

**Universidad Pública de Navarra
ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

*Nafarroako Unibertsitate Publikoa
NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

**Verificación de un equipo de análisis rápido de
determinación de dióxido de azufre en alimentos**

presentado por:

Virginia Izuriaga Escudero


**MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS
AGROALIMENTARIAS**

**TEKNOLOGIA ETA KALITATEA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN
INDUSTRIETAN MASTERRA**

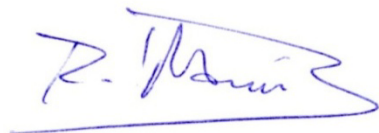
Septiembre, 2014

Montserrat Navarro Huidobro y Remedios Marín Arroyo, directoras del Trabajo Fin de Máster titulado **Verificación de un equipo de análisis rápido de determinación de dióxido de azufre en alimentos,** autorizan su presentación a la alumna **Virginia Izuriaga.**

Pamplona, 10 de septiembre de 2014



Fdo: Montserrat Navarro Huidobro



Fdo.: Remedios Marín Arroyo

RESUMEN

El dióxido de azufre es uno de los conservantes más empleados en la industria agroalimentaria. Debido a sus propiedades antioxidantes, antioxidásico, estabilizantes y antimicrobianas, se utiliza para la conservación de productos como el vino, zumos, mermeladas y derivados vegetales. El uso sistemático de SO_2 ha permitido mejorar considerablemente la calidad de diferentes productos y mantener sus características peculiares evitando que se produzcan pérdidas en parámetros de calidad.

Es fundamental conocer el contenido de SO_2 presente en los diferentes alimentos tanto desde el punto de vista técnico como legislativo. La legislación impone límites precisos al contenido total de dióxido de azufre por sus efectos de toxicidad en el consumidor, entre otros. Por ejemplo, en la Unión Europea, está regulado el contenido máximo permitido para los vinos secos es de 160 mg/l para el vino tinto, 210 mg/l para el blanco y rosado por la Normativa CEE 1493/99. En el caso de las conservas vegetales, el contenido máximo fijado es de 50 mg/L según el Reglamento (CE) Nº 1333/2008 del Parlamento Europeo Y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentario. Aquellos productos que superen estos valores no pueden ser comercializados. En España, el uso del dióxido de azufre y los sulfitos se permite en determinadas condiciones, en una amplia variedad de alimentos. La reglamentación española aplicable es el RD 142/2002 y su modificación, RD 1118/2007, referente a los aditivos distintos de los colorantes y edulcorantes.

Por lo tanto, las industrias agroalimentaria, deben saber la cantidad de sulfuroso que deben añadir a sus productos y para ello necesitan sistemas de medición del mismo. Los métodos oficiales son largos y costosos y muchas veces pueden ser causa de errores humanos por su dificultad. Por todo esto se plantea la necesidad de encontrar métodos más rápidos, sencillos y precisos y que no estén sujetos a errores por parte del operario.

Así se planteó la necesidad de verificar un equipo de determinación rápida de sulfuroso en dos tipos de alimentos (vinos y conservas vegetales) mediante comparación con los métodos oficiales. Para cumplir con los objetivos previstos, se realizó una comparación de la exactitud y de la precisión entre ambos métodos. Se

siguieron las indicaciones dadas por la Resolución OENO 10/2005 de la OIV y norma UNE 82009-6 utilizando la metodología de comparación del método alternativo con el de referencia.

El equipo de determinación rápida, es un sistema HANNA para el análisis de sulfuroso tanto libre como total que se basa en una valoración yodométrica rápida. Este equipo se verificó mediante comparación con el método de referencia CE 2676/90 para la determinación de sulfitos en vinos y el método oficial Monier-William para determinación de sulfitos en alimentos (AOAC 990.28)

Las matrices que se utilizaron pertenecen a dos tipos de alimentos diferentes. Por un lado, vinos secos tanto tintos como blancos de diferentes años, procedencia y variedades y por otro lado conservas vegetales como legumbres y encurtidos.

Tras el estudio de exactitud se pudo comprobar un posible efecto matriz entre las variedades de vinos puesto que había una buena correlación lineal en el análisis del sulfuroso total y libre en vinos tintos y una correlación peor en los vinos blancos - mostrando los resultados posibles diferencias de especificidad entre los procedimientos de medida comparados en el análisis del dióxido de azufre libre en los vinos blancos.

Además, el equipo es válido para medir el dióxido de azufre total en conservas vegetales tanto en encurtidos como en legumbres puesto que el estudio de veracidad no muestra diferencias significativas en los resultados obtenidos por ambos métodos de análisis -.

1.	ANTECEDENTES	1
1.1.	Los sulfitos en los alimentos	1
1.2.	Efectos producidos por los sulfitos en la salud	5
1.3.	Los sulfitos en el vino y conservas.....	7
1.4.	Métodos de análisis de sulfitos	11
1.5.	Validación del método analítico.....	17
2.	OBJETIVOS	21
3.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
3.1.	Análisis de dióxido de azufre en vino.....	23
3.2.	Análisis de dióxido de azufre en conservas vegetales.....	23
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
4.1.	Materias primas	25
4.2.	Pre- tratamiento de las muestras.....	26
4.3.	Métodos de análisis	27
4.4.	Análisis estadístico	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1.	Verificación del método alternativo de determinación de dióxido de azufre en vinos.....	33
5.2.	Verificación del método alternativo para la determinación de dióxido de azufre en conservas vegetales	63
6.	CONCLUSIONES.....	75
7.	BIBLIOGRAFÍA	77
8.	ANEJOS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.Diferentes aditivos de sulfitos.	2
Tabla 1.2.Cantidades establecidas de aditivo SO ₂ en diferentes alimentos.	4
Tabla 1.3.Metodologías alternativas para la medición de SO ₂ .	12
Tabla 4.1.Muestras de vino y sus características.	25
Tabla 4.2.Muestra de conservas.	26
Tabla 5.1.Resultados del contenido de sulfuroso libre (mg/l) obtenidos por los dos métodos objetos de estudio en vino.	33
Tabla 5.2.Resultados del contenido de sulfuroso total (mg/l) obtenidos por los dos métodos objetos de estudio en vino.	34
Tabla 5.3.Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino.	36
Tabla 5.4.Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino.	38
Tabla 5.5.Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino.	43
Tabla 5.6. Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino.	44
Tabla 5.7.Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino blanco.	47
Tabla 5.8.Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino blanco.	48
Tabla 5.9.Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino blanco.	51
Tabla 5.10.Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino blanco.	53
Tabla 5.11.Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino tinto.	55
Tabla 5.12.Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino tinto.	56
Tabla 5.13. Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino tinto.	60

Tabla 5.14.Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino tinto.	62
Tabla 5.15. ANOVA realizado para el contenido en dióxido de azufre total (media ± desviación estándar; mg/l) en muestras de encurtidos	64
Tabla 5.16. ANOVA realizado para el contenido en dióxido de azufre total (media ± desviación estándar; mg/l) en muestras de legumbres.	64
Tabla 5.17.Resultados del contenido de sulfuroso total (mg/l) obtenidos por los dos métodos objetos de estudio en encurtidos.	65
Tabla 5.18.Resultados del contenido de sulfuroso total (mg/l) obtenidos por los dos métodos objetos de estudio en legumbres.	65
Tabla 5.19.Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de encurtidos.	66
Tabla 5.20.Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de encurtidos.	68
Tabla 5.21.Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de legumbres.	70
Tabla 5.22.Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de legumbres.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Diferentes tipos de sulfitos y su disociación en medio acuoso.	3
Figura 1.2. Diferentes formas de SO ₂ al pH del vino.	8
Figura 1.3. Control del proceso de vinificación mediante la adición de SO ₂ .	9
Figura 3.1. Diseño experimental para el análisis de vino.	23
Figura 3.2. Diseño experimental para el análisis de conservas vegetales.	24
Figura 4.1. Aparato para la determinación del dióxido de azufre según F. Paul.	28
Figura 4.2. Aparato de destilación.	29
Figura 4.3. Equipo de Hanna Instruments HI 8500 para determinar el SO ₂ .	30
Figura 5.1. Representación de la recta de regresión de sulfuroso libre en vino.	39
Figura 5.2. Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en vino.	41
Figura 5.3. Representación de diferencias absolutas de sulfuroso libre en vino.	43
Figura 5.4. Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso libre en vino.	44
Figura 5.5. Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en vino.	45
Figura 5.6. Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en vino.	46
Figura 5.7. Representación de la recta de regresión de sulfuroso libre en vino blanco.	49
Figura 5.8. Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en vino blanco.	50

Figura 5.9. Representación de diferencias absolutas de sulfuroso libre en vino blanco.	52
Figura 5.10. Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso libre en vino blanco.	53
Figura 5.11. Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en vino blanco.	54
Figura 5.12. Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en vino blanco.	55
Figura 5.13. Representación de la recta de regresión de sulfuroso libre en vino tinto.	58
Figura 5.14. Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en vino tinto.	59
Figura 5.15. Representación de diferencias absolutas de sulfuroso libre en vino tinto.	61
Figura 5.16. Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso libre en vino tinto.	61
Figura 5.17. Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en vino tinto.	62
Figura 5.18. Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en vino tinto.	63
Figura 5.19. Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en encurtido.	67
Figura 5.20. Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en encurtidos.	69
Figura 5.21. Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en encurtidos.	69
Figura 5.22. Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en legumbres.	71
Figura 5.23. Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en legumbres.	73
Figura 5.24. Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en legumbres.	73

1. ANTECEDENTES

1.1. Los sulfitos en los alimentos

Los sulfitos son las sales inorgánicas o ésteres del ácido sulfuroso (H_2SO_3) que contienen el anión SO_3^{2-} , siendo los más importantes el sulfito de sodio y el sulfito de magnesio. Estas sales se forman cuando se ponen en contacto el óxido de azufre (IV) (SO_2) con disoluciones alcalinas. Se tratan de sustancias reductoras pasando el azufre del estado de oxidación +IV a +VI.

Tienen propiedades conservantes y antioxidantes. Los compuestos capaces de producir sulfito, llamados agentes, se utilizan como aditivos alimentarios para prevenir reacciones enzimáticas y reacciones de pardeamiento no enzimático así como para controlar el crecimiento de microorganismos y actuar como antioxidantes. Entre los agentes de sulfito se incluyen el dióxido de azufre, sulfato de sodio, sodio y bisulfito de potasio, y metabisulfitos.

El sulfito es un aditivo conservante eficaz y de bajo coste utilizado para la conservación de los vinos y otros alimentos. Al proporcionar la estabilización y funciones de acondicionamiento, mejora la apariencia y mantiene su calidad (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

Aditivo alimentario es toda sustancia que normalmente no se consume como alimento en sí misma ni se use como ingrediente característico de los alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada – con un propósito tecnológico – a un alimento durante su fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento tenga por efecto, o quepa razonablemente prever que tenga por efecto, que el propio aditivo o sus subproductos se conviertan directa o indirectamente en un componente del alimento. (Reglamento CE N° 1333/2008).

Los aditivos figuran en el etiquetado de los alimentos, bien por su nombre o bien por su número E. De esta manera, el etiquetado proporciona información al consumidor que le va a permitir elegir o evitar consumir alimentos que contengan determinados aditivos. El hecho de que un aditivo tenga un número E asignado da garantías de que el aditivo ha pasado controles de seguridad y que ha sido aprobado para su uso en la Unión Europea. (AECOSAN: Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición).

El anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre ha sido ampliamente utilizado a lo largo de la historia debido a sus múltiples funciones. En la antigua Grecia parece documentado que la ropa de los enfermos tras ser lavada era espolvoreada con azufre y puesta al sol para desinfectarla ya que las partículas de azufre expuestas al sol desprenden dióxido de azufre. También los egipcios y romanos quemaban azufre para producir dióxido de azufre y limpiar el utillaje para la elaboración del vino y sus vasijas

de almacenaje. En agricultura, desde tiempos remotos, se ha usado el azufre para proteger las plantas contra algunas plagas. Las partículas de azufre que se depositan sobre las hojas por efecto del sol se transforman también en dióxido de azufre.

En la actualidad, los agentes sulfitantes (E220 a E228) que incluyen el dióxido de azufre (SO₂, E220) y distintos sulfitos inorgánicos que generan SO₂ con el que coexisten en distintas proporciones dependiendo de las condiciones del medio, pueden encontrarse en bebidas y alimentos como aditivos conservantes. Su mecanismo de acción es antimicrobiano mediante la inhibición del deterioro provocado por bacterias, mohos y levaduras, así como antioxidante, evitando las reacciones de pardeamiento, tanto enzimático como no enzimático que tiene lugar durante el procesamiento de los alimentos o el almacenamiento de los mismos. (Mischek, D., 2011).

Concretamente, dentro de los aditivos de sulfitos encontramos diferentes compuestos que se pueden identificar desde E-220 hasta E-228. A continuación se muestran en la tabla 1.1:

Tabla 1.1: Diferentes aditivos de sulfitos

Nº E	Denominación
E-220	Dióxido de azufre
E-221	Sulfito de sodio
E-222	Sulfito ácido de sodio
E-223	Metabisulfito sódico
E-224	Metabisulfito potásico
E-226	Sulfito de calcio
E-227	Sulfito ácido de calcio
E-228	Sulfito ácido de potasio

El dióxido de azufre (SO₂) es un gas incoloro, de olor sofocante, que se forma por la combustión del azufre, de los sulfuros o de la pirita. Algunas de sus propiedades físico-químicas son las siguientes:

- Es menos pesado que el aire.
- Se licúa a 15 °C con una presión de 2,72 bares.
- Hierve a -10 °C y se solidifica a -76 °C.
- Su peso específico es de 1,3960 a 15 °C y 1,4350 a 0 °C.

Es un aditivo auto limitante en su uso, es decir, por encima de una cierta dosis altera las características gustativas del producto. Es especialmente eficaz en medio ácido, inhibiendo bacterias y mohos, y en menor grado, levaduras. Actúa destruyendo la tiamina (vitamina B1), por lo que no debe usarse en aquellos alimentos que la aporten en una proporción significativa a la dieta, como es el caso de la carne; sin embargo, protege en cierto grado a la vitamina C. Durante el cocinado o procesado

industrial este tipo de conservantes se pierden en parte por evaporación o por combinación con otros componentes. El anhídrido sulfuroso y los sulfitos son muy utilizados para la conservación de zumos de uva, mostos y vinos, así como para la de la sidra y vinagre. También se utiliza como conservante en salsas de mostaza y especialmente en los derivados de fruta (zumos, etc.) que van a utilizarse como materia prima para otras industrias, de los que desaparece en su mayor parte durante el procesado posterior. (Mischek, D. 2011).

Los sulfitos actúan como antioxidantes, inhibiendo especialmente las reacciones de oscurecimiento producidas por ciertos enzimas en vegetales y crustáceos. Con este fin se autoriza su uso en conservas vegetales y aceitunas de mesa, cefalópodos congelados y crustáceos. En algunos países se utiliza para conservar el aspecto fresco de los vegetales que se consumen en ensalada. También puede utilizarse para mejorar el aspecto de la carne y dar impresión de mayor frescura, pero esta última práctica se considera un fraude, al engañar al comprador respecto a la calidad real. También es perjudicial en el aspecto nutricional al destruir la tiamina (vitamina B1) aportada en una gran proporción por la carne. Esta práctica está prohibida en muchos países, entre ellos en España (Jackowetz, Li, Mira de Orduña, 2012).

En la figura 1.1 se puede observar los diferentes tipos de sulfitos y su denominación así como la disociación en medio acuoso:

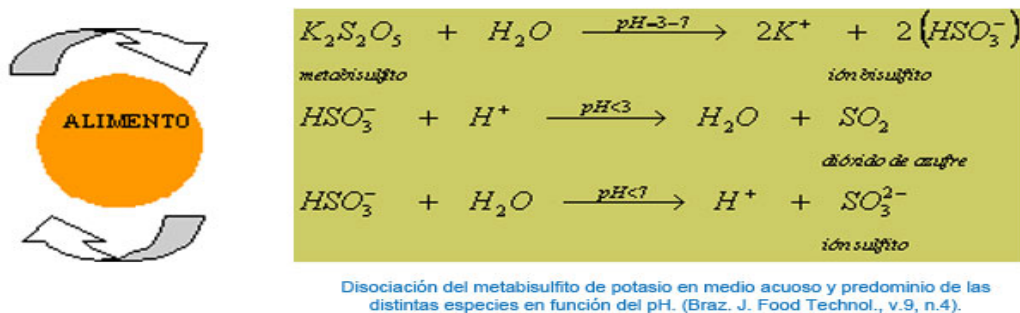


Figura 1.1: Diferentes tipos de sulfitos y su disociación en medio acuoso. Fuente: AECOSAN: Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición.

Existen diferentes formas de adicionar el sulfuroso a los alimentos:

Mediante sulfuroso en estado gaseoso, que se disuelve previamente en agua y se añade posteriormente. En este caso, se presenta en botellas o balas con el gas licuado.

- Mediante metabisulfito potásico ($K_2S_2O_5$) en polvo. En este caso hay que añadir el doble de cantidad de metabisulfito de la que realmente se necesite de sulfuroso. Esta forma de adición provoca un aumento de la concentración de potasio y puede dar problemas posteriores de estabilización.
- Mediante azufre puro en pastillas o mechas que se hacen arder. Principalmente se utiliza para la desinfección de las barricas y envases de madera.
- En disoluciones de bisulfito amónico ya preparadas. (Taylor,S.L.1986)

En España, el uso del dióxido de azufre y los sulfitos se permite en determinadas condiciones, en una amplia variedad de alimentos. La reglamentación española aplicable es el RD 142/2002 y su modificación, RD 1118/2007, referente a los aditivos distintos de los colorantes y edulcorantes.

Su uso se autoriza en alimentos diversos como galletas, siropes, productos de aperitivo, patata, vino y cerveza, productos vegetales frescos (uvas de mesa y lichis frescos), confituras y mermeladas, frutos secos, crustáceos, moluscos y carnes (longaniza fresca, butifarra fresca y salchicha fresca). Las dosis máximas permitidas dependen del alimento y comprenden un amplio rango de concentración, que oscila entre los 10 y los 2000 mg/kg de SO_2 . A continuación, en la tabla 1.2, se pueden observar las dosis permitidas de SO_2 en cada tipo de alimento:

Tabla 1.2: Cantidades establecidas de aditivo SO_2 en diferentes alimentos (Reglamento (CE) N°1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo)

Muestra	Nº E	Dosis Máxima (mg/l o mg/kg)
Frutas y hortalizas enteras frescas	E 220-228 Dióxido de azufre y sulfitos	10-100
Frutas y hortalizas en conservas	E 220-228 Dióxido de azufre y sulfitos	50
Confituras	E 220-228 Dióxido de azufre y sulfitos	100
Preparados de carne	E 220-228 Dióxido de azufre y sulfitos	450
Zumo de frutas	E 220-228 Dióxido de azufre y sulfitos	20-350
Vino convencional	E 220-228 Dióxido de azufre y sulfitos	200

La Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. (FDA) recomienda que debe haber etiquetas de advertencia en todos los alimentos que contengan más de 10 mg/kg de sulfito o cualquier bebida que contenga más de 10 mg/L de sulfito.

En enero de 2009 el Comité del Codex sobre aditivos alimentarios FAO/OMS evaluó el uso de sulfitos en alimentos, informando que la contribución a la ingesta total de sulfitos la realizan en mayor medida los siguientes alimentos: vino, jugos de fruta, refrescos, diversas formas de patatas elaboradas, fruta seca, nueces y embutidos, en general (Codex, 2014).

Se hace necesario su control, por varios motivos:

- Para asegurar el cumplimiento de la legislación.
- Debido a la pérdida del valor nutricional de algunos alimentos por la capacidad que tienen los sulfitos para descomponer la tiamina o vitamina B1 en sus componentes, tiazol y pirimidina.
- Debido a la toxicidad que poseen causando efectos nocivos para la salud. Por ejemplo, en personas sensibles (asmáticos), los sulfitos pueden provocar asma, que se caracteriza por las dificultades respiratorias, la respiración entrecortada, la sibilancia y la tos.

Hoy en día, existen distintos proyectos donde se buscan alternativas para reducir o sustituir el SO₂ en los distintos alimentos. Concretamente, el proyecto europeo "Replacement of sulphur dioxide in food keeling the same quality and shelf-life of the products" (SO₂SAY), que tiene como objetivo la búsqueda de alternativas y tecnologías innovadoras que permitan sustituir o reducir al máximo el empleo del dióxido de azufre (SO₂) en diversos alimentos como el vino, zumos o productos vegetales, ha iniciado recientemente sus trabajos de investigación en nuestro país.

El proyecto, iniciado en junio de 2009, persigue durante años, a través de ocho subproyectos que aglutinan 25 tareas, la sustitución del empleo del SO₂ a través de:

- La reducción del contacto con oxígeno a través de atmósferas modificadas en el envasado o mediante la utilización de recubrimientos comestibles para frutas y vegetales.
- El empleo de metabolitos obtenidos de diversas plantas como agentes antioxidantes y antimicrobianos.
- La inhibición de la polifenoloxidasas, responsable del pardeamiento enzimático en frutas y productos vegetales.

Todos los avances que se lleven a cabo irán acompañados por estudios sensoriales y de test realizados a los consumidores para garantizar la calidad organoléptica de los productos finales. Además se han aplicado tecnologías innovadoras en la elaboración de vino y zumos que permitan sustituir el uso del sulfuroso en estos productos sin comprometer su calidad (Proyecto SO₂SAY).

1.2. Efectos producidos por los sulfitos en la salud

Por sus propiedades tecnológicas y bajo coste el SO₂ ha sido ampliamente utilizado en la industria alimentaria (vino, zumo, marisco,...). A pesar de su amplio uso y de su eficacia como conservadores, a los sulfitos se les atribuyen diversos efectos adversos en humanos, como dolor de cabeza, dificultades respiratorias, diarrea, reacciones alérgicas, fatiga, irritación, hinchazón de cara, labio o garganta; observándose en los últimos años un aumento en la intolerancia o alta sensibilidad al SO₂, relacionados con su ingestión, particularmente en personas sensibles o vulnerables a los mismos como personas asmáticas y niños. (Taylor, 1986; Gao, 2002).

Este hecho, ha generado una creciente preocupación por parte de los consumidores por el uso de compuestos químicos como conservantes alimentarios y la demanda de la búsqueda de nuevos aditivos naturales.

Estos efectos tiene que ver en cómo el organismo los elimina ya que los considera dañinos o tóxicos, es decir, los metaboliza o transforma en algo atóxico; esto se hace principalmente a nivel hepático (también en riñón, intestino, corazón) y el hígado necesita de enzimas como la sulfito-oxidasa y la acción de un oligoelemento como el molibdeno. Esta enzima (sulfito oxidasa) es la responsable de la eliminación del sulfito producido en el propio organismo durante el metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre (Montano, 1989).

