



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

FACULTAD DE QUÍMICA

# **DETERMINACIÓN DE SULFITOS EN SIDRA ASTURIANA**

**Departamento Química Física y Analítica**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN QUÍMICA**

***Sara Reguera Riera***

**Oviedo, junio 2024**

## **Agradecimientos**

*A mi padre, cuya pasión por la sidra fue la inspiración detrás de esta memoria. Gracias por compartir tus conocimientos sobre esta tradición asturiana, proporcionarme las muestras para la investigación y ayudarme con la construcción del equipo.*

# Índice

Abreviaturas .....	1
1. Resumen .....	2
2. Introducción .....	2
2.1. Contextualización .....	2
2.2. Antecedentes .....	4
2.3. Metodología seleccionada .....	6
3. Objetivos.....	7
4. Metodología Experimental.....	7
4.1. Instrumentación.....	7
4.2. Reactivos .....	8
4.3. Procedimiento experimental .....	8
4.3.1. Ensayo de análisis .....	8
4.3.2. Optimización de las condiciones de análisis.....	9
4.3.3. Calibrado.....	9
4.3.4. Determinación de sulfitos en muestras de sidra asturiana .....	9
5. Resultados y Discusión .....	10
5.1. Optimización de la concentración de Fe(III).....	10
5.2. Optimización del tiempo de extracción. ....	11
5.3. Optimización de la temperatura de extracción.....	11
5.4. Calibrado por Patrón Externo.....	13
5.5. Determinación de sulfitos en muestras de sidra asturiana y vinagre. ....	14
5.5.1. Muestras de sidra con sulfitos añadidos. ....	14
5.5.2. Muestras de sidra sin sulfitos añadidos.....	15
5.5.3. Muestras de vinagre .....	15
5.6. Cálculo de errores .....	17
5.7. Determinación de los límites de detección y cuantificación.....	18
6. Conclusiones.....	19

7. Bibliografía.....	20
8. Anexos .....	22
8.1. Anexo 1 .....	22
8.2. Anexo 2 .....	22

## **Abreviaturas**

**LOD:** Limit of Detection (Límite de detección)

**LOQ:** Limit of Quantification (Límite de cuantificación)

**FIA:** Flow Injection Analysis (Análisis por inyección en flujo)

**HPLC-IME:** High Performance Liquid Chromatography Immobilized Enzyme (Cromatografía líquida de alta resolución con enzima inmovilizada)

**HS-TFME:** Headspace Thin Film Microextraction (microextracción en espacio de cabeza en película fina)

# 1. Resumen

Los sulfitos son sales de azufre utilizados comúnmente como aditivos alimentarios capaces de liberar  $\text{SO}_2$  por desplazamiento del equilibrio químico en el que se encuentran. Este gas consta de propiedades antioxidantes y antisépticas y es el que actúa verdaderamente como conservante en bebidas como el vino o, más importante por el contexto regional, la sidra asturiana. Debido a los peligros que conlleva una ingesta de grandes cantidades de sulfitos, el uso de este aditivo se encuentra regulado por la Unión Europea y es de gran importancia que se lleve a cabo su análisis para comprobar el cumplimiento de la legislación. Hoy en día se consta de numerosos métodos de análisis, desde los más sofisticados hasta los más sencillos; sin embargo, cabe resaltar la microextracción en espacio de cabeza en película fina por ser más novedosa, sostenible y según la bibliografía de gran precisión. Este método fue probado analizando muestras de sidra con y sin sulfitos añadidos y muestras de vinagre de sidra. Se obtuvo como LOD  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , y  $16 \text{ mg L}^{-1}$  como LOQ. Las concentraciones en sulfitos obtenidas superaron los límites legales para los tres tipos de muestras, demostrando la posible presencia de interferencias.

## 2. Introducción

### 2.1. Contextualización

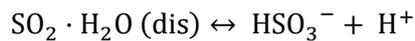
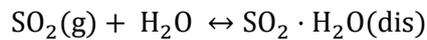
El anhídrido sulfuroso, también llamado dióxido de azufre, es un gas incoloro de olor acre que se puede disolver sin dificultad en el agua formando ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ). Este puede formarse por combustión de materiales que contengan azufre como carbón o aceites naturales. Suele originarse también como subproducto en procesos industriales tales como la fundición de metales (por ejemplo el cobre) o en centrales eléctricas, lo cual es peligroso para el medio ambiente por su toxicidad ante altos niveles de exposición al gas.<sup>1</sup>

Sin embargo, su aplicación más conocida es como aditivo alimentario, principalmente en bebidas como el vino y la sidra, debido a sus propiedades antioxidantes y antisépticas. Esta característica del compuesto ya era conocida en la antigüedad, cuando los romanos quemaban azufre para conservar el vino. Con el paso de los años y con el fin de evitar el manejo directo del gas ya descrito como irritante, el uso de dióxido de azufre en bebidas y alimentos ha derivado en su adición en forma de sales de sulfito (E220-E228) capaces de desprender  $\text{SO}_2$ , y es por ello por lo que en esta memoria se hablará sobre determinación de sulfitos.<sup>2</sup>

La sidra asturiana es la bebida emblemática de esta región, esta ha adquirido una gran importancia a nivel turístico a lo largo de la historia. Pese a ser un producto con una gran tradición artesanal, la adición de sulfitos como conservante se ha promulgado en la producción de esta bebida tanto a nivel industrial como para consumo propio, incluyéndose como requisito para obtener el título de “Denominación de

Origen". Por lo tanto, el presente trabajo se centrará en el uso de sulfitos en sidra casera y vinagre preparado a partir de ella.

Al adicionarse el dióxido de azufre (independientemente de en qué forma se añada inicialmente, sulfito, bisulfito...) este se disuelve en la bebida formando el ácido sulfuroso, el cual se encuentra en equilibrio con sus formas cargadas:



Este equilibrio se desplaza dependiendo del pH de la muestra; en el caso de la sidra, cuyo pH está entre 3 y 4 (como el vino), la forma más estable es el anión bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ).

La capacidad del anhídrido sulfuroso de actuar como antioxidante evita el oscurecimiento de las bebidas gracias a que inhibe las enzimas oxidantes presentes.<sup>3</sup>

En cuanto a sus propiedades antisépticas, estas dependen de la cantidad de los llamados sulfitos libres en la muestra. Las especies cargadas presentes en el equilibrio químico del  $\text{SO}_2$  pueden actuar como nucleófilos con cetonas, aldehídos y otras moléculas orgánicas habituales en alimentos y bebidas, perdiendo su actividad antimicrobiana y convirtiéndose en sulfitos ligados.<sup>3</sup>

Los sulfitos libres que se encuentran en su forma molecular son capaces de atravesar las membranas de los microorganismos por difusión facilitada. Una vez en el interior de las células, el cual se encuentra a un pH distinto del de la muestra, el  $\text{SO}_2$  se transforma en bisulfito y es este el que realiza la acción antiséptica. Por ejemplo, en levaduras, se ha demostrado que dicha función se centra en tres aspectos:

- Daños en la membrana por la unión y bloqueo de distintos receptores.<sup>4</sup>
- Pérdida de metabolitos intracelulares.<sup>5</sup>
- Consumo de ATP debido a la hidrólisis de este en una enzima (ATPasa) acoplada en la membrana.<sup>6</sup>

Pese a sus propiedades beneficiosas para mantener la calidad de alimentos, y tal y como ocurre con otros aditivos, este conservante puede llegar a ser perjudicial para la salud del consumidor. En personas con alergia al anhídrido sulfuroso puede provocar urticaria y, en personas asmáticas, dificultad respiratoria.<sup>7</sup>

La Unión Europea ha delimitado conforme a velar por la seguridad de los ciudadanos, según el Reglamento 1129/2011<sup>8</sup>, la cantidad máxima de sulfitos que pueden contener ciertos alimentos,

siendo el valor máximo en sidra 200 mg L<sup>-1</sup>. Adicionalmente, el Reglamento 1169/2011<sup>9</sup> afirma que se debe informar en el etiquetado de que dichos alimentos llevan sulfitos si la concentración supera los 10 mg L<sup>-1</sup> en términos de SO<sub>2</sub> total (ligado y libre).

