

# Nueva formulación para la determinación, libre de interferencias, de sulfitos totales en vino tinto

Andreu Tobeña, Director de Investigación línea Enology

Sergio Muñoz, Investigador línea Enology

Sabina Dueñas e Inés López, Técnicos de Investigación línea Enology

**BioSystems S.A.**

La utilización de sulfitos para preservar los alimentos es una práctica habitual en nuestra cultura desde hace siglos<sup>1</sup>. En el vino, el sulfito es un producto secundario de algunas reacciones de fermentación, pero también se añade para que mantenga sus propiedades a lo largo del tiempo. La actuación del sulfito tiene un triple efecto<sup>2</sup>:

- Evitar la oxidación (antioxidante).
- Anular el crecimiento bacteriano (antimicrobiano).
- Inhibir las reacciones enzimáticas que provocan cambios en la coloración (antioxidásico).

Debido al pH del vino, el sulfito está en equilibrio adoptando diferentes formas (*figura 1 y 2*). El sulfito libre se encuentra en forma de SO<sub>2</sub> molecular (anhídrido sulfuroso) o en forma de HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> (bisulfito) y SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> (sulfito) tras la reacción con agua. La otra fracción de sulfito se presenta en el vino de forma combinada a compuestos insaturados (azúcares, polifenoles, ácidos, acetaldehído, etc.), la cual está en equilibrio con la fracción libre. La suma de sulfito libre y combinado es el sulfito total<sup>3,4</sup>.

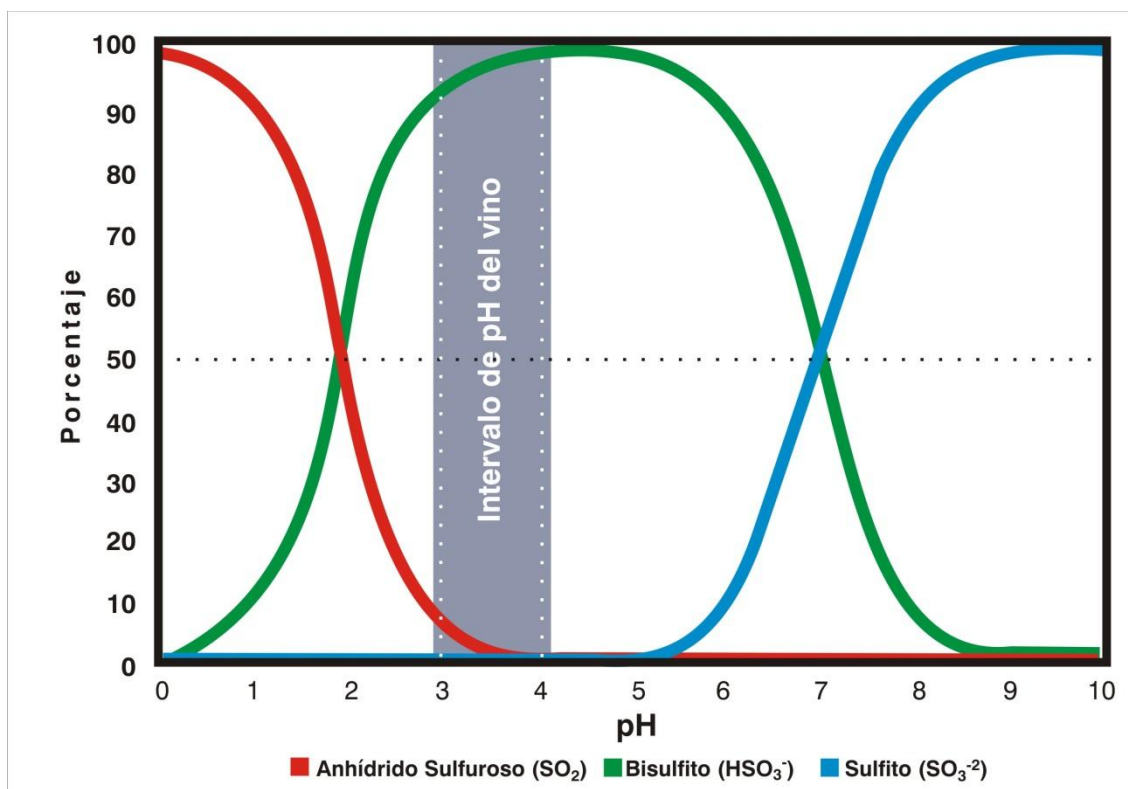
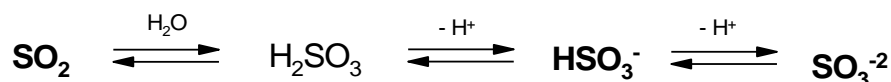


Figura 1. Especies de sulfito en el vino.