Además del molibdeno, para metabolizar los sulfitos se necesitan otros elementos como: metionina, cisteína y vitamina B6, es decir que cada vez que el organismo metaboliza o transforma estos aditivos está utilizando nutrientes como oligoelementos, vitaminas y aminoácidos que pueden ser requeridos por las células para otras funciones.

Un estudio realizado por la agencia austríaca para la salud y seguridad alimentaria muestra que más del 40 % de la población tiene déficit del oligoelemento molibdeno (esto es debido al empobrecimiento de las tierras ya que no aparece en los vegetales tratados con abonos químicos) por lo que tendrán dificultades o no podrán transformar los sulfitos presentando reacciones adversas (Montano, 1989).

Ha de tenerse en cuenta que los sulfitos afectan principalmente a algunos individuos asmáticos (5-10 %), habiéndose registrado reacciones adversas como dermatitis, dolor de cabeza, irritación del tracto gastrointestinal, urticarias, exacerbación de asma e incluso shock anafiláctico, y en el caso del trastorno metabólico hasta lesiones oculares y daño cerebral grave. (Dalton-Bunnow MF, 1985).

Además de los asmáticos, las personas con afectación hepática o con un déficit en este enzima sulfito oxidasa, pueden tener problemas o síntomas al ingerir estos aditivos. Se han observado en algunos casos otros tipos de reacciones frente a los sulfitos usados como aditivos alimentarios, entre ellos manifestaciones cutáneas o diarrea, especialmente entre personas con el jugo gástrico poco ácido. Por ejemplo si

consumes una cantidad diaria que exceda de 50 mg/kg puede dar lugar a dolores de cabeza fuertes, náuseas y diarrea.

Por todo ello, en muchos países, el contenido de sulfitos en alimentos y bebidas ha sido controlado y limitado estrictamente.

En numerosas ocasiones se ha propuesto la sustitución del anhídrido sulfuroso y de los sulfitos con el fin de evitar los efectos nocivos que se producen en ciertas personas, esto es prácticamente imposible en la industria del vino, aunque sí en las demás, especialmente cuando se emplea con fines antioxidantes.

Hoy en día se sabe que los sulfitos no tienen efectos teratógenos ni cancerígenos, no representando ningún riesgo para la inmensa mayoría de la población a los niveles presentes en los alimentos. (Montano, 1989).

1.3. Los sulfitos en el vino y conservas

1.3.1. Sulfitos en vino

El anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre (SO₂) es el principal conservante utilizado durante la vinificación para proteger a los vinos de posibles alteraciones. Su uso como conservante enológico se conoce desde la antigüedad, siendo ya utilizado en tiempos de egipcios y romanos para la desinfección y limpieza de bodegas (Frazier y Westhoff, 1978).

Pero ha sido en las últimas décadas cuando se han adquirido la mayor parte de los conocimientos científicos sobre su empleo en enología, extendiéndose su uso en operaciones de pre-fermentación durante la vinificación. En los vinos, este compuesto tiene múltiples propiedades, entre las que se pueden destacar su capacidad antimicrobiana y antioxidante.

El SO₂ es un agente antiséptico frente a levaduras y bacterias, presentando un mayor poder antimicrobiano frente a bacterias ácido lácticas (BAL) que frente a levaduras. El SO₂ impide la oxidación no enzimática y enzimática del vino mediante un consumo lento del oxígeno e inhibición de enzimas oxidativas tales como la tirosinasa y lacasa. Además, la unión del SO₂ con el etanol y otros compuestos similares protege los aromas del vino. Por otra parte, también previene el pardeamiento de los vinos mediante la inactivación de enzimas como la peroxidasa, e inhibe la reacción de Maillard (Ribéreau, Gayon, 2006).

Generalmente, a las concentraciones en las que están presentes los sulfitos en el vino no existe riesgo para el consumidor. Sin embargo, en los últimos años, existe una tendencia a reducir progresivamente los niveles máximos de SO₂ autorizados en los mostos y vinos, debido al aumento de problemas para la salud humana, preferencias de los consumidores, posibles alteraciones organolépticas en el producto final (olores defectuosos producidos por el propio gas sulfuroso, o por su reducción a

sulfhídrico y otros mercaptanos) y a una legislación cada vez más estricta sobre los conservantes (Santos, 2012).

Durante la vinificación, las distintas formas químicas del SO_2 , libre y combinada, se encuentran en un equilibrio que depende del pH, composición y temperatura del vino. El SO_2 libre se define como la fracción presente en forma gaseosa o inorgánica en el vino, mientras que la fracción combinada es aquella que se encuentra unida a las diferentes sustancias orgánicas del vino, denominándose SO_2 total a la suma de ambas fracciones (Figura 1.2).

El SO_2 libre al pH del vino está presente en las formas: ácido sulfuroso (H_2SO_3), gas dióxido de azufre (SO_2) y bisulfito de hidrógeno (HSO_3^-). El SO_2 molecular constituye la llamada forma "activa" del SO_2 , responsable de la mayor parte de sus propiedades enológicas, las cuales dependen del pH del vino. De la misma manera, podría ser el causante del sabor y olor desagradable en el vino.

La mayor parte del SO_2 adicionado al mosto o al vino está combinado con diversos compuestos orgánicos, tales como: azúcares, polisacáridos, polifenoles, etc. La principal unión del SO_2 con estos compuestos, se produce con el acetaldehído generándose un compuesto muy estable y por lo tanto irreversible. Por otro parte, la unión del anhídrido sulfuroso con azúcares, ácidos, etc., es menor y reversible, denominándose a este dióxido de azufre SO_2 residual. En la figura 1.2 se pueden observar las diferentes formas de SO_2 . (Togores J. 2013).

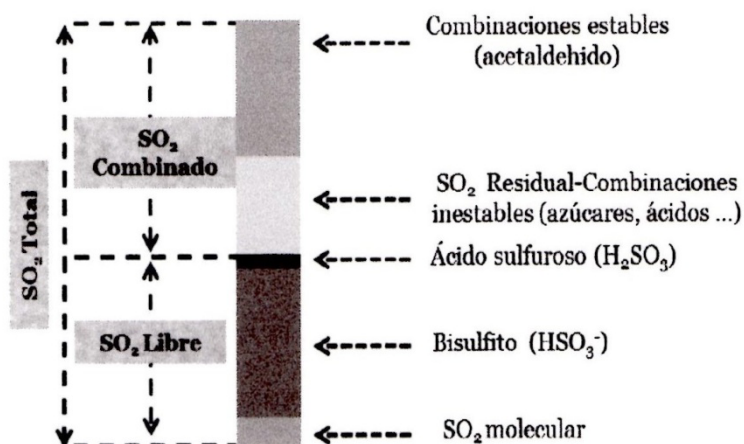


Figura 1.2: Diferentes formas del SO_2 al pH del vino (Tomada Krieger, 2008).

El SO_2 combinado es más abundante que el SO_2 libre en el vino. Sin embargo, esta fracción tiene menor relevancia que el SO_2 libre en relación a las propiedades antisépticas y antioxidantes del SO_2 en el vino; a pesar de que su unión con el etanol permite la protección de aromas del vino y hace que el carácter plano del mismo desaparezca.

Los derivados azufrados utilizados habitualmente en enología son el SO_2 , y el metabisulfito de sodio y/o de potasio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$), entre otros. Durante la vinificación, estos productos se utilizan fundamentalmente en tres etapas (Figura 1.3). Una primera, en las uvas o en el mosto durante la etapa pre-fermentativa, con el objetivo fundamental de prevenir la oxidación del mismo y rebajar la carga microbiana inicial; más adelante, una vez finalizados los procesos de fermentación y previa a las etapas de crianza o conservación de los vinos, para así inhibir el crecimiento de microorganismos alterantes de los vinos; y como último paso, inmediatamente antes del embotellado, con objeto de estabilizar los vinos e impedir cualquier alteración dentro de las botellas. Por otro lado, el SO_2 también se emplea en la limpieza y desinfección de barricas, aunque la reciente revisión de la Directiva Biocidas 98/8 podría conllevar su prohibición (Ribéreau, Gayon, 2006).

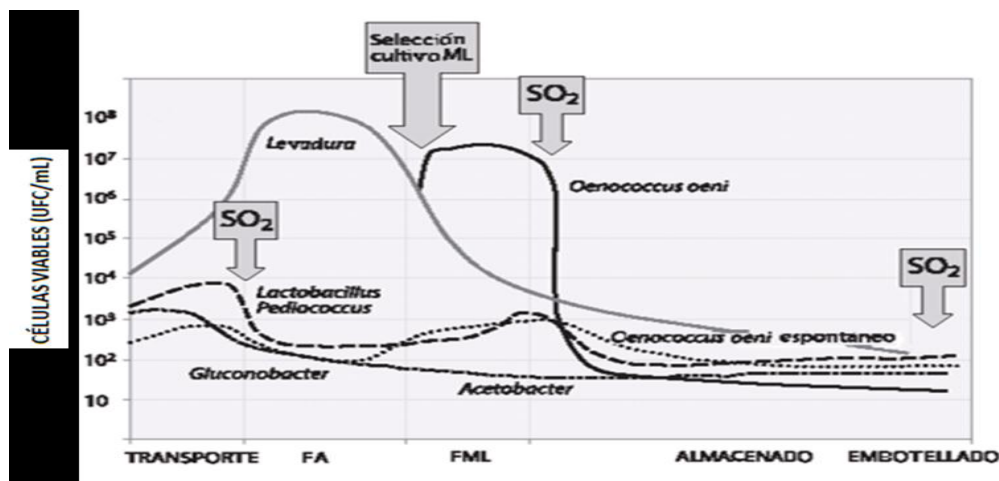


Figura 1.3. Control del proceso de vinificación mediante la adición de SO_2 (FA: fermentación alcohólica y FML: fermentación malo láctica) (Tomada Krieger, 2008).

Diversas propiedades de interés de los sulfitos:

- Fácil **combinación** con diversas sustancias del mosto o de los vinos, principalmente con compuestos orgánicos con función carbonilo (aldehídos y cetonas): azúcares, polisacáridos, polifenoles...
- Acción **antiséptica** y **selectiva** de la microflora natural de los mostos. Acción **estimulante**, potenciando el proceso de transformación de las sustancias orgánicas por los microorganismos. Acción **antiséptica** sobre la actividad vital de los microorganismos. Acción **selectiva** de los microorganismos, pues a igualdad de condiciones unos son más resistentes que otros. En la acción antiséptica del anhídrido sulfuroso influyen diversos factores como son la cantidad de SO_2 libre, el pH del medio y la temperatura. Cuanto menor sea el pH y mayor sea la temperatura mayor cantidad de SO_2 libre habrá en el vino y, por tanto, mayor será su acción antiséptica.
- Acción **esterilizante** en botellas, corchos y, sobre todo, envases de madera y barricas.

- Acción **solubilizante** y **acidificante**. Al destruir las células del hollejo favorece la salida de sus compuestos solubles, de carácter ácido. Favorece la extracción de antocianos de los hollejos y, por tanto, de color.
- Acción **defecante** y **clarificante**. Al retrasar la fermentación por su acción antiséptica, favorece la decantación de las partículas. Además, tiene poder **coagulante** con determinadas sustancias coloidales.
- Acción **antioxidante**. Inhibe la acción de determinadas enzimas oxidantes (tirosinasa y lacasa). También mediante su acción reductora frente a la oxidación no enzimática.
- Efecto **corrosivo** sobre ciertos metales, es necesario el uso de aceros inoxidable especiales (AISI 316).
- Efecto sensorial. Se detecta fácilmente su presencia y puede ser un **defecto** sensorial en los vinos.
- Efecto **entorpecedor** y **paralizador** de la fermentación maloláctica por su acción antiséptica frente a las bacterias lácticas.
- Efecto **activador** sobre la quiebra cuprosa.

Por sus propiedades tecnológicas y bajo coste el SO₂ ha sido ampliamente utilizado en la industria alimentaria (vino, zumo, marisco,...) (Mischek, D., 2011).

Por otro lado y con el objetivo de aumentar la seguridad de los alimentos, las autoridades europeas han regulado de una forma estricta el uso del SO₂ como conservante alimentario, Directivas 95/2/CE y 2006/52/CE.

En relación al vino, la dosis máxima autorizada por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) es de 150 a 400 mg/L de SO₂ total dependiendo del tipo de vino y de su contenido en materias reductoras. Por otro lado, la Unión Europea (Reglamento Comunidad Europea nº 497/2008) establece que los límites del contenido total de SO₂ en los vinos tintos no podrán exceder de 160 mg/L, y en blancos y rosados de 210 mg/L, mientras en Japón, Estados Unidos, Canadá y Australia el límite de SO₂ total es de 350 mg/L para todos los vinos.

Por otra parte, en Estados Unidos, Sudáfrica y la Unión Europea (en concreto desde el 26 de noviembre de 2005, Reglamento nº 1991/2004), la legislación obliga a los elaboradores, a señalar la presencia de sulfitos en el etiquetado de los vinos, siempre y cuando su nivel exceda de los 10 mg/L. De hecho, en los vinos españoles, es cada vez más frecuente encontrar la indicación “*contiene sulfitos*” en un lugar visible de la etiqueta.

1.3.2. Sulfitos en conservas

En las diferentes conservas lo podemos encontrar tanto de forma libre como combinada actuando como conservantes y antioxidantes.

Los conservantes son sustancias que impiden o retardan la descomposición de los alimentos provocada por los microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) que

se nutren de ellos, o por los productos de su metabolismo que pueden ser perjudiciales para la salud del consumidor. Por ejemplo, la toxina botulínica es un potente tóxico producido por la bacteria *Clostridium botulinum* presente en conservas mal esterilizadas. Para evitar los efectos de los microorganismos sobre los alimentos se emplean métodos físicos (calentamiento, deshidratación, irradiación, congelación), y sustancias que eliminan microorganismos o evitan su proliferación (Togores, J. 2011).

Los antioxidantes son sustancias que retardan o evitan la oxidación de los alimentos. La oxidación es una reacción en cadena que, una vez iniciada, continúa hasta la oxidación total de las sustancias sensibles. Como consecuencia, aparecen olores y sabores a rancio, se altera el color y la textura, desciende el valor nutritivo al perderse algunas vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados, y se obtienen productos que pueden ser nocivos para la salud. Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos:

- Detienen la reacción en cadena de oxidación.
- Eliminan el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o en los envases.
- Mediante el uso de agentes quelantes se eliminan trazas de ciertos metales, como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación.

Los antioxidantes más utilizados son: ácido ascórbico (vitamina C), ácido cítrico y sulfitos en jugos de frutas, conservas vegetales, mermeladas; tocoferoles (vitamina E) en alimentos con mayor contenido graso; BHA (butilhidroxianisol) y BHT (butilhidroxitoluol), en quesos fundidos, aceites de semillas y margarinas. (Togores, J. 2011).

1.4. Métodos de análisis de sulfitos

Como previamente se ha comentado, los sulfitos se utilizan como conservante en la industria alimentaria, ya que se añade a varios productos (verduras, frutas, y varias bebidas) para evitar la oxidación e inhibir el crecimiento de bacterias, además de ayudar en la conservación de la vitamina C. A pesar de estas grandes ventajas, el contenido de sulfito en los alimentos y bebidas deben ser estrictamente limitada debido a su toxicidad y los productos que contengan más del límite establecido deben ser etiquetados adecuadamente como ya se ha explicado anteriormente. Por ello hay que detectarlos y cuantificarlos en los diferentes alimentos.

La determinación del SO₂ en el vino es una importante tarea analítica, particularmente en lo que respecta a legislación de seguridad alimentaria, comercio del vino y enología. Para los enólogos y viticultores, la cantidad de SO₂ libre es el valor más importante, ya que proporciona información sobre los procesos de fermentación, mientras que desde un punto de vista legislativo lo es la cantidad total de sulfitos.

Existen numerosos métodos de análisis de sulfitos en alimentos, la mayor parte basados en el principio de conversión de las distintas formas de sulfito en dióxido de azufre. En general, pueden agruparse en dos categorías básicas:

1. Aquellos que requieren una destilación inicial de la muestra problema para extraer el dióxido de azufre.
2. Aquellos que utilizan otras reacciones químicas o procedimiento de separación para medir el SO₂.

El carácter inestable del analito, al igual que las uniones que establece con ciertos compuestos presentes en el alimento, son dos puntos críticos en todos los casos.

Los métodos más aceptados para la determinación de sulfitos son el método Ripper (titulación con yodo) (Ripper, 1892; AOAC, 1984), el método Monier-Williams (destilación + titulación alcalina) (Monier-Williams, 1927; Cunniff, 1995) y el método de oficial de Paul (Paul, F.1985), (OIV.1990). Estos procedimientos son lentos y laboriosos y presentan limitaciones, como son una pobre precisión y una baja selectividad (Bruno y col., 1979; Cardwell y col., 1991; Mataix y Lague de Castro, 1998).

Por ello, en los últimos años con el objetivo de minimizar las limitaciones y tiempo de análisis de estos métodos, otros procedimientos basados en técnicas tales como HPLC, análisis por inyección de flujo (FIA), cromatografía de gases (GC), en combinación con sensores ópticos, métodos electroquímicos, enzimáticos, han sido desarrollados (Tabla 1.3). Sin embargo, algunos de estos métodos carecen de sensibilidad y precisión (por ejemplo, iodimetría), mientras que otros requieren una preparación de la muestra muy costosa en tiempo, equipamiento y personal, reactivos muy costosos. Debido a todas estas desventajas, es necesario buscar alternativas de detección de sulfitos en alimentos como métodos rápidos sensibles, específicos y precisos.

Tabla 1.3: Metodologías alternativas para la medición de SO₂

SO ₂	SEPARACIÓN	DETECCIÓN	BIBLIOGRAFÍA
LIBRE/TOTAL	Cromatografía de gases	Detector fotométrico de llama (FID)	Hamano y col., 1979
	Cromatografía iónica	Electroquímica	Kim y Kim, 1986
	HPLC	Sensor fotométrico	Pizzoferrato y col., 1997
	Electroforesis capilar	UV	Jankovskienė y col., 2003
	Sensor de membrana	Sensor óptico	Silva y col., 2006

	Análisis por inyección	UV/Vis	Segundo y col., 2001
	Secuencial	Amperométrico	Chinvongamorn y col., 2008
	Análisis por inyección de flujo	Espectrométrica	Carinhanha y col., 2006
	Sistema de flujo continuo	Sensor piezoeléctrico	Palenzuela y col., 2005
TOTAL	Análisis por inyección de flujo	Quimioluminiscencia	Huang y col., 1992
		Amperométrica	Corbo y col., 2002
		Conductivímetro	
	Cromatografía iónica	Conductividad	Cooper y col., 1986
	Membrana bioactiva	Sensor enzimático	Dinçkaya y col., 2007

A continuación se comentan algunos de los métodos que más se utilizan habitualmente en los laboratorios:

1.4.1. Método optimizado de Monier-Williams

Este método se basa en la aireación de la muestra para extraer el sulfito, la oxidación a ácido sulfúrico por burbujeo en una solución de peróxido de hidrógeno y la titulación de la solución resultante con hidróxido sódico. Para extraer el sulfito libre es suficiente con la aireación de la muestra durante 15 minutos a 10°C, mientras que para el sulfito total se requiere el mismo tiempo pero la muestra debe estar a 100°C.

El método mide sulfitos libres más porciones reproducibles de sulfitos ligados, tales como productos carbonílicos, en alimentos.

La muestra es calentada con ácido clorhídrico (HCl) en reflujo para convertir el sulfato a SO₂ (sulfitos). El nitrógeno introducido a la solución arrastra el SO₂ a través del condensador enfriado por agua y pasa a una solución del H₂O₂ al 3% donde el SO₂ se oxida a ácido sulfúrico (H₂SO₄). El contenido de sulfito es directamente relacionado al H₂SO₄ generado, el cual es determinado por titulación con hidróxido de sodio (NaOH) estandarizado.

Es aplicable para la determinación de ≥ 10 ppm de sulfitos en alimentos. Aplicable en presencia de otros compuestos volátiles de azufre. Este método tiene varios problemas que lo hace poco práctico como por ejemplo que es lento, manual, depende del analista y es necesario un volumen de muestra elevado (Monier-Williams, 1927; Cunniff, 1995).

1.4.2. Método de Paul

El método de Paul, es el método oficial de determinación del dióxido de azufre en vinos. El dióxido de azufre se encuentra en los vinos en forma libre y formando combinaciones inestables con compuestos como azúcares. En este método, el dióxido de azufre libre se lleva por una corriente de aire o nitrógeno, y se fija y se oxida por burbujeo a través de una solución diluida y neutra de peróxido de hidrógeno. El ácido sulfúrico formado se determina por titulación con una solución valorada de hidróxido de sodio. El arrastre en frío (10°C) garantiza el arrastre únicamente del dióxido de azufre libre.

El dióxido de azufre combinado que queda en el vino tras la extracción del libre, se determina calentando el vino directamente (aproximadamente 100 ° C).

Es un método con el que se obtiene resultados más precisos pero tiene el inconveniente de ser un método muy largo ya que exige mucha atención ya que hay que controlar la temperatura, el flujo de gas y el tiempo de paso del gas. (Paul, F.1985), (OIV.1990)

1.4.3. Iodometría

Consiste en una valoración en la que se añade a la muestra un exceso de yodo, formado por acidificación estándar KIO_3 y se adiciona una solución de KI. Cierta cantidad de yodo se reduce a yoduro por el sulfito de la muestra y el yodo restante se mide por titulación con tiosulfato de sodio estándar utilizando el almidón como indicador.

Puesto que la cantidad de sulfito es equivalente a la cantidad de la reducción de yodo y puesto que la cantidad de tiosulfato de sodio usado en la titulación es equivalente a la cantidad de yodo restante, la diferencia entre el yodo total y el volumen de tiosulfato de sodio es la medida de la concentración de sulfito de sodio.

Un modo de valoración por retroceso se utiliza para evitar la pérdida de sulfito en la forma de SO_2 en un ambiente ácido.

Las ventajas de este método son la determinación absoluta de contenido, la atractiva relación costo/beneficio, los resultados exactos y reproducibles. En cuanto a las desventajas, se manipulan productos químicos peligrosos y requiere mucho tiempo de procedimiento, pueden existir interferencias, depende del analista (Mataix, Luge de Castro, 1998).

