solución es estable durante 5 días.

Preparar, a partir de esta solución y mediante diluciones sucesivas con la ayuda de la mezcla (4.5), las soluciones siguientes:

S_8	1	µg/ml
S_4	0,5	µg/ml
S_2	0,25	µg/ml
S_1	0,125	µg/ml

6. **Preparación del extracto y de las soluciones**

6.1. *Extracción*

6.1.1. *Productos cuyo contenido en viginiamicina no excede de 100 mg/kg*

Pesar una cantidad de muestra de 50,0 g. Añadir 200 ml de solución (4.6), agitar durante 30 minutos y dejar luego sedimentar o centrifugar. Recoger 20 ml de la solución sobrenadante y evaporar hasta 5 ml en un evaporador rotatorio a una temperatura que no exceda de 40 ºC. Disolver el residuo con ayuda de la mezcla (4.5) para obtener una concentración supuesta de virginiamicina de 1 µg/ml (= U_8).

6.1.2. *Productos cuyo contenido en virginiamicina es superior a 100 mg/kg*

Pesar una cantidad de muestra que no exceda de 10,0 g y contenga de 1 a 50 mg de virginiamicina. Añadir 100 ml de solución (4.6), agitar durante 30 minutos, y dejar sedimentar luego o centrifugar. Disolver la solución sobrenadante con ayuda de la mezcla (4.5) para obtener una concentración de virginiamicina de 1 µg/ml (= U_8).

6.2. *Soluciones del extracto*

Preparar, a partir de la solución U_8 y por diluciones sucesivas (1 + 1) con ayuda de la mezcla (4.5), las soluciones U_4 (concentración supuesta: 0,5 µg/ml, U_2 (concentración supuesta: 0,25 µg/ml) y U_1 (concentración supuesta: 0,125 µg/ml).

7. **Modalidades de la determinación**

7.1. *Inoculación del medio de cultivo*

Sembrar a unos 50 ºC el medio de base de la determinación (4.1) con la suspensión bacteriana (3.2). Mediante ensayos preliminares sobre placas con el medio (4.1), determinar la cantidad de suspensión bacteriana que permite obtener para las differentes concentraciones de virginiamicina zonas de inhibición lo más amplias posibles sind dejar de ser nítidas.

7.2. *Preparación de las cajas*

La difusión en gelosa se efectúa en cajas con las cuatro concentraciones de la solución de referencia (S_8, S_4, S_2, S_1) y las cuatro concentraciones del extracto (U_8, U_4, U_2, U_1). Cada caja debe recibir necesariamente las cuatro concentraciones de la referencia y del extracto. A tal fin, hay que elegir la dimensión de las cajas de forma que se puedan excaver en el medio de gelosa por lo menos ocho cavidades de 10 a 13 mm de diámetro, cuyos centros no disten menos de 30 mm. Pueden emplearse como cajas placas de vidrio planas, coronadas por un anillo de aluminio o de materia plástica de 200 mm de diámetro y 20 mm de altura.

Introducir en las cajas una cantidad del medio (4.1), sembrado tal como se indica en 7.1, que permita obtener una capa de unos 2 mm de grosor (60 ml para una caja de 200 mm de diámetro). Dejar solidificar, excavar las cavidades y depositar en ellas volúmenes exactamente medidos de

▼M2

las soluciones de la referencia y del extracto (0,10 a 0,15 ml por cavidad según el diámetro). Repetir por lo menos cuatro veces cada concentración, de forma que cada determinación comprenda la valoración de 32 zonas de inhibición.

7.3. *Incubación*

Incubar las cajas durante dieciséis a dieciocho horas a 30 ºC I 2 ± ºC.

8. **Valoración**

Medir el diámetro de las zonas de inhibición con un error no superior a 0,1 mm. Para cada concentración, registrar las medidas medias en papel semilogarítmico, trasladando el logaritmo de las concentraciones en relación con los diámetros de las zonas de inhibición. Trazar las rectas más ajustadas para la solución de referencia y para el extracto, por ejemplo, mediante el procedimiento siguiente:

Determinar el punto más apropiado del nivel más bajo de la solución de refrencia (SL) con ayuda de la fórmula:

$$\text{(a)}\quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Determinar el punto más apropiado del nivel más alto de la solución de referencia (SH) con ayuda de la fórmula:

$$\text{(b)}\quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Determinar del mismo modo los puntos más apropiados del extracto para el nivel más bajo (UL) y el nivel más alto (UH) sustituyendo S_1, S_2, S_4 y S_8 en las fórmulas anteriores por U_1, U_2, U_4 y U_8.

Consignar los valores SL y SH en la misma gráfica. Al unir los dos puntos, se obtiene la recta más ajustada para la solución de referencia. Sie se sigue el mismo método para UL y UH, se obtiene la recta más ajustada para el extracto.

Si no hubiere ninguna interferencia, las rectas se consideran paralelas cuando (SH — SL) y (UH — UL) no difieren en más de un 10 % de su media.

Si las rectas no son paralelas, pueden eliminarse U_1 y S_1, o U_8 y S_8. Los valores SL, SH, UL y UH que permiten obtener las rectas más ajustadas se calculan entonces con ayuda de la fórmulas siguientes:

$$\text{(a}')\qquad SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{ó} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$\text{(b}')\qquad SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{ó} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

y de fórmulas análogas para UL y UH. La utilización de esta alternativa obliga a respetar los mismos criterios de paralelismo.

En el boletín de análisis debe mencionarse la obtención de un resultado procedente de tres niveles.

Cuando las rectas se consideren paralelas, hay que calcular el logaritmo de la actividad relativa (log A) mediante una de las fórmulas siguientes, según el número de niveles (4 o 3) utilizados para la valoración del paralelismo.

Para 4 niveles:

$$\text{(c)}\quad \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Para 3 niveles:

$$\text{(d)}\quad \log A = \frac{(u_1 - u_2 - u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 - s_4 - u_1 - s_1}$$

o

$$\text{(d}')\quad \log A = \frac{(u_2 - u_4 - u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 - s_8 - u_2 - s_2}$$

▼**M2**

Actividad del extracto de la muestra = actividad de la referencia correspondiente × A:

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Si la actividad relativa no se encuentra en la gama de valores comprendidos entre 0,5 y 2,0, ha de repetirse la determinación procediendo a los ajustes apropiados de las concentraciones del extracto o, en su caso, de las soluciones de referencia. Cuando actividad no pueda encuadrarse en la gama de los valores exigidos, el resultado se considerará aproximado y así se hará constar en el boletín de análisis.

Cuando las rectas no se consideren paralelas, se repetirá la determinación. Si tampoco ahora se lograre el paralelismo, la determinación se considerará insatisfactoria.

Expresar el resultado en miligramos de virginiamicina por kilogramo de alimento.

9. **Reproducibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas en la misma muestra por el mismo analista no debe exceder de:

2 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de virginiamicina inferiores a 10 mg/kg,

20 por 100 del resultado más alto, para los contenidos de 10 a 25 mg/kg,

5 mg/kg, en valor absoluto, para los contenidos de 25 a 50 mg/kg,

10 por 100 del resultado más alto, para los contenidos superiores a 50 mg/kg.