## 2.2. Antecedentes

Por todos los ya mencionados factores (salud, calidad del producto y legislación), se requiere una metodología analítica adecuada para la determinación de anhídrido sulfuroso en bebidas como la sidra asturiana. Dicha técnica debe ser rápida, específica y sensible para poder analizar cantidades del orden de mg L<sup>-1</sup> como se indica en el reglamento. Además, debido a la gran cantidad de personas en Asturias que hacen sidra casera de forma particular, para el consumo propio, este método también debería ser económico y sencillo.

Tabla 1 Métodos analíticos para la determinación de sulfito

Método	Matriz	Detección	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	Referencia
Monier-Williams	Maíz molido, zumo de fruta y marisco	Valoración	10-20	10
Electroforesis capilar	Vino y sidra	Espectrofotometría	0,5 (SO <sub>2</sub> libre)	11
FIA	Vino	Espectrofotometría	1	12
			0,1	13
Enzimático	Vino, copos de patata, zumo y manzana seca	Espectrofotometría	2	14
HPLC-IME	Zumo, vino y cerveza	Amperometría	0,01	15
HS-TFME	Vinagre de sidra, zumo de limón y agua	Teléfono móvil + ImageJ	0,04	16

Uno de los métodos más antiguos es el método *Monier-Williams*, el cual ha sufrido numerosas optimizaciones debido a su uso intensivo. Consiste en calentar y tratar la muestra con ácido para que las sales de sulfito presentes en la muestra liberen el dióxido de azufre gaseoso por desplazamiento del equilibrio químico. Este es arrastrado por una corriente de nitrógeno a través de un condensador hasta un burbujeador con una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este peróxido es capaz de oxidar el anhídrido sulfuroso a ácido sulfúrico. La disolución ácida resultante es posteriormente valorada con una disolución estandarizada de NaOH. Además, para corroborar el resultado de la valoración, es usual determinar el sulfato paralelamente mediante una gravimetría por precipitación de BaSO<sub>4</sub><sup>10</sup>. Esta técnica, pese a basarse en una química sencilla, requiere de un tiempo de análisis bastante extendido; además, la

sensibilidad del método es fácilmente superable por otras técnicas más modernas capaces de minimizar el error humano.

La electroforesis capilar es otro método utilizado para la determinación de sulfitos. Aprovechando el equilibrio del dióxido de azufre con sus formas cargadas, la electroforesis separa por aplicación de un campo eléctrico los aniones sulfito y bisulfito de la forma molecular, la cual puede ser medida directamente por absorción ultravioleta a una longitud de onda de 192 nm. Este método analítico presenta una gran sensibilidad ( $LOD = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y rapidez de análisis (4 min por inyección de muestra). Sin embargo, solo es capaz de analizar los sulfitos libres y, pese a ser los que realmente llevan a cabo la función antimicrobiana, la legislación solo recoge el valor máximo de sulfitos totales, por lo que no se podría comprobar el cumplimiento de esta.<sup>11</sup>

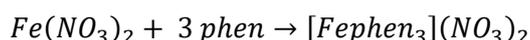
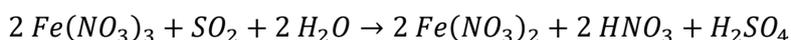
Otra técnica ampliamente utilizada es el análisis por inyección en flujo, usualmente acoplado a un fotómetro. Estos equipos presentan grandes ventajas, son automáticos, rápidos y minimizan el error humano. El estudio de *Silva et al.* se basa en la capacidad de oxidar metales de los compuestos de S(IV). En este sistema FIA con detección espectrofotométrica y celda de difusión de gas, el dióxido de azufre oxida un compuesto de Mn(II) a Mn(III), por intermedios radicales, el cual posteriormente reacciona con yoduro en disolución formándose triyoduro, que absorbe a 352 nm<sup>12</sup>. Por otro lado, *Decnop-Weever et al.* basa la detección en el pH de la disolución. El método consiste en la reacción entre una disolución ácida (donadora de protones) y los sulfitos, liberando el anhídrido sulfuroso gas, el cual atraviesa la membrana de la celda de difusión, donde se mezcla con otro caudal que porta una disolución aceptora de protones y con un indicador. El SO<sub>2</sub> se solubiliza disminuyendo el pH y provocando un cambio de color del indicador ácido-base, verde de bromocresol, que se mide en el detector fotométrico. La señal analítica, proporcional a la concentración de sulfitos totales en la muestra, es la disminución de absorbancia medida. El mayor inconveniente de este método es que presenta interferencias con el dióxido de carbono presente en la sidra.<sup>13</sup>

Los métodos analíticos enzimáticos proporcionan una gran especificidad a la hora de realizar el análisis y pueden ser una buena opción para la determinación. En el estudio colaborativo de *Edberg et al.*, los sulfitos son oxidados en presencia de oxígeno por la enzima sulfito oxidasa, produciéndose en la reacción sulfato y peróxido de hidrógeno. Posteriormente, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxida al NADH en disolución con la enzima NADH peroxidasa. El descenso en la concentración inicial de NADH es medida espectrofotométricamente y es proporcional a la concentración de sulfitos en la muestra<sup>14</sup>. Otra alternativa similar a la anterior se explica en el artículo de *Theisen et al.* donde se emplea un sistema de separación por HPLC seguido de un reactor con la enzima sulfito oxidasa inmovilizada y, finalmente, un detector electroquímico con un electrodo de platino donde se detecta el peróxido de hidrógeno

formado<sup>15</sup>. Ambas técnicas, al igual que otras que emplean enzimas, alcanzan niveles de LOD muy bajos, de hasta 0,001 mg L<sup>-1</sup> para el caso de HPLC, debido a su especificidad. Sin embargo, estos reactivos de origen biológico son considerablemente costosos.

### 2.3. Metodología seleccionada

Tras la revisión de los métodos analíticos más representativos para la determinación de sulfitos, se decidió seleccionar una metodología novedosa empleada en el estudio de *Shahvar et al.*, la cual combina la separación en espacio de cabeza con la microextracción de película fina. En primer lugar, se libera el SO<sub>2</sub> gaseoso por acidificación de la muestra contenida en un vial cerrado que evita la pérdida de muestra. El gas se encuentra con un trozo de celulosa en el interior del vial (sin estar en contacto con la muestra) empapado de los reactivos: 1,10-fenantrolina, sal de Fe(III) y una disolución amortiguadora. El SO<sub>2</sub> reacciona reduciendo al Fe(III) a su estado +2, el cual forma un complejo de color rojo con la 1,10-fenantrolina [Figura 1].



El cambio de color que tiene lugar en el papel es fotografiado con un dispositivo móvil y la imagen obtenida como resultado se procesa en el ordenador en el software de ImageJ. Dicho programa es capaz de analizar la intensidad de los colores rojo, verde y azul (RGB) del área seleccionada dentro de la fotografía. La señal analítica consiste en la diferencia entre la intensidad de color azul del blanco menos la de la muestra (B<sub>b</sub>-B<sub>s</sub>).