1.4.4. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica de separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre

dos fases inmiscibles, una fija y otra móvil. En cromatografía gaseosa, la fase móvil es un gas que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. La cromatografía de gases proporciona información cualitativa y cuantitativa para los compuestos individuales presentes en una muestra. Se puede aplicar para la determinación de sulfitos libres y combinados en los alimentos. Se utiliza ácido tartárico (0,1 M) como excelente agente de extracción para la extracción selectiva de sulfitos libres, y un agente de extracción alcalina que contiene tartrato de sodio y potasio y sulfito ferroso (desoxidante). Entre las diferentes ventajas de este método se puede destacar los cortos tiempos de ejecución, columnas baratas, sólo requiere muestras muy pequeñas con poca preparación y alta relación señal-ruido. Por otro lado, requiere una amplia instrumentación y operadores cualificados. (Chandra S. y col.2013).

1.4.5. La cromatografía iónica

Recientemente, la AOAC Internacional adoptó un método que utiliza cromatografía de exclusión iónica con detección amperométrica de corriente continua. Este método (método AOAC 990.31) es lo suficientemente selectivo y solo es necesario se homogeneizar las muestras en tampón, filtrar, e inyectar para el análisis.

Un inconveniente de este método es que el ensuciamiento del electrodo de trabajo de platino se produce con bastante rapidez, lo que lleva a una disminución significativa en la respuesta del detector. Se ha informado que hasta el 40% de pérdida de la respuesta del detector al sulfito durante un período de 8 h. Por tanto esto hace una desventaja grande en esta técnica. Por el contrario, la detección es simultánea y de alta selectividad (Kim, 1990)

1.4.6. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

HPLC normalmente utiliza diferentes tipos de fases estacionarias, una bomba donde se mueve la fase móvil (s) y el analito a través de la columna, y un detector para proporcionar un tiempo de retención característico para el analito. El detector también puede proporcionar información adicional relacionada con el analito (es decir, datos espectroscópicos de UV / VIS). El tiempo de retención del analito varía dependiendo de la fuerza de sus interacciones con la fase estacionaria, la relación / composición de disolvente (s) utilizado, y la velocidad de flujo de la fase móvil.

HPLC es una forma de cromatografía de líquidos que usa una columna de tamaño más pequeño, los medios de comunicación dentro de la columna también más pequeña, la fase móvil y las presiones más altas. Mediante este método se han analizado en diferentes estudios los sulfitos totales y libres de productos vegetales acidificados, puré de patata y manzanas secas. Los sulfitos se separan por HPLC y se cuantifican con un detector de UV / vis.

Los resultados que se han ido obteniendo mediante esta técnica, han sido muy sensibles, reproducibles y precisos. Además es una técnica rápida y automatizada. Por

otro lado, los productos químicos son muy costosos y se requiere experiencia en el manejo (Theiser S., 2010).

1.4.7. Análisis por inyección en flujo (FIA)

El análisis por inyección de flujo, es un enfoque para el análisis químico que se logra mediante la inyección de muestra en un portador de corriente continua. Es un método automatizado en el que se inyecta una muestra en un flujo continuo de una solución utilizada como vehículo que se mezcla con otras soluciones que fluyen continuamente antes de llegar a un detector.

La técnica que emplean consiste básicamente en una destilación en medio ácido y posterior valoración yodométrica del dióxido de azufre generado. Recientemente se ha puesto a punto un nuevo método para la determinación cuantitativa de dióxido de azufre en alimentos por FIA basado en el método oficial AOAC 990.29, que automatiza el análisis, mejora el límite de cuantificación (alcanza los 10 mg/kg SO₂), optimiza la estabilización del SO₂ y permite un aumento de la cobertura analítica en el control oficial de alimentos.

El método de análisis consta de una serie de transformaciones químicas del analito que conducen a la formación de SO₂, el cual decolora una solución de verde de malaquita. Primero se extraen de los sulfitos de la muestra con tetracloromercurato (TCM), el cual genera un complejo dicloro-sulfito-mercurato estable. Ya en el analizador, el medio básico produce la rotura de las uniones de los sulfitos con aldehídos y TCM, liberándolos, y a continuación por acidificación se genera SO₂ gaseoso, el cual difunde a través de una membrana de teflón presente en una célula de difusión de gas y entra en contacto con una matriz de verde malaquita que se decolora, en un grado proporcional a la cantidad de sulfitos de la muestra problema.

Debido al bajo límite de detección obtenido, muestras de vino pueden ser fuertemente diluidas antes de la inyección, lo que hace que el pretratamiento de la muestra rápido y sencillo (JJ Sullivan y col, 1986).

Entre las ventajas encontramos la simplicidad y el bajo coste del instrumento y por el contrario, se consume mucho reactivo.

1.4.8. Espectrofotometría

Diferentes estudios, han utilizado el método espectrofotométrico altamente selectivo para la determinación de sulfitos que se desarrolla sobre la base de la reacción de sulfito con formaldehído en presencia de amoníaco, produciendo un complejo de color azul oscuro cuya absorbancia es sensible a concentraciones de sulfito. El método es sencillo, muy sensible y apropiado para la determinación de sulfitos.

La absorbancia que se mide es a 628 nm, que fue el mejor de los dos máximos de absorción que fueron exhibidos por el compuesto. Se proponen dos métodos simples para la determinación de sulfito en los productos alimenticios:

- 1) El método-formaldehído modificado (PRA) que mostró un rango lineal mucho más amplio (0,05-5,0 mg / L como SO₂) que el procedimiento utilizado para la detección de dióxido de azufre en la atmósfera (0,05-1,0 mg / L como SO₂). Con el uso de una tarjeta de color de referencia estándar, este método sólo necesita 5 minutos para completar la prueba.
- 2) El método de 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) es otra buena alternativa para la determinación rápida de sulfito, ya que sólo necesita un reactivo principal y es robusto y fácil de realizar, con un rango lineal de 0,10 a 4,3 mg / L como SO₂. Cuando se aplica a muestras reales de los alimentos, el método DTNB tenía buenas recuperaciones de todas las muestras analizadas y los resultados obtenidos están de acuerdo con los obtenidos por el método oficial de valoración yodométrica.

El método ARP-formaldehído modificado funcionaba bien con todos los productos alimenticios secos ensayados, aunque se observó un efecto matriz de sulfito de unión para muestras de cerveza. Por lo tanto, el método ARP-formaldehído modificada tiene ventajas de la sensibilidad y rapidez, pero el método DTNB ofrece una gama más amplia de aplicaciones. Ambos métodos proporcionan medios prácticos para la determinación in situ de sulfito.

Las ventajas que ofrece este método es que es simple y muy sensible aunque por otro lado, algunos de ellos requieren un procedimiento de destilación y se necesitan cantidades grandes de muestras. (Monzir S, Abdel ,1994).

1.4.9. Biosensores

Los biosensores amperométricos combinan las ventajas de las técnicas electroquímicas con alta especificidad de sustrato-enzima, el tiempo de respuesta rápida, y un procedimiento fácil. Recientemente, el rendimiento analítico de los biosensores se ha mejorado con el uso de los nanomateriales.

Nanoestructuras de óxidos metálicos tienen la capacidad única de promover rápidamente la cinética de transferencia de electrones entre el electrodo y el sitio activo de la enzima deseada. Durante los últimos años, gran atención se ha prestado al desarrollo de diversos biosensores para la determinación de sulfito.

Los biosensores de sulfitos se pueden clasificar en 12 clases en función de su tipo de transductor. El principio básico de los biosensores incluye la producción de H₂O₂ de la oxidación aerobia de sulfito por medio de una oxidasa inmovilizada y su descomposición electroquímica en condiciones de alta tensión para generar electrones, es decir, la corriente, la cual es directamente proporcional a la

concentración de sulfito. Las ventajas de este método a modo general, es que es una detección sencilla, rápida y sensible.

Todos estos métodos se utilizan en la actualidad para detectar los sulfitos en los alimentos y como se ha podido observar presentan cada uno de ellos tanto ventajas como desventajas. No existe el método ideal de detección y por ello es necesario seguir buscando alternativas rápidas y automatizadas, sensibles y sencillas. (Chandra Shekhar Pundir, Rachna Rawal, 2013).

1.5. Validación del método analítico

El término validación ha sido definido de diversas maneras y por numerosos autores:

“Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto” (VIM, 2008)

“Confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización específica prevista.” (ICH, 2005).

Definición analítica: “Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos”

Para poder definir correctamente el término de validación no hay que olvidarse de términos como cualificación y calibración, quienes van intrínsecamente relacionados entre sí (Aguirre, L. y col, 2001):

-Cualificación: consiste en la operación por la que se comprueba que un equipo funciona correctamente y produce en realidad los resultados previstos.

- Calibración: conjunto de operación que determinan, bajo condiciones previamente definidas, la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

Las características de funcionamiento de la validación se concretan en unos parámetros de calidad como son la exactitud, la precisión, los límites de detección y cuantificación, el intervalo dinámico, la sensibilidad, la selectividad y la robustez (ICH, 2005). A continuación se define la exactitud y la precisión:

-La exactitud se define como la proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando. La exactitud es un método cualitativo y por ello va asociado a otro concepto, “error”. Este es definido como la diferencia entre el

resultado de la medida y el valor real del mesurando. Los errores pueden clasificarse como aleatorios o indeterminados y sistemáticos. (VIM, 2008)

Para conocer la exactitud de un método se pueden utilizar distintos caminos. La comparación con un método de referencia es uno de ellos y es uno de los puntos de los que trata este trabajo. La “comparación con un método de referencia” es una posible alternativa:

“Cuando no se dispone de materiales de referencia apropiados, una posible alternativa consiste en la comparación de los resultados del método que estamos evaluando con los obtenidos mediante un método validado que puede considerarse como un método de referencia.”

-La Precisión de medida es la proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas (VIM, 2008)

Esta comparación es conocida también por el nombre de verificación. La veracidad es la proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia. La veracidad de medida no es una magnitud y no puede expresarse numéricamente, aunque la norma ISO 5725 especifica formas de expresar dicha proximidad. La veracidad de medida está inversamente relacionada con el error sistemático, pero no está relacionada con el error aleatorio. (VIM, 2008)

Otro de los parámetros que caracterizan el proceso de validación de un método es el término precisión, el cual se entiende como el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en unas condiciones bien definidas.

Mediante la precisión se evalúa la dispersión de los resultados que se obtienen al realizar medidas replicadas sobre una misma muestra. Los resultados obtenidos de la precisión dependen exclusivamente de los errores aleatorios del proceso de medida y es independiente de los errores sistemáticos.

Mediante el estudio de la desviación estándar se mide la precisión. Debido a que el número de factores que afectan a la precisión es elevado, para poder evaluar se llevan a cabo los estudios de repetibilidad, precisión intermedia y reproductibilidad.

Para poder llevar a cabo estos estudios de repetibilidad, se deben cumplir unas condiciones de repetibilidad que se entienden como:

-Aquellas en que las medidas se llevan a cabo aplicando el mismo método a un mismo material, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos, el mismo operador y en un intervalo corto de tiempo.

Las razones por las cuales sería justificado llevar a cabo la realización de la validación de métodos analíticos son:

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizan el número de fallos repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.
- Trabajar con métodos validados permite no solo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales.
- La validación es también un paso o requisito previo a los procesos de transferencia de métodos analíticos.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es verificar un método de análisis rápido de sulfitos en dos tipos de alimentos: vino y conservas vegetales. Para poder alcanzar este objetivo, se plantean las siguientes acciones:

- Comparar la precisión entre el método oficial y el método alternativo tanto en vino como en conservas vegetales.
- Comparar la exactitud entre el método oficial y el método alternativo tanto en vino como en conservas vegetales.

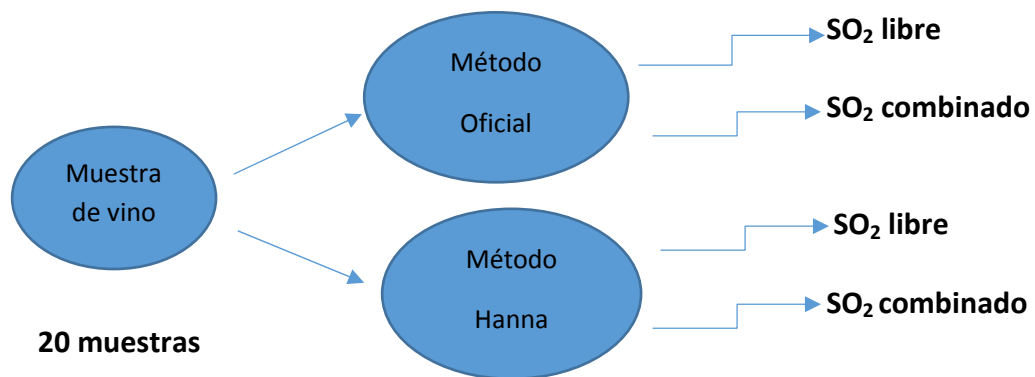
3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos propuestos se realizó el siguiente diseño experimental:

3.1. Análisis de dióxido de azufre en vino

Se han utilizado dos tipos de muestras: vino tinto seco y vino blanco seco. Se analizaron 20 muestras de cada tipo de vino.

En las muestras se analizó tanto el dióxido de azufre libre como el dióxido de azufre combinado por el método oficial y por el método de determinación alternativo utilizando un equipo de análisis rápido de Hanna Instruments siguiendo el siguiente esquema:



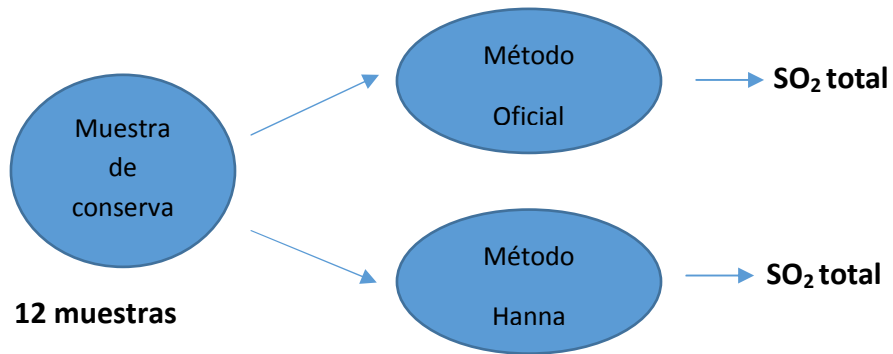
Por cada muestra de vino se realizan un total de 12 determinaciones, seis por el método oficial y otras seis por el método rápido. Como se han analizado 20 muestras de vino, se han realizado un total de 240 determinaciones.

3.2. Análisis de dióxido de azufre en conservas vegetales

Se han utilizado dos tipos diferentes de conservas: encurtidos y legumbres.

Se analizaron 12 muestras de cada tipo.

En las muestras se analizó el dióxido de azufre total tanto por el método oficial como por el método de determinación rápido Hanna Instruments siguiendo el siguiente esquema:



Por cada muestra de conserva se han realizado seis determinaciones. Como se han estudiado 12 tipos de conservas, en total se han realizado 72 determinaciones.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Materias primas

Para la primera parte de este trabajo nos servimos de 2 tipos de vino: tinto y blanco. Se tomó una muestra representativa de la variabilidad que existe en el mercado para este tipo de vinos, eligiendo vinos de diferentes variedades y procedencia, diferente grado alcohólico y diferentes añadas.

Para poder llevar a cabo este experimento, se recogieron un total de 20 muestras de vino seco:

- 10 muestras de vino tinto
- 10 muestras de vino blanco

Se compraron en una vinoteca especializada y se almacenaron a 4 °C hasta que se procesaron. A continuación se muestran las muestras en la tabla 4.1:

Tabla 4.1: Muestras de vino y sus características

Muestra	Tipo	Año cosecha	Grado alcohólico % v/v	pH	Variedades
1	Tinto-Crianza	2008	14,5	3,42	Cabernet Sauvignon
2	Tinto-Crianza	2006	14	3,19	Cabernet Sauvignon, Merlot
3	Tinto	2012	13,5	3,28	Tempranillo, Merlot, Cabernet
4	Tinto -Crianza	2012	13,3	3,28	Cabernet Sauvignon, Merlot
5	Tinto-Reserva	2003	13,5	3,12	Tempranillo, Merlot, Cabernet
6	Tinto	2011	14	3,2	Tempranillo, Merlot, Cabernet
7	Tinto	2011	14	3,25	Tempranillo, Merlot, Cabernet
8	Tinto-Reserva	2007	13,5	3,27	Tempranillo, Merlot, Cabernet
9	Tinto –Tempranillo	2011	14	3,16	Tempranillo, Merlot, Cabernet
10	Tinto-Reserva	2007	13,5	3,21	Cabernet Sauvignon, Merlot
11	Blanco	2012	12,5	3,06	Variedades blancas
12	Blanco	2007	12,5	2,7	Variedades blancas

13	Blanco	2012	12,5	3	Variedades blancas
14	Blanco	2012	12,5	2,83	Variedades blancas
15	Blanco	2012	12,5	3,1	Variedades blancas
16	Blanco-eco	2012	12,5	3,29	Variedades blancas
17	Blanco	2011	12,5	3,07	Variedades blancas
18	Blanco	2011	12,5	3	Variedades blancas
19	Blanco	2012	12,5	2,68	Variedades blancas
20	Blanco	2011	12,5	3,07	Variedades blancas
CV%				19,46	

Como se puede observar en la tabla 4.1., las muestras de vino tienen un grado alcohólico y un pH variado. El grado alcohólico va desde 12,5 % en todos los vinos blancos hasta 14,5 % en los vinos tintos. Por otro lado, en cuanto al pH, va desde 3,12 hasta 3,42 de máxima en vinos tintos y de 2,68 hasta 3,29 en vinos blancos. El coeficiente de variación es del 19,46%.

Para la segunda parte de este trabajo se utilizaron diferentes tipos de conservas. En total eran 12 muestras de dos tipos diferentes: encurtidos y legumbres (tabla 4.2). Todas son de marca y origen diferentes. También son representativas dentro de la variabilidad que existe en el mercado de estos productos. Todas las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

Tabla 4.2: Muestras de conservas

Muestra	Tipo
1	Encurtido-Pepinillos
2	Encurtido- Pepinillos
3	Encurtido-Pepinillos
4	Encurtido-Banderillas
5	Encurtido-Banderillas
6	Encurtido- Aliño combinado
7	Legumbre-Garbanzos
8	Legumbre- Garbanzos
9	Legumbre-Garbanzos Extra
10	Legumbre-Alubias
11	Legumbre- Alubias Largas Extra
12	Legumbre-Alubias pochas

4.2. Pre- tratamiento de las muestras

En el caso del vino, para realizar el análisis de sulfitos, no fue necesario realizar ningún pre-tratamiento de la muestra para ninguno de los dos métodos.

En el caso de las conservas vegetales, para poder analizar los sulfitos, sí que fue necesario realizar una puesta a punto de la preparación de la muestra a analizar para el método alternativo de análisis. Según el método oficial de referencia, para la determinación del dióxido de azufre en alimentos (Método AOAC 990.28), la muestra debe disolverse en etanol al 5% y no es necesario filtrarla antes de su análisis. Por tanto, para el método alternativo, realizamos la misma preparación de la muestra (disolver en etanol al 5% y no filtrarla).

4.3. Métodos de análisis

Los análisis se hicieron de forma simultánea en ambos métodos, para garantizar que no se producían alteraciones en las muestras de análisis de un método a otro.

4.3.1. Método oficial de referencia para la determinación del dióxido de azufre por el método de Paul en vinos. (Método II Tipo OIV-MA-AS323-04)

Se llevó a cabo el análisis determinando el dióxido de azufre por el método oficial de OIV-MA-AS323-04.

El método sigue el siguiente principio:

El dióxido de azufre libre se determina por acidificación del vino, arrastre por corriente de aire o de nitrógeno, oxidación por borbotado en una solución diluida de peróxido de hidrógeno neutro y posterior valoración con hidróxido sódico del ácido sulfúrico formado. El arrastre en frío (10 °C) garantiza el arrastre únicamente del dióxido de azufre libre.

El dióxido de azufre combinado, que queda en el vino tras la extracción del dióxido de azufre libre, se determina por calentamiento moderado (aproximadamente 100 °C) y análogo procedimiento al anterior.

El dióxido de azufre total es la suma del libre y el combinado. Puede determinarse también, acidificando y calentando el vino directamente, y siguiendo el procedimiento antes descrito.

Para la aplicación el método oficial el vino se atemperó a temperatura ambiente para evitar errores de temperatura, lo que pudiese dar resultados no correspondidos con la realidad.

Los resultados se expresan como mg/l de dióxido de azufre.

El aparato de arrastre que hay que utilizar se puede observar en la figura 4.1 compuesto por matraz (A), tubo borboteador (B), frasco con agua(C) y refrigerante (D).

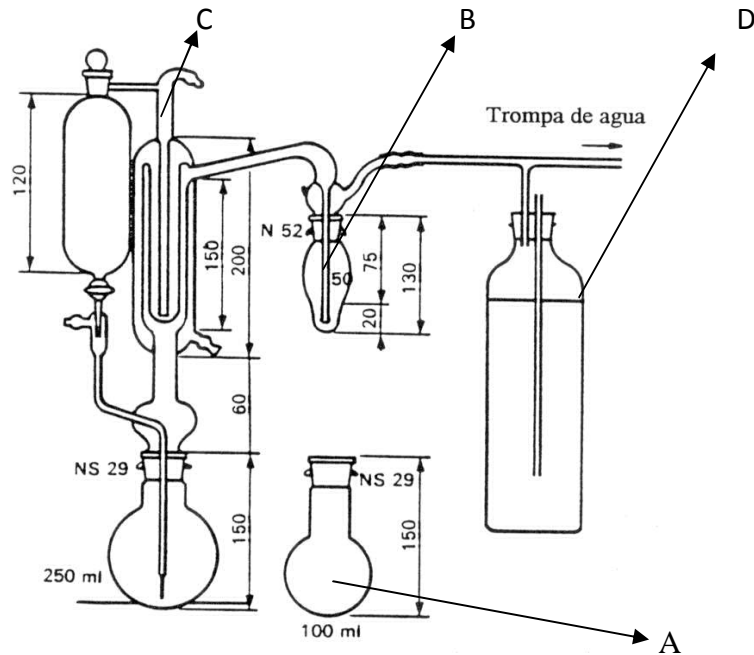


Figura 4.1 Aparato para la determinación del dióxido de azufre según F.Paul.

Sabiendo los ml de muestra inicial y el volumen de NaOH gastado en la valoración se sabrá el SO₂ libre y total de nuestra muestra.

4.3.2. Método oficial de referencia para la determinación del dióxido de azufre en alimentos (Método AOAC 990.28, método Monier-Williams)

Se llevó a cabo el análisis determinando el dióxido de azufre por el método oficial de AOAC 990.28 en alimentos.

