

# Validación de un método automatizado basado en espectrofotometría para el análisis de sulfito en vino

## Validation of an automated method based on spectrophotometry for the analysis of sulfite in wine

Andreu Tobeña, Sergio Muñoz y Dominicó Guillén

BioSystems S.A., Costa Brava 30, Barcelona, 08030 Catalonia, Spain

**Resumen.** Si hay un aditivo al que aún es difícil renunciar en la elaboración de vinos es el sulfito. Hasta la fecha no se ha conseguido ningún producto que aglutine las cualidades antimicrobianas, antioxidantes y antioxidásicas de este compuesto. BioSystems dispone de un reactivo automatizado mediante el uso del analizador Y15, para la cuantificación de sulfito libre en vino y mosto. Se presentan los datos de la validación: el rango de linealidad es de 0 a 100 mg/l ( $r^2 > 0,99$ ). El LOQ es de 2,1 mg/l y los valores de precisión en todo el rango de medida están entre 1,0 y 1,3 % (repetibilidad) y 1,1 y 2,1 % (reproducibilidad). Las comparaciones con el método de referencia tipo II, Franz-Paul (OIV-MA-AS323-04B) realizadas en diversos laboratorios, muestran una buena correlación. El método Free Sulfite Y15 BioSystems automatizado, simple y rápido ha sido validado con éxito.

**Abstract.** If there is an additive that is still difficult to give up in winemaking, it is sulphite. To date, no product has been found that brings together the antimicrobial, antioxidant and antioxidase qualities of this compound. BioSystems has an automated reagent using the Y15 analyzer for the quantification of free sulfite in wine and must. Validation data are presented: the linearity range is 0 to 100 mg/l ( $r^2 > 0,99$ ). The LOQ is 2,1 mg/L and precision values over the entire measurement range are between 1.0 and 1.3% (repeatability) and 1.1 and 2.1% (reproducibility). Comparisons with the type II reference method, Franz-Paul (OIV-MA-AS323-04B) carried out in various laboratories, show a good correlation. The automated, simple and fast Free Sulfite Y15 BioSystems method has been successfully validated.

## 1 Introducción

### 1.1 El uso del sulfito

La adición de sulfito es una práctica habitual en nuestra cultura desde hace siglos y actualmente es el aditivo más empleado en la industria agroalimentaria y enológica por sus propiedades antioxidantes, antioxidásicas y antimicrobianas [1].

Está presente en el vino en dos formas: como azufre libre principalmente bajo la forma de  $\text{HSO}_3^-$ , que es la porción antioxidante, y una pequeña cantidad de sulfito disuelto que está unido a acetaldehído, polifenoles, cetonas, azúcares y ácidos. La suma de ambos corresponde al sulfito total [2].

El nivel máximo de sulfito total está regulado (entre 150 y 450 mg/L) y depende del tipo de vino (vinos tintos, blanco o rosado, dulce o vinos especiales) y de la legislación por la que se rige (Organización Internacional de la Viña y el Vino, Codex Alimentarius, Unión Europea...) [1]. Si el contenido total de sulfito excede los 10 mg/L, debe declararse en la etiqueta de la botella de vino [3-4].

Se utiliza durante la vinificación para evitar el deterioro microbiano ya que presenta un amplio espectro de acción contra numerosos microorganismos (levaduras y bacterias), protege a los vinos de la oxidación y los cambios de color debido a reacciones indeseables enzimáticas y no enzimáticas indeseables [5], además protege muchos de los compuestos aromáticos deseables en los vinos, facilita la precipitación de los fangos en vinos blancos durante el desfangado y posee la capacidad de romper membranas, favoreciendo la extracción de compuestos desde la piel de la uva al mosto, lo que es especialmente interesante en el caso de la elaboración de vinos tintos. En resumen, el sulfito es un conservante muy eficiente, con un espectro de acción muy amplio y además barato.

Sin embargo, altas concentraciones de sulfito afectan a la calidad final del vino, principalmente al olor y al sabor y puede inhibir la fermentación maloláctica. Además, incluso a bajas concentraciones, la presencia de sulfito puede causar síntomas graves en personas con enfermedades alérgicas o intolerancia alimentaria [6].