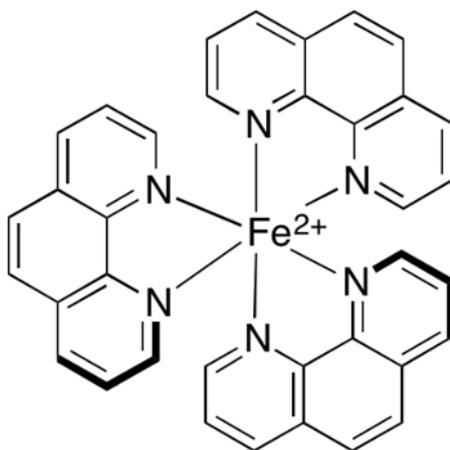


Figura 1 Estructura de tris(1,10-fenantrolina)Fe(II) o ferroína

Para mejorar el factor de repetitividad del método, la instrumentación necesaria para realizar el análisis incluye una caja donde colocar el vial que consta con una bombilla LED en su interior para mantener la

luz uniforme a la hora de realizar la fotografía y un apoyo para que el móvil siempre tenga la misma posición.<sup>16</sup>

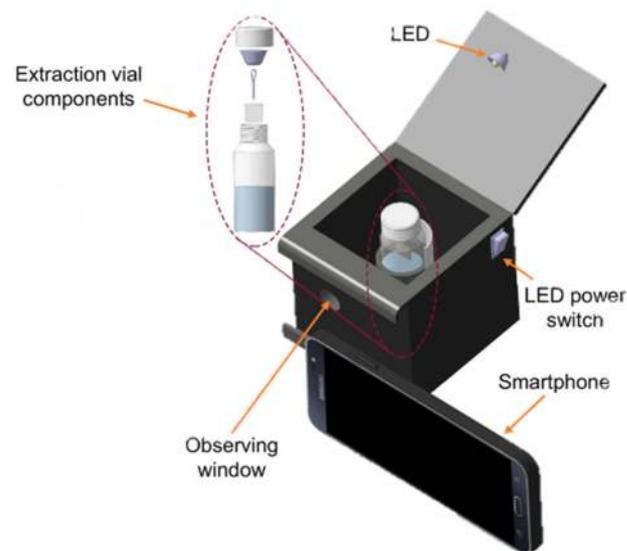


Figura 2 Diseño instrumentación para el análisis<sup>16</sup>

Las ventajas que presenta este método son su simplicidad, la utilización de instrumentación básica, es económico, requiere de un tratamiento de la muestra sencillo y es respetuoso con el medio ambiente ya que trabaja en pequeños volúmenes. Además, se obtienen límites de detección de  $0,04 \text{ mg L}^{-1}$  a pesar de usar un sistema de detección inusual.<sup>16</sup>

### 3. Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un método analítico basado en la microextracción en espacio de cabeza por medio de una película fina de celulosa capaz de determinar la concentración de sulfitos en muestras de sidra asturiana a la que se le ha añadido metabisulfito potásico (E-224) como aditivo. Caracterizar la técnica estudiando los límites de detección y cuantificación. Y comprobar que el empleo de este método es capaz de determinar si la sidra analizada cumple los reglamentos establecidos por la Unión Europea sobre los aditivos alimentarios.

### 4. Metodología Experimental

La metodología experimental se basó principalmente en la seguida en el estudio de *Shahvar et al.*<sup>16</sup>

#### 4.1. Instrumentación

- Teléfono móvil Xiaomi Redmi Note 8T con cámara Ultra HD de 48 MP
- Software ImageJ

- Placa calefactora agitadora con termostato
- pH-metro
- Caja de madera provista de una ventana y 5 bombillas LED construida.

## 4.2. Reactivos

- Metabisulfito potásico ( $K_2S_2O_5$ , TCI Europe, 97% pureza)
- Nitrato de hierro (III) nonahidratado ( $Fe(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$ , VWR Chemicals, 99% pureza)
- Ácido clorhídrico 37% (HCl, Scharlau)
- 1,10-fenantrolina monohidratada (VWR Chemicals, 99% pureza)
- Ácido acético glacial ( $C_2H_4O_2$ , Fisher Scientific)
- Etanol absoluto (VWR Chemicals)
- Hidróxido sódico (NaOH, VWR Chemicals, 98% pureza)
- Ácido etilendiaminotetraacético dihidratado (EDTA, VWR Chemicals, 99% pureza)

## 4.3. Procedimiento experimental

En primer lugar se prepararon las siguientes disoluciones:

- Disolución  $1000 \text{ mg L}^{-1} K_2S_2O_5$  en  $1 \text{ mM EDTA}$
- Disolución  $300 \text{ mM Fe(NO}_3)_3 \cdot 9 H_2O$  en HCl  $0,5 \text{ M}$
- Disolución  $600 \text{ mM}$  1,10-fenantrolina en etanol
- Disolución amortiguadora de HAc  $1 \text{ M}$  ajustando el pH con NaOH a 5,5.

### 4.3.1. *Ensayo de análisis*

Todos los análisis de la metodología experimental se realizaron siguiendo el mismo procedimiento.

En primer lugar, se añadieron 6,5 mL de la muestra, disolución patrón o blanco de procedimiento (agua destilada) para analizar en un vial. Al mismo tiempo, se preparó un trozo de papel de dimensiones 10 x 10 mm empapándolo dos veces con 3 minutos de reposo entre cada una con  $9 \mu\text{L}$  de una disolución que contiene Fe(III) en concentraciones óptimas,  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  de fenantrolina y  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de una disolución amortiguadora de acetato a pH 5,5. El papel empapado se colocó con un clip de acero inoxidable adherido al tapón del vial con silicona, de manera que no entrase en contacto con la muestra o patrón.

Después, se añadieron al vial  $250 \mu\text{L}$  de EDTA  $0,028 \text{ mol L}^{-1}$  y  $250 \mu\text{L}$  de HCl  $2,8 \text{ mol L}^{-1}$ . El ácido produce la liberación del dióxido de azufre contenido en la muestra en forma de sales de sulfito por desplazamiento del equilibrio químico. Inmediatamente después se cerró inmediatamente el vial con el tapón ya preparado para evitar la pérdida de sensibilidad.

A continuación, el vial, provisto de un núcleo de agitación con la muestra y todos los reactivos necesarios, se introdujo en un baño de agua a la temperatura óptima estudiada. Este se mantuvo en el baño el tiempo de extracción determinado en la optimización del apartado siguiente.

Una vez transcurrido el tiempo estipulado, el recipiente se colocó dentro de la caja especialmente diseñada fuera del laboratorio para mantener la iluminación y posición de la cámara constantes. Se tomó una fotografía de él con el dispositivo móvil asegurando que este estuviera colocado correctamente y la luz LED de la caja estuviera encendida. Finalmente, la imagen obtenida se procesó en el programa ImageJ del ordenador, obteniendo como señal analítica la diferencia en el parámetro azul (B) del blanco y la muestra ( $B_b - B_s$ ).

#### **4.3.2. Optimización de las condiciones de análisis**

En este apartado de la metodología experimental se ajustaron las variables del análisis con el objetivo de obtener la mayor sensibilidad del método. Para todas las optimizaciones de parámetros, se mantuvo en cada caso el resto de las variables constantes y se realizó el análisis en cada una de ellas de un mismo patrón de metabisulfito potásico de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  que fue elaborado a partir de la disolución preparada inicialmente de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  en EDTA.

En primer lugar, se ajustó la concentración de Fe (III) de la disolución utilizada para empapar el papel de la microextracción. Para ello, se realizó el análisis del patrón de metabisulfito variando la concentración de Fe (III) en el papel entre  $10$  y  $40 \text{ mmol L}^{-1}$ .

A continuación, se optimizaron el tiempo de extracción y la temperatura del baño de agua. En el caso del tiempo de extracción, se realizó el análisis del patrón esperando tiempos en un rango entre  $90$  y  $540$  segundos desde el cierre del vial. Por otro lado, para la temperatura se estudió su efecto en un rango de entre  $20$  y  $75^\circ\text{C}$ .

#### **4.3.3. Calibrado**

Con el fin de probar el método analítico y obtener una recta de calibrado para el posterior análisis de muestras de sidra asturiana y vinagre de sidra por patrón externo, se realizó el análisis de patrones de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  preparados por dilución de la disolución de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  ya elaborada inicialmente. Las concentraciones de las disoluciones patrón fueron de  $20$ ,  $50$ ,  $100$ ,  $200$  y  $250 \text{ mg L}^{-1}$  conforme para obtener un rango lineal que permitiera comprobar el cumplimiento con la cantidad máxima legal de sulfitos en las muestras.