El método sigue el siguiente principio:

El método mide sulfitos libres y sulfitos más consolidados, como los productos de adición de carbonilo, en los alimentos. La muestra se calienta con un reflujo de HCl

(1M) para convertir los sulfitos en dióxido de azufre. Se introduce una corriente de N_2 debajo de la superficie de la solución que barre el dióxido de azufre a través del condensador refrigerado por agua y a través del burbujeo conectado al condensador con una solución de H_2O_2 al 3 % donde el SO_2 se oxida a H_2SO_4 .

El contenido de sulfitos está directamente relacionado con el H_2SO_4 generado y se determina por medio de una valoración con $NaOH$.

A continuación se puede observar en la figura 4.2 el aparato de destilación necesario con el embudo de separación, un matraz de fondo redondo, un condensador, un borboteador, y un recipiente de vidrio.

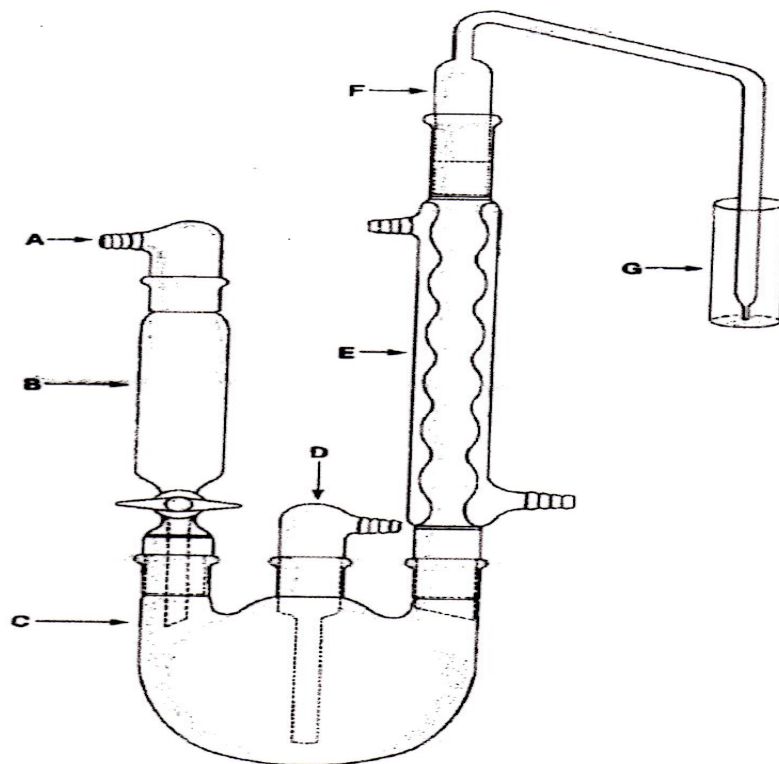


Figura 4.2: Aparato de destilación para la determinación de dióxido de azufre en alimentos (A. Adaptador entrada B. Bureta C. Matraz D. Tubo de entrada gas E. Condensador F. Burbujeador G. Recipiente vidrio).

4.3.3. Método alternativo para la determinación del dióxido de azufre

El método alternativo que se estudia en este trabajo para la determinación del dióxido de azufre tanto en vinos como para conservas es un equipo automático, fácil de usar y económico, de la casa comercial HANNA Instruments HI 84500. A continuación se observa en la figura 4.3.



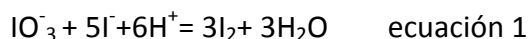
Figura 4.3: Equipo Hanna Instruments HI-84500 para determinar dióxido de azufre

Este equipo es un valorador potenciométrico que usa un electrodo de pH para la determinación del punto final. El uso del equipo elimina los factores subjetivos de las mediciones, tales como indicadores de color, errores en los cálculos matemáticos o adiciones erráticas de valorantes. Tiene una bomba peristáltica simple y precisa para garantizar la mayor precisión y repetibilidad.

El principio de funcionamiento es el siguiente:

La determinación del dióxido de azufre en las muestras se realiza mediante valoración del dióxido de azufre presente en las mismas con yodato. En este procedimiento se añade exceso de yodo a la muestra y es tritrado con yodato.

El yodato reacciona con el yoduro y el ácido sulfúrico presente en el vino y produce yodo (ecuación 1):



El yodo producido en la reacción de la ecuación 1 reacciona a continuación con el dióxido de azufre (ecuación 2):



Para lograr resultados precisos es muy importante saber el volumen exacto de la muestra y el volumen del valorante.

Es necesario realizar una calibración de la bomba, y para ello se utiliza una solución conocida. Al realizar el análisis de la misma, el instrumento realiza un análisis diferencial entre el estándar y la muestra real. La capacidad volumétrica de la bomba y la concentración real del valorante son compensadas. Solo se tiene que saber con precisión el volumen de la muestra.

El equipo se suministra con un método de análisis pre-programado diseñado para mediciones de dióxido de azufre libre y total en las muestras de vino y conservas.

Cuando se añade dióxido de azufre a las muestras, dependiendo de las circunstancias, parte se combina inmediatamente. La relación entre la cantidad de dióxido de azufre añadido y la cantidad que permanece libre es compleja.

Para las muestras de vino se necesitan 50 ml para medir el SO₂ Libre y otros 50 ml para medir el SO₂ Total.

Para las muestras de conservas se necesitan 50 gramos de muestra batida y se agregan 175 ml de agua destilada y se mide el SO₂Total.

4.3.4. Método oficial de referencia para la medición del pH en vino (Method OIV-MA-AS313-15)

Se llevó a cabo el análisis de pH en vino mediante el método de determinación oficial de OIV-MA-AS313-15.

El método se basa en la determinación potenciométrica.

La medida del pH es relativa, ya que no se determina directamente la concentración de H⁺, sino que se compara el pH de una muestra con el de una disolución patrón de pH conocido.

4.3.5. Veracidad del método analítico alternativo

Para estudiar la veracidad de un procedimiento de medida es necesario comparar una media de valores obtenidos con un valor convencionalmente verdadero.

Para llevar a cabo el estudio de la veracidad del método analítico alternativo en este estudio, se han determinado diversos parámetros siguiendo la resolución OENO 10/2005 (OIV, 2005).

Se han determinado los siguientes parámetros:

- Precisión: se va a mirar mediante el cálculo de la repetibilidad y de la comparación de las repetibilidades de ambos métodos según las indicaciones de la resolución OENO 10/2005. La repetibilidad es la proximidad entre los resultados de análisis independientes entre sí obtenidos con el método considerado sobre un mismo tipo de muestra, en el mismo laboratorio, por el

mismo operario, utilizando el mismo material y en un breve intervalo de tiempo.

- Exactitud: es el grado de concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del mensurando. Para ello se ha estudiado la relación existente entre el valor obtenido por el método de referencia y el método alternativo determinando la correspondiente recta de regresión.

4.4. Análisis estadístico

Para el tratamiento de datos nos hemos servido de distintos programas estadísticos tales como:

- Microsoft Office Excel 2007
- Statgraphics Centurion XVI.I

El estudio de resultados se ha llevado a cabo mediante la aplicación de análisis estadísticos tales como:

- ANOVA. Técnica que desarrolla un contraste de hipótesis estadísticas que afecta simultáneamente a los valores medios con distribución normal y con idénticas varianzas.
- Análisis de correlación. Mediante este análisis se pretende identificar asociaciones entre dos grupos de variables.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Verificación del método alternativo de determinación de dióxido de azufre en vinos

Siguiendo las indicaciones de la resolución OENO 10/2005 se va a proceder al estudio de la veracidad del método. En nuestro caso el estudio se ha realizado con 20 muestras de vino realizando los análisis por triplicado. El orden de análisis de las diferentes muestras se llevó a cabo de forma aleatoria, sin llevar ningún orden ni teniendo ninguna muestra de inicio predeterminada.

Hemos calculado los valores medios de las 3 mediciones efectuadas por el método alternativo y por el método de referencia. Se puede apreciar que el rango de valores en los que vamos a trabajar se encuentra entre 3,73-20,40 mg/l de sulfuroso libre y de 17,92-73,67mg/l de sulfuroso total. Estos valores se encuentran dentro de la normativa ya que está regulado el contenido máximo permitido para los vinos secos es de 160 mg/l para el vino tinto ,210 mg/l para el blanco y rosado por la Normativa CEE 1493/99.

Para el estudio de la veracidad, hemos determinado: la precisión mediante el cálculo de la repetibilidad y, el análisis de diferencias y regresión lineal para el análisis de la exactitud.

Los resultados de los experimentos se han plasmado en dos tablas. En la tabla 5.1 encontramos los resultados del sulfuroso libre y en la tabla 5.2 los resultados del sulfuroso total.

Tabla 5.1. Resultados del contenido de sulfuroso libre (mg/l) obtenidos por los dos métodos objetos de estudio en vino.

Muestras	Método alternativo X			Método oficial Y			Valor medio X	CV Mtdo.X	Valor medio Y	CV Mtdo.Y
	rep 1	rep 2	rep3	rep 1	rep2	rep3				
1	8,2	9,2	8,8	9,6	8,96	9,6	8,73	0,50	9,39	0,37
2	7,8	8,7	9,5	8,32	9,6	10,24	8,67	0,85	6,39	0,65
3	6,9	7,2	7,3	8,96	6,4	8,32	7,13	0,21	7,89	1,33
4	12,2	11,9	12,5	10,24	14,08	13,44	12,20	0,30	12,59	2,06
5	3,5	3,7	4	3,84	3,2	5,12	3,73	0,25	4,05	0,98
6	19,8	20,4	21	21,76	17,92	20,48	20,40	0,60	20,05	1,96

7	5,7	5,8	6,5	6,4	7,04	5,76	6,00	0,44	6,40	0,64	
8	7,5	8	8,2	8,32	9,6	7,68	7,90	0,36	8,53	0,98	
9	12,1	12,7	14,8	13,44	12,16	11,52	13,20	1,42	12,37	0,98	
10	6,7	7,4	8,2	10,24	8,32	7,68	7,43	0,75	8,75	1,33	
11	9,6	10,4	10,5	16	17,28	15,36	10,17	0,49	16,21	0,98	
12	7,6	7,8	7	10,68	7,68	8,96	7,47	0,42	9,11	1,51	
13	12	11,7	12,2	9,6	10,24	10,88	11,97	0,25	10,24	0,64	
14	5,7	5,5	5	3,2	3,84	4,48	5,40	0,36	3,84	0,64	
15	17,1	17,6	15,9	10,24	9,6	10,24	16,87	0,87	10,03	0,37	
16	4,4	4	4,2	5,76	4,48	3,84	4,20	0,20	4,69	0,98	
17	13,3	11,9	12,5	9,6	11,52	10,66	12,57	0,70	10,59	0,96	
18	6,3	6,2	5,9	5,12	5,76	6,4	6,13	0,21	5,76	0,64	
19	15,4	11,7	10,4	8,82	9,6	10,24	12,50	2,59	9,55	0,71	
20	11,7	10,8	10,6	8,98	10,24	8,32	11,03	0,59	9,18	0,98	
							Medias	9,69		9,28	

Tabla 5.2. Resultados del contenido de sulfuroso total (mg/l) obtenidos por los dos métodos objetos de estudio en vino.

Muestras	Método alternativo X			Método oficial Y			Valor medio X	CV Mtdo.X	Valor medio Y	CV Mtdo.Y
	rep 1	rep 2	rep3	rep 1	rep2	rep3				
1	36,3	36,7	37,8	35,2	35,84	35,84	36,93	0,78	35,63	0,37
2	39,1	36,4	40,3	37,12	35,2	37,12	38,60	2,00	36,48	1,11
3	19,1	18,8	18,3	19,2	16,64	17,92	18,73	0,40	17,92	1,28
4	40	39,5	38	39,04	38,4	39,04	39,17	1,04	38,83	0,37
5	31	29,4	30	26,24	27,52	30,72	30,13	0,81	28,16	2,31
6	46,4	48,7	47	50,56	44,16	46,08	47,37	1,19	46,93	3,28
7	22,1	21,4	21,2	17,92	21,12	20,48	21,57	0,47	19,84	1,69
8	37	36,2	36	37,12	35,2	33,92	36,40	0,53	35,41	1,61
9	28,6	28	27,9	29,44	26,24	26,24	28,17	0,38	27,31	1,85
10	21,5	20,4	21	20,48	22,4	19,84	20,97	0,55	20,91	1,33

11	78	73	70	64	69,12	66,56	73,67	4,04	66,56	2,56	
12	30	26	25	23,68	21,12	21,12	27,00	2,65	21,97	1,48	
13	51	48	46	38,4	43,52	46,08	48,33	2,52	42,67	3,91	
14	23,2	26,3	25	26,88	29,44	31,36	24,83	1,56	29,23	2,25	
15	66	58	56	58,24	56,96	56,32	60,00	5,29	57,17	0,98	
16	22,7	24,3	23	24,96	24,96	22,4	23,33	0,85	24,11	1,48	
17	53	50	48	40,32	46,72	44,8	50,33	2,52	43,95	3,28	
18	56	58	52	42,88	46,72	48	55,33	3,06	45,87	2,66	
19	62	59	57	49,92	52,48	53,54	59,33	2,52	51,98	1,86	
20	42,7	43,1	43,2	39,72	45,44	42,24	43,00	0,26	42,47	2,87	
							Medias	39,16		36,67	

5.1.1. Estudio de la veracidad para el conjunto de muestras de vino

Estudio de la precisión

La precisión se va a determinar mediante el cálculo de la repetibilidad y de la comparación de las repetibilidades de ambos métodos según las indicaciones de la resolución OENO 10/2005.

La repetibilidad es la proximidad entre los resultados de análisis independientes entre sí obtenidos con el método considerado sobre un mismo tipo de muestra, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, utilizando el mismo material y en un breve intervalo de tiempo.

El valor de la repetibilidad r es el valor por debajo del cual se puede estimar que se sitúa la diferencia absoluta entre dos resultados de un análisis único, obtenido en las condiciones de repetibilidad definidas anteriormente, y con un nivel de confianza del 95%.

La fórmula utilizada para el cálculo de la repetibilidad es la siguiente:

$$r = 2,8 S_r$$

Siendo S_r la desviación estándar de los resultados, que calcularemos aplicando la siguiente fórmula:

$$S_r = \sqrt{\text{Var}(x_{ij})} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{D_i} (\bar{x}_{ij} - M_{x_i})^2}{N-n}}$$

Xij= media de las tres repeticiones de cada muestra

Mxi= media de todas las muestras

N= Número total de repeticiones

n= Número total de muestras

Por otro lado para estimar el rendimiento de un método, es útil comparar su repetibilidad con la de un método de referencia. Para ello es necesario aplicar un test de Fisher-Snedecor para saber si el valor hallado para el método alternativo es significativamente superior al del método de referencia.

Para ello se calcula la relación:

$$F_{obs} = \frac{S_{ralt}^2}{S_{ref}^2}$$

La F_{obs} se compara con el valor de la F correspondiente de la distribución F de Fisher. La interpretación del test es la siguiente:

- Si el valor obtenido de F_{obs} es inferior al valor de $F_{1-\alpha}$, no se puede afirmar que el valor de la repetibilidad del método alternativo sea significativamente superior al del método de referencia.
- Si el valor obtenido de F_{obs} es superior al valor de $F_{1-\alpha}$, se puede afirmar que el valor de la repetibilidad del método alternativo sea significativamente superior al del método de referencia.

A continuación en la tabla 5.3 mostramos los datos para el cálculo de la repetibilidad del análisis del sulfuroso libre en las muestras de vino:

Tabla 5.3 .Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino.

Muestra	Mx	(X-Mx) ²	My	(Y-My) ²
1	8,73	0,91	9,39	0,01
2	8,67	1,04	6,39	8,38
3	7,13	6,51	7,89	1,93
4	12,20	6,33	12,59	10,93
5	3,73	35,42	4,05	27,33
6	20,40	114,81	20,05	116,04
7	6,00	13,58	6,40	8,30

8	7,90	3,19	8,53	0,56
9	13,20	12,36	12,37	9,56
10	7,43	5,07	8,75	0,29
11	10,17	0,23	16,21	48,06
12	7,47	4,92	9,11	0,03
13	11,97	5,21	10,24	0,92
14	5,40	18,36	3,84	29,60
15	16,87	51,58	10,03	0,56
16	4,20	30,09	4,69	21,05
17	12,57	8,30	10,59	1,72
18	6,13	12,61	5,76	12,40
19	12,50	7,92	9,55	0,07
20	11,03	1,82	9,18	0,01

SrX	SrY	SrX ²	SrY ²	rX	rY	F _{obs}
2,92	2,73	8,51	7,44	8,14	7,61	1,14

SrX= desviación estándar método alternativo

SrY=desviación estándar método oficial

rX= repetibilidad método alternativo

rY= repetibilidad método oficial

Fobs= F test de Fisher-Snedecor

N= Número total de repeticiones

n= Número total de muestras

Estos resultados permiten afirmar que con una probabilidad del 95%, los resultados obtenidos tendrán una repetibilidad inferior a 8,14 mg/l en el método alternativo y una repetibilidad inferior a 7,61mg/l en el método oficial en el análisis del sulfuroso libre de los vinos.

$$F_{obs} \leq F_{1-\alpha}$$

$$1,14 \leq 2,12$$

Además como el valor de F_{obs} obtenido es inferior al valor F_{1-α}, no se puede afirmar que el valor de la repetibilidad del método alternativo sea significativamente superior al del método de referencia. Se puede afirmar así que la repetibilidad del método alternativo es buena puesto que no hay diferencias significativas. Sí que es ligeramente mayor pero es comparable. Por tanto es positivo porque el método utilizado es bueno.

A continuación en la tabla 5.4 encontramos los datos para el cálculo de la repetibilidad del análisis del sulfuroso total en las muestras de vino:

Tabla 5.4 .Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino.

Muestra	Mx	(X-Mx) ²	My	(Y-My) ²
1	36,93	4,96	35,63	1,09
2	38,60	0,31	36,48	0,04
3	18,73	417,25	17,92	351,53
4	39,17	0,00	38,83	4,66
5	30,13	81,48	28,16	72,40
6	47,37	67,35	46,93	105,36
7	21,57	309,53	19,84	283,22
8	36,40	7,62	35,41	1,58
9	28,17	120,85	27,31	87,65
10	20,97	331,00	20,91	248,45
11	73,67	1190,71	66,56	893,47
12	27,00	147,87	21,97	215,96
13	48,33	84,15	42,67	35,97
14	24,83	205,25	29,23	55,39
15	60,00	434,31	57,17	420,43
16	23,33	250,48	24,11	157,81
17	50,33	124,84	43,95	52,96
18	55,33	261,58	45,87	84,60
19	59,33	406,96	51,98	234,43
20	43,00	14,75	42,47	33,61

SrX	SrY	SrX ²	SrY ²	rX	rY	F _{obs}
10,56	9,14	111,53	83,51	29,56	25,58	1,34

SrX= desviación estándar método alternativo

SrY=desviación estándar método oficial

rX= repetibilidad método alternativo

rY= repetibilidad método oficial

Fobs= F test de Fisher-Snedecor

N= Número total de repeticiones

n= Número total de muestras

Estos resultados permiten afirmar que con una probabilidad del 95%, los resultados obtenidos tendrán una repetibilidad inferior a 29,56mg/l en el método alternativo y una repetibilidad inferior a 25,28 mg/l en el método oficial en el análisis del sulfuroso total de los vinos.

$$F_{obs} \leq F_{1-\alpha}$$

$$1,34 \leq 2,124$$

Además como el valor de F_{obs} obtenido es inferior al valor F_{1-α}, no se puede afirmar que el valor de la repetibilidad del método alternativo sea significativamente superior al del método de referencia. Esto significa que aunque la repetibilidad del

método alternativo es ligeramente superior es una repetibilidad buena puesto que no hay diferencias significativas.

Estudio de la exactitud

Se comparan los resultados obtenidos con el método analítico que se quiere validar con los obtenidos con un método de referencia, cuya exactitud está bien determinada o definida.

El protocolo a utilizar lo llevamos a cabo basándonos en las indicaciones de la resolución OENO 10/2005. Para ello nos servimos de un estudio de regresión. Tomamos como variable independiente (x) los valores obtenidos para el método de referencia y como variable dependiente (y) los valores obtenidos por el método alternativo. A continuación se pueden observar los resultados obtenidos con el vino:

En cuanto al dióxido de azufre libre la recta de regresión que obtenemos tiene los valores siguientes:

$$Y = 1,51721 + 0,880102 X (\alpha=0,05; p=0,0000)$$

Coefficiente de Correlación = 0,823013

En la figura 5.1 podemos observar la distribución de los datos alrededor de la recta de regresión y ver la dispersión.

Además, el coeficiente de correlación (r) es inferior a 0,975 .Esto puede ser debido a que existan diferencias de especificidad entre los procedimientos de medida comparados. Sería recomendable realizar un nuevo estudio ampliando el número de muestras.

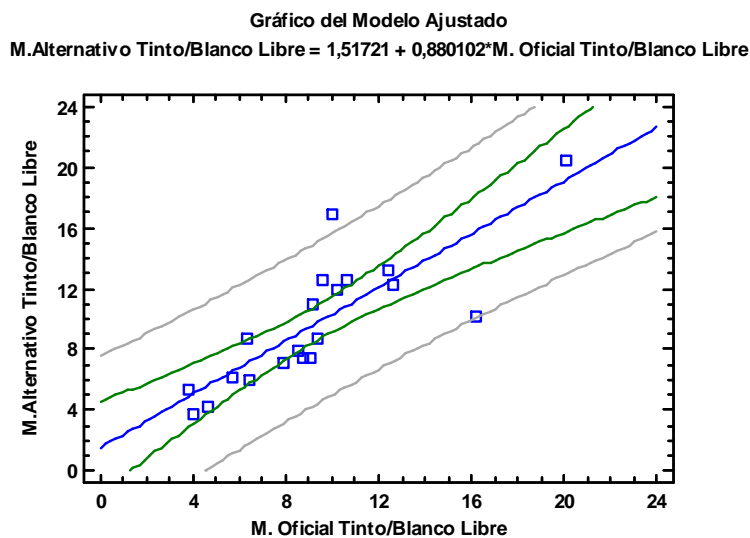


Figura 5.1: Representación de la recta de regresión de sulfuroso libre en vino.

Para determinar la posible existencia de errores sistemáticos, procedemos al cálculo de los intervalos de confianza de la pendiente y del término independiente:

- Para b (pendiente): $b \pm t^* S_b$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; $gl = n-2$)

$$b \pm t^* S_b = 0,880102 \pm 2,1009 * 0,143171 \\ (0,579702; 1,18088)$$

- Para a (termino independiente): $a \pm t^* S_a$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; $gl = n-2$)

$$a \pm t^* S_a = 1,51721 \pm 2,1009 * 1,43894 \\ (-1,505859; 4,54027)$$

Mediante los resultados obtenidos determinamos que:

- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, podemos decir que para un nivel de confianza del 95% no existe un error proporcional a la cantidad de sulfuroso libre.