Existe una nueva corriente de productores a nivel internacional que apuestan por reducir su uso al mínimo

indispensable (por ejemplo, en entrada de uva o pre-embotellado) para cumplir con las especificaciones requeridas por la certificación como “vino ecológico”, o incluso productores de “vinos naturales” o “vinos sin sulfitos añadidos” que descartan usar este aditivo en el proceso productivo.

No obstante, a pesar de los recursos y esfuerzo invertidos por investigadores de todo el mundo, hasta la fecha no se ha conseguido caracterizar ningún producto que aglutine las cualidades de este compuesto.

Por todo ello cobra vital importancia conocer los niveles de sulfito, sobre todo en su forma libre, tanto en la vinificación, como en la crianza y posterior embotellado del vino para garantizar todos los efectos positivos y evitar los negativos, certificar el cumplimiento de la legislación y por seguridad desde el punto de vista de la salud del consumidor.

## 2 Métodos de análisis

### 2.1 Métodos OIV

La OIV recoge como métodos de referencia para cuantificar el sulfito libre de vinos y mostos, diversos métodos de análisis.

El método Ripper es tipo IV (OIV-MA-AS323-04B) y es una yodometría en la que se induce la oxidación del dióxido de azufre de la muestra con yodo, usando almidón como indicador. Es quizás el método más extendido, por su manejo sencillo y por la disponibilidad de configuraciones automatizadas en menor o mayor medida, pero no deja de ser un método desaconsejado para vinos tintos o vinos a los que se les haya añadido productos reductores del yodo (ácido ascórbico, por ejemplo).

El método Franz-Paul es tipo II (OIV-MA-AS323-04B) y es muy robusto y fiable en todo tipo de matrices, pero su automatización no es posible y su tiempo de respuesta (15-20 minutos para el sulfito libre y hasta 40 minutos para el total) hace inviable en muchas ocasiones su implantación, lo que empuja a muchos usuarios a asumir los errores conocidos del Ripper.

Existen otros métodos recogidos: en el Compendio de Métodos de la OIV, como el método molecular (OIV-MA-AS323-04C), también de tipo IV y mucho menos usado o alternativos, como biosensores electroquímicos, amperométricos y enzimáticos, métodos basados en análisis de inyección de flujo (FIA) y los más usuales basados en colorimetría. [7]

Una de las técnicas colorimétricas para detectar sulfitos libres utiliza clorhidrato de pararosanilina, una sal de amina altamente conjugada. La adición de ácido clorhídrico y formaldehído a la pararosanilina acuosa produce una solución, de color púrpura claro, que se vuelve violeta intenso cuando se expone a sulfitos. Este reactivo se puede utilizar como prueba cuantitativa para sulfitos basada en espectroscopia de absorción [8]. Sin embargo, esta técnica no está libre de interferencias sobre todo de vinos tintos que contienen moléculas que reaccionan de forma inespecífica con la pararosanilina causando sobrestimación del sulfito.

### 2.2 Método Free Sulfite Y15 BioSystems

BioSystems ha optimizado y automatizado un método para la cuantificación del sulfito libre basado en la reacción con la pararosanilina en medio ácido en presencia de formaldehído y posterior medida del producto de reacción formado a 560 nm por espectrofotometría UV-VIS. Aunque esta reacción es muy específica para el sulfito libre, otras moléculas pueden causar interferencias en la medida, principalmente en vinos tintos, obteniéndose concentraciones falsamente elevadas. La eliminación de estos interferentes se hace mediante una segunda reacción donde, todo el anhídrido sulfuroso libre contenido en la muestra es eliminado con un agente oxidante fuerte y se mide de nuevo la absorbancia a 560 nm. Por diferencia entre ambas medidas (en la primera se mide sulfito e interferentes y en la segunda sólo interferentes), se asegura un resultado final de la concentración de sulfito libre, sin interferencias.

El método incluye un material de calibración líquido, estable durante 36 meses, listo para usar y con una concentración adecuada para determinar la concentración de sulfito en el rango de medida del método, hasta 100 mg/L sin dilución de muestra o más allá si se programa la dilución deseada que el analizador hace de forma automatizada.