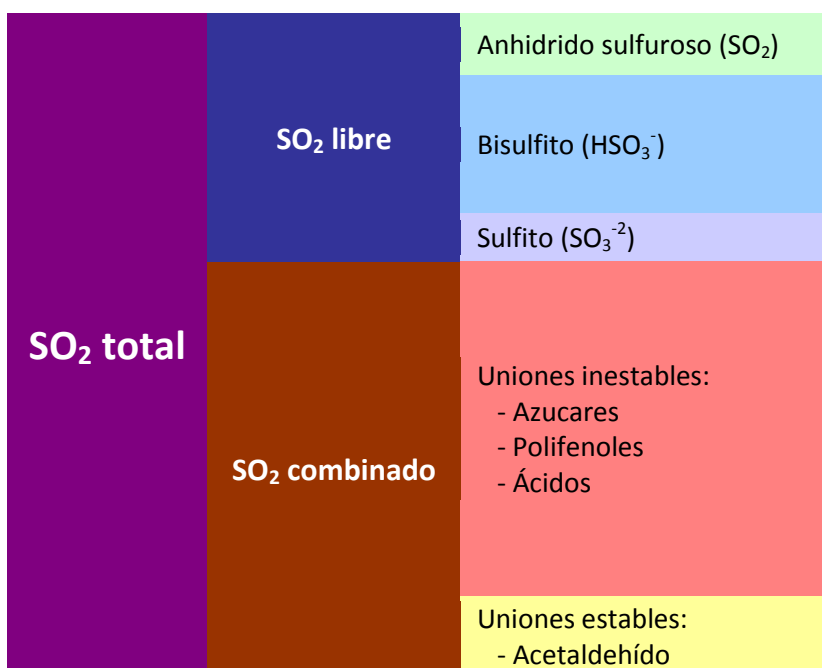


Figura 2. Esquema de las proporciones aproximadas de los sulfitos libres, combinados y totales.

El interés por el análisis de los sulfitos en el vino viene determinada por diversas razones:

- Las legislaciones de diferentes países regulan las cantidades máximas de sulfito y en algunos casos obliga al etiquetado con el correspondiente aviso.
- La monitorización de la disminución del sulfito en el vino durante el envejecimiento (difusión, oxidación o combinación) y la determinación de la cantidad de sulfito que debe añadirse.
- La necesidad de evitar concentraciones elevadas de sulfitos, que proporcionan sabores y olores desagradables e inhiben la fermentación maloláctica<sup>5</sup>.
- Diversos estudios indican que el sulfito puede ser perjudicial para la salud. Una de cada 100 personas de la población es sensible a este compuesto y parte de la población asmática tiene riesgo de padecer efectos adversos leves (dermatitis, dolor de cabeza, exacerbación del asma) o más graves (shock anafiláctico, lesiones oculares o daño cerebral)<sup>6</sup>.

### Procedimientos de medida para sulfitos totales:

#### **Métodos oficiales:**

- *Monier-Williams modificado* (OIV-MA-AS323-04A:2012; Categoría II y AOAC:990.28): es el método recomendado por la Organización Internacional del Vino (OIV)<sup>7</sup> y la *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC)<sup>8</sup>. 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.
- *Análisis por Inyección de Flujo (FIA)* (AOAC 990.29): implantada recientemente por la AOAC, esta técnica facilita la separación de sulfitos empleando varias transformaciones

químicas que culminan en la extracción del SO<sub>2</sub> en fase gas a través de una membrana de teflón. Ya libre de interferencias, el SO<sub>2</sub> reacciona con el colorante verde de malaquita y se detecta por espectrofotometría.

- *Método Ripper (OIV-MA-AS323-04B:R2009; Categoría IV)*: aunque es de menor categoría analítica que el procedimiento Monier-Williams, es más rápido y su uso es más frecuente en las bodegas. Se basa en la titulación directa de la muestra con una solución de yodo y detección visual del punto de equivalencia con almidón.

### Métodos no oficiales:

La literatura también presenta un amplio abanico de métodos que dan solución a la determinación de sulfitos. La mayoría de métodos se pueden organizar en dos grupos<sup>2,9</sup>:

- Determinación directa por transformación química del sulfito: volumetría, espectrofotometría (química o enzimática), fluorescencia, etc.
- Extracción del sulfito de la muestra y posterior análisis: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Cromatografía de Intercambio Iónico, Electroforesis Capilar, Análisis por Inyección de Flujo (FIA), etc.