- El intervalo de confianza del término independiente incluyen el valor 0, lo que significa que con un nivel de confianza del 95% no existe un error sistemático por exceso como por defecto. Sin embargo, el bajo valor del coeficiente de correlación hace que sea necesario tomarse este resultado con reserva.

En cuanto al dióxido de azufre total, la recta de regresión que obtenemos tiene los valores siguientes:

$$Y = -0,700662 + 1,0581 X (\alpha=0,05; p=0,0000) \\ \text{Coeficiente de Correlación} = 0,985405$$

Podemos apreciar en este caso la existencia de una relación lineal entre ambos procedimientos a lo largo de todo el intervalo de medida. En la figura 5.2 podemos observar la distribución de los datos alrededor de la recta de regresión y observar que no existe una importante dispersión de los puntos.

Además, el coeficiente de correlación (r) es superior a 0,975 y por tanto esto significa que para la determinación de dióxido de azufre total no aparece diferencia de especificidad entre los métodos.

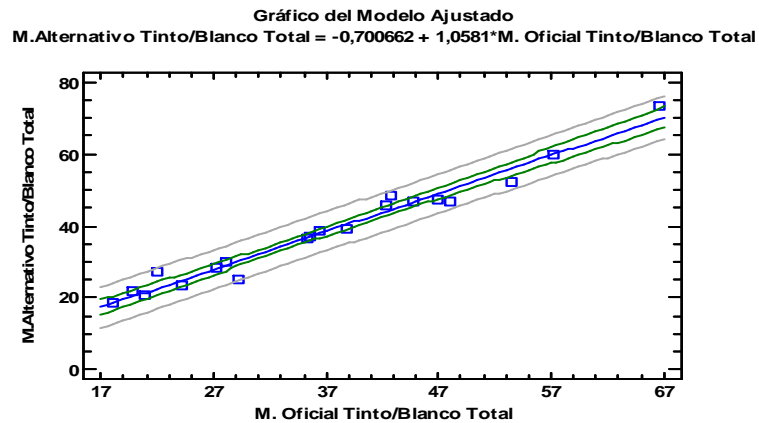


Figura 5.2: Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en vino

En base a los resultados obtenidos, consideramos que existe una buena correlación lineal, y procedemos a analizar los intervalos de confianza del 95% de los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen en este caso.

Procedemos al cálculo de los intervalos de confianza de la pendiente y del término independiente:

- Para b (pendiente): $b \pm t^* S_b$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; $gl = n-2$)

$$b \pm t^* S_b = 1,0581 \pm 2,1009 * 0,0430824$$

$$(0,0967588; 1,148612)$$

- Para a (termino independiente): $a \pm t^* S_a$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; $gl = n-2$)

$$a \pm t^* S_a = -0,70062 \pm 2,1009 * 1,68668$$

$$(-4,244208; 2,842884)$$

Mediante los resultados obtenidos determinamos que:

- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen incluye el valor 0, se puede concluir que el procedimiento evaluado proporciona valores que no son significativamente diferentes a los obtenidos con el de comparación.
- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, podemos decir que para un nivel de confianza del 95% no existe un error proporcional a la cantidad de sulfuroso total.
- El intervalo de confianza del término independiente incluyen el valor 0, lo que significa que con un nivel de confianza del 95% no existe un error sistemático por exceso como por defecto.

Para poder confirmar con más claridad si existen o no errores sistemáticos y complementar así la regresión hemos realizado un análisis de diferencias complementando a la regresión.

Para la realización del análisis es necesario determinar los siguientes parámetros:

- Cálculo de las diferencias (D_i) entre el resultado obtenido con el procedimiento evaluado (x_i) y el resultado con el procedimiento de comparación (y_i):

$$D_i = y_i - x_i$$

- Cálculo del promedio de cada pareja de resultados:

$$(y_i + x_i) / 2$$

- Calcular las diferencias relativas porcentuales (DR_i) entre el resultado obtenido con el procedimiento evaluado y el resultado con el procedimiento de comparación, respecto del valor promedio.

$$DR_i = 100 * y_i - x_i / (y_i + x_i) / 2$$

Se representan en gráficas las diferencias (D_i o DR_i) frente al promedio de ambos valores. La diferencia entre los resultados de los dos procedimientos puede ser descrita mediante el valor de la media de las diferencias (D_m o DR_m) y el de la desviación estándar de la media (S_D o S_{DR})².

El intervalo de confianza del 95% de la media será:

- Para las diferencias absolutas: $D_m \pm 2x S_D$
- Para las diferencias relativas: $DR_m \pm 2x S_{DR}$

Si el intervalo de confianza del 95% de la media incluye el valor cero, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los resultados de los procedimientos de medida. En caso de que exista una diferencia sistemática constante entre los resultados de los procedimientos de medida, el intervalo de confianza del 95% de la media de las diferencias absolutas no incluye el valor cero.

Cuando los resultados con uno de los procedimientos de medida muestran diferencias sistemáticas de tipo proporcional respecto al otro, el intervalo de confianza del 95% de la media de las diferencias relativas porcentuales no incluye el valor cero.

A continuación en la tabla 5.5, encontramos los datos para el análisis de diferencias del sulfuroso libre en las muestras de vino:

Tabla 5.5: Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino.

Muestra	$D_i=Y-X$	$(Y+X)/2$	DR
1	0,65	9,06	7,21
2	-2,28	7,53	-30,29
3	0,76	7,51	10,12
4	0,39	12,39	3,12
5	0,32	3,89	8,22
6	-0,35	20,23	-1,71
7	0,4	6,2	6,45
8	0,63	8,22	7,71
9	-0,83	12,79	-6,47
10	1,31	8,09	16,23
11	6,05	13,19	45,84
12	1,64	8,29	19,79
13	-1,73	11,10	-15,55
14	-1,56	4,62	-33,77
15	-6,84	13,45	-50,87
16	0,49	4,45	11,09
17	-1,97	11,58	-17,04
18	-0,37	5,95	-6,28
19	-2,95	11,03	-26,72
20	-1,85	10,11	-18,34
Suma	-0,40		-3,56

D_m	DR_m	S_D	S_{DR}
-0,40	-3,56	2,45	22,09

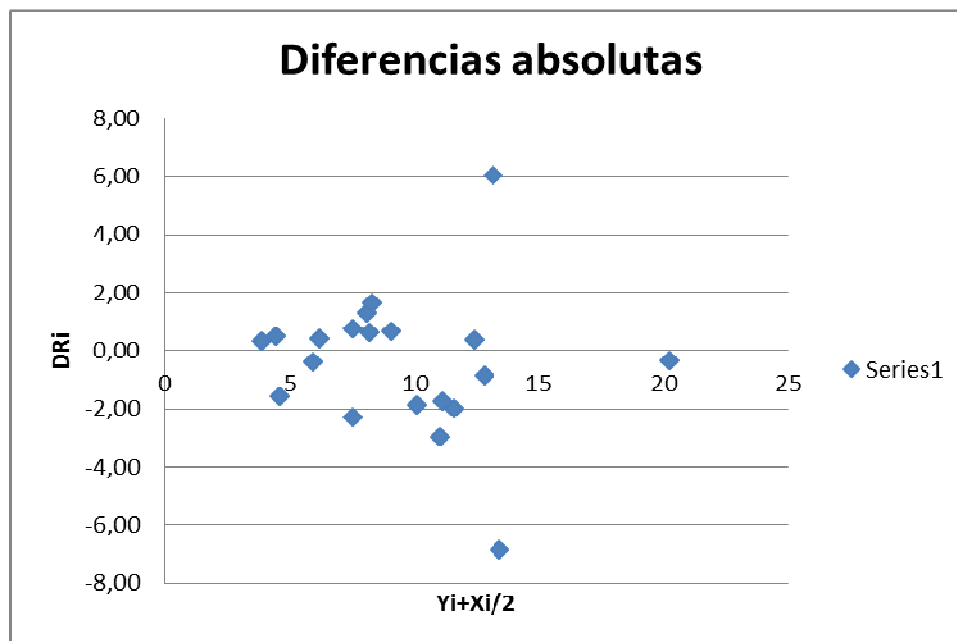


Figura 5.3: Representación de diferencias absolutas de sulfuroso libre en vino

- Valor medio de las diferencias (D_m)= -0,40
- Desviación estándar de la media (S_D)= 2,45
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-5,29;4,09)

Podemos concluir que no hay un error sistemático constante significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias no incluye el valor cero.

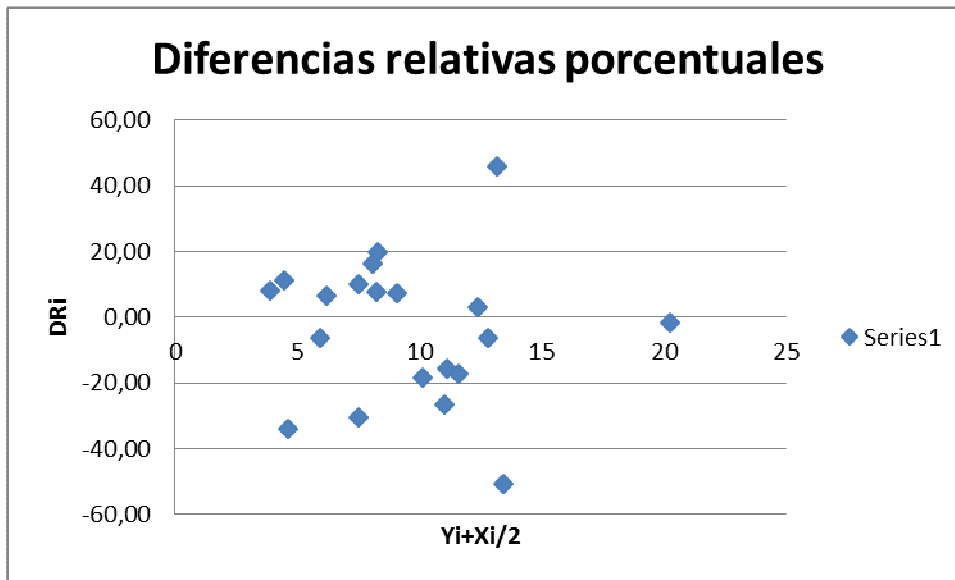


Figura 5.4: Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso libre en vino

- Valor medio de las diferencias (DR_m)= -3,56
- Desviación estándar de la media (S_{DR})= 22,09
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-25,65; 18,52)

Podemos concluir que no hay un error sistemático proporcional significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

A continuación en la tabla 5.6, encontramos los datos para el análisis de diferencias del sulfuroso total en las muestras de vino:

Tabla 5.6: Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino.

Muestra	$D_i=Y-X$	$(Y+X)/2$	DR
1	-1,31	36,28	-3,60
2	-2,12	37,54	-5,65
3	-0,81	18,33	-4,44

4	-0,34	39,00	-0,87
5	-1,97	29,15	-6,77
6	-0,43	47,15	-0,92
7	-1,73	20,70	-8,34
8	-0,99	35,91	-2,75
9	-0,86	27,74	-3,10
10	-0,06	20,94	-0,29
11	-7,11	70,11	-10,14
12	-5,03	24,49	-20,53
13	-5,67	45,50	-12,45
14	4,39	27,03	16,25
15	-2,83	58,59	-4,82
16	0,77	23,72	3,26
17	-6,39	47,14	-13,55
18	-9,47	50,60	-18,71
19	-7,35	55,66	-13,21
20	-0,53	42,73	-1,25
Suma	-2,491		-5,59

D_m	DR_m	S_D	S_{DR}
-2,49	-5,59	3,34	8,14

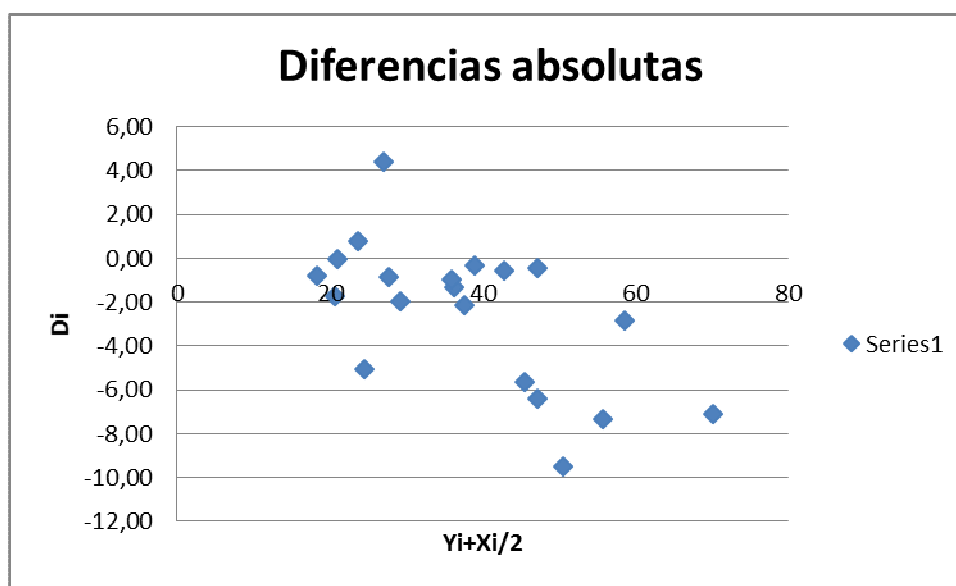


Figura 5.5: Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en vino.

- Valor medio de las diferencias (D_m)= -2,49
- Desviación estándar de la media (S_D)= 3,34
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-9,17;4,19)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático constante significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

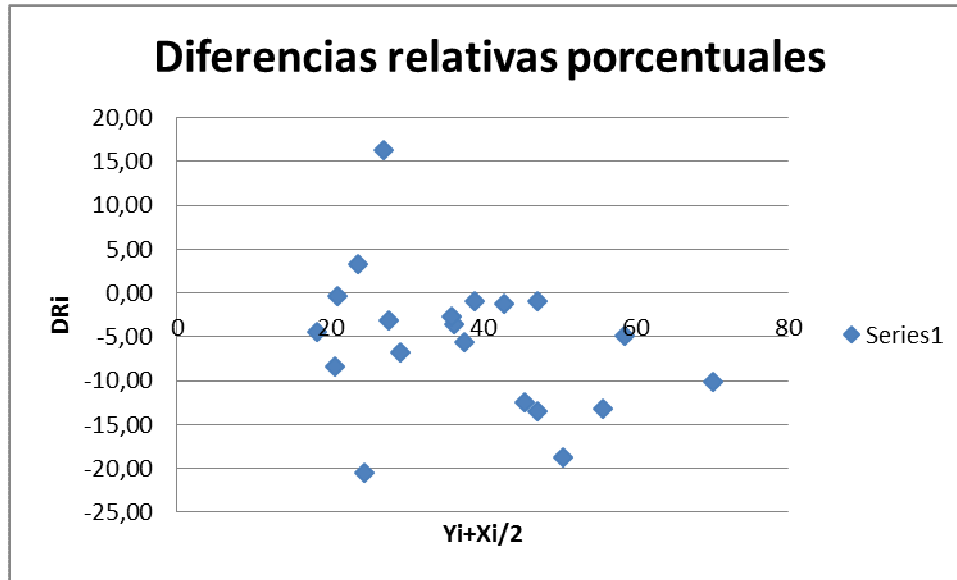


Figura 5.6: Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en vino

- Valor medio de las diferencias (DR_m)= -5,59
- Desviación estándar de la media (S_{DR})= 8,14
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-21,87-10,69)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático proporcional significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

Una vez analizadas la precisión mediante la repetibilidad y la ver la correlación entre ambos métodos mediante la regresión y el análisis de diferencias, del conjunto de muestras de vino, podemos considerar la no existencia de errores sistemáticos. Estos errores sistemáticos para poder considerarlos deben ser significativos tanto en el análisis de las diferencias como en la regresión lineal. Además, hemos podido comprobar que existen diferencias de especificidad entre ambos procedimientos en el análisis del dióxido de azufre libre y que esto puede ser debido a un posible efecto matriz de la muestras del vino blanco sobre uno de los procedimientos comparados. Por ello hemos creído conveniente realizar el análisis separando las muestras. Por un lado, analizaremos el vino blanco y por el otro lado el vino tinto.

5.1.2. Estudio de la veracidad para muestras de vino blanco

Estudio de la precisión

A continuación en la tabla 5.7 encontramos los datos para el cálculo de la repetibilidad del análisis del sulfuroso libre en las muestras de vino blanco:

Tabla 5.7 .Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino blanco.

Muestra	Mx	(X-Mx) ²	My	(Y-My) ²
1	10,17	0,11	16,21	53,18
2	7,47	5,59	9,11	0,03
3	11,97	4,57	10,24	1,74
4	5,40	19,62	3,84	25,81
5	16,87	49,51	10,03	1,22
6	4,20	31,70	4,69	17,87
7	12,57	7,49	10,59	2,80
8	6,13	13,67	5,76	9,99
9	12,50	7,13	9,55	0,40
10	11,03	1,45	9,18	0,07

SrX	SrY	SrX ²	SrY ²	rX	rY	F _{obs}
2,65	2,38	7,04	5,66	7,42	6,63	1,24

SrX= desviación estándar método alternativo

SrY=desviación estándar método oficial

rX= repetibilidad método alternativo

rY= repetibilidad método oficial

Fobs= F test de Fisher-Snedecor

N= Número total de repeticiones

n= Número total de muestras

Estos resultados permiten afirmar que con una probabilidad del 95%, los resultados obtenidos tendrán una repetibilidad inferior a 7,42 mg/l en el método alternativo y una repetibilidad inferior a 6,63 mg/l en el método oficial en el análisis del sulfuroso libre de los vinos blancos.

$$F_{obs} \leq F_{1-\alpha}$$

$$1,24 \leq 2,978$$

Además como el valor de F_{obs} obtenido es inferior al valor F_{1-α}; no se puede afirmar que el valor de la repetibilidad del método alternativo sea significativamente superior al del método de referencia. Esto significa que la repetibilidad del método alternativo es buena puesto que no hay diferencias significativas. Sí que es

ligeramente mayor pero es comparable. Por tanto es positivo porque el método utilizado es bueno.

A continuación en la tabla 5.8 encontramos los datos para el cálculo de la repetibilidad del análisis del sulfuroso total en las muestras de vino blanco:

Tabla 5.8 .Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino blanco.

Muestra	MX	(X-Mx) ²	MY	(Y-My) ²
1	73,67	737,12	66,56	574,24
2	27,00	380,90	21,97	425,32
3	48,33	3,30	42,67	0,00
4	24,83	470,17	29,23	178,76
5	60,00	181,80	57,17	212,48
6	23,33	537,47	24,11	341,88
7	50,33	14,57	43,95	1,82
8	55,33	77,73	45,87	10,69
9	59,33	164,27	51,98	88,05
10	43,00	12,37	42,47	0,02

SrX	SrY	SrX ²	SrY ²	rX	rY	F _{obs}
11,36	9,57	128,98	91,66	31,80	26,79	1,41

SrX= desviación estándar método alternativo

SrY=desviación estándar método oficial

rX= repetibilidad método alternativo

rY= repetibilidad método oficial

Fobs= F test de Fisher-Snedecor

N= Número total de repeticiones

n= Número total de muestras

Estos resultados permiten afirmar que con una probabilidad del 95%, los resultados obtenidos tendrán una repetibilidad inferior a 31,80 mg/l en el método alternativo y una repetibilidad inferior a 26,79 mg/l en el método oficial en el análisis del sulfuroso total de los vinos blancos.

$$F_{obs} \leq F_{1-\alpha}$$

$$1,41 \leq 2,978$$

Además como el valor de F_{obs} obtenido es inferior al valor F_{1-α}, no se puede afirmar que el valor de la repetibilidad del método alternativo sea significativamente superior al del método de referencia. Esto significa que la repetibilidad del método alternativo es buena puesto que no hay diferencias significativas. Aunque la repetibilidad del método alternativo es ligeramente superior es una repetibilidad buena y el por tanto el método utilizado es bueno.

Estudio de la exactitud

En cuanto al sulfuroso libre, la recta de regresión que obtenemos tiene los valores siguientes:

$$Y = 3,738 + 0,683071 X \quad (\alpha=0,05; p=0,0601)$$

Coefficiente de Correlación = 0,611936

Podemos apreciar en este caso la no existencia de una relación lineal entre ambos procedimientos. En la figura 5.7 podemos observar la distribución de los datos de forma dispersa alrededor de la recta de regresión.

Además, el coeficiente de correlación es inferior a 0,975. Esto puede ser debido a que existan diferencias de especificidad entre los procedimientos de medida comparados. Además, sería recomendable realizar un nuevo estudio ampliando el número de muestras.

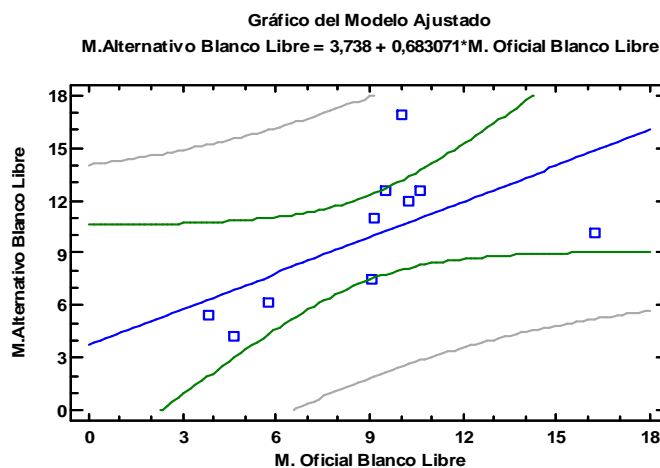


Figura 5.7: Representación de la recta de regresión de sulfuroso libre en vino blanco

La dispersión de los puntos alrededor de la recta es superior a la que cabría esperar -. Por tanto, podemos decir que no existe una buena correlación lineal ya para poder analizar las causas vamos a calcular los intervalos de confianza de la pendiente y del término independiente.