El método analítico se automatiza gracias al analizador BioSystems Y15 que consta de un brazo robótico cartesiano de tres ejes, una bomba de pistón de cerámico, bastidores para la bandeja de muestras y la bandeja de reactivos y un rotor de reacción alojado en una cámara a 37°C. El brazo sostiene una aguja de jeringa de muestreo para manejar la muestra y los reactivos que se dispensan en el rotor de reacción. La velocidad de dosificación y la geometría de la reacción crean una mezcla homogénea e inician la reacción química. El instrumento se controla por una computadora instalada con software especializado. La pantalla de la computadora muestra tanto el estado en tiempo real del análisis como los resultados del análisis.

BioSystems Y15 se suministra con un software fácil de usar para facilitar la rutina del laboratorio. El método de sulfito libre está programado en el software.

## 3 Estudio de validación Free Sulfite Y15 BioSystems

Este estudio de validación se realizó según los protocolos estipulados en la “Guía práctica para la validación, control de calidad y evaluación de la incertidumbre de un método de análisis enológico alternativo (Resolución 10/2005)”. Se validó el método automatizado Free Sulfite Y15 BioSystems para vinos de diferentes tipos (blanco, tinto, rosado), diversas bodegas y variedades de uva. Los estudios realizados incluyen linealidad, límite de detección y cuantificación, exactitud, precisión, y estabilidad.

### 3.1 Linealidad

Habilidad del ensayo para obtener respuestas que son directamente proporcionales a la concentración del analito

en la muestra. Un método analítico cuantitativo es lineal cuando existe una relación lineal verificada matemáticamente entre los valores observados y las concentraciones reales del analito.

- (a) Diseño y metodología. — Se calibró de acuerdo con el procedimiento de calibración del método. Se disolvió sodio metabisulfito (Sigma CAS No. 7681-57-4 pureza >99%) en un tampón adecuado para mantener su estabilidad a una concentración de aproximadamente 100 mg/l. El patrón madre se diluyó para que las concentraciones se distribuyeran regularmente en el rango de valores estudiado (0, 11, 21, 32, 43, 54, 64, 86 y 107 mg/l). Los materiales de referencia se midieron 5 veces, en condiciones de reproducibilidad según el método escrito. Se calcularon y trazaron las estadísticas de regresión y los residuos apropiados. La distribución aleatoria de residuos alrededor de cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican no linealidad.
- (b) Resultados. — Los resultados muestran un comportamiento lineal de 0 a 100 mg/l, con estadísticas de regresión que cumplen con los criterios establecidos del factor de respuesta frente a concentración (Tabla 1 y Fig. 1).

**Tabla 1.** Datos del estudio de linealidad.

Valor ref. (mg/l)	Valores medidos (mg/l)					Valores estadísticos			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	$\bar{X}$	Sr	RSDr (%)	Bias(mg/l)
0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,12	-	-0,7
11	9	10	11	10	11	10	0,60	5,88	-0,5
21	20	22	22	22	22	22	0,78	3,62	0,2
32	31	33	33	32	33	32	0,86	2,68	0,1
43	42	43	44	43	43	43	0,94	2,18	0,2
54	53	54	55	54	55	54	0,85	1,57	0,6
64	63	64	64	63	65	64	1,00	1,57	-0,5
86	83	84	85	85	84	84	0,93	1,10	-1,3
107	103	104	105	102	104	104	1,14	1,10	-3,4

### 3.2 Detectabilidad

El límite de detección (LOD) es la concentración de analito más baja que se puede detectar en la muestra, pero no necesariamente cuantificado bajo las condiciones experimentalmente establecidas. El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración de analito más baja que se puede determinar con una precisión y exactitud aceptable en una muestra bajo las condiciones del método utilizado.

- (a) Diseño y metodología. — La determinación de LOD y LOQ se hizo mediante el cálculo de la desviación estándar del análisis de 10 replicados de muestras blancas. A partir de estos resultados, el LOD se define convencionalmente mediante la fórmula:

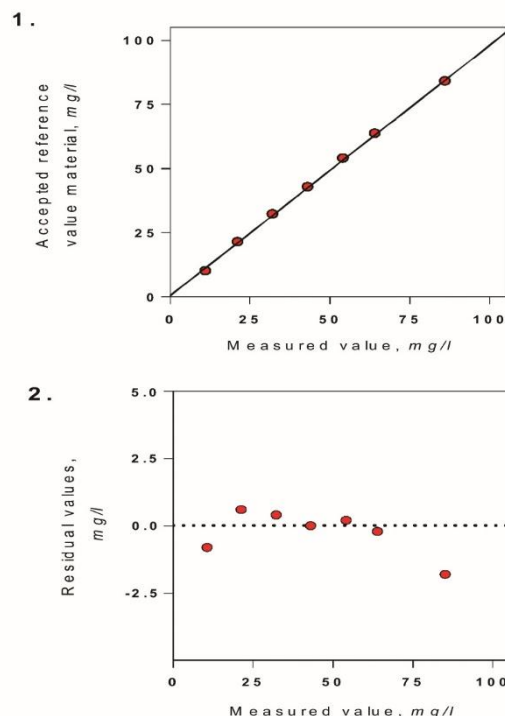
$$LOD = \bar{X}_{blanco} + (3 \cdot S_{blanco}) \quad (1)$$

A partir de estos resultados el límite de cuantificación se define convencionalmente por la fórmula:

$$LOQ = \bar{X}_{blanco} + (10 \cdot S_{blanco}) \quad (2)$$

luego verificado midiendo 10 repeticiones.

- (b) Resultados. — En base a los cálculos se establece un LOD de 0,7 mg/l y un LOQ de 2,1 mg/l. El LOQ se verificó a 1,5 mg/l. Los datos mostraron RSDr por debajo del 15%.



#### Valores óptimos

Pendiente	0,9772 ± 0,005502
Intersección en Y cuando X=0.0	0,3928 ± 0,3139
Intersección en X cuando Y=0.0	-0,402
1/pendiente	1,023

#### Intervalos de confianza del 95 %

Pendiente	0,9661 to 0,9883
Intersección en Y cuando X=0.0	-0,2406 to 1,026
Intersección en X cuando Y=0.0	-1,060 to 0,2440

#### Bondad de ajuste

R <sup>2</sup>	0,9986
----------------	--------

#### Datos

Número de valores X	8
Número máximo de réplicas Y	5
Número total de valores	40
<b>Ecuación</b>	Y = 0,9772 * X + 0,3928

**Figura 1.** Representación y datos de los valores medidos frente a los valores aceptados de los materiales de referencia (1) y los valores residuales frente a los valores medidos (2).

### 3.3 Precisión

Grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones predefinidas. La precisión se expresa como imprecisión al calcular el estándar relativo calculado.

- (a) Diseño y metodología. — Se preparan 3 muestras con concentraciones a lo largo del rango de medida. Se mide la concentración de sulfito diariamente por

triplicado durante 7 días. El estudio de la precisión consiste en estimar la imprecisión intraserial (repetibilidad, RSD<sub>r</sub>) e interserial (reproducibilidad intralaboratorio, RSD<sub>R</sub>).

- (b) Resultados. — Se determinó la desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad (RSD<sub>r</sub>) y de reproducibilidad (RSD<sub>R</sub>) para los 3 niveles y en todos los casos se muestran valores <10% (Tabla 2).

**Tabla 2.** Datos de imprecisión. Desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad (RSD<sub>r</sub>) y de reproducibilidad (RSD<sub>R</sub>) para 3 niveles de concentración.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Promedio	15,5 mg/L	38,7 mg/L	76,1 mg/L
Repetibilidad (r)			
SD <sub>r</sub>	0,2 mg/L	0,4 mg/L	0,7 mg/L
RSD <sub>r</sub>	1,3 %	1,1 %	1,0 %
r (2,8xSD <sub>r</sub> )	0,5 mg/L	1,2 mg/L	2,1 mg/L
Reproducibilidad interlaboratorio (R)			
SD <sub>R</sub>	0,3 mg/L	0,6 mg/L	0,8 mg/L
RSD <sub>R</sub>	2,1 %	1,6 %	1,1 %
R (2,8xSD <sub>R</sub> )	0,9 mg/L	1,7 mg/L	2,4 mg/L

### 3.4 Comparación de métodos de referencia

La veracidad se define como la proximidad entre los valores obtenidos por el método de referencia y la obtenida por el método alternativo, con independencia de los errores de fidelidad de los dos métodos.