Sin embargo, todos los métodos descritos tienen una serie de problemas que los hace poco prácticos o fiables<sup>5,10,11</sup> (figura 3).

<b>Método Monier-Williams modificado</b>	Lento Manual Dependiente del analista Volumen de muestra elevado
<b>Análisis por Inyección de flujo (FIA)</b>	Analista especializado Elevado coste
<b>Método Ripper</b>	Manual Dependiente del analista Interferencias
<b>Métodos Cromatográficos</b>	Analista especializado Elevado coste

Figura 3. Inconvenientes de los métodos recomendados para la determinación de sulfitos en vino.

Así pues, aunque existen métodos diversos para analizar sulfitos, la comunidad científica no se pone de acuerdo de que método puede sustituir el método oficial actual que sea fiable, rápido y automatizado.

### Espectrofotometría. Método del ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB)

La espectrofotometría se basa en la determinación de la transmitancia o la absorbancia de las disoluciones en el espectro de la luz ultravioleta y visible. Es probable que los métodos de absorción molecular sean los más utilizados entre todas las técnicas de análisis cuantitativo en los laboratorios de análisis a lo largo del mundo<sup>12</sup>. El poder de esta técnica radica en encontrar una reacción que sea sensible y selectiva al compuesto que se quiere analizar. Siguiendo la ley de Lambert-Beer se puede encontrar una relación entre la variación de la absorbancia y la concentración del analito. Además, es una técnica que determina el analito de forma directa, es rápido, se puede automatizar y necesita una instrumentación de bajo coste.

El método espectrofotométrico para la determinación de sulfitos totales se basa en el ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB). El SO<sub>2</sub> utiliza su poder reductor para provocar la rotura del puente disulfuro y generar el 3-tio-6-nitrobenzoato (TNB) que se puede medir a 405 nm (amarillo)<sup>13,14</sup>.

Esta reacción es rápida y se puede automatizar fácilmente. Es conocido sin embargo que, aunque es funcional con muestras de vino blanco, este método puede presentar interferencias con la matriz de vino tinto.

### BioSystems: El nuevo kit de Sulfito Total

Conscientes de los problemas asociados al método espectrofotométrico, BioSystems decide afrontar el reto de desarrollar un nuevo reactivo que permita determinar la concentración de sulfitos totales en vinos independientemente de la matriz

Su departamento de I+D+i, fruto de una intensa investigación y de la colaboración con sus clientes de todo el mundo, lanza al mercado un kit único, que cambiará la manera de trabajar de las bodegas y laboratorios enológicos.

El nuevo reactivo para la determinación de sulfitos totales sigue basándose en el cromógeno DTNB, pero la nueva formulación consigue evitar las interferencias tanto en muestras de vino blanco como de vino tinto.

### Estudio de la veracidad: Monier-Williams (INCAVI) vs. Espectrofotometría (BioSystems)

Para evaluar el nuevo procedimiento de medida de sulfitos totales Enology, se ha establecido una colaboración con el Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI).

El INCAVI mediante las estaciones de viticultura y enología de Reus y Vilafranca del Penedès, es la infraestructura más especializada de la Generalitat de Catalunya puesta al Servicio de la industria vitivinícola.

Los servicios analíticos de su laboratorio están autorizados para realizar análisis oficiales en el sector del vino, trabajan en el entorno de calidad que determinan los requisitos técnicos y de gestión definidos en la Norma Internacional UNE-EN ISO/IEC 17025. El procedimiento de medida para la determinación de sulfitos totales es el método oficial Monier-Williams modificado que está acreditado por la ENAC.

Para realizar el estudio, INCAVI ha recogido 40 muestras (30 vinos tintos, 9 vinos blancos y 1 vino rosado) de diferentes orígenes y D.O: Penedès, Rioja, Alella, Priorat, Castilla y León, Murcia, DO Cava, Pla de Bages y se han analizado en paralelo con los dos procedimientos de medida.

Según los datos de la comparación (*figura 4*) obtenidos mediante el estudio estadístico por regresión lineal (*figura 5*), no existen errores sistemáticos, indicando que no hay diferencias significativas entre los resultados de los dos procedimientos.

Muestra	mg/L		Muestra	mg/L	
	INCAVI	BioSystems		INCAVI	BioSystems
1594	12	7	2302	28	25
1605	38	45	2304	59	60
1606	30	27	2346	36	35
1607	68	70	2347	22	14
1624	22	19	2349	5	0
1698	39	42	2352	93	97
1801	82	91	2363	68	64
1813	30	25	2365	30	29
1814	50	53	2381	13	4
1949	125	127	2536*	58	61
1954	5	1	2539*	66	70
2006	78	80	2544*	22	23
2011	84	81	2549*	87	97
2017	117	118	2552*	107	113
2027	83	84	2607*	89	93
2044	34	40	2566*	82	81
2068	30	26	2589*	90	97
2086	6	12	2604*	127	115
2094	104	104	2553♦	146	145

\*Vino tinto      ♦ Vino rosado

Figura 4. Comparación de los procedimientos de medida de Monier-Williams y el kit de sulfitos totales modificado de BioSystems.

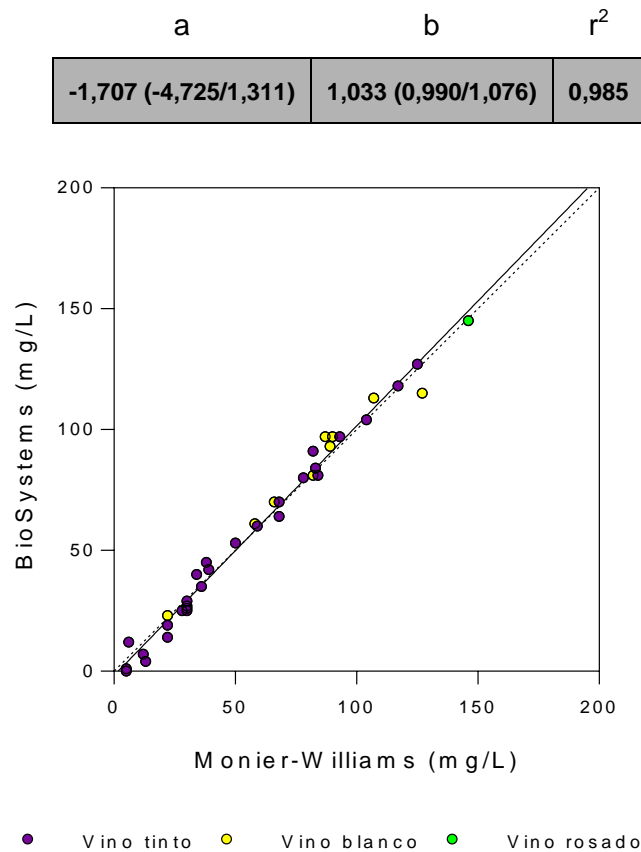


Figura 5. Regresión lineal de la comparación de resultados por los dos métodos.

## CONCLUSIONES

El nuevo reactivo de BioSystems de Sulfito Total ofrece unos resultados equivalentes al método oficial de Monier-Williams modificado.

Una vez más Biosystems consigue solucionar un problema dentro del mercado enológico proporcionando a los laboratorios un reactivo para determinar sulfitos totales independientemente de la matriz del vino de una forma rápida, automática, a bajo coste y con resultados comparables a los obtenidos con el método oficial.

El nuevo kit de Sulfito Total, permite a BioSystems seguir ofreciendo un sistema único al mercado (22 reactivos y 2 analizadores), garantizando a los enólogos un esfuerzo constante en el desarrollo y la mejora de sus productos y manteniendo sus altos estándares de calidad.

## Bibliografía

---

- <sup>1</sup> Fatibello-Filho O, da Cruz Vieira I. Anal. Chim. Acta 1997; 354: 51-57.
- <sup>2</sup> Li Y, Zhao M. Food Control 2006; 17: 975-980.
- <sup>3</sup> Falcone F, Maxwell KC. J. Agr. Food. Chem. 1992; 40:1355-1357.
- <sup>4</sup> Joslyn MA. Am. J. Enol. Viticult. 1952; 3:59-68.
- <sup>5</sup> Mataix E, Luque de Castro MD. Analyst 1998; 123: 1547-1549.
- <sup>6</sup> Sadegh C, Schreck RP. MURJ 2003; 8: 39-43.
- <sup>7</sup> <http://www.oiv.int>
- <sup>8</sup> <http://www.aoac.org>
- <sup>9</sup> Hassan SSM, Hamza MSA, Mohamed AHK. Anal. Chim. Acta 2006; 570: 232-239.
- <sup>10</sup> Williams DJ, Scudamore-Smith PD, Nottingham SM, Petroff M. Am. J. Enol. Viticult. 1992; 43: 227-229.
- <sup>11</sup> Joslyn MA. Am. J. Enol. Viticult. 1955; 6: 1-10.
- <sup>12</sup> Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. McGraw-Hill, 5ª edición (2001).
- <sup>13</sup> Humphrey RE, Ward MH, Hinze W. Anal. Chem. 1970; 42: 698-702.
- <sup>14</sup> Ellman GL. Arch. Biochem. Biophys. 1959; 82: 70-77.