- Para b (pendiente): $b \pm t^* S_b$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; gl = n-2)

$$b \pm t^* S_b = 0,683071 \pm 2,3060 * 0,31213$$

$$(-0,036; 1,402)$$

- Para a (termino independiente): $a \pm t^* S_a$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; $gl = n-2$)

$$a \pm t^* S_a = 3,738 \pm 2,3060 * 2,97553$$

$$(-3,124; 10,599)$$

Mediante los resultados obtenidos determinamos que:

- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, podemos decir que para un nivel de confianza del 95% no existe un error proporcional a la cantidad de sulfuroso libre.
- El intervalo de confianza del término independiente incluyen el valor 0, lo que significa que con un nivel de confianza del 95% no existe un error sistemático por exceso como por defecto. Sin embargo, el bajo valor del coeficiente de correlación hace que sea necesario tomarse este resultado con reserva.

En cuanto al sulfuroso total, la recta de regresión que obtenemos tiene los valores siguientes:

$$Y = -2,82121 + 1,15818X \quad (\alpha=0,05; p=0,0000)$$

Coefficiente de Correlación = 0,976255

Podemos apreciar en este caso la existencia de una relación lineal entre ambos procedimientos. En la figura 5.8 podemos observar la distribución adecuada de los valores alrededor de la recta de regresión.

Además, el coeficiente de correlación es igual a 0,975 y esto significa que para la determinación de dióxido de azufre total no existen diferencias de especificidad entre los métodos y por tanto en las determinaciones.

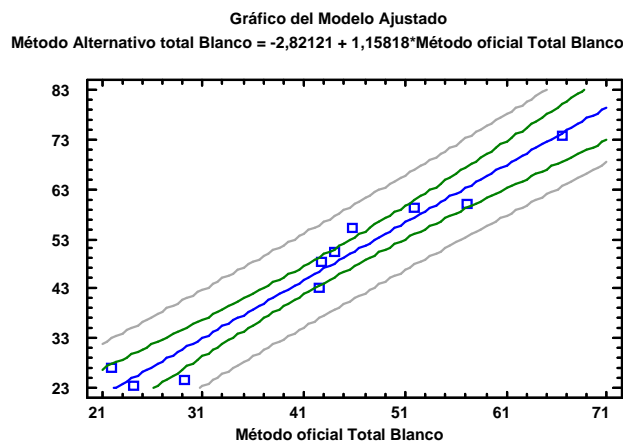


Figura 5.8: Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en vino blanco

En base a los resultados del estudio de veracidad consideramos que los resultados obtenidos por el método alternativo son comparables con los obtenidos por el método de referencia.

Examinamos los intervalos de confianza del 95% de los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen:

- Para b (pendiente): $b \pm t \cdot S_b$ donde t es $t_{student} (\alpha = 0,05/2 ; gl = n-2)$

$$b \pm t \cdot S_b = 1,15818 \pm 2,3060 \cdot 0,09086 \\ (0,94866; 1,3677)$$

- Para a (termino independiente): $a \pm t \cdot S_a$ donde t es $t_{student} (\alpha = 0,05/2 ; gl = n-2)$

$$a \pm t \cdot S_a = -2,8212 \pm 2,3060 \cdot 4,0612 \\ (-12,186; 6,544)$$

Mediante los resultados obtenidos determinamos que:

- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen incluye el valor 0, se puede concluir que el procedimiento evaluado proporciona valores que no son significativamente diferentes a los obtenidos con el de comparación.
- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, podemos decir que para un nivel de confianza del 95% no existe un error proporcional a la cantidad de sulfuroso total.
- El intervalo de confianza del término independiente incluyen el valor 0, lo que significa que con un nivel de confianza del 95% no existe un error sistemático por exceso como por defecto.

Para poder confirmar la existencia o no de errores sistemáticos y complementar la regresión hemos realizado un análisis de diferencias.

A continuación en la tabla 5.9, encontramos los datos para el análisis de diferencias del sulfuroso libre en las muestras de vino blanco:

Tabla 5.9: Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino blanco

Muestra	$D_i=Y-X$	$(Y+X)/2$	DR
1	6,05	13,19	45,84
2	1,64	8,29	19,79
3	-1,73	11,10	-15,55
4	-1,56	4,62	-33,77
5	-6,84	13,45	-50,87
6	0,49	4,45	11,09
7	-1,97	11,58	-17,04

8	-0,37	5,95	-6,28
9	-2,95	11,03	-26,72
10	-1,85	10,11	-18,34
Suma	-0,91		-9,18

D_m	DR_m	S_D	S_{DR}
-0,91	-9,18	3,33	28,13

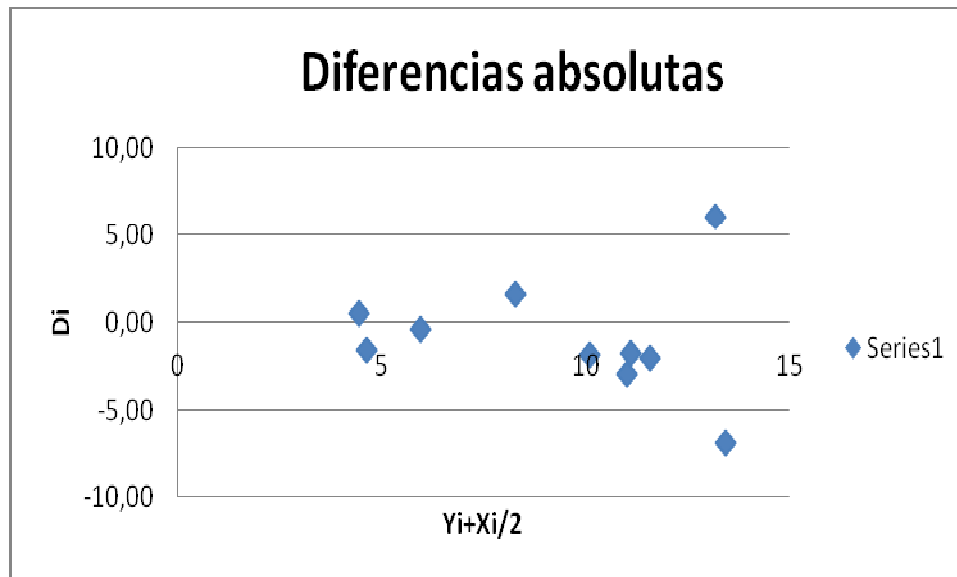


Figura 5.9: Representación de diferencias absolutas de sulfuroso libre en vino blanco

- Valor medio de las diferencias (D_m)= -0,91
- Desviación estándar de la media (S_D)= 3,33
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-7,63;5,81)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático constante significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

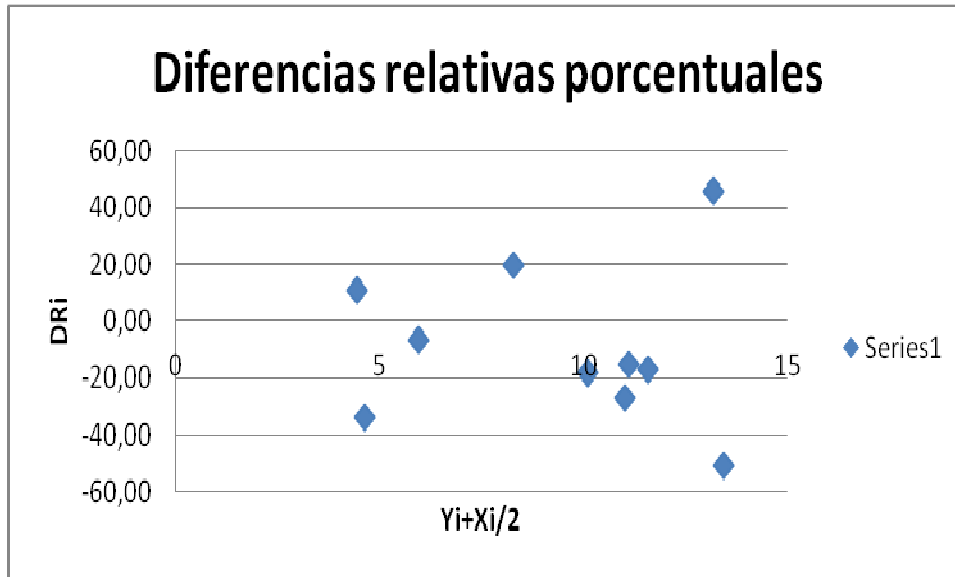


Figura 5.10: Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso libre en vino blanco

- Valor medio de las diferencias (DRm)= -9,18
- Desviación estándar de la media (S_{DR})= 28,13
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-65,44;47,08)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático proporcional significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

A continuación en la tabla 5.10, encontramos los datos para el análisis de diferencias del sulfuroso total en las muestras de vino:

Tabla 5.10: Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino blanco.

Muestra	$D_i=Y-X$	$(Y+X)/2$	DR
1	-7,11	70,11	-10,14
2	-5,03	24,49	-20,53
3	-5,67	45,50	-12,45
4	4,39	27,03	16,25
5	-2,83	58,59	-4,82
6	0,77	23,72	3,26
7	-6,39	47,14	-13,55
8	-9,47	50,60	-18,71
9	-7,35	55,66	-13,21
10	-0,53	42,73	-1,25
Suma	-3,92		-7,51

D_m	DR_m	S_D	S_{DR}
-3,92	-7,51	4,31	11,17

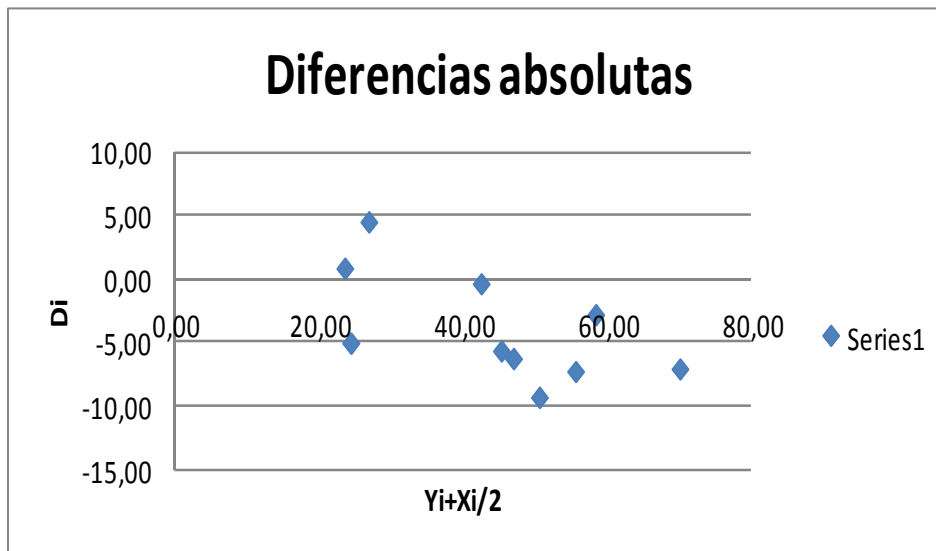


Figura 5.11: Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en vino blanco

- Valor medio de las diferencias (D_m)= -3,92
- Desviación estándar de la media (S_D)= 4,31
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-12,52;4,68)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático constante significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

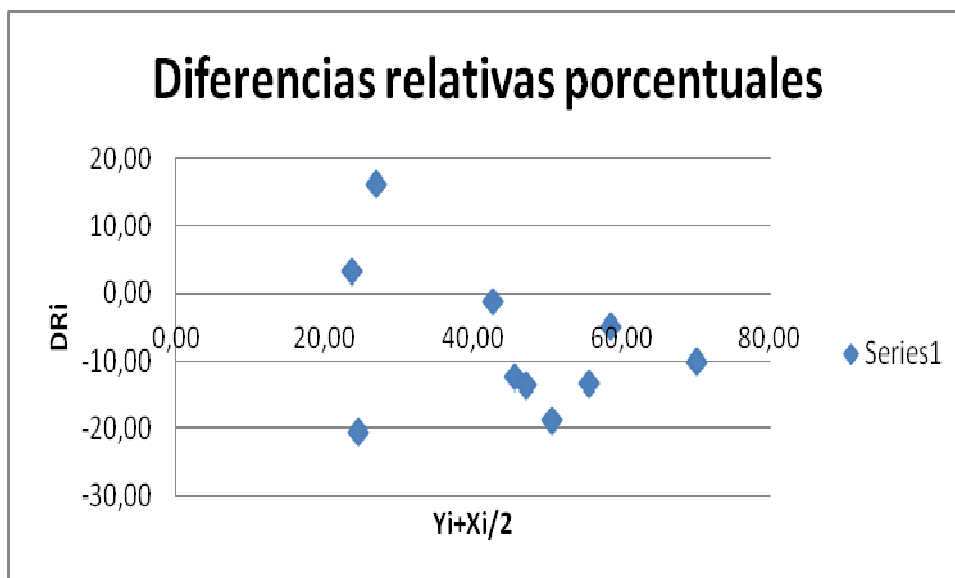


Figura 5.12: Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en vino blanco

- Valor medio de las diferencias (DR_m)= -7,51
- Desviación estándar de la media (S_{DR})= 11,17
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-26,24;18,4)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático proporcional significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

5.1.3. Estudio de la veracidad para muestras de vino tinto

Estudio de la precisión

A continuación en la tabla encontramos los datos para el cálculo de la repetibilidad del análisis del sulfuroso libre en las muestras de vino tinto:

Tabla 5.11 .Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino tinto.

Muestra	M_x	$(X-M_x)^2$	M_y	$(Y-M_y)^2$
1	8,73	0,65	9,39	0,06
2	8,67	0,76	6,39	10,59
3	7,13	5,79	7,89	3,06
4	12,20	7,08	12,59	8,67
5	3,73	33,72	4,05	31,23
6	20,40	117,94	20,05	108,41
7	6,00	12,53	6,40	10,51
8	7,90	2,69	8,53	1,23

9	13,20	13,40	12,37	7,46
10	7,43	4,44	8,75	0,80

SrX	SrY	SrX ²	SrY ²	rX	rY	F _{obs}
3,15	3,02	9,95	9,10	8,82	8,42	0,91

SrX= desviación estándar método alternativo

SrY=desviación estándar método oficial

rX= repetibilidad método alternativo

rY= repetibilidad método oficial

Fobs= F test de Fisher-Snedecor

N= Número total de repeticiones

n= Número total de muestras

Estos resultados permiten afirmar que con una probabilidad del 95%, los resultados obtenidos tendrán una repetibilidad inferior a 8,82 mg/l en el método alternativo y una repetibilidad inferior a 8,42 mg/l en el método oficial en el análisis del sulfuroso libre de los vinos tintos.

$$F_{obs} \leq F_{1-\alpha}$$

$$0,91 \leq 2,978$$

Además como el valor de F_{obs} obtenido es inferior al valor F_{1-α}, no se puede afirmar que el valor de la repetibilidad del método alternativo sea significativamente superior al del método de referencia. Es una repetibilidad buena y por tanto es comparable a la del método de referencia.

A continuación en la tabla 5.12 encontramos los datos para el cálculo de la repetibilidad del análisis del sulfuroso total en las muestras de vino tinto:

Tabla 5.12 .Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino tinto.

Muestra	Mx	(X-Mx) ²	My	(Y-My) ²
1	36,93	26,32	35,63	23,87
2	38,60	46,19	36,48	32,93
3	18,73	170,82	17,92	164,39
4	39,17	54,22	38,83	65,37
5	30,13	2,79	28,16	6,66
6	47,37	242,22	46,93	262,18
7	21,57	104,79	19,84	118,84
8	36,40	21,13	35,41	21,83
9	28,17	13,23	27,31	11,80
10	20,97	117,43	20,91	96,72

SrX	SrY	SrX ²	SrY ²	rX	rY	Fobs
6,32	6,34	39,96	40,23	17,69	17,75	1,01

SrX= desviación estándar método alternativo

SrY=desviación estándar método oficial

rX= repetibilidad método alternativo

rY= repetibilidad método oficial

Fobs= F test de Fisher-Snedecor

N= Número total de repeticiones

n= Número total de muestras

Estos resultados permiten afirmar que con una probabilidad del 95%, los resultados obtenidos tendrán una repetibilidad inferior a 17,69 mg/l en el método alternativo y una repetibilidad inferior a 17,75 mg/l en el método oficial en el análisis del sulfuroso libre de los vinos tintos.

$$F_{obs} \leq F_{1-\alpha}$$

$$1,01 \leq 2,978$$

Además como el valor de F_{obs} obtenido es inferior al valor $F_{1-\alpha}$; - No se puede afirmar que haya diferencias significativas entre las repetibilidades - aunque la repetibilidad del método alternativo es ligeramente menor que la repetibilidad del método oficial.

Estudio de la exactitud

En cuanto al dióxido de azufre libre, la recta de regresión que obtenemos tiene los valores siguientes:

$$Y = -0,303519 + 1,0209X \quad (\alpha=0,05; p=0,0000)$$

Coefficiente de Correlación = 0,976121

Podemos apreciar en este caso la existencia de una relación lineal entre ambos procedimientos. En la figura 5.13 podemos observar la distribución adecuada de los valores alrededor de la recta de regresión.

Además, el coeficiente de correlación es superior a 0,975 y esto significa que no existen diferencias de especificidad entre los métodos.

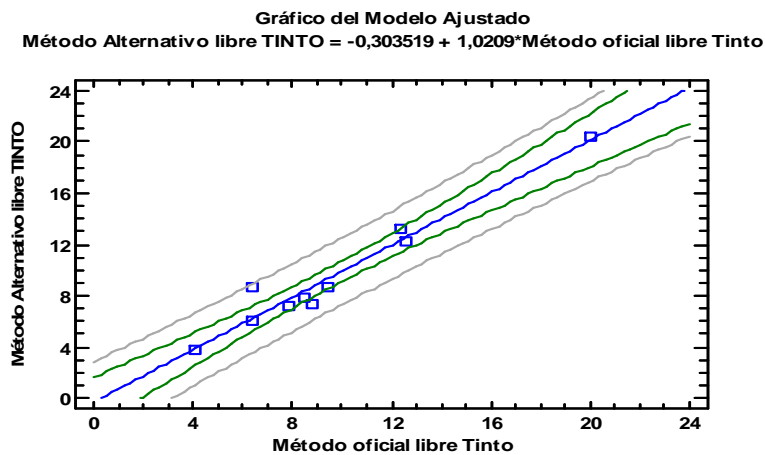


Figura 5.13: Representación de la recta de regresión de sulfuroso libre en vino tinto

En base a los resultados del estudio de veracidad consideramos que los resultados obtenidos por el método alternativo son comparables con los obtenidos por el método de referencia.

Examinamos los intervalos de confianza del 95% de los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen:

- Para b (pendiente): $b \pm t^* S_b$ donde t es $t_{student} (\alpha = 0,05/2 ; gl = n-2)$

$$b \pm t^* S_b = 1,0209 \pm 2,3060 * 0,08032$$

$$(0,8357; 1,2061)$$

- Para a (termino independiente): $a \pm t^* S_a$ donde t es $t_{student} (\alpha = 0,05/2; gl = n-2)$

$$a \pm t^* S_a = -0,3035 \pm 2,3060 * 0,846835$$

$$(-2,2553; 1,6493)$$

Mediante los resultados obtenidos determinamos que:

- -Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen incluye el valor 0, se puede concluir que el procedimiento evaluado proporciona valores que no son significativamente diferentes a los obtenidos con el de comparación
- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, podemos decir que para un nivel de confianza del 95% no existe un error proporcional a la cantidad de sulfuroso libre.
- El intervalo de confianza del término independiente incluyen el valor 0, lo que significa que con un nivel de confianza del 95% no existe un error sistemático por exceso como por defecto.

En cuanto al dióxido de azufre total, la recta de regresión que obtenemos tiene los valores siguientes:

$$Y = 1,24778 + 0,993957X \quad (\alpha=0,05; p=0,0000)$$

Coefficiente de Correlación = 0,9972

Podemos apreciar en este caso la existencia de una relación lineal entre ambos procedimientos. En la figura 5.14 podemos observar la distribución adecuada de los valores alrededor de la recta de regresión.

Además, el coeficiente de correlación es superior a 0,975 y esto significa que no hay diferencia en cuanto a la especificidad de los métodos comparados.

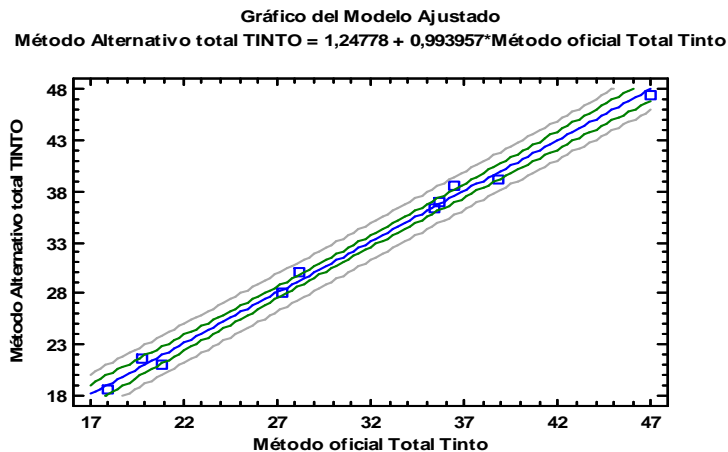


Figura 5.14: Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en vino tinto

En base a los resultados del estudio de veracidad consideramos que los resultados obtenidos por el método alternativo son comparables con los obtenidos por el método de referencia.

Examinamos los intervalos de confianza del 95% de los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen:

- Para b (pendiente): $b \pm t^* S_b$ donde t es $t_{student} (\alpha = 0,05/2 ; gl = n-2)$

$$b \pm t^* S_b = 0,9939 \pm 2,3060 * 0,0262$$

$$(0,93348; 1,05432)$$

- Para a (termino independiente): $a \pm t^* S_a$ donde t es $t_{student} (\alpha = 0,05/2 ; gl = n-2)$

$$a \pm t^* S_a = -1,2477 \pm 2,3060 * 0,8410$$

$$(-0,6916; 3,187)$$

Mediante los resultados obtenidos determinamos que:

- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen incluye el valor 0, se puede concluir que el procedimiento evaluado proporciona valores que no son significativamente diferentes a los obtenidos con el de comparación.
- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, podemos decir que para un nivel de confianza del 95% no existe un error proporcional a la cantidad de sulfuroso total.
- El intervalo de confianza del término independiente incluyen el valor 0, lo que significa que con un nivel de confianza del 95% no existe un error sistemático por exceso como por defecto.

Para poder confirmar la existencia o no de errores sistemáticos y complementar la regresión hemos realizado un análisis de diferencias.