- (a) Diseño y metodología. — Este ensayo se realizó en 2 laboratorios enológicos de EE. UU y 1 de Australia. Se utilizaron muestras de rutina de diferentes tipos: mostos, vinos tintos, blancos o rosados originados a partir de diferentes variedades de uva con concentraciones naturales de sulfito libre a lo largo del rango de medida. Las muestras se analizaron con el método de referencia Franz- Paul basado en OIV-MA-AS323-04B (8) y con el método Free Sulfite Y15 BioSystems. Cada muestra se analizó por duplicado mediante los dos métodos en condiciones de repetibilidad. Se hizo un análisis de diferencias por regresión lineal y por Bland-Altman, considerando todas las muestras como una única población.
- (b) Resultados. — Las muestras mostraron muy buena correlación ( $r^2 > 0,94$ ) en todos los laboratorios, por el análisis de regresión lineal y no se observó ningún error proporcional o constante entre los dos métodos. Todas las estadísticas mostraron que ambos métodos eran equivalentes (Figs. 2-4).

### 3.5 Consistencia del reactivo

- (a) Diseño y metodología. — Cada lote de reactivo Free Sulfite fabricado en BioSystems se controla en base a criterios establecidos para garantizar la consistencia entre lotes. Todos estos estudios se realizan en

diferentes analizadores Y15 del departamento de Control de Calidad. Los criterios utilizados son:

- (1) Blanco de reactivo: la absorbancia obtenida con una muestra sin sulfito (agua). Esto permite asegurar que el cromógeno utilizado no presenta grandes variaciones a pesar de que el lote de materia prima puede ser diferente en cada lote de reactivo.
  - (2) Sensibilidad: es el cálculo que resulta de dividir la absorbancia obtenida con el calibrador por la concentración del mismo calibrador (75 mg/l). De esta forma aseguramos la consistencia de la absorbancia independientemente del proceso de fabricación de cada lote.
  - (3) Precisión: se realiza con dos controles internos con concentraciones de 30 mg/l (C1) y en el límite de linealidad de 100 mg/l (Clin). El resultado se expresa como una relación entre el valor obtenido y el esperado; El criterio de aceptación es  $\pm 10\%$  con respecto al valor asignado.
- (b) Resultados. — Los 15 lotes estudiados cumplieron con los criterios establecidos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Consistencia lote a lote. Resultados de varios lotes fabricados.

Lote	Blanco reactivo	Sensibilidad	Exactitud	
	$Abs_{560nm}$ Tol. <0,600	$mAbs/conc$ Tol. 22 - 26,9	<i>ratio</i> Tol. 0,90 -1,10	
			C1	Clin
00119	0,372	24,4	1,03	1,02
00126	0,360	24,9	1,04	0,94
00127	0,381	25,6	1,03	0,99
00134	0,416	24,2	1,03	1,01
00136	0,464	25,2	1,02	1,02
00137	0,383	24,6	1,03	0,97
00139	0,388	24,1	1,02	0,99
00141	0,392	24,4	1,01	0,98
00142	0,392	24,4	1,01	0,98
00143	0,373	23,6	1,00	1,02
00145	0,387	25,2	1,00	1,00
00146	0,400	24,7	1,03	1,02
00150	0,395	25,6	1,00	1,02
00151	0,391	25,2	1,02	0,99
00153	0,406	24,0	1,05	1,03
Promedio	0,067	44,8	1,06	1,00
Sr	0,012	1,110	0,027	0,038
RSD <sub>r</sub> (%)	18,6	2,48	2,50	3,82

### 3.6 Estudio de estabilidad a tiempo real

- (a) Diseño y metodología. — Los reactivos y el calibrador, una vez abiertos, se almacenaron a la temperatura de conservación recomendada (2-8°C). A intervalos definidos y al final de la vida útil, los

reactivos y el calibrador se ensayaron con el procedimiento utilizando un BioSystems Y15. Los parámetros controlados para el reactivo son: blanco de reactivo, sensibilidad, exactitud y linealidad. Para el calibrador se comprueba que la concentración asignada se mantenga dentro de un rango de  $\pm 5\%$ .

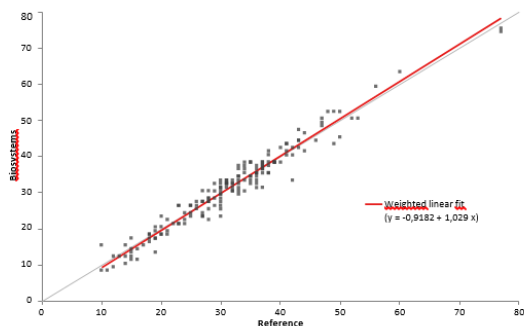
(b) Resultados. — En base a los resultados que cumplieron con los criterios establecidos, se asignó una estabilidad a tiempo real de 24 meses para los reactivos (Tabla 4) y de 36 meses para el calibrador (Fig. 5).