#### **4.3.4. Determinación de sulfitos en muestras de sidra asturiana**

Por último, se analizaron las muestras, las cuales pueden dividirse en dos tipos. Por un lado, se determinó la cantidad de sulfitos en muestras de sidra asturiana a las que se les añadió metabisulfito

durante su producción y muestras a las que no se les añadió ningún aditivo durante su elaboración. Por otro lado, también se determinó la concentración de sulfitos en vinagre de manzana obtenida a partir de la fermentación acética de sidra sin sulfitos añadidos.

Previamente al análisis, se realizó una preparación de la muestra sencilla. Las muestras se filtraron utilizando un embudo cónico para eliminar los restos de la pulpa de la manzana que pudiera contener la botella. Después, el filtrado se pasó a través de un filtro de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  para garantizar que se hayan eliminado todas las partículas que puedan interferir en el ensayo.

Tras analizar todas las muestras, se continuó con el tratamiento de los datos experimentales obtenidos para determinar finalmente el contenido de sulfitos en ellas.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Optimización de la concentración de Fe(III).

Se realizó el análisis de un patrón de 100  $\text{mg L}^{-1}$  empapando el papel de la microextracción con disoluciones de concentraciones de Fe(III) de 10, 20, 30 y 40  $\text{mmol L}^{-1}$ . A su vez, también se prepararon cuatro blancos para cada disolución, ya que cada una de ellas proporciona una señal de  $B_b$  distinta.

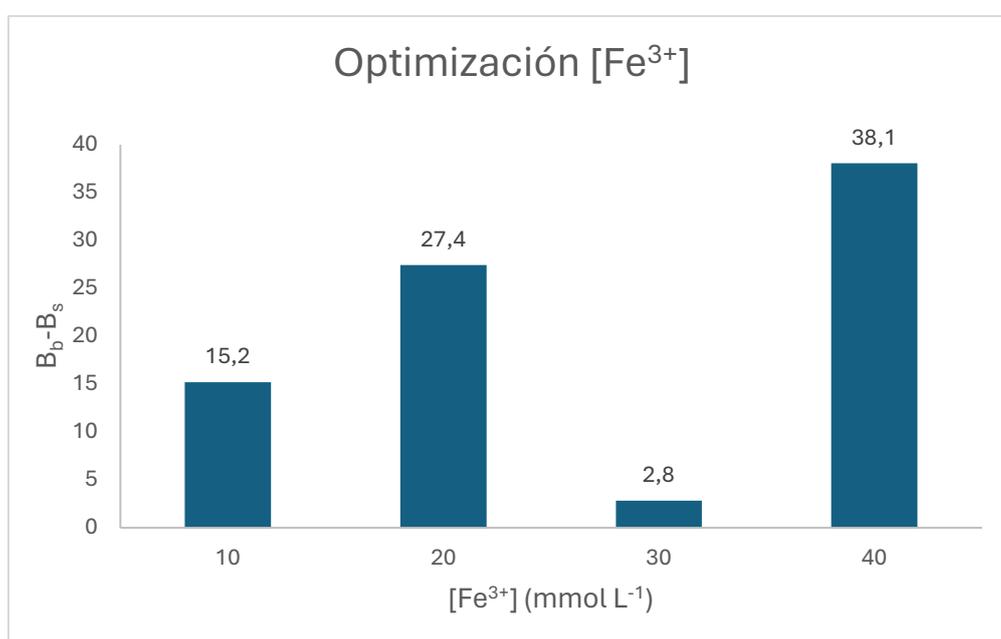


Figura 3 Análisis de patrón de 100  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$  con concentraciones de Fe(III) de 10, 20, 30 Y 40  $\text{mmol L}^{-1}$ .

La concentración que más sensibilidad de señal  $B_b$ - $B_s$  dio fue la correspondiente a 40  $\text{mmol L}^{-1}$  de Fe (III), por lo que fue la seleccionada para el resto de los ensayos por ser la óptima.

Se trata de la señal de mayor sensibilidad, puesto que de acuerdo con el comportamiento que mostraban el resto de las concentraciones analizadas (descartando el ensayo con 30  $\text{mmol L}^{-1}$  por

posible error cometido durante el ensayo), una mayor concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  producía más cantidad de complejo tris(1,10-fenantrolina) $\text{Fe}(\text{II})$  y, por lo tanto, la señal analítica será superior [Figura 3].

## 5.2. Optimización del tiempo de extracción.

Para el estudio del tiempo de extracción, se realizaron análisis esperando 90, 240, 360 y 540 segundos desde el cierre del vial tras la adición del HCl y el EDTA. A partir de los 240 s se observó una tendencia a un máximo de señal [Figura 4].

Pese a que el valor óptimo verdadero fuera 540 s se decidió tomar 360 s (6 min) como tiempo de extracción. Esta decisión se tomó basándose en que la diferencia en la intensidad de señal de ambos tiempos de extracción no era apreciable, y además, también se tuvo en cuenta como factor determinante el número de análisis por minuto, siendo este mayor si el tiempo de espera era de 6 minutos en lugar de 9.

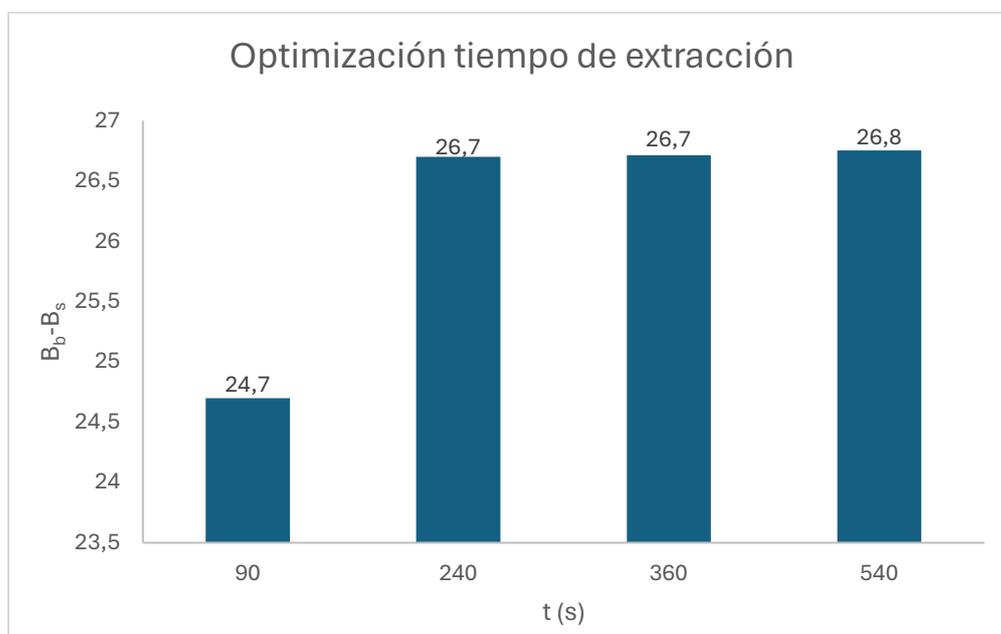
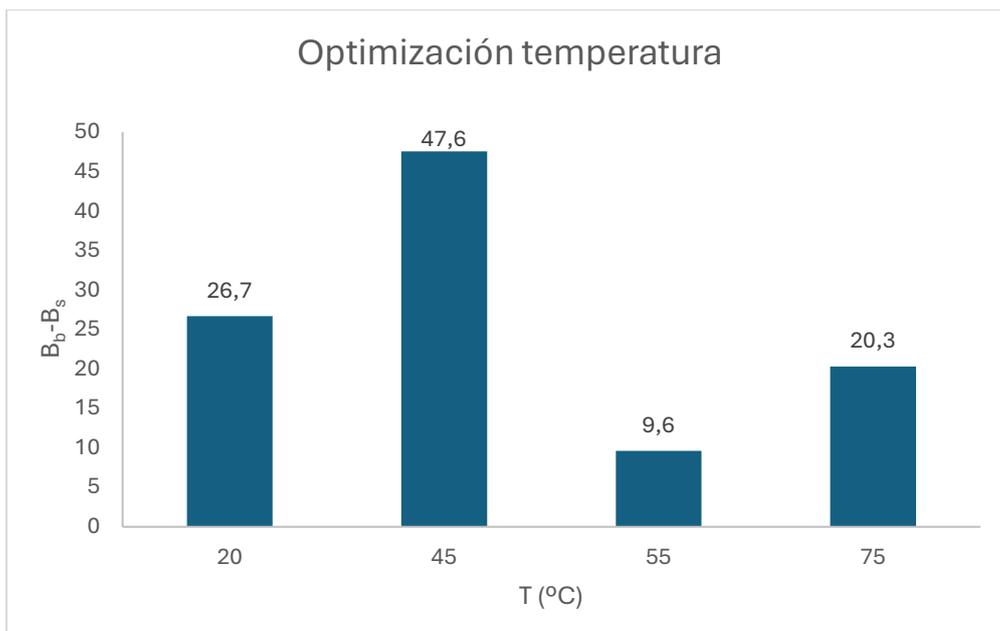


Figura 4 Análisis de patrón  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$  para tiempos de extracción de 90, 240, 360 y 540 s.

## 5.3. Optimización de la temperatura de extracción.

En el caso de la optimización de la temperatura, se realizaron cuatro análisis del patrón de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$  a 20, 45, 55 y  $75^\circ\text{C}$ , obteniendo los resultados reflejados en la Figura 5.



*Figura 5 Análisis de patrón 100 mg L<sup>-1</sup> de S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup> realizando la extracción a 20, 45, 55 y 75°C*

Para temperaturas superiores a 45°C se observó una disminución en la señal analítica debido a la condensación del vapor de agua tras calentar a altas temperaturas. Esto provocaba un empañamiento del cristal del vial, lo que dificultaba el análisis posterior del software de ImageJ que interpretaba dicha condensación como píxeles blancos, los cuales aumentaban la señal B<sub>s</sub> y, por tanto, disminuía la señal B<sub>b</sub>-B<sub>s</sub>.

Además, el vapor de agua también provocaba la dilución de la disolución del papel de microextracción, desencadenando la aparición de manchas irregulares del complejo, lo cual también impedía la realización del posterior análisis en el ordenador de la fotografía tomada.

Por ello se tomó como temperatura óptima 45°C.



*Imagen 1 Análisis de patrón de 100 mg L<sup>-1</sup> de S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup> en baño de agua a 75°C. En la imagen se observa la condensación del vapor de agua en el vial y la formación de manchas irregulares en el papel de extracción.*

#### 5.4. Calibrado por Patrón Externo

Para el calibrado por patrón externo de metabisulfito se analizaron disoluciones patrones de concentraciones crecientes de 20 a 250 mg L<sup>-1</sup> (20, 50, 100, 200, 250 mg L<sup>-1</sup>). El ajuste por mínimos cuadrados dio como resultado la recta  $B_b - B_s = (0,08 \pm 0,01 \text{ mg}^{-1} \text{ L}) \cdot C (\text{mg L}^{-1}) + (1,05 \pm 1,32)$  con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0,9877$ .

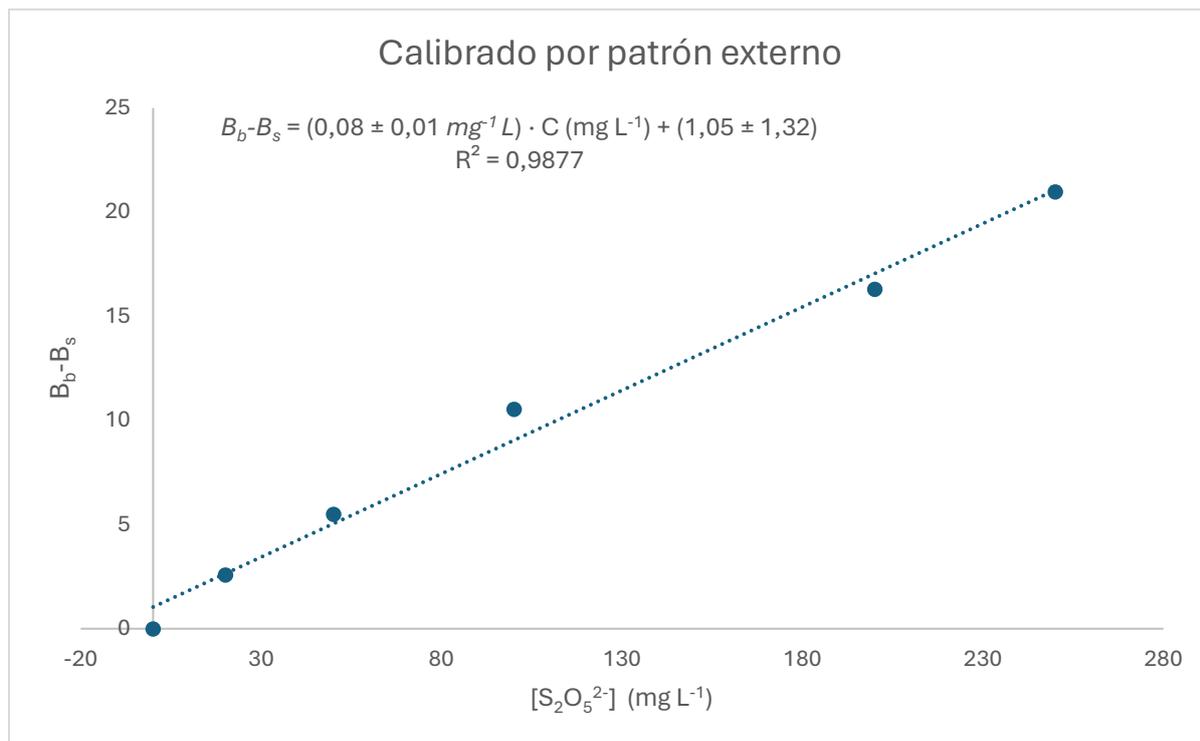


Figura 6 Recta de calibrado por patrón externo de metabisulfito. Representación gráfica de  $B_b - B_s$  frente a la concentración de los patrones ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

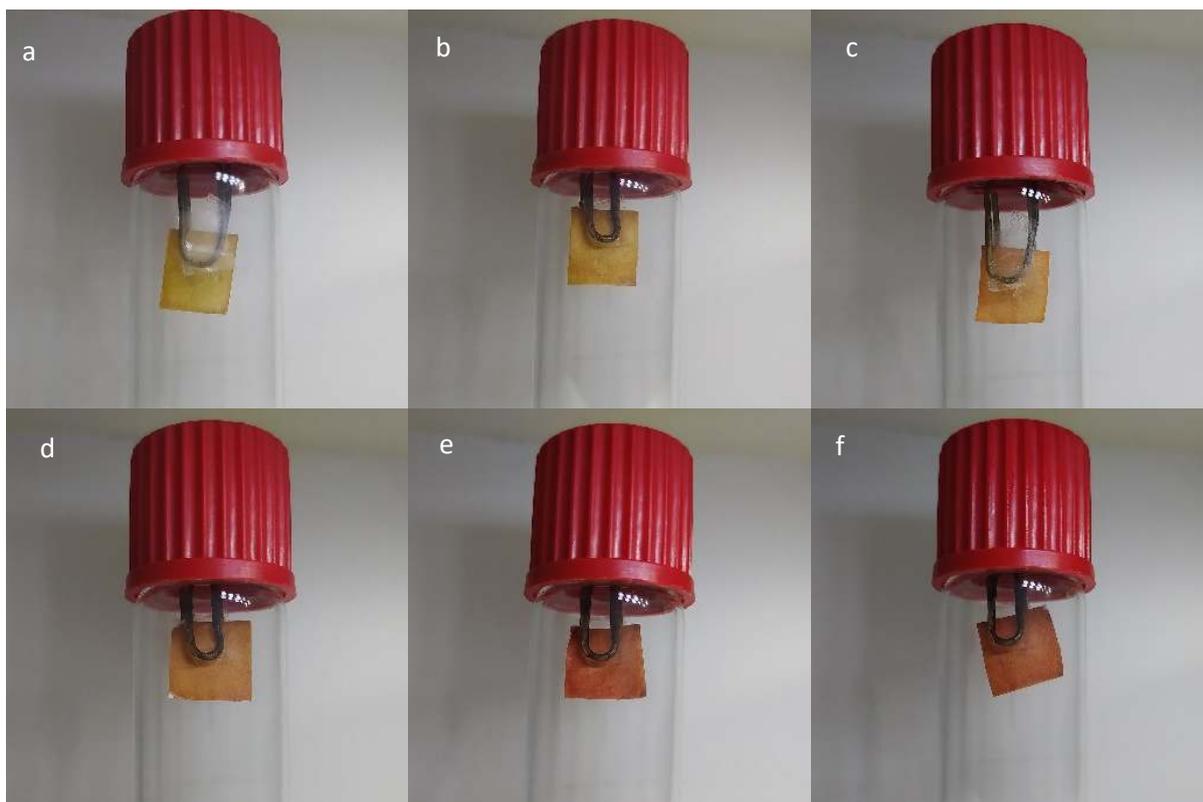


Imagen 2 Imágenes tomadas por el dispositivo Redmi Note 8T y procesadas en ImageJ de los análisis de disoluciones patrón para el calibrado. (a) Blanco de procedimiento; (b) patrón 20 mg L<sup>-1</sup>; (c) patrón 50 mg L<sup>-1</sup>; (d) patrón 100 mg L<sup>-1</sup>; (e) patrón 200 mg L<sup>-1</sup>; (f) patrón 250 mg L<sup>-1</sup>.

## 5.5. Determinación de sulfitos en muestras de sidra asturiana y vinagre.

Para la determinación de sulfitos en muestras, se analizó por triplicado sidra con sulfitos añadidos, sidra sin sulfitos añadidos y vinagre preparado a partir de sidra sin sulfitos añadidos. Las concentraciones se obtuvieron a partir de la recta de calibrado adquirida en el apartado anterior [Figura 6].

### 5.5.1. **Muestras de sidra con sulfitos añadidos.**

El análisis de las muestras de sidra con sulfitos añadidos dio como resultados los siguientes expresados en la Tabla 2, siendo  $C_{\text{vial}}$  la concentración promedio en la muestra analizada contenida en el vial en unidades de mg L<sup>-1</sup> y  $C_{\text{botella}}$  la concentración en mg L<sup>-1</sup> de sulfitos en la botella de sidra, de donde se tomó la muestra de 6,5 mL.

Tabla 2 Resultados del análisis por triplicado de muestra de sidra asturiana casera con sulfitos añadidos.

	$B_b - B_s$	$C$ (mg L <sup>-1</sup> )	$C_{\text{vial}}$ (mg L <sup>-1</sup> )	$C_{\text{botella}}$ (mg L <sup>-1</sup> )
1	19,3	227	218 ± 9	235 ± 9
2	17,7	208		
3	18,5	217		

Como se señaló en la introducción, la sidra provista para el análisis es casera, y por ello se conoce la cantidad de sulfitos que fue añadida durante su producción. La concentración de sulfitos esperada en

la muestra analizada es de 80 mg L<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos tras el ensayo reflejan unos valores notablemente lejanos de la concentración real. Esto puede justificarse en un error en la producción, dado que esta no es llevada a cabo por un profesional, o el fallo puede originarse en el propio análisis.

Asimismo, la concentración obtenida supera los límites legales reflejados en el Reglamento 1129/2011<sup>8</sup>, por lo que la sidra analizada no podría ser comercializada y su consumo podría tener consecuencias para la salud en personas alérgicas.

### 5.5.2. Muestras de sidra sin sulfitos añadidos.

De forma análoga se calculó la concentración de sulfitos en las muestras de sidra sin aditivos.

Tabla 3 Resultados del análisis por triplicado de muestra de sidra asturiana casera sin sulfitos añadidos.

	B <sub>b</sub> -B <sub>s</sub>	C (mg L <sup>-1</sup> )	C <sub>vial</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	C <sub>botella</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
1	15,2	176	192 ± 16	207 ± 16
2	17,7	207		
3	16,6	194		

No es incongruente que la sidra elaborada sin la adición de conservantes contenga sulfitos, debido a que estos pueden generarse naturalmente durante la fermentación alcohólica. Las levaduras pueden producir anhídrido sulfuroso durante dicho proceso por la vía sulfato-reductora, la cual toman cuando se agotan los azúcares necesarios para sintetizar alcohol<sup>17</sup>. Sin embargo, un resultado tan elevado puede significar la presencia de contaminación cruzada durante el análisis.

Por otro lado, la concentración obtenida para la muestra de sidra sin sulfitos también supera el límite legal. No obstante, cabe resaltar que, como se observa en la Tabla 3, los resultados presentan una gran incertidumbre, lo cual disminuye su fiabilidad, por lo que el valor real de sulfitos en la muestra podría ser inferior a los 200 mg L<sup>-1</sup> y poder comercializarse.

### 5.5.3. Muestras de vinagre

Por último, las muestras de vinagre preparado a partir de sidra sin sulfitos añadidos dieron los resultados de la Tabla 4.

Tabla 4 Resultados del análisis por triplicado de muestra de vinagre sin sulfitos añadidos.

	B <sub>b</sub> -B <sub>s</sub>	C (mg L <sup>-1</sup> )	C <sub>vial</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	C <sub>botella</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
1	19,9	235	216 ± 23	232 ± 23
2	18,9	222		
3	16,2	189		

Al igual que para los resultados de las muestras de sidra sin sulfitos añadidos, el vinagre analizado también presenta sulfitos debido a la producción natural durante la fermentación alcohólica. No obstante, nuevamente, los resultados son notoriamente más altos de lo esperado, superando el valor de referencia legal, y con una incertidumbre elevada.

Si se comparan las imágenes tomadas durante los análisis de las muestras, se observa que el color resultante no es similar al obtenido tras el análisis del patrón de 200 mg L<sup>-1</sup> [Imagen 3]; sin embargo, la señal analítica que dieron como resultado y, por tanto, la concentración sí. Según el estudio publicado por *Attari A. et al.*<sup>18</sup>, donde emplean la misma reacción para la determinación de SO<sub>2</sub> con una detección espectrofotométrica, durante el análisis puede tener lugar una alteración en la absorción del blanco residual por la formación de un complejo dimérico de Fe(III) con la fenantrolina, el cual tiene un color marrón amarillento.

La obtención de concentraciones tan elevadas de sulfitos en las muestras, de acuerdo con el estudio de interferencias de *Shahvar et al.*<sup>16</sup>, puede ser causada por la presencia de especies capaces de reducir el Fe (III) en la muestra produciendo el complejo coloreado al igual que los sulfitos. Una de estas especies es sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), producido al igual que el dióxido de azufre de forma natural por las levaduras durante la fermentación.<sup>19</sup>

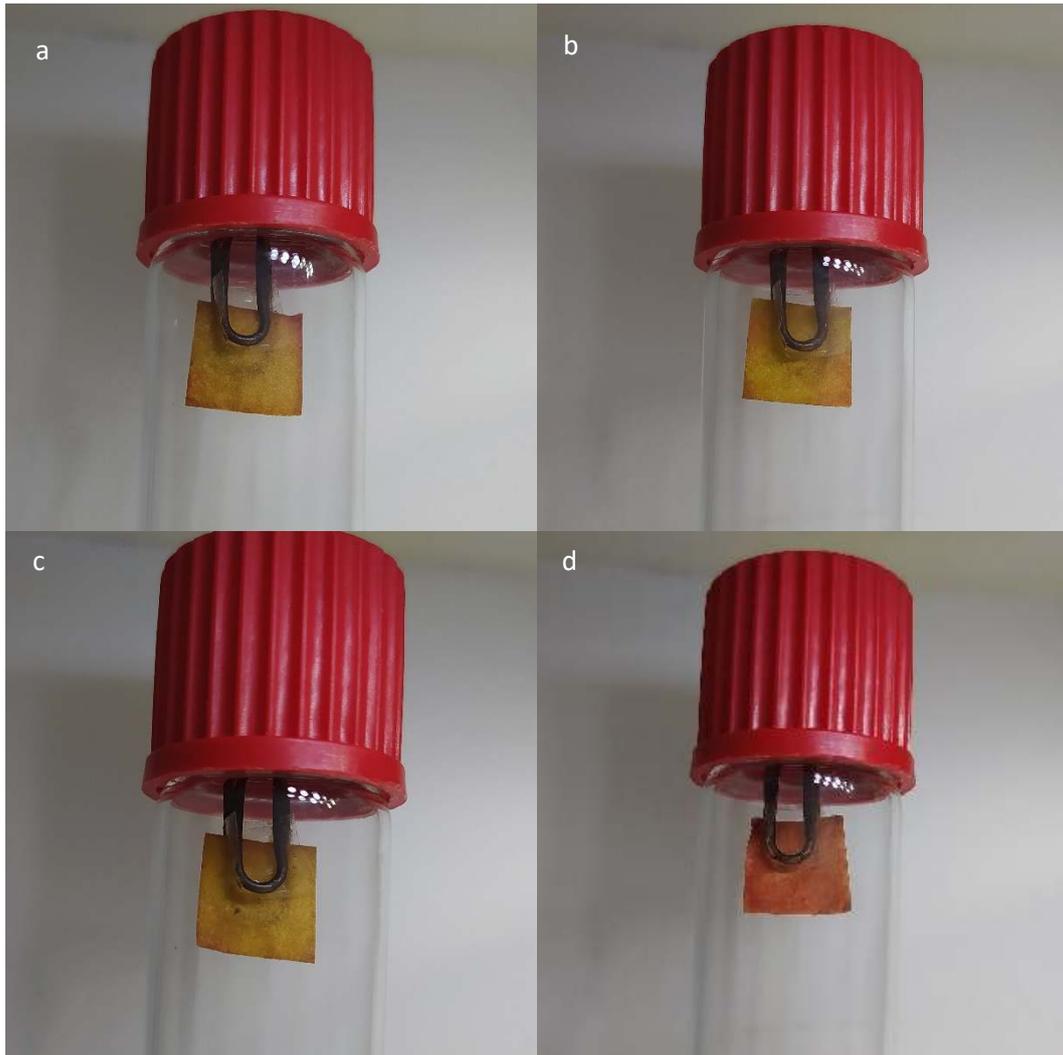


Imagen 3 Imágenes tomadas por el dispositivo Redmi Note 8T y procesadas en ImageJ para el análisis de muestras comparadas con la del patrón de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ . (a) muestra de sidra casera con sulfitos añadidos; (b) muestra de sidra casera sin sulfitos añadidos; (c) muestra de vinagre preparada a partir de sidra sin sulfitos añadidos; (d) patrón  $200 \text{ mg L}^{-1}$ .

## 5.6. Cálculo de errores

Se realizó el cálculo de los errores de la pendiente (b) y la ordenada en el origen (a) de la recta de regresión representada en la Figura 6. Para ello, se calculó en primer lugar la desviación estándar de los residuos de  $y$ ,  $S_{y/x}$ , siguiendo la Ecuación 1<sup>20</sup> donde  $n$  es el número de puntos experimentales,  $y_i$  son los residuos de  $y$ ,  $\hat{y}_i$  son los residuos de  $y$  corregidos calculados sustituyendo las concentraciones ( $x$ ) en la ecuación de la recta de calibrado.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Una vez calculado este parámetro estadístico, se calculan las desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen de acuerdo con la Ecuación 2 y Ecuación 3<sup>20</sup> respectivamente, donde  $x_i$  son los residuos de  $x$  y  $\bar{x}$  es el promedio de los residuos de  $x$ .

$$s_b = \frac{sy/x}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 2

$$s_a = sy/x \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 3

Finalmente, el error de la pendiente y el de la ordenada en el origen se obtuvieron con la Ecuación 4 y Ecuación 5<sup>20</sup>, donde  $\Delta_b$  es el error de la pendiente,  $\Delta_a$  el de la ordenada en el origen y  $t_{p,(n-2)}$  es el valor estadístico de la distribución t de Student seleccionado para un grado de confianza de 90% y 3 grados de libertad (n-2).

$$\Delta_a = s_a \cdot t_{p,(n-2)}$$

Ecuación 4

$$\Delta_b = s_b \cdot t_{p,(n-2)}$$

Ecuación 5

Por lo tanto, el error obtenido  $\Delta_b = 0,01 \text{ mg}^{-1}\text{L}$  y  $\Delta_a = 1,32$ . El valor de la incertidumbre de la ordenada en el origen obtenido es mayor que el propio resultado de la ordenada en el origen obtenido en la regresión lineal ( $a = 1,05$ ), esto no es sorprendente debido a que el coeficiente de correlación entre los puntos del calibrado no es óptimo ( $R^2 = 0,9877$ ).

### 5.7. Determinación de los límites de detección y cuantificación.

Los límites de detección y cuantificación se calculan mediante la Ecuación 6 y la Ecuación 7 respectivamente siendo  $b$  la pendiente de la recta de calibrado representada en la Figura 6 y  $s_0$  una desviación estándar.

$$LOD = \frac{3s_0}{b}$$

Ecuación 6

$$LOQ = \frac{10s_0}{b}$$

Ecuación 7

La desviación estándar que se debe utilizar se trata de la correspondiente a los valores obtenidos en el análisis de varios blancos de procedimiento. Debido a que durante la parte experimental de la memoria no se realizó un estudio de réplicas del blanco, la desviación estándar tomada fue la de las muestras analizadas del patrón de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  suponiendo que este sea un valor cercano al LOD. Esta aproximación suele emplearse en métodos como la cromatografía, donde no se puede obtener una señal para el blanco, puesto que esta se encuentra en el ruido.<sup>21</sup>

Por lo tanto, el LOD calculado fue de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , y el LOQ  $16 \text{ mg L}^{-1}$ . Con el resultado obtenido para el LOQ, se puede afirmar que con la metodología desarrollada no es posible comprobar el cumplimiento de la legislación, puesto que este es superior a los  $10 \text{ mg L}^{-1}$  que el Reglamento 1169/2011<sup>9</sup> estipulaba como referencia a partir de la cual se debía informar al consumidor del contenido en sulfitos de la sidra.

Estos parámetros son notablemente superiores a los obtenidos en el estudio de *Shahvar et al.*, donde se obtuvo un LOD de  $0,04 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  y un LOQ de  $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>16</sup>

## 6. Conclusiones

El desarrollo de esta memoria tiene como objetivos determinar la concentración de sulfitos en muestras de sidra con sulfitos añadidos, sidra sin sulfitos añadidos y vinagre preparada a partir de sidra sin sulfitos añadidos y calcular los valores de LOD y LOQ del método.

La técnica analítica propuesta ha cumplido con los objetivos propuestos, siendo los valores de concentraciones de sulfitos en muestras obtenidos  $235 \text{ mg L}^{-1}$  en el caso de la sidra con sulfitos añadidos,  $207 \text{ mg L}^{-1}$  para la sidra sin sulfitos añadidos y  $232 \text{ mg L}^{-1}$  en vinagre de sidra sin sulfitos añadidos. El LOD calculado fue  $5 \text{ mg L}^{-1}$  y el LOQ,  $16 \text{ mg L}^{-1}$ .

Sin embargo, el hecho de que todas las muestras presenten concentraciones superiores al límite legal y que la incertidumbre de los resultados sea tan elevada indica una incongruencia en los resultados. Pese a que en un primer momento se atribuyó el origen de la incoherencia a un error durante la producción y la adición de los conservantes, el hecho de que los resultados obtenidos para las muestras sin aditivos también fueran elevados hizo que se descartara la hipótesis.

Tras una revisión bibliográfica, se concluyó que la obtención de resultados superiores a lo esperado podría originarse en la presencia de interferencias capaces de reducir el Fe (II) y aumentar la señal analítica, como el  $\text{H}_2\text{S}$  generado por levaduras.

En cuanto a los elevados valores obtenidos en la incertidumbre del análisis de muestras, estos pueden justificarse en la alteración del color del papel de la microextracción por la formación de complejos diméricos de Fe (III) y fenantrolina, lo que dificulta el posterior procesamiento de la imagen en el programa ImageJ y afecta a la repetitividad del ensayo. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo un estudio más detallado al respecto, realizando un calibrado por adiciones estándar.

Por otro lado, los resultados de LOD y LOQ demuestran que el método no es lo suficientemente sensible como para comprobar el cumplimiento de la legislación sobre el etiquetado de la sidra. Pese a ser una técnica sencilla y verde, no cumple con las expectativas planteadas.

## 7. Bibliografía

- (1) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological Review of Sulfur Anhydride* [Hoja Informativa]; 1998. [www.atsdr.gov/es/](http://www.atsdr.gov/es/).
- (2) Carlos Barros. *Los Aditivos En La Alimentación de Los Españoles y La Legislación Que Regula Su Autorización y Uso*, 2nd ed.; Vision Net, 2009; Vol. 2, pp 62–63
- (3) Divol, B.; Du Toit, M.; Duckitt, E. Surviving in the Presence of Sulphur Dioxide: Strategies Developed by Wine Yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2012**, *95* (3), 601–613. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4186-x>.
- (4) Freese, E.; Schew, C.; Galliers, E. Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives. *Nature* **1973**, *241*, 321–325. <https://doi.org/10.1038/241321a0>.
- (5) Schimz, K.-L. The Effect of Sulfite on the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Archives of Microbiology* **1980**, *125*, 85–89. <https://doi.org/10.1007/bf00403203>.
- (6) Schimz, K.-L.; Holzer, H. Rapid Decrease of ATP Content in Intact Cells of *Saccharomyces Cerevisiae* after Incubation with Low Concentrations of Sulfite. *Archives of Microbiology* **1979**, *121*, 225–229. <https://doi.org/10.1007/bf00425059>
- (7) González Mancebo, E.; Carrascosa, J. V. C.; Miranda, E. E.; Pulido Marrero, Z. Reacciones Adversas a Los Aditivos Alimentarios. In *Tratado de Alergología*; Ergon, 2007; Vol. 2, pp 1013–1014.
- (8) Unión Europea. *Reglamento (UE) N° 1129/2011* del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008. Diario Oficial de la Unión Europea. 2011; L295: 1-177.
- (9) Unión Europea. *Reglamento (UE) N° 1169/2011* del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. Diario Oficial de la Unión Europea. 2011; L304: 18-63.
- (10) Hillery, B. R.; Elkins, E. R. Optimized Monier-Williams Method for Determination of Sulfites in Foods: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* **1989**, *72* (3), 470–475.
- (11) Ashmore, P. L.; Valdez, F.; Harbertson, J. F.; Boulton, R. B.; Collins, T. S. Rapid Determination of Free Sulfur Dioxide in Wine and Cider by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **2023**, *1695*, 463936. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463936>.

- (12) Silva, R. L. G. N. P.; Silva, C. S.; Nóbrega, J. A.; Neves, E. A. Flow Injection Spectrophotometric Determination of Free and Total Sulfite in Wines Based on the Induced Oxidation of Manganese (II). *Analytical Letters* **1998**, *31* (13), 2195–2208. <https://doi.org/10.1080/00032719808005296>.
- (13) Decnop-Weever, L. G.; Kraak, J. C. Determination of Sulphite in Wines by Gas-Diffusion Flow Injection Analysis Utilizing Spectrophotometric PH-Detection. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *337*, 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)00421-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00421-7)
- (14) Edberg, U.; Anttonen, M.-L.; Berg-Nilsen, K.; Blomberg, K.; Gjerstad, Karl O.; Gustavsson, T.; Loimaranta, J.; Mustranta, A.; Oksanen, M.; Pero, L.; Sonsterud, B. Enzymatic Determination of Sulfite in Foods: NMKL 1 Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International* **1993**, *76* (1), 53–58.
- (15) Theisen, S.; Hänsch, R.; Kothe, L.; Leist, U.; Galensa, R. A Fast and Sensitive HPLC Method for Sulfite Analysis in Food Based on a Plant Sulfite Oxidase Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *26* (1), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.009>.
- (16) Shahvar, A.; Saraji, M.; Gordan, H.; Shamsaei, D. Combination of Paper-Based Thin Film Microextraction with Smartphone-Based Sensing for Sulfite Assay in Food Samples. *Talanta* **2019**, *197*, 578–583. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.071>.
- (17) Werner, M.; Rauhut, D.; Correreau, P. LEVADURAS Y PRODUCCIÓN NATURAL DE ANHÍDRIDO SULFUROSO. *Infowine* **2009**, *9* (2).
- (18) Attari, A.; Igielski, T. P.; Jaselskis, B. Spectrophotometric Determination of Sulfur Dioxide. *Analytical Chemistry* **1970**, *42*, 1282–1285.
- (19) Walker, M. E.; Zhang, J.; Sumbly, K. M.; Lee, A.; Houlès, A.; Li, S.; Jiraneck, V. Sulfate Transport Mutants Affect Hydrogen Sulfide and Sulfite Production during Alcoholic Fermentation. *Yeast* **2021**, *38* (6), 367–381. <https://doi.org/10.1002/yea.3553>.
- (20) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría Para Química Analítica*, 4th ed.; Prentice Hall, 2002
- (21) Magnusson, B.; Örnemark, U. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed.; 2014.

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo 1

Tabla 5: Anexo 1; valores obtenidos en el calibrado analizando cada patrón por triplicado calculando su desviación estándar y su coeficiente RSD. En esta tabla no se incluyó el blanco por no haberse analizado por triplicado.

[S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sup>2-</sup> ] (mg L <sup>-1</sup> )	Blanco	Muestra	B <sub>b</sub> -B <sub>s</sub>	Promedio	S <sub>d</sub>	RSD (%)
20	62,2	59,8	2,4	2,6	0,1	5
	62,2	59,5	2,7			
	62,2	59,6	2,6			
50	62,2	57,8	4,4	5,5	1,0	17
	62,2	56,4	5,8			
	62,2	55,9	6,3			
100	62,2	51,0	11,2	10,5	0,8	8
	62,2	52,3	9,9			
	62,2	52,4	9,8			
200	62,2	45,1	17,1	16,3	3,2	20
	62,2	49,4	12,8			
	62,2	43,1	19,1			
250	62,2	42,6	19,7	21,0	1,2	6
	62,2	40,1	22,0			
	62,2	41,0	21,2			

### 8.2. Anexo 2

Tabla 6: Anexo 2; cálculos realizados para el cálculo de los errores de la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de calibrado.

	C (mg L <sup>-1</sup> ) = x	B <sub>b</sub> -B <sub>s</sub> = y	$\hat{y}$	$y - \hat{y}$	$y - \bar{y}$	$(y - \bar{y})^2$	$x - \bar{x}$
	0	0,0	1,0	-1,0	-9,3	86,9	-103
	20	2,6	2,7	-0,1	-6,7	45,3	-83
	50	5,5	5,1	0,5	-3,8	14,6	-53
	100	10,5	9,1	1,5	1,2	1,5	-3
	200	16,3	17,1	-0,7	7,0	48,8	97
	250	21,0	21,1	-0,1	11,7	136,0	147
media	103	9,3					
suma cuadrados	115400			4,1			51333

S <sub>x/y</sub>	1,011
S <sub>b</sub>	0,004
S <sub>a</sub>	0,619

$\Delta_b$	0,01
$\Delta_a$	1,32

90% confianza	
p	0,950
n	6
t	2,1318

Donde p se calculó siguiendo la Ecuación 8.

$$p = \frac{1 + \frac{\% \text{ confianza}}{100}}{2}$$

*Ecuación 8*