A continuación en la tabla 5.13, encontramos los datos para el análisis de diferencias del sulfuroso libre en las muestras de vino tinto:

Tabla 5.13: Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso libre en las muestras de vino tinto

Muestra	$D_i=Y-X$	$(Y+X)/2$	DR
1	0,65	9,06	7,21
2	-2,28	7,53	-30,29
3	0,76	7,51	10,12
4	0,39	12,39	3,12
5	0,32	3,89	8,22
6	-0,35	20,23	-1,71
7	0,40	6,20	6,45
8	0,63	8,22	7,71
9	-0,83	12,79	-6,47
10	1,31	8,09	16,23
Suma	0,10		2,06

D_m	DR_m	S_D	S_{DR}
0,10	2,06	1,02	12,98

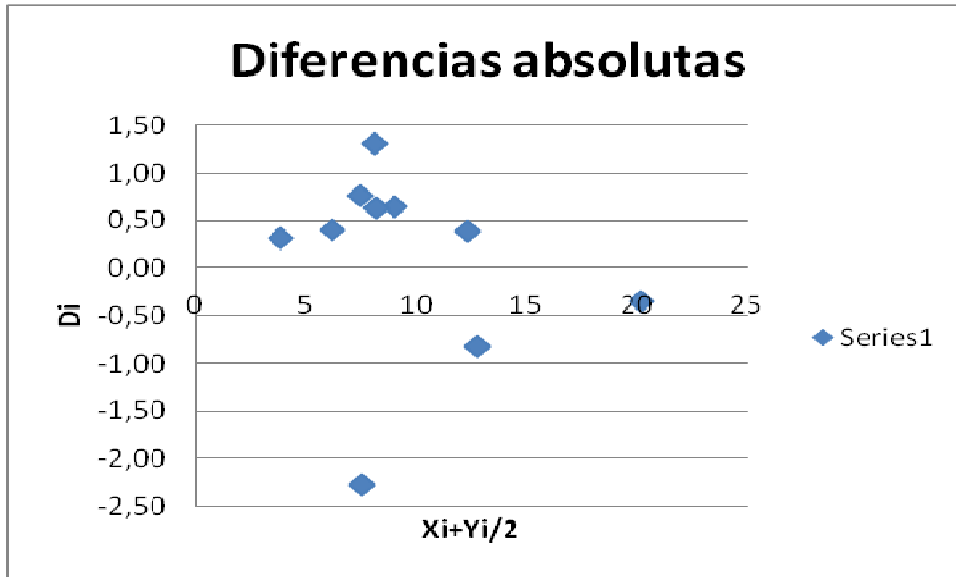


Figura 5.15: Representación de diferencias absolutas de sulfuroso libre en vino tinto

- Valor medio de las diferencias (D_m)= 0,10
- Desviación estándar de la media (S_D)= 1,02
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-1,95;2,148)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático constante significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

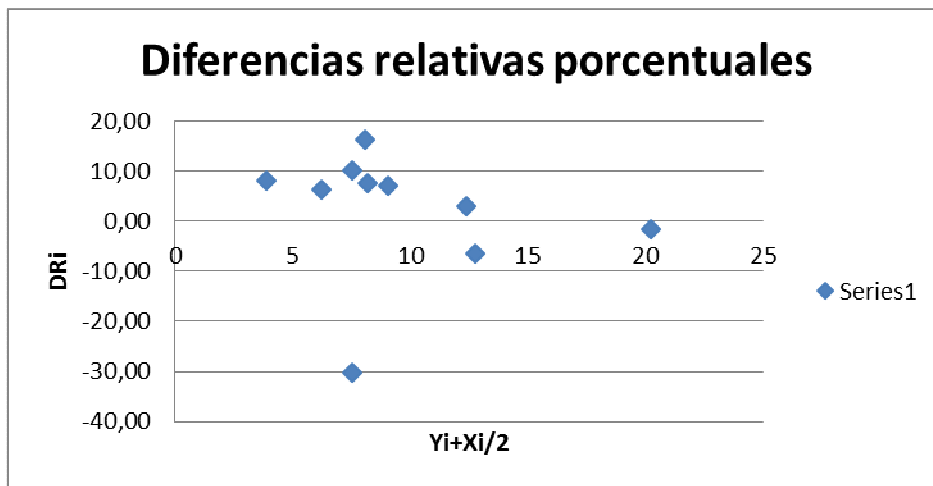


Figura 5.16: Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso libre en vino tinto

- Valor medio de las diferencias (DR_m)= 2,06
- Desviación estándar de la media (S_{DR})= 12,98
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-23,94;28,01)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático proporcional significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

A continuación en la tabla 5.14, encontramos los datos para el análisis de diferencias del sulfuroso libre en las muestras de vino tinto:

Tabla 5.14: Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de vino tinto

Muestra	$D_i=Y-X$	$(Y+X)/2$	DR
1	-1,31	36,28	-3,60
2	-2,12	37,54	-5,65
3	-0,81	18,33	-4,44
4	-0,34	39,00	-0,87
5	-1,97	29,15	-6,77
6	-0,43	47,15	-0,92
7	-1,73	20,70	-8,34
8	-0,99	35,91	-2,75
9	-0,86	27,74	-3,10
10	-0,06	20,94	-0,29
Suma	-1,06		-3,67
D_m	DR_m	S_D	S_{DR}
-1,06	-3,67	0,71	2,67

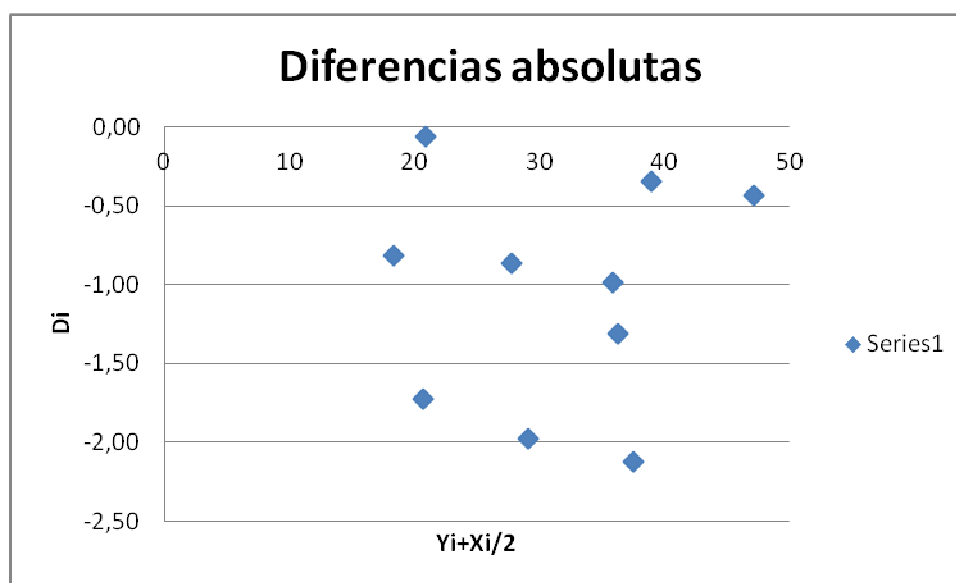


Figura 5.17: Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en vino tinto

- Valor medio de las diferencias (D_m)= -1,06
- Desviación estándar de la media (S_D)= 0,71
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-2,46;0,34)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático constante significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

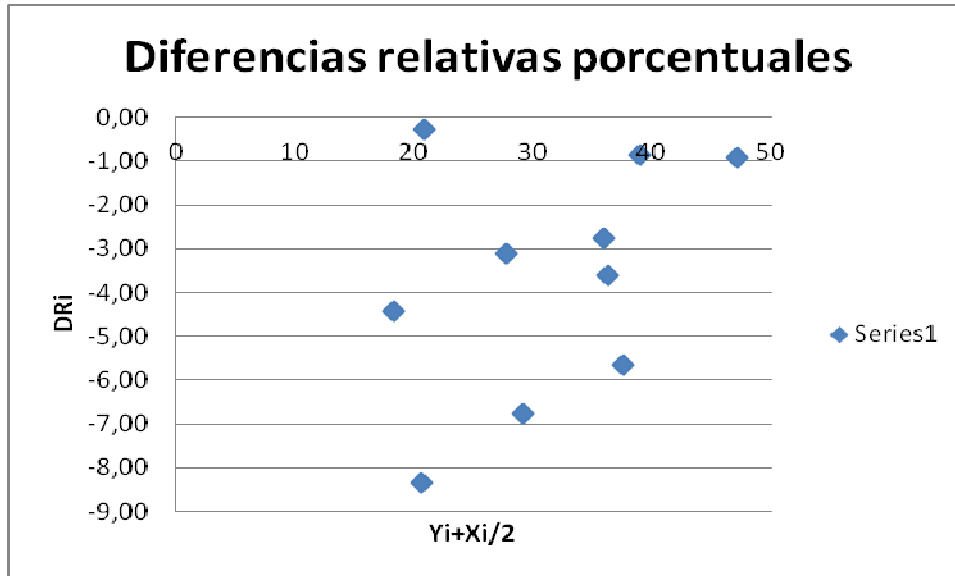


Figura 5.18: Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en vino tinto

- Valor medio de las diferencias (DRm)= -3,67
- Desviación estándar de la media (S_{DR})= 2,67
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-9,01;1,67)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático proporcional - significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

5.2. Verificación del método alternativo para la determinación de dióxido de azufre en conservas vegetales

Debido a que el equipo Hi 84500 está diseñado para el análisis de vinos, previamente al estudio de la veracidad, se ha realizado un estudio de la posible influencia de la preparación de la muestra en los resultados obtenidos con el método alternativo.

La preparación de la muestra en el método de referencia lleva la adición de etanol al 5% y hemos querido comprobar si esta adición interfiere en el resultado final. Además, como las muestras vegetales son menos homogéneas que las muestras de vino, también hemos querido comprobar si una filtración previa podría influir.

Por tanto, y con el fin de estudiar la influencia de la presencia de etanol y del filtrado previo de las muestras de conservas, se ha llevado a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) sobre los datos correspondientes a las determinaciones de dióxido de azufre total. Dichas determinaciones se realizaron por triplicado.

El resultado de la interacción entre variables fue el que se muestra a continuación, por un lado en la tabla 5.15 las muestras de encurtidos y por otro lado en la tabla 5.16 las muestras de legumbres:

Tabla 5.15: ANOVA realizado para el contenido en dióxido de azufre total (media \pm desviación estándar; mg/l) en muestras de encurtidos

Variables	Filtrada	Sin Filtrar
Sin Etanol	39,66 \pm 0,81 ^{aA}	41 \pm 0,81 ^{aA}
Con etanol	39,66 \pm 0,81 ^{aA}	40,66 \pm 0,81 ^{aA}

Las letras minúsculas iguales indican la no existencia de diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre columnas. Las letras mayúsculas indican la no existencia de diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre filas.

Según los resultados obtenidos podemos observar en el caso de las muestras de encurtidos que para $\alpha=0,05$ no existen diferencias significativas entre filtrar o no filtrar la muestra antes de realizar el análisis ($p=0,1909$) y que además, no existen diferencias significativas entre usar etanol o no usar ($p=0,8434$).

Tabla 5.16: ANOVA realizado para el contenido en dióxido de azufre total (media \pm desviación estándar; mg/l) en muestras de legumbres.

Variables	Filtrada	Sin Filtrar
Sin Etanol	40,6 \pm 0,92 ^{aA}	43,33 \pm 0,92 ^{aA}
Con etanol	43,33 \pm 0,92 ^{aA}	42,66 \pm 0,92 ^{aA}

Las letras minúsculas iguales indican la no existencia de diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre columnas. Las letras mayúsculas indican la no existencia de diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre filas.

Según los resultados obtenidos podemos observar en el caso de las legumbres, que para $\alpha=0,05$ no existen diferencias significativas entre filtrar o no filtrar ($p=0,6047$) la muestra antes de realizar la determinación y que no existen diferencias significativas entre usar etanol o no usar ($p=0,1447$). En este caso tampoco existe interacción entre las variables ($p= 0,2441$).

Debido a que no hay diferencias en las diferentes variables estudiadas a la hora de preparar la muestra, hemos elegido la opción de sin filtrar y con etanol ya que es la

preparación de la muestra indicada por el método oficial. De esta manera no se introducen más variables en el método de análisis.

Hemos calculado los valores medios de las 3 mediciones efectuadas por el método alternativo y por el método de referencia. Se puede apreciar que el rango de valores en los que vamos a trabajar se encuentra entre de 32,33-44,58 mg/l de sulfuroso total correspondiente a las conservas vegetales de encurtidos y legumbres que se encuentra dentro del rango permitido (50 mg/l por el Reglamento CE Nº1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo).

Para el estudio de la veracidad, hemos determinado: la precisión mediante el cálculo de la repetibilidad y, el análisis de diferencias y regresión lineal para el análisis de la exactitud.

Los resultados de los experimentos se han plasmado en dos tablas. En la tabla 5.17 los resultados del sulfuroso total en encurtidos y en las tablas 5.18 el sulfuroso total de legumbres

Tabla 5.17 Resultados del contenido de sulfuroso total (mg/l) obtenidos por los dos métodos objetos de estudio en encurtidos.

Muestras	Método Alternativo X			Método oficial Y			Valor medio X	CV Mtdo. X	Valor medio Y	CV Mtdo. Y
	rep 1	rep 2	rep3	rep 1	rep2	rep3				
1	43	40	38	35,2	37,76	35,2	40,33	2,52	36,05	1,48
2	42	45	44	42,24	44,8	46,08	43,66	1,53	44,37	1,96
3	46	42	43	43,52	45,44	44,8	43,66	2,08	44,58	0,98
4	36	37	42	35,2	37,12	39,04	38,33	3,21	37,12	1,92
5	35	37	34	36,48	37,76	37,12	35,33	1,53	37,12	0,64
6	37	38	37	38,4	39,04	38,4	37,33	0,58	38,61	0,37
						Medias	39,77		39,64	

Tabla 5.18. Resultados del contenido de sulfuroso total (mg/l) obtenidos por los dos métodos objetos de estudio en legumbres.

Muestras	Método Alternativo X			Método oficial Y			Valor medio X	CV Mtdo. X	Valor medio Y	CV Mtdo. Y
	rep 1	rep 2	rep3	rep 1	rep2	rep3				
1	40	41	39	39,04	41,6	37,12	40	1,00	39,25	2,25
2	41	44	43	41,6	42,88	44,8	42,66	1,53	43,09	1,61
3	30	32	35	32	34,56	33,28	32,33	2,52	33,28	1,28
4	38	37	40	38,4	40,32	39,68	38,33	1,53	39,46	0,98
5	43	41	44	41,6	43,52	44,8	42,66	1,53	43,3	1,61

6	35	38	36	35,2	32	33,92	36,33	1,53	33,7	1,61
						Medias	38,71		38,68	

5.2.1. Estudio de la veracidad para encurtidos

Estudio de la precisión

A continuación en la tabla 5.19 encontramos los datos para el cálculo de la repetibilidad del análisis del sulfuroso total en las muestras de encurtidos:

Tabla 5.19 .Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de encurtidos

Muestra	Mx	(X-Mx) ²	My	(Y-My) ²
1	40,33	0,31	36,05	12,90
2	43,66	15,21	44,37	22,36
3	43,66	15,21	44,58	24,43
4	38,33	2,09	37,12	6,37
5	35,33	19,75	37,12	6,37
6	37,33	5,98	38,61	1,06

SrX	SrY	SrX ²	SrY ²	rX	rY	F _{obs}
2,20	2,47	4,86	6,12	6,16	6,91	0,794

SrX= desviación estándar método alternativo

SrY=desviación estándar método oficial

rX= repetibilidad método alternativo

rY= repetibilidad método oficial

Fobs= F test de Fisher-Snedecor

N= Número total de repeticiones

n= Número total de muestras

Estos resultados permiten afirmar que con una probabilidad del 95%, los resultados obtenidos tendrán una repetibilidad inferior a 6,16 mg/l en el método alternativo y una repetibilidad inferior a 6,91 mg/l en el método oficial en el análisis del sulfuroso libre de los vinos tintos.

$$F_{obs} \leq F_{1-\alpha}$$

$$0,794 \leq 4,284$$

Además como el valor de F_{obs} obtenido es inferior al valor F_{1-α}, teniendo en cuenta que la repetibilidad del método alternativo es ligeramente inferior a la repetibilidad del método oficial, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre las repetibilidades de ambos métodos.

Estudio de la exactitud

En cuanto al sulfuroso total, la recta de regresión que obtenemos tiene los valores siguientes:

$$Y = 3,3997 + 0,907752 X (\alpha=0,05; p=0,0000)$$

Coefficiente de Correlación = 0,92498

En este caso se obtiene un coeficiente de correlación elevado sin embargo el valor del mismo inferior a 0,975 puede indicarnos que para la determinación de dióxido de azufre total en encurtidos existen diferencias de especificidad entre los métodos.

En la figura 5.19 podemos observar la distribución de forma dispersa de los valores alrededor de la recta de regresión.

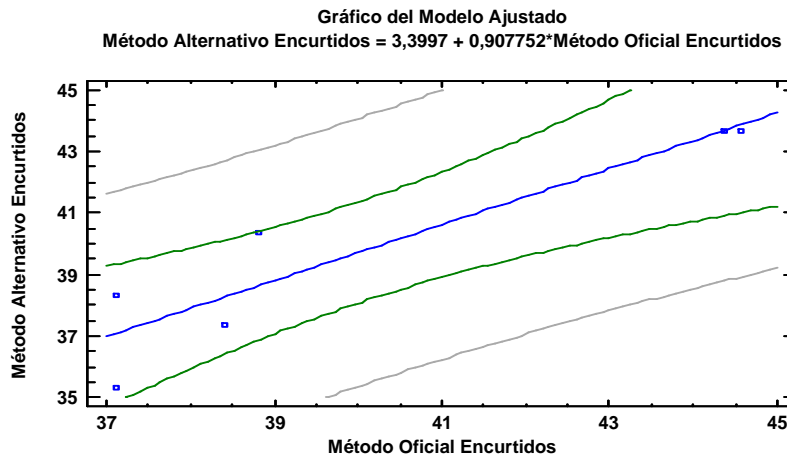


Figura 5.19: Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en encurtido

Si, como en casos anteriores, realizamos el cálculo de los intervalos de confianza de la pendiente y del término independiente:

- Para b (pendiente): $b \pm t * S_b$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; $gl = n-2$)

$$b \pm t * S_b = 0,9077 \pm 2,7765 * 0,1864$$

$$(0,39016; 1,42523)$$

- Para a (termino independiente): $a \pm t * S_a$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; $gl = n-2$)

$$a \pm t * S_a = 3,3997 \pm 2,7765 * 7,49523$$

$$(-17,4107; 24,2101)$$

Mediante los resultados obtenidos determinamos que:

- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen incluye el valor 0, se puede concluir que el procedimiento evaluado proporciona valores que no son significativamente diferentes a los obtenidos con el de comparación.
- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, podemos decir que para un nivel de confianza del 95% no existe un error proporcional a la cantidad de sulfuroso total.
- El intervalo de confianza del término independiente incluyen el valor 0, lo que significa que con un nivel de confianza del 95% no existe un error sistemático por exceso como por defecto.

Hemos realizado un análisis de diferencias para considerar mejor si existen o no errores sistemáticos significativos. A continuación en la tabla 5.20, encontramos los datos para el análisis de diferencias del sulfuroso total en las muestras de encurtidos.

Tabla 5.20: Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de encurtidos

Muestras	$D_i=Y-X$	$(Y+X)/2$	DR
1	-4,28	38,19	-11,21
2	0,71	44,02	1,61
3	0,92	44,13	2,08
4	-1,21	37,73	-3,22
5	1,79	36,23	4,93
6	1,28	37,97	3,37
Suma	-0,13		-0,40
D_m	DR_m	S_D	S_{DR}
0,56	1,40	3,45	5,96

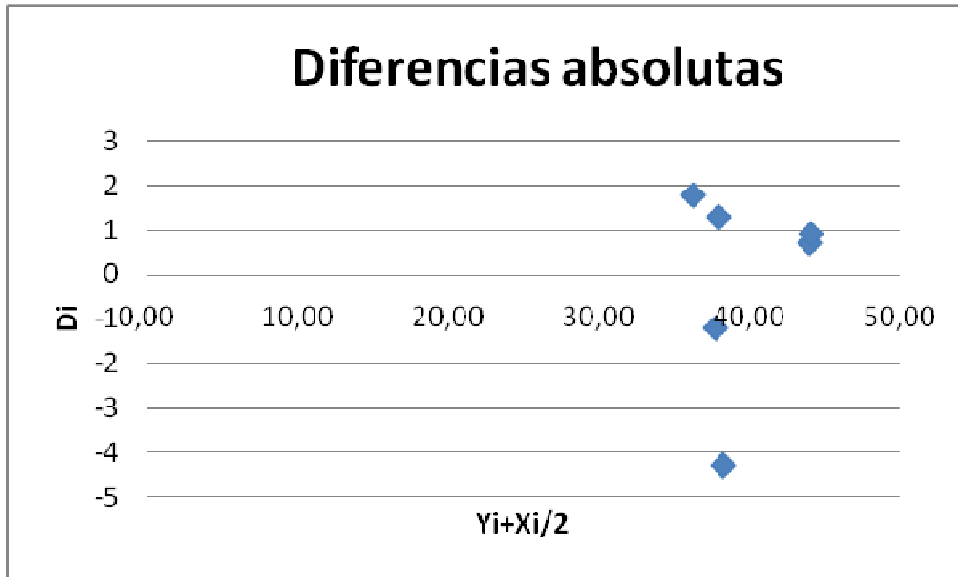


Figura 5.20: Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en encurtidos

- Valor medio de las diferencias (D_m)= 0,56
- Desviación estándar de la media (S_D)= 3,45
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-7,03;6,77)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático constante significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

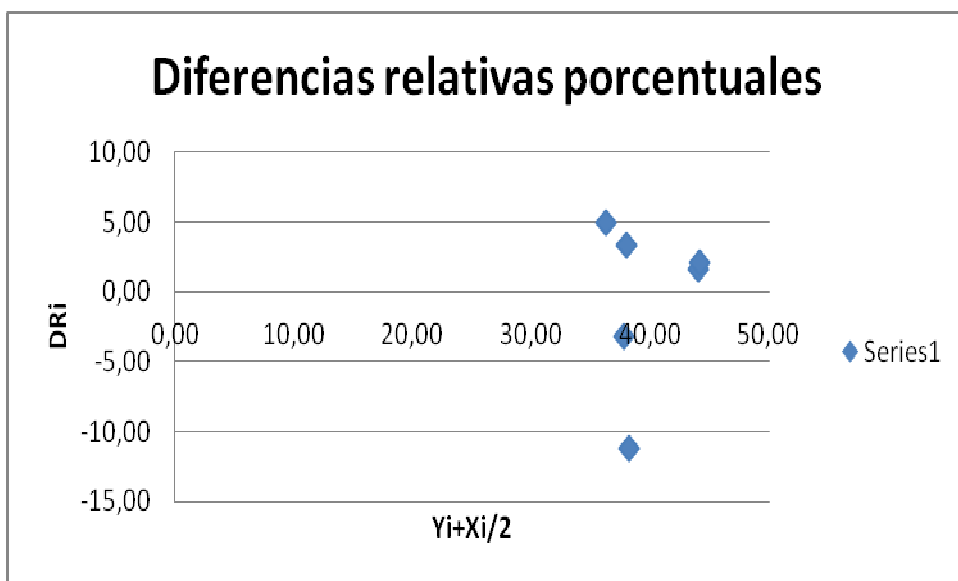


Figura 5.21: Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en encurtidos

- Valor medio de las diferencias (DRm)= 1,40
- Desviación estándar de la media (S_{DR})= 5,96
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-12,3;11,92)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático proporcional significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

5.2.2. Estudio de la veracidad para legumbres

Estudio de la precisión

A continuación en la tabla 5.21 encontramos los datos para el cálculo de la repetibilidad del análisis del sulfuroso total en las muestras de legumbres:

Tabla 5.21 .Resultados de la repetibilidad del contenido de sulfuroso total en las muestras de legumbres

Muestra	Mx	(X-Mx) ²	My	(Y-My) ²
1	40	1,63	39,25	0,32
2	42,66	15,56	43,09	19,44
3	32,33	40,82	33,28	29,21
4	38,33	0,15	39,46	0,61
5	42,66	15,56	43,3	21,36
6	36,33	5,71	33,7	24,78

SrX	SrY	SrX ²	SrY ²	rX	rY	F _{obs}
2,57	2,82	6,61	7,79	7,19	7,89	0,82

SrX= desviación estándar método alternativo

SrY=desviación estándar método oficial

rX= repetibilidad método alternativo

rY= repetibilidad método oficial

Fobs= F test de Fisher-Snedecor

N= Número total de repeticiones

n= Número total de muestras

Estos resultados permiten afirmar que con una probabilidad del 95%, los resultados obtenidos tendrán una repetibilidad inferior a 7,19 mg/l en el método alternativo y una repetibilidad inferior a 7,89 mg/l en el método oficial en el análisis del sulfuroso libre de los vinos tintos.

$$F_{obs} \leq F_{1-\alpha}$$

$$0,82 \leq 4,284$$

Además como el valor de F_{obs} obtenido es inferior al valor $F_{1-\alpha}$, y teniendo en cuenta que la repetibilidad del método alternativo es ligeramente inferior a la repetibilidad del método oficial, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre las repetibilidades de ambos métodos.