**Tabla 4.** Estabilidad a tiempo real del reactivo.

Meses	Lotes	Blanco reactivo	Sensibilidad	Exactitud	
		<i>Abs</i> <sub>560nm</sub> Tol. <0,600	<i>Abs/conc</i> Tol. 22 - 26,9	Tol. 0,90 -1,10	ratio
				CI	Clin
0	00119	0,372	24,4	1,03	1,02
0	00127	0,381	25,6	1,03	0,99
5	00127	0,387	25,3	1,02	1,00
7	00119	0,378	24,2	1,03	1,01
12	00119	0,305	23,7	1,02	1,00
12	00127	0,361	24,7	1,05	0,99
17	00119	0,389	24,6	1,01	1,05
25	00119	0,390	25,5	1,09	0,96
25	00127	0,375	23,7	1,01	0,99

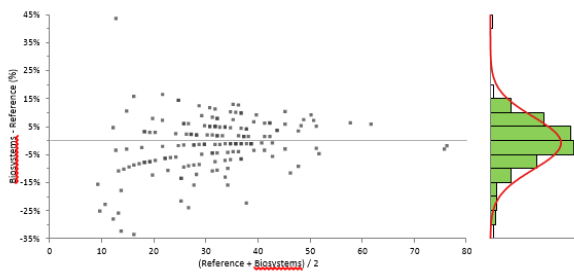
**Regresión lineal**

95% IC  
 Ordenada **-0,9** -1,8 - 0,0  
 Pendiente **1,029** 0,995 - 1,063  
 Coef. de correlación (r) **0,976**  
 n **194**



**Análisis de diferencias**

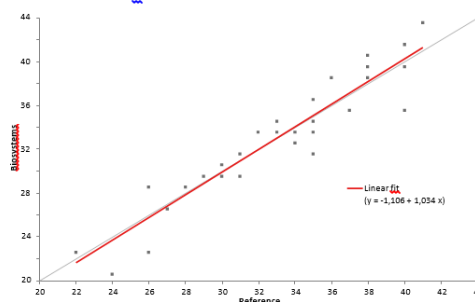
95% IC  
 Diferencias absolutas **0,0** -0,3 - 0,4  
 Diferencias relativas **-0,8** -2,1 - 0,6



**Figura 2.** Regresión lineal y análisis por diferencias del método Free Sulfite Y15 BioSystems frente al método de referencia OIV-MA-AS323-04B realizado en la bodega 1 de Estados Unidos.

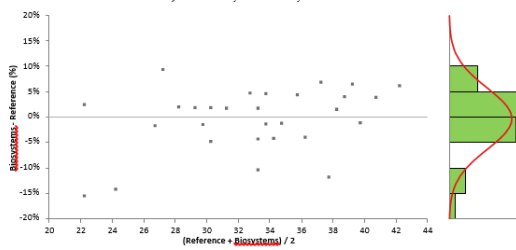
**Regresión lineal**

95% IC  
 Ordenada **-1,1** -5,4 - 3,1  
 Pendiente **1,034** 0,904 - 1,164  
 Coef. de correlación (r) **0,944**  
 n **34**



**Análisis de diferencias**

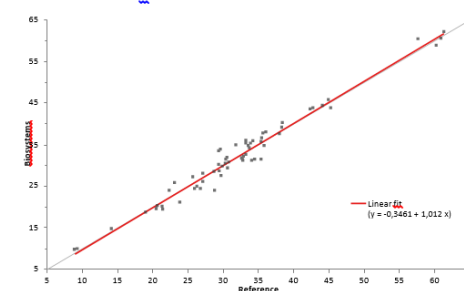
95% IC  
 Diferencias absolutas **0,0** -0,6 - 0,7  
 Diferencias relativas **-0,2** -2,3 - 1,9



**Figura 3.** Regresión lineal y análisis por diferencias del método Free Sulfite Y15 BioSystems frente al método de referencia OIV-MA-AS323-04B realizado en la bodega 2 de Estados Unidos.

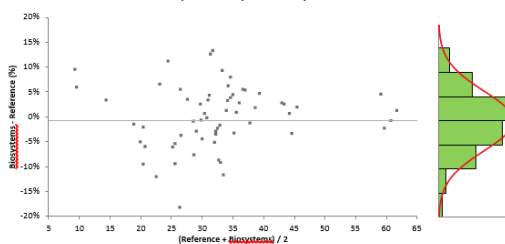
**Regresión lineal**

95% IC  
 Ordenada **-0,3** -1,9 - 1,2  
 Pendiente **1,012** 0,967 - 1,057  
 Coef. de correlación (r) **0,985**  
 n **64**

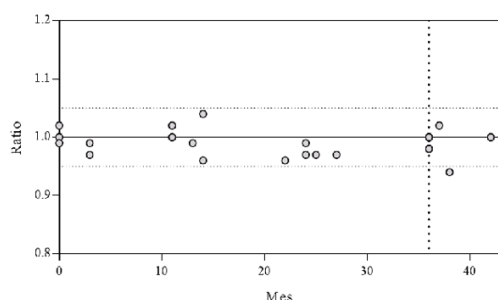


**Análisis de diferencias**

95% IC  
 Diferencias absolutas **0,0** -0,4 - 0,5  
 Diferencias relativas **-0,1** -1,7 - 1,5



**Figura 4.** Regresión lineal y análisis por diferencias del método Free Sulfite Y15 BioSystems frente al método de referencia OIV-MA-AS323-04B realizado en la bodega 4 de Australia.



**Figura 5.** Estabilidad a tiempo real del calibrador (Free Sulfite S - 75 mg/l).

## 4 Conclusiones

El método Free Sulfite Y15 BioSystems ofrece una determinación rápida, precisa y automatizada de sulfito libre en muestras obtenidas a lo largo del proceso de vinificación, crianza y embotellado. La automatización de la medida en el analizador BioSystems Y15 mejora la precisión y exactitud, evita errores del usuario y permite trabajar de forma flexible ya que es posible analizar desde pocas muestras o con un alto rendimiento de hasta 150 muestras/hora. Además, la automatización en un analizador que de acceso aleatorio ofrece la posibilidad de intercalar la determinación del análisis de sulfito libre con otros parámetros de control enológico rutinario.

Todo ello comporta una herramienta muy potente para enólogos, responsables de laboratorio e investigadores del sector enológico, ya que permite hacer series largas de análisis manera rápida, exacta, precisa y con un manejo de usuario sencillo (hay laboratorios enológicos que han

acreditado el ensayo bajo norma UNE-EN ISO/IEC 17025).

## Referencias

1. C. Stockley, A. Paschke-Kratzin, P. Teissedre, P. Restani, N. Garcia Tejedor y C. Quini. SO<sub>2</sub> and Wine Review. *OIV publications, 1st Edition*. March 2021
2. R. Eschenbruch. Sulfite and Sulfide Formation during Winemaking -- A Review. *Am J Enol Vitic.* **25**, 157-161 (1974)
3. Norma internacional para el etiquetado de vinos. *OIV publications*, Agosto 2021
4. J. B Adams. Food additive-additive interactions involving sulphur dioxide and ascorbic and nitrous acids: a review. *Food Chemistry* **59**, 401-409 (1997)
5. T. Fazio y CR. Warner. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Addit Contam.* **7**(4), 433-454 (1990). doi:10.1080/02652039009373907
6. Norma general para el etiquetado de los alimentos preenvasados. *CODEX Alimentarius* (Codex Stan I-1985)
7. P. Giménez-Gómez, M. Gutiérrez-Capitán, A. Puig-Pujol, F. Capdevila, S. Muñoz, A. Tobeña, A. Miró y C. Jiménez-Jorquera. Analysis of free and total sulfur dioxide in wine by using a gas-diffusion analytical system with pH detection, *Food Chemistry* **228**, 518-525 (2017)
8. T.M Monro, R.L. Moore, M-C. Nguyen, H. Eborderff-Heidepriem, G.K. Skouroumounis, G.M. Elsey y D.L. Taylor. Sensing Free Sulfur Dioxide in Wine. *Sensors* **12**, 10759-10773 (2012)