Estudio de la exactitud

En cuanto al sulfuroso total, la recta de regresión que obtenemos tiene los valores siguientes:

$$Y = 5,40435 + 0,8612 X \ (\alpha=0,05; p=0,0044)$$

Coefficiente de Correlación = 0,945593

Se obtiene un coeficiente de correlación elevado sin embargo el valor del mismo inferior a 0,975 puede indicarnos que para la determinación de dióxido de azufre total en encurtidos existen diferencias de especificidad entre los métodos.

En la figura 5.22 podemos observar la distribución de forma dispersa de los valores alrededor de la recta de regresión.

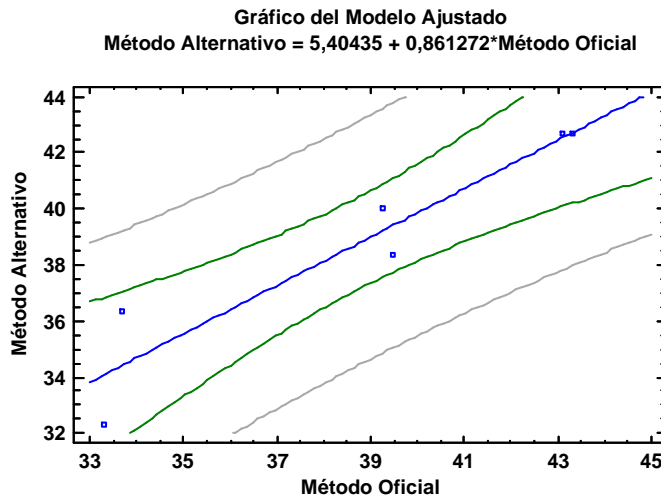


Figura 5.22: Representación de la recta de regresión de sulfuroso total en legumbres

Procedemos al cálculo de los intervalos de confianza de la pendiente y del término independiente:

- Para b (pendiente): $b \pm t^* S_b$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; $gl = n-2$)

$$b \pm t^* S_b = 0,8612 \pm 2,7765 * 0,1481$$

$$(0,46; 1,271)$$

- Para a (termino independiente): $a \pm t^* S_a$ donde t es tstudent ($\alpha = 0,05/2$; $gl = n-2$)

$$a \pm t^* S_a = 5,40435 \pm 2,7765 * 5,76169$$

$$(-10,5929; 21,40168)$$

Mediante los resultados obtenidos determinamos que:

- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen incluye el valor 0, se puede concluir que el procedimiento evaluado proporciona valores que no son significativamente diferentes a los obtenidos con el de comparación.
- Debido a que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1, podemos decir que para un nivel de confianza del 95% no existe un error proporcional a la cantidad de sulfuroso total.
- El intervalo de confianza del término independiente incluyen el valor 0, lo que significa que con un nivel de confianza del 95% no existe un error sistemático por exceso como por defecto.

A continuación en la tabla 5.22, encontramos los datos para el análisis de diferencias del sulfuroso total en las muestras de legumbres para poder considerar mejor la existencia o no errores sistemáticos.

Tabla 5.22: Resultados del análisis de diferencias del contenido de sulfuroso total en las muestras de legumbres

Muestras	$D_i=Y-X$	$(Y+X)/2$	DR
1	-0,75	39,63	-1,88
2	0,43	42,88	1,00
3	0,95	32,81	2,89
4	1,13	38,90	2,91
5	0,64	42,99	1,49
6	-2,63	35,02	-7,50
Suma	-0,04		-0,18
D_m	DR_m	S_D	S_{DR}
-0,04	-0,18	4,12	3,99

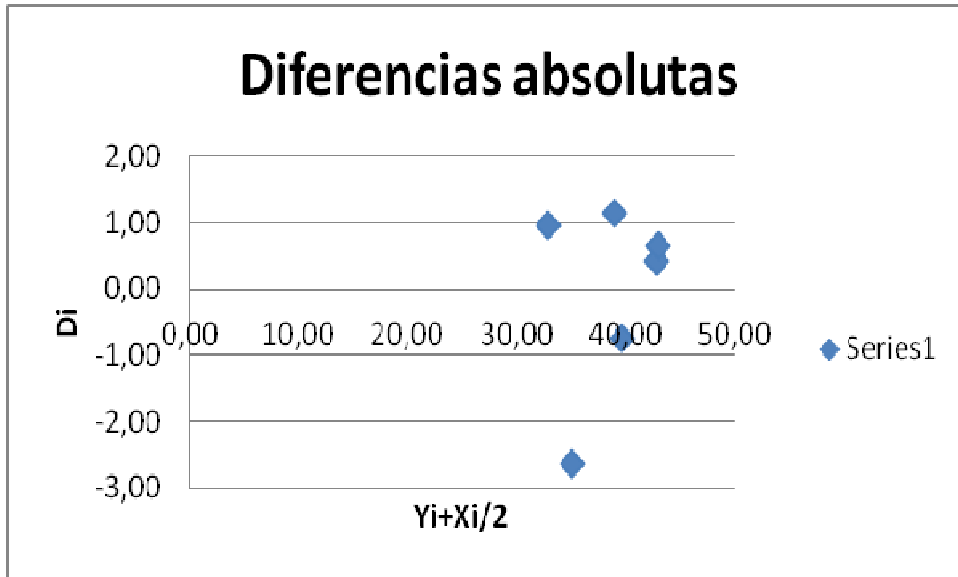


Figura 5.23: Representación de diferencias absolutas de sulfuroso total en legumbres

- Valor medio de las diferencias (D_m)= -0,04
- Desviación estándar de la media (S_D)= 4,12
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-8,28;8,2)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático constante significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

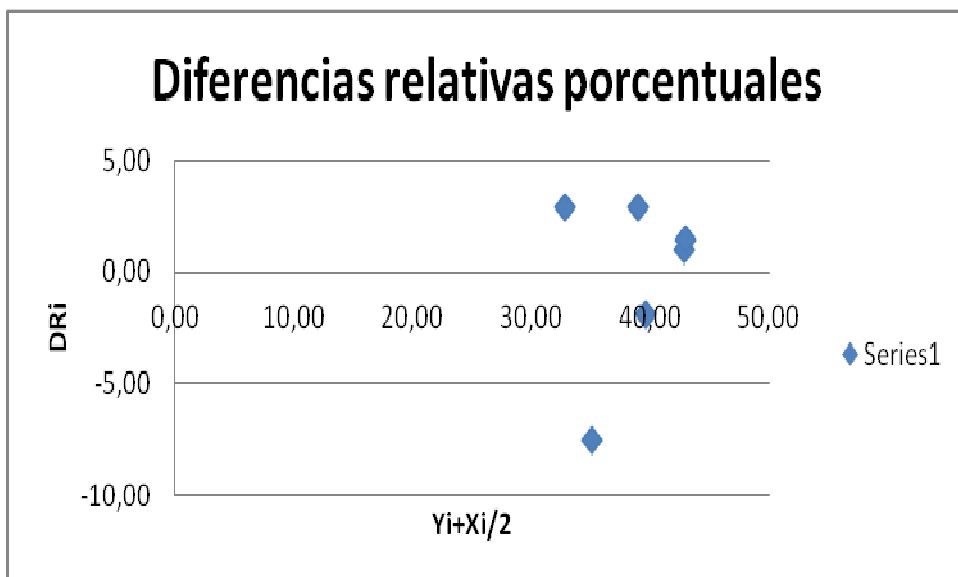


Figura 5.24: Representación de diferencias relativas porcentuales de sulfuroso total en legumbres

- Valor medio de las diferencias (DR_m)= -0,18
- Desviación estándar de la media (S_{DR})= 3,99
- Intervalo de confianza (95%) del valor medio: (-8,18;7,8)

Podemos concluir diciendo que no hay un error sistemático proporcional significativo porque el intervalo de confianza del valor medio de las diferencias incluye el valor cero.

6. CONCLUSIONES

Tras el estudio de verificación realizado sobre el equipo de análisis rápido utilizado para determinar el dióxido de azufre en alimentos, comentamos a continuación las conclusiones de los resultados obtenidos:

- Tras el estudio de la repetibilidad - realizado para muestras de vino y de conservas vegetales, se puede concluir que el método de determinación alternativo -presenta una repetibilidad comparable a la del método de referencia ya que no existen diferencias significativas para ninguno de los grupos de muestras estudiados, tanto en la determinación de dióxido de azufre libre como total. -
- Tras el estudio de la exactitud, realizado para el análisis del dióxido de azufre total de las muestras de vino tanto en conjunto como por separado- muestra una buena correlación lineal entre ambos métodos. Además de que no existen diferencias de especificidad entre los procedimientos de medida comparados. Se puede concluir que el método alternativo presenta en este caso una exactitud comparable a la del método de referencia para la determinación del dióxido de azufre total en vinos.
- Tras el estudio de la exactitud en el análisis del dióxido de azufre libre tanto en el conjunto de las muestras de vino como en el vino blanco, observamos que no existe una buena correlación lineal entre ambos métodos a diferencia del vino tinto que sí que existe buena correlación lineal. Además, existen diferencias de especificidad entre los procedimientos de medida que pueden ser debidos al ácido ascórbico de vino blanco. Se puede concluir que el método alternativo presenta en este caso una exactitud no comparable a la del método de referencia para la determinación del dióxido de azufre libre en vinos.
- el estudio de la exactitud -para el análisis del dióxido de azufre total de las conservas vegetales, -no muestra la existencia de diferencias significativas entre el método alternativo y el de referencia.
- En todos los análisis hemos podido comprobar la no existencia de errores sistemáticos,(ni proporcionales ni constantes). -
- De forma general, se puede afirmar que no aparecen diferencias importantes entre los resultados obtenidos utilizando ambos métodos ni en las muestras de vino ni en las muestras de conservas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, L., García, F. J., García, T., Illera, M., & Juancadella, M. (2001). Validación de métodos analíticos. *Asociación española de farmacéuticos de la industria*.
- Chandra S., Rachna R., (2013). Determination of sulfite, with emphasis on methods of biological detection: a review. Department of Biochemistry, University of Maryland. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- Dalton-Bunnow M.F; Review of sulfite sensitivity. *American Journal of Hospital Pharmacy (Now: American Journal of Health-System Pharmacy)*,42, 2220-2226.
- Daniels D., Joe Jr, F.L.,Warnwer, C.R. (1992). Survey of sulphites determined in a variety of foods by the optimized Monier-Williams method. *Food Chemistry and technology*, 9,283-289.
- FDA. (2001). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation.
- Frazier, W.C., Westhoff, D.C. (1978). Preservation by food additives. In: *Food Microbiology*. McGraw- Hill Book Company, New York, United States, 154-170.
- Ho-Soo Lim, Sung-Kwan Park, So-Hee Kim, Sung-Bong Song (2014). Comparison of four different methods for the determination of sulfites in foods marketed in South Korea. *Food Additives & Contaminants: Part A*, Vol. 31, No. 2, 187–196.
- ICH. (2005). International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. In).
- Jackowetz, J. N., Li, E., & Mira de Orduña, R. (2012). Sulphur dioxide content of wines: The role of winemaking and carbonyl compounds. *Practical Winery & Vineyard*, 38-49.
- Kim HJ (1990) Determination of sulfite in foods and beverages by ion exclusion chromatography with electrochemical detection: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 73:. 216-222.
- Mischeka D.; C. Krapfenbauer. (2011). Exposure assessment of food Preservatives (sulphites, benzoic and sorbic acid). Austrian Agency for Health and Food Safety, Vienna, Austria; Institute for Food Control. (Received 8 September 2011; final version received 17 November 2011).

- Montano M.L. (1989). Adverse reactions induced by food additives: sulfites. *Revista alergia México*, 36, 107-117.
- OIV. (2005). Guía práctica para la validación, el control de calidad y la estimación de la incertidumbre de un método de análisis enológico alternativo.
- Paul F., 1958, Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein.
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B. Lonvaud, A.; (2006) (2nd ed). The microbiology of wine and vinifications. *Handbook of Enology*, vol 1 and 2. Wiley, Chichester, England.
- Sullivan, J. TA Hollingworth, Wekell MM, Newton RT, Larose JE (1986) Determination of sulfites in foods by flow injection analysis. *Assoc Off Anal Chem.* 69:542-546.
- Taylor, S.L. (1986); Romano, Suzzi, (1999); Gao, (2002); Higley, N.A., Bush, R.K. (1986). Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Advances in Food Research*, 30: 1-76.
- Theisen S, R Hansch, Kothe L, (2010). Un método de HPLC rápido y sensible para el análisis de sulfito en los alimentos sobre la base de una planta de sulfito oxidasa (2010). *Biosens Bioelectrón* 26:175-181.
- Togores, J. H. (2003). *Tratado de enología: microbiología del vino*: Mundi-Prensa.

Otras fuentes

- Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I.). Marzo 2001.
- REGLAMENTO (CE) No 1333/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios.
- Instituto Nacional del Consumo y Agencia Española de Seguridad Alimentario y Nutrición, AECOSAN.
- Vocabulario internacional de metrología, VIM, 2008
- Codex alimentario
- ICH, 2005
- Proyecto SO2SAY

8. ANEJOS

A continuación se pueden observar las distintas disposiciones existentes sobre aditivos alimentarios:

Reglamento (CE) nº 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios (aplicable en función del Reglamento 1333/2008).

Reglamento (UE) nº 234/2011 de la Comisión, de 10 de marzo de 2011, de ejecución del Reglamento (CE) no 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios

Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios

- **Modificado por: Reglamento (UE) nº 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011** por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) Nº1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión.
 - **Modificado por: Reglamento (UE) nº 380/2012 de la Comisión, de 3 de mayo de 2012**, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las condiciones de utilización y los niveles de utilización de aditivos alimentarios que contienen aluminio (Aplicable a partir del 1 de febrero de 2014 para aditivos distintos de edulcorantes y colorantes y a partir del 1 de agosto de 2014 para lacas de aluminio fabricadas a partir de colorantes)
 - **Modificado por: Reglamento (UE) no 1274/2013 de la Comisión, de 6 de diciembre de 2013**, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión en lo que concierne a determinados aditivos alimentarios. (Aplicable a partir del 26 de diciembre de 2013).
 - **Modificado por: Reglamento (UE) no 59/2014 de la Comisión, de 23 de enero de 2014**, que modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en cuanto a la utilización de dióxido de azufre y sulfitos (E 220-228) en productos aromatizados a base de vino. (Aplicable a partir del 13 de febrero de 2014)

- **Modificado por: Reglamento (UE) no 264/2014 de la Comisión, de 14 de marzo de 2014**, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, en lo relativo a la utilización del copolímero de acetato de vinilo/polivinilpirrolidona en complementos alimenticios sólidos, y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión, en lo relativo a las especificaciones de dicho copolímero (Aplicable a partir del 7 de abril de 2014).
 - **Modificado por: Reglamento (UE) no 298/2014 de la Comisión, de 21 de marzo de 2014**, por el que se modifican el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión por lo que se refiere al uso del difosfato magnésico de dihidrógeno como gasificante y regulador de la acidez. (Aplicable a partir del 14 de abril de 2014).
- **Modificado por: Reglamento (UE) nº 1130/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011**, por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre aditivos alimentarios, para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión autorizados para ser empleados en aditivos alimentarios, enzimas alimentarias, aromas alimentarios y nutrientes .
 - **Modificado por: Reglamento (UE) no 1274/2013 de la Comisión, de 6 de diciembre de 2013**, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión en lo que concierne a determinados aditivos alimentarios. (Aplicable a partir del 26 de diciembre de 2013).

Reglamento (UE) nº 231/2012 de la Comisión, de 9 de marzo de 2012, por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo.

- **Modificado por: Reglamento (UE) no 1274/2013 de la Comisión, de 6 de diciembre de 2013**, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión en lo que concierne a determinados aditivos alimentarios. (Aplicable a partir del 26 de diciembre de 2013).
- **Modificado por: Reglamento (UE) no 264/2014 de la Comisión, de 14 de marzo de 2014**, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, en lo relativo a la utilización del copolímero de acetato de vinilo/polivinilpirrolidona en complementos alimenticios sólidos, y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión, en lo relativo a las especificaciones de dicho copolímero (Aplicable a partir del 7 de abril de 2014).
- **Modificado por: Reglamento (UE) no 298/2014 de la Comisión, de 21 de marzo de 2014**, por el que se modifican el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento

(UE) no 231/2012 de la Comisión por lo que se refiere al uso del difosfato magnésico de dihidrógeno como gasificante y regulador de la acidez. (Aplicable a partir del 14 de abril de 2014).

Reglamento (UE) Nº 257/2010 de la Comisión, de 25 de marzo de 2010, por el que se establece un programa para la reevaluación de aditivos alimentarios autorizados de conformidad con el Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios.

Reglamento (UE) nº 234/2011 de la Comisión, de 10 de marzo de 2011, de ejecución del Reglamento (CE) no 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios

Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios

- **Modificado por: Reglamento (UE) nº 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011** por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) Nº1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión.
 - **Modificado por :Reglamento (UE) nº 380/2012 de la Comisión, de 3 de mayo de 2012**, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las condiciones de utilización y los niveles de utilización de aditivos alimentarios que contienen aluminio (Aplicable a partir del 1 de febrero de 2014 para aditivos distintos de edulcorantes y colorantes y a partir del 1 de agosto de 2014 para lacas de aluminio fabricadas a partir de colorantes)
 - **Modificado por: Reglamento (UE) no 1274/2013 de la Comisión, de 6 de diciembre de 2013**, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión en lo que concierne a determinados aditivos alimentarios. (Aplicable a partir del 26 de diciembre de 2013).
 - **Modificado por: Reglamento (UE) no 59/2014 de la Comisión, de 23 de enero de 2014**, que modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en cuanto a la utilización de dióxido de azufre y sulfitos (E 220-228) en productos aromatizados a base de vino. (Aplicable a partir del 13 de febrero de 2014)
 - **Modificado por: Reglamento (UE) no 264/2014 de la Comisión, de 14 de marzo de 2014**, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, en lo relativo a la utilización del copolímero de acetato de vinilo/polivinilpirrolidona en complementos alimenticios sólidos, y el anexo del Reglamento (UE)

- no 231/2012 de la Comisión, en lo relativo a las especificaciones de dicho copolímero (Aplicable a partir del 7 de abril de 2014).
- **Modificado por: Reglamento (UE) no 298/2014 de la Comisión, de 21 de marzo de 2014**, por el que se modifican el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión por lo que se refiere al uso del difosfato magnésico de dihidrógeno como gasificante y regulador de la acidez. (Aplicable a partir del 14 de abril de 2014).
- **Modificado por: Reglamento (UE) nº 1130/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011**, por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre aditivos alimentarios, para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión autorizados para ser empleados en aditivos alimentarios, enzimas alimentarias, aromas alimentarios y nutrientes .
 - **Modificado por: Reglamento (UE) no 1274/2013 de la Comisión, de 6 de diciembre de 2013**, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión en lo que concierne a determinados aditivos alimentarios. (Aplicable a partir del 26 de diciembre de 2013).

Reglamento (UE) nº 231/2012 de la Comisión, de 9 de marzo de 2012, por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo.

- **Modificado por: Reglamento (UE) no 1274/2013 de la Comisión, de 6 de diciembre de 2013**, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión en lo que concierne a determinados aditivos alimentarios. (Aplicable a partir del 26 de diciembre de 2013).
- **Modificado por: Reglamento (UE) no 264/2014 de la Comisión, de 14 de marzo de 2014**, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, en lo relativo a la utilización del copolímero de acetato de vinilo/polivinilpirrolidona en complementos alimenticios sólidos, y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión, en lo relativo a las especificaciones de dicho copolímero (Aplicable a partir del 7 de abril de 2014).
- **Modificado por: Reglamento (UE) no 298/2014 de la Comisión, de 21 de marzo de 2014**, por el que se modifican el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) no 231/2012 de la Comisión por lo que se refiere al uso del difosfato magnésico de dihidrógeno como gasificante y regulador de la acidez. (Aplicable a partir del 14 de abril de 2014).

Reglamento (UE) Nº 257/2010 de la Comisión, de 25 de marzo de 2010, por el que se establece un programa para la reevaluación de aditivos alimentarios autorizados de conformidad con el Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios