Panreac

Técnicas usuales de Análisis en Enología

Masa Volúmica a 20 ºC y Densidad Relativa a 20 ºC • Grado Alcohólico Probable en Mosto • Grado Alcohólico Volumétrico Adquirido • Acidez Total • Acidez Volátil • Ácido Tartárico • pH • Extracto Seco Total y Extracto Seco sin Azúcar • Azúcar total • Dióxido de azufre • Seguimiento de la Fermentación Maloláctica (FML) • Polifenoles totales • Características Cromáticas • Calcio • Hierro • Sobrepresión de Dióxido de Carbono • Dióxido de Carbono • Recuento de levaduras • Grado Acético en Vinagre

Ilustraciones:
J.A. Colomer (SOLTEVI)
J. García (INCAVI)
A. Esteve (MÓN DEL CAVA)
Dptº I+C - Panreac Química S.A.

Fotografías:
S. Rovira (INCAVI)
J. García (INCAVI)

Panreac Química S.A.
C/ Garraf, 2
Polígono Pla de la Bruguera
E-08211 - Castellar del Vallès
Barcelona - España
Tel: +34 937 489 400
Fax: +34 937 489 401
e-mail: central@panreac.com
046 - 6 - 1.000 - 09/05
Dep. Legal
Imprime: Creacions Gràfiques Canigó

"Sé templado en el beber, considerando que el vino demasiado ni guarda secreto ni cumple palabra"

El Quijote
(Cervantes)
II, cap. XLIII

PRESENTACIÓN

Manual redactado por el **Dr. Juan García Cazorla** y la **Dra. María Xirau Vayreda**, Jefe del laboratorio de la Estació Enològica de Vilafranca del Penedès del Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI) y Profesora titular del Departament de Química Analítica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona respectivamente; y **Robert Azorín Romero**, Jefe de A+D de Panreac Química S.A.

ÍNDICE

1. MASA VOLÚMICA A 20 ºC
Y DENSIDAD RELATIVA A 20 ºC 6
2. GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE EN MOSTO 9
3. GRADO ALCOHÓLICO VOLUMÉTRICO ADQUIRIDO 15
4. ACIDEZ TOTAL 21
5. ACIDEZ VOLÁTIL 23
6. ÁCIDO TARTÁRICO 25
7. pH 27
8. EXTRACTO SECO TOTAL Y
EXTRACTO SECO SIN AZÚCAR 29
9. AZÚCAR TOTAL 31
10. DIÓXIDO DE AZUFRE 34
11. SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN
MALOLÁCTICA (FML) 39
12. POLIFENOLES TOTALES 42
13. CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS 45
14. CALCIO 47
15. HIERRO 49
16. SOBREPRESIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO 51
17. DIÓXIDO DE CARBONO 53
18. RECUENTO DE LEVADURAS 56
19. GRADO ACÉTICO EN VINAGRE 59

20. LISTADO REACTIVOS 61

1. MASA VOLÚMICA A 20 °C Y DENSIDAD RELATIVA A 20 °C

Introducción

La ***masa volúmica a 20 °C*** es el peso de un determinado volumen de vino o mosto a la temperatura de 20 °C. Su símbolo es $\rho_{20\,°C}$.

La ***densidad relativa a 20 °C*** o ***la densidad 20 °C/20 °C*** es la relación entre la masa volúmica de un vino o mosto y la del agua a la temperatura de 20 °C. Su símbolo es $d\,{}^{20\,°C}_{20\,°C}$.

MÉTODO AREOMÉTRICO

Fundamento

La areometría se basa en el principio de ARQUÍMEDES para la determinación de la masa volúmica de líquidos en función de la flotabilidad que presenta en ellos un cuerpo de peso constante.

La determinación se realiza a partir de la lectura de los denominados areómetros, graduados en unidades de masa volúmica a 20 °C (*densímetro*) que se introducen en el vino.

Material y reactivos

- Probeta graduada de 250 o 500 mL.
- Termómetro contrastado de 0-35 °C, con apreciación de 0,5 °C.
- Areómetros contrastados de clase II, en milésimas y medias milésimas:
  - 0,983-1,003 g/mL (vino).
  - 0,990-1,020 g/mL (control de la fermentación alcohólica y tiraje).
  - 1,000-1,100 y 1,100-1,200 g/mL (mosto de uva).
  - 1,200-1,300 y 1,300-1,400 g/mL (mosto concentrado).
- Plataforma con tornillos de nivelación.
- Etanol 96% v/v PA, *Código 121085*.
- Potasio Hidróxido 85% lentejas PA, *Código 121515*.
- Ácido Clorhídrico 37% PA-ACS-ISO, *Código 131020*.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Los areómetros se han de limpiar sucesivamente con: solución alcohólica de hidróxido de potasio 50 g/L, solución de ácido clorhídrico diluido 1/10 y agua destilada.

Procedimiento

Si el vino o el mosto contienen cantidades importantes de dióxido de carbono, se ha de eliminar por agitación o ultrasonidos.

Se colocan en una probeta limpia y seca ***200 mL de la muestra a analizar*** convenientemente homogeneizada.

Se introduce el termómetro, se agita con el mismo la muestra y se hace la lectura al cabo de 1 min. Se retira el termómetro y ***se introduce el densímetro*** en la probeta (si flota por debajo del tallo introducir uno de mayor graduación y si se sumerge totalmente introducir uno de menor). Cuando el densímetro se mantenga inmóvil, efectuar la ***lectura de la masa volúmica aparente*** (ρ_t) ***por la parte superior del menisco*** (Fig.1.1).

Cálculo

La ***masa volúmica aparente*** (ρ_t) a t °C se ha de corregir para poder

expresarla a 20 °C mediante la fórmula siguiente:

$$\rho_{20\,°C} = \rho_t + c$$

c = factor de corrección de la masa volúmica en función de la temperatura (Tabla 1.1 y 1.2)

La masa volúmica a 20 °C (ρ_{20}) se expresa con ***cuatro decimales*** y en ***g/mL***. La cuarta cifra decimal se deduce por interpolación en la escala del densímetro y se aproxima a 0 o 5.

La ***densidad relativa a 20 °C*** se obtiene multiplicando la masa volúmica por el factor 1,0018. Se expresa con ***cuatro decimales*** y ***es adimensional***.

Los valores habituales de la masa volúmica a 20 °C para cada tipo de muestra son:

-Vino blanco seco:
0,9880-0,9930 g/mL.

-Vino tinto seco:
0,9910-0,9950 g/mL.

-Vino espumoso:
0,9890-1,0080 g/mL.

- Vino de licor (moscatel, mistela):
1,0500-1,0700 g/mL.

- Mosto: 1,0590-1,1150 g/mL.

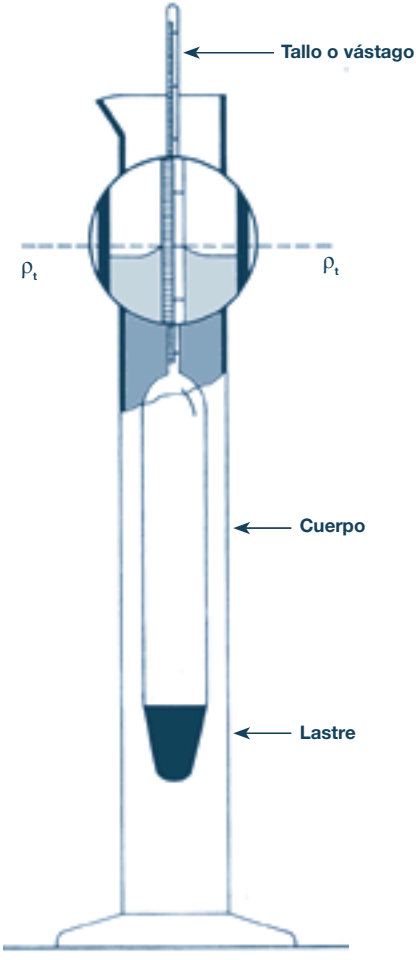


Figura 1.1
Lectura de la masa volúmica aparente (ρ_t)

En ***determinaciones muy precisas***, debe corregirse la acción del dióxido de azufre sobre la masa volúmica a 20 °C según la fórmula siguiente:

$$\rho_{20\,°C} = \rho'_{20\,°C} - 0{,}000006 \times S$$

$\rho'_{20\,°C}$ = masa volúmica observada

S = dióxido de azufre total, mg/L

	Grado alcohólico volumétrico, % vol								
	8	9	10	11	12	13	14	15	16
14°C	-0,0011	-0,0011	-0,0012	-0,0012	-0,0013	-0,0014	-0,0014	-0,0015	0,0016
15°C	-0,0010	-0,0010	-0,0010	-0,0011	-0,0011	-0,0012	-0,0012	-0,0013	0,0014
16°C	-0,0008	-0,0008	-0,0008	-0,0009	-0,0009	-0,0010	-0,0010	-0,0011	0,0011
17°C	-0,0006	-0,0006	-0,0007	-0,0007	-0,0007	-0,0007	-0,0008	-0,0008	0,0008
18°C	-0,0004	-0,0004	-0,0004	-0,0005	-0,0005	-0,0005	-0,0005	-0,0006	0,0006
19°C	-0,0002	-0,0002	-0,0002	-0,0002	-0,0003	-0,0003	-0,0003	-0,0003	0,0003
20°C	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
21°C	0,0002	0,0002	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003
22°C	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
23°C	0,0007	0,0007	0,0008	0,0008	0,0008	0,0009	0,0009	0,0009	0,0010
24°C	0,0010	0,0010	0,0010	0,0011	0,0011	0,0012	0,0012	0,0012	0,0013
25°C	0,0013	0,0013	0,0013	0,0014	0,0014	0,0015	0,0015	0,0016	0,0016
26°C	0,0015	0,0016	0,0016	0,0017	0,0017	0,0018	0,0019	0,0019	0,0020

Tabla 1.1.
*Factores de corrección (c) de la masa volúmica para **vinos secos** según la temperatura de lectura*

	Masa volúmica, g/ml								
	1,05	1,06	1,07	1,08	1,09	1,10	1,11	1,12	1,13
14°C	-0,0014	-0,0015	-0,0016	-0,0017	-0,0018	-0,0019	-0,0020	-0,0021	0,0022
15°C	-0,0012	-0,0013	-0,0014	-0,0015	-0,0015	-0,0016	-0,0017	-0,0018	0,0018
16°C	-0,0010	-0,0011	-0,0011	-0,0012	-0,0013	-0,0013	-0,0014	-0,0014	0,0015
17°C	-0,0008	-0,0008	-0,0009	-0,0009	-0,0010	-0,0010	-0,0011	-0,0011	0,0011
18°C	-0,0005	-0,0006	-0,0006	-0,0006	-0,0007	-0,0007	-0,0007	-0,0007	0,0008
19°C	-0,0003	-0,0003	-0,0003	-0,0003	-0,0004	-0,0004	-0,0004	-0,0004	0,0004
20°C	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
21°C	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004
22°C	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0,0007	0,0007	0,0007	0,0008	0,0008
23°C	0,0009	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010	0,0011	0,0011	0,0001	0,0012
24°C	0,0012	0,0012	0,0013	0,0013	0,0014	0,0014	0,0015	0,0015	0,0016
25°C	0,0014	0,0015	0,0016	0,0017	0,0017	0,0018	0,0019	0,0020	0,0020
26°C	0,0018	0,0018	0,0019	0,0020	0,0021	0,0022	0,0023	0,0023	0,0024

Tabla 1.2
***Factores de corrección** (c) de la **masa volúmica** para **mostos** según la temperatura de lectura.*

Bibliografía

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) N° 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 3-14 (1990).

- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 41-58 (1990).

- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 39-56 (1993).

2. Grado Alcohólico Probable en Mosto

Introducción

El *mosto* o zumo de uva contiene cantidades variables de *glúcidos* llamados comúnmente ***azúcares***.

La uva contiene de un 15 a un 25% de ***glucosa y fructosa***. La glucosa es una aldosa con función *aldehído*, la fructosa es una cetosa con función *cetona*.

En las uvas perfectamente maduras estos compuestos se encuentran casi en la misma proporción aunque siempre hay un poco más de fructosa que de glucosa, siendo la relación glucosa/fructosa aproximadamente de 0,95. Durante la fermentación alcohólica estos azúcares del mosto son transformados por las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en etanol ($C_6H_{12}O_6$) y dióxido de carbono (CO_2), obteniéndose el vino.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2 \uparrow$$

Esto hace que la relación glucosa/fructosa disminuya ya que la mayoría de las levaduras fermentan preferentemente la glucosa y al final de la fermentación la relación es de 0,3.

La uva contiene además una pequeña cantidad de azúcares no fermentables, principalmente pentosas, del orden de 1 g/L que por lo tanto pasan al vino. La uva apenas contiene sacarosa y ésta desaparece en el transcurso de la fermentación. Por lo tanto, el vino no puede contener este azúcar si no se le ha añadido.

Para obtener una buena calidad en los vinos es importante hacer la recolección de la uva en el momento óptimo, ya que la composición de azúcares de la uva varía durante la maduración. Para fijar el momento adecuado de la vendimia se utiliza el ***índice de maduración*** (azúcar/acidez total) por lo que es necesario controlar periódicamente el estado de madurez de la uva por ***refractometría***. Es conveniente comparar los valores de alcohol probable con los obtenidos en las mejores cosechas de años anteriores.

Se ha considerado interesante establecer las normas básicas para determinar el alcohol probable en mostos debido a la importancia vitivinícola y comercial de su correcta valoración.

2.1 Evaluación del grado alcohólico probable por refractometría (método de referencia)

La refractometría es un método indirecto que determina la concentración de azúcar de un mosto mediante la medida del ***índice de refracción*** (n).

Fundamento

La *refracción* se basa en la modificación de la trayectoria de un rayo luminoso al atravesar una superficie que limita dos medios diferentes. Se puede demostrar que *el rayo de luz incidente AO*, *la normal a la superficie* y el *rayo de luz refractado OB* están en el mismo plano (Fig. 2.1) y que la relación entre el seno del ángulo de incidencia i_1 y el del ángulo de refracción i_2 siguen la ley de SNELLIUS.

$$n = \frac{\text{sen } i_1}{\text{sen } i_2}$$

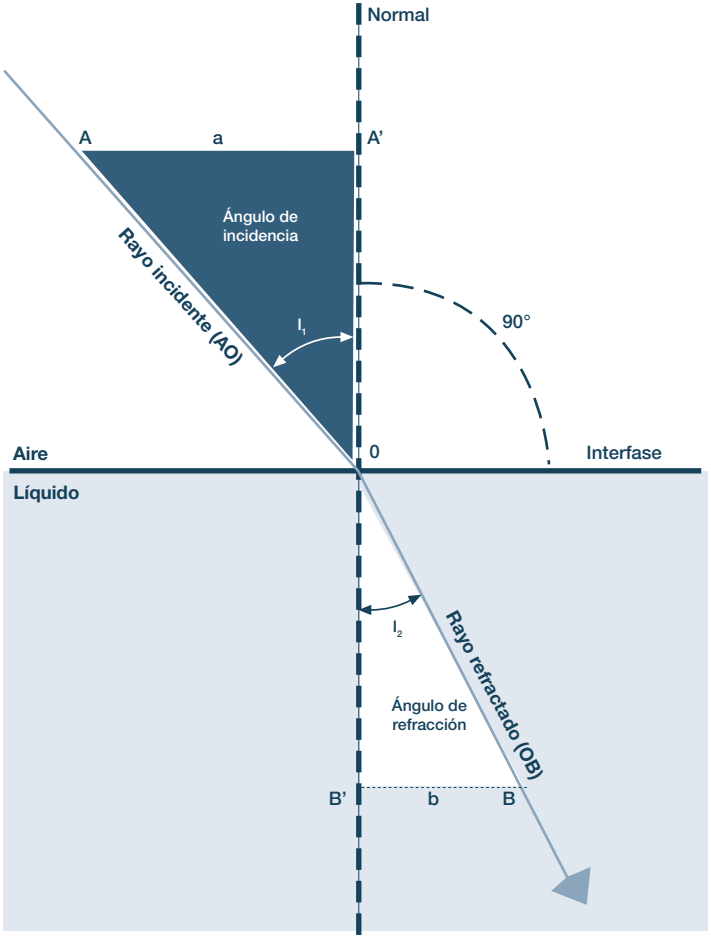


Figura 2.1.
Refracción de un rayo luminoso a través de un líquido

Cuanto mayor sea la concentración de los azúcares de un mosto, más denso será éste y menor la velocidad con que la luz lo atraviese, provocando un cambio en el *n*. Así se puede establecer una relación entre la concentración de azúcar y el *n* (Fig. 2.2).

Este índice se mide con el ***refractómetro de ABBÉ***, que puede llevar dos escalas, una graduada en ***n*** y la otra en ***grados Brix*** (° Brix) o porcentaje en masa de sacarosa.

El n y el ° Brix se relacionan por las fórmulas siguientes en el ***intervalo de 15-25 ° Brix***.

$$n = (0{,}00166 \times \text{° Brix}) + 1{,}33063$$

$$\text{° Brix} = (600{,}90502 \times n) - 799{,}58215$$

Material y reactivos

- Refractómetro tipo ABBÉ (Fig. 2.3) provisto de una escala que indique el porcentaje en masa de sacarosa (° Brix) con una precisión del 0,1%, o bien el n con 4 decimales.
- Termómetro contrastado de 0-35 °C, con apreciación de 0,5 °C.
- Dispositivo de circulación de agua termostatizado a 20 °C.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Pipetas pasteur de 5 mL de un solo uso.
- Papel de filtro.
- Soluciones patrones de sacarosa (MR) de:
  - Sacarosa solución 14,9% p/p VINIKIT, *Código 624867*.
  - Sacarosa solución 19,4% p/p VINIKIT, *Código 624868*.
  - Sacarosa solución 23,8% p/p VINIKIT, *Código 625241*.
  - Sacarosa, pack de soluciones (14,9% p/p, 19,4% p/p, 23,8% p/p) VINIKIT, *Código 625484*.

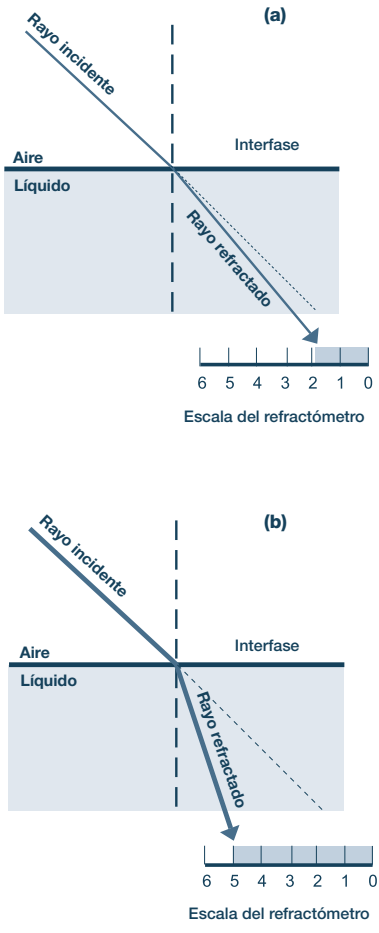


Figura 2.2.
Lectura en la escala de ° Brix del refractómetro de ABBÉ: (a) solución de baja riqueza en azúcar y (b) solución de alta riqueza en azúcar.

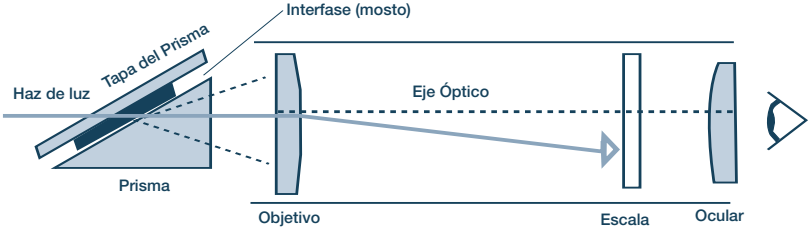


Figura 2.3.
Esquema del refractómetro de ABBÉ.

Calibración del refractómetro

Se debe calibrar siguiendo estrictamente las instrucciones del maual del instrumento, usando como reactivos el agua destilada (0° Brix) y los patrones de sacarosa.

Procedimiento

Se debe filtrar el mosto a través de papel de filtro, eliminando las primeras gotas del filtrado.

Unas gotas del filtrado, mantenido a una temperatura próxima a los 20 °C, se colocan mediante la pipeta en el prisma inferior del refractómetro procurando que al estar los prismas en estrecho contacto la superficie de vidrio quede cubierta uniformemente.

El porcentaje en masa de sacarosa (° Brix) se ha de medir con una aproximación de 0,1%, o anotar el n con 4 decimales (Fig. 2.4). Se han de efectuar las determinaciones por triplicado, anotando la temperatura a la que se realiza el ensayo.

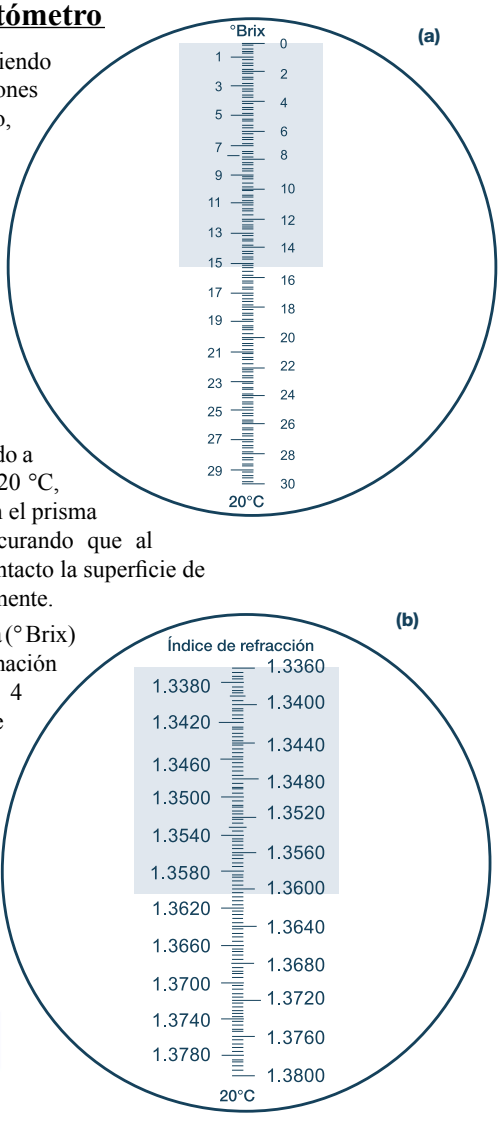


Figura 2.4. Campo de visión del ocular de un refractómetro con escalas de medida en ° Brix (a) y en índice de refracción (b).

Temperatura	c
15°C	-0,3
16°C	-0,3
17°C	-0,2
18°C	-0,1
19°C	-0,1
20°C	0,0
21°C	0,1
22°C	0,1
23°C	0,2
24°C	0,3
25°C	0,3

Tabla 2.1. Factores de corrección (c) del ° Brix en función de la temperatura.

Cálculo

Como el ° Brix y el *n* sufren variaciones con los cambios de temperatura, siempre que sea posible las determinaciones deben hacerse a 20 °C (ICUMSA: *International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis*; y la UE, 1990). En caso contrario es necesario corregir el valor de la lectura de ***° Brix aparente*** ($° Brix_t$) del refractómetro según la fórmula siguiente:

$$° Brix_{20\,°C} = ° Brix_t + c$$

Para conocer el ***grado alcohólico probable*** del mosto analizado es necesario interpolar el resultado de la lectura del °Brix en la siguiente fórmula (válida en el intervalo de 15-25 °Brix):

$$\text{Grado alcohólico probable, \% vol} = (0{,}6757 \times ° \text{Brix}) - 2{,}0839$$

2.2 EVALUACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE POR AREOMETRÍA (MÉTODO USUAL)

Fundamento

La areometría se basa en el principio de ARQUÍMEDES como se ha descrito en el apartado 1.

Material y reactivos

- Probeta graduada de 250 o 500 mL.
- Termómetro contrastado de 0-35 °C, con apreciación de 0,5 °C.
- Areómetro contrastado de clase II, en milésimas y medias milésimas:
  - 1,000-1,100 y 1,100-1,200 g/L.
- Plataforma con tornillos de nivelación.
- Baño termostatizado.
- Etanol 96% v/v PA, *Código 121085*.
- Potasio Hidróxido 85% lentejas PA, *Código 121515*.
- Ácido Clorhídrico 37% PA-ACS-ISO, *Código 131020*.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.

Los areómetros se han de limpiar sucesivamente con: solución alcohólica de hidróxido de potasio 50 g/L, solución de ácido clorhídrico diluido 1/10 y agua destilada.

Procedimiento

El mosto una vez homogeneizado se introduce en la probeta colocada en la plataforma para mantenerla vertical, junto con el termómetro. Al cabo de un minuto se lee la temperatura, se retira el termómetro y se introduce el areómetro y se lee la masa volúmica aparente en la ***parte superior del menisco*** que forma el líquido con la escala graduada del vástago (Fig. 1.1).

La determinación de la masa volúmica se halla afectada por la temperatura del mosto. Por esta razón las determinaciones areométricas deben realizarse a 20ºC

o bien utilizar un factor de corrección de la masa volúmica en función de la temperatura (c), según la fórmula siguiente:

$$\rho_{20\,°C} = \rho_t + c$$

c = factor de corrección de la masa volúmica en función de la temperatura (Tabla 1.2)

Cálculo

El resultado de la ***masa volúmica a 20 ºC*** (ρ_{20}) se expresa con ***4 decimales*** y en ***g/mL***.

Para conocer el ***grado alcohólico probable*** del mosto debe interpolarse el resultado de la lectura de la $\rho_{20\,°C}$ en la fórmula siguiente (válida para el intervalo de 1,0599-1,1049 g/mL) y se expresa con ***dos decimales*** en ***% vol.***

$$\text{Grado alcohólico probable, \% vol} = (150{,}5537 \times \rho_{20\,°C}) - 151{,}4771$$

Bibliografía

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 3-14 (1990).
- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 41-58 (1990).
- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 39-56 (1993).
  J. M. VIDAL. Curso de física. 355-359 (1974).

3. Grado Alcohólico Volumétrico Adquirido

Vinómetro

Introducción

Es una determinación de gran importancia ya que en las ***transacciones comerciales*** los vinos se cotizan según su grado alcohólico volumétrico (GAV).

Por definición el ***grado alcohólico volumétrico adquirido*** es el número de litros de *etanol* y de sus homólogos (metanol, alcoholes superiores, 2,3-butanodiol, etc.) contenidos en 100 L de vino, medidos ambos volúmenes a la temperatura de 20 ºC.

El grado ***alcohólico en potencia*** es el porcentaje de alcohol que se formaría si fermentase el azúcar residual de un vino (16,8 g de azúcar ≡ 1% vol) y el ***grado alcohólico total*** es la suma del volumétrico adquirido y del grado en potencia.

3.1 Método por destilación y areometría

Fundamento

Destilación del vino alcalinizado y determinación del grado alcohólico en el destilado por areometría. Se usan areómetros, expresamente graduados en % vol. llamados alcohómetros o alcoholímetros.

Material y reactivos

- Aparato de destilación (Fig. 3.1) compuesto por:
  - Manta calefactora.
  - Matraz de destilación de fondo redondo y 1l de capacidad
  - Columna rectificadora.
  - Refrigerante terminado en un tubo afilado para conducir el destilado al fondo del matraz aforado receptor que deberá contener algunos mL de agua.
- Matraz aforado de 200 mL.
- Termómetro contrastado de 0-35 ºC, con apreciación 0,5 ºC.
- Probetas de 10 y 250 mL.
- Areómetro (alcohómetro) contrastado de clase II, graduado entre 5 y 15% vol.
- Plataforma con tornillos de nivelación.
- Pipetas pasteur de un solo uso.
- Calcio Óxido natural, trozos QP, *Código 211234*.
- Calcio Hidróxido 2 mol/l (suspensión) VINIKIT, *Código 625409*.
- Piedra Pómez gránulos QP, *Código 211835*.
- Silicona líquida antiespumante (ORG) QP, *Código 211628*.
- Ácido Clorhídrico 37% PA-ACS-ISO, *Código 131020*.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

• Solución Hidroalcohólica 8,5% v/v VINIKIT, *Código 625337*.
• Solución Hidroalcohólica 11% v/v VINIKIT, *Código 625338*.
• Solución Hidroalcohólica 13,5% v/v VINIKIT, *Código 625339*.
• Solución Hidroalcohólica 16% v/v VINIKIT, *Código 625434*.
• Solución Hidroalcohólica 20% v/v VINIKIT, *Código 625435*.

Los areómetros se han de limpiar sucesivamente con: solución alcohólica de hidróxido de potasio 50 g/L, solución de ácido clorhídrico diluido 1/10 y agua destilada.

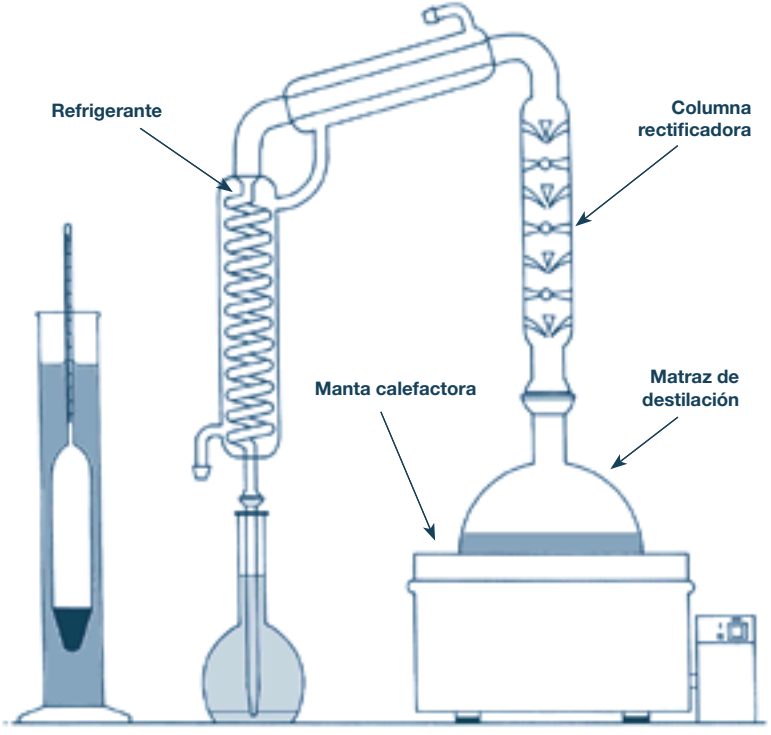


Figura 3.1.
Aparato de destilación: manta calefactora, matraz de destilación, columna rectificadora y refrigerante.

Procedimiento

En el caso de vinos jóvenes o espumosos se comienza por eliminar el dióxido de carbono por agitación o ultrasonidos. A continuación se llena un matraz aforado de 200 mL con el vino. Se pasa el contenido al matraz de destilación, evitando toda pérdida, y se lava 4 veces el matraz aforado con unos 5 mL de agua destilada cada vez, que se agregan al matraz de destilación. Se añaden unos 10 mL de la suspensión de hidróxido de calcio para alcalinizar el vino y algunas gotas de silicona líquida para evitar la espuma y/o unos fragmentos de piedra pómez para regular la ebullición en el caso de vinos dulces o licores tipo crema. Se enlaza el matraz de destilación al refrigerante y se conecta la manta calefactora. Se destilan aproximadamente 3/4 del volumen primitivo, recogiendo el destilado en el mismo matraz usado para medir el vino. Se completa con agua destilada hasta el enrase y se agita para conseguir una buena homogeneización.

Se vierte el destilado en una probeta de 250 mL. Se introduce el termómetro y se lee la temperatura al cabo de 1 min. Se retira el termómetro y se introduce el alcohómetro. Se han de realizar por lo menos 3 lecturas del grado alcohólico aparente por la parte inferior del menisco después del minuto de reposo del alcohómetro utilizando o no una lupa para facilitar la lectura (Fig. 3.2).

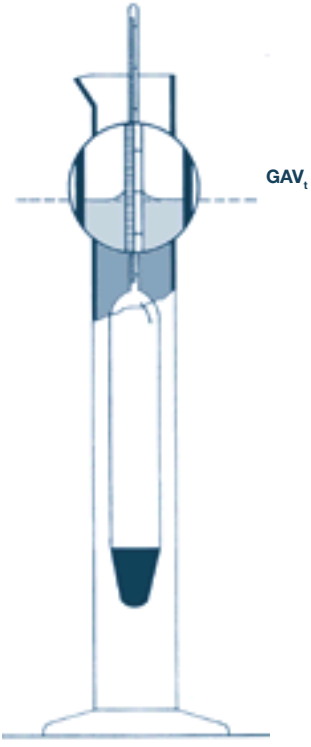


Figura 3.2. Lectura del grado alcohólico volumétrico (GAV) del destilado por aerometría.

Cálculo

El grado alcohólico volumétrico se expresa en ***% vol a 20 ºC*** con ***2 cifras decimales*** debiendo aproximarse la 2ª a 0 o 5. Como el GAV sufre variaciones con los cambios de temperatura, siempre que sea posible las determinaciones deben hacerse a 20 ºC. En su defecto, es necesario corregir del valor obtenido a t ºC utilizando la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Corrección del grado alcohólico aparente según la temperatura de lectura.

	Grado alcohólico volumétrico, % vol												
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
14ºC	-0,85	-0,91	-0,97	-1,04	-1,12	-1,20	-1,29	-1,39	-1,49	-1,58	-1,68	-1,78	-1,88
15ºC	-0,73	-0,77	-0,83	-1,89	-0,95	-1,02	-1,09	-1,16	-1,24	-1,32	-1,40	-1,48	-1,56
16ºC	-0,60	-0,63	-0,67	-0,72	-0,77	-0,82	-0,88	-0,94	-1,00	-1,06	-1,12	-1,19	-1,25
17ºC	-0,46	-0,48	-0,51	-0,55	-0,59	-0,62	-0,67	-0,71	-0,75	-0,80	-0,84	-0,89	-0,94
18ºC	-0,31	-0,33	-0,35	-0,37	-0,40	-0,42	-0,45	-0,48	-0,51	-0,53	-0,56	-0,59	-0,62
19ºC	-0,16	-0,17	-0,18	-0,19	-0,20	-0,21	-0,23	-0,24	-0,25	-0,27	-0,28	-0,30	-0,31
20ºC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21ºC	-0,17	-0,18	-0,19	-0,19	-0,20	-0,22	-0,23	-0,25	-0,26	-0,28	-0,29	-0,30	-0,31
22ºC	-0,34	-0,36	-0,37	-0,39	-0,41	-0,44	-0,47	-0,49	-0,52	-0,55	-0,57	-0,60	-0,62
23ºC	-0,51	-0,54	-0,57	-0,60	-0,63	-0,66	-0,70	-0,74	-0,78	-0,82	-0,86	-0,90	-0,93
24ºC	-0,70	-0,73	-0,77	-0,81	-0,85	-0,89	-0,94	-0,99	-1,04	-1,10	-1,15	-1,20	-1,25
25ºC	-0,89	-0,93	-0,97	-1,02	-1,07	-1,13	-1,19	-1,25	-1,31	-1,37	-1,43	-1,49	-1,56
26ºC	-1,08	-1,13	-1,18	-1,24	-1,30	-1,36	-1,43	-1,50	-1,57	-1,65	-1,73	-1,80	-1,87

3.2 Método ebulloscópico

Fundamento

El método ebulloscópico se basa en la variación del punto de ebullición que experimentan los líquidos hidroalcohólicos según su proporción de alcohol.

En condiciones normales (760 mm Hg/cm^2 ≡ 1013 hPa) el punto de ebullición del agua es 100 ºC y el del alcohol 78,5 ºC. Una mezcla de alcohol y agua que se mantenga constante mediante un refrigerante a reflujo, hervirá a una temperatura tanto más próxima a la del agua cuanto menos alcohol contenga y viceversa.

Por lo tanto es lógico que se pueda llegar a fijar la composición alcohólica de una mezcla atendiendo a las relaciones que podamos establecer entre el porcentaje de alcohol y la temperatura de ebullición. Sin embargo si este fundamento es aplicable a mezclas de agua y alcohol (al margen de algunas limitaciones debidas a ciertos detalles de la técnica) no es igual para los vinos en los que la mayor o menor cifra de extracto seco total influye en la determinación, siendo un motivo de error. Por esta razón aunque son métodos muy generalizados es necesario indicar siempre en los informes el método seguido.

Los primeros ebullómetros fueron los construidos por MALLIGAND (1875) Y DUJARDIN-SALLERON (1881).

Modelo original del ebullómetro de Malligand

Material y reactivos

- Ebullómetro (Fig. 3.3):
  - Caldera metálica protegida por una envoltura para disminuir la pérdida de calor por radiación.
  - Refrigerante.
  - Termómetro contrastado de 86-100 ºC, con apreciación de 0,05 ºC.
  - Mechero de alcohol.
  - Regla deslizante o disco graduado de cálculo.
- Probeta de 15 y 50 mL.
- Alcohol 96% v/v PA, *Código 121085*.
- Derquim LM 01 Alcalino, *Líquido, Código 502600*.
- Sodio Hidróxido lentejas PA-ACS-ISO, *Código 131687*.
- Solución de hidróxido de sodio al 2%.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.
- Solución Hidroalcohólica 8,5% v/v VINIKIT, *Código 625337*.
- Solución Hidroalcohólica 11% v/v VINIKIT, *Código 625338*.
- Solución Hidroalcohólica 13,5% v/v VINIKIT, *Código 625339*.
- Solución Hidroalcohólica 16% v/v VINIKIT, *Código 625434*.

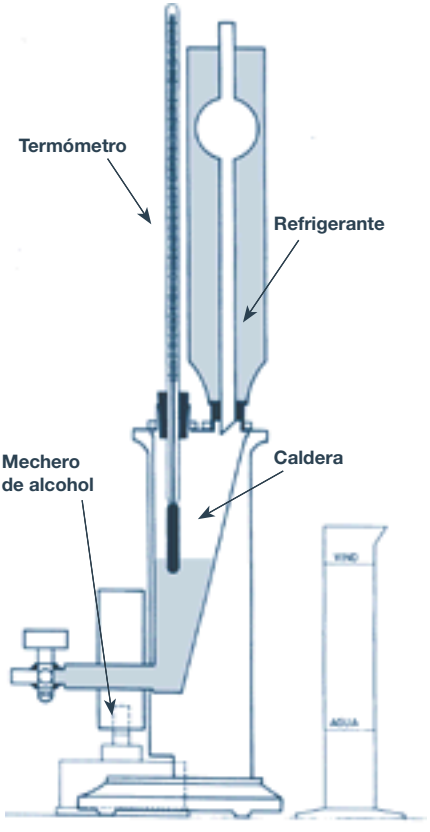


Figura 3.3.
Esquema del ebullómetro de Dujardin-Salleron

Procedimiento

Primero se determina el punto de ebullición del agua. Para ello se introduce en la caldera por el orificio que luego se insertará el termómetro 15 mL de agua medidos con probeta, se coloca el refrigerante vacío y se ajusta el termómetro de manera que su bulbo esté situado en el espacio que queda por encima de la superficie del líquido. Se enciende el mechero de alcohol y se observa la marcha ascendente de la columna de mercurio del termómetro, una vez ésta permanece constante, se anota la temperatura de ebullición del agua (T_1).

En la regla deslizante o disco graduado que acompaña al aparato se hace coincidir la parte central móvil hasta que la cifra de la temperatura de ebullición del agua coincida con el cero del grado alcohólico y se fija la escala que queda así preparada para las determinaciones en los vinos mientras se mantenga constante la presión atmosférica.

Se vacía la caldera, se lava con algunas porciones del vino a analizar y en el caso que sea necesario con detergente o con una solución del 2% de hidróxido de sodio, se deja escurrir bien y se pone en ella unos 50 mL del vino. Se procede como antes, pero trabajando ahora con el refrigerante lleno de agua y el bulbo del termómetro dentro del líquido. Cuando se estabiliza la temperatura del termómetro se lee esta (T_2) y se busca en la escala exterior de grados alcohólicos de la regla el que coincide con el punto de ebullición del vino.

En el caso de muestras con un gran contenido de alcohol es conveniente diluirlas antes de realizar la determinación del punto de ebullición.

Cálculo

El ***GAV a 20ºC*** se expresa con ***2 decimales*** y ***en % vol***.

Para facilitar el cálculo en la Tabla 3.2 se exponen los valores del GAV, ajustados a 0 o 5 en la segunda cifra decimal, correspondientes a las diferencias más frecuentes entre los puntos de ebullición del agua y del vino ($DT = T_1 - T_2$).

DT, ºC	GAV, % vol	DT, ºC	GAV, % vol
6,35	8,00	8,45	11,60
6,40	8,10	8,50	11,70
6,45	8,15	8,55	11,80
6,50	8,25	8,60	11,90
6,55	8,30	8,65	12,00
6,60	8,40	8,70	12,10
6,65	8,50	8,75	12,20
6,70	8,55	8,80	12,30
6,75	8,65	8,85	12,40
6,80	8,70	8,90	12,50
6,85	8,80	8,95	12,60
6,90	8,85	9,00	12,70
6,95	8,95	9,05	12,80
7,00	9,05	9,10	12,90
7,05	9,10	9,15	13,00
7,10	9,20	9,20	13,10
7,15	9,30	9,25	13,20
7,20	9,35	9,30	13,30
7,25	9,45	9,35	13,40
7,30	9,55	9,40	13,50
7,35	9,60	9,45	13,65
7,40	9,70	9,50	13,75
7,45	9,80	9,55	13,85
7,50	9,85	9,60	13,95
7,55	9,95	9,65	14,05
7,60	10,05	9,70	14,15
7,65	10,15	9,75	14,30
7,70	10,20	9,80	14,40
7,75	10,30	9,85	14,50
7,80	10,40	9,90	14,60
7,85	10,50	9,95	14,70
7,90	10,60	10,00	14,85
7,95	10,65	10,05	14,95
8,00	10,75	10,10	15,05
8,05	10,85	10,15	15,15
8,10	10,95	10,20	15,30
8,15	11,05	10,25	15,40
8,20	11,15	10,30	15,50
8,25	11,20	10,35	15,65
8,30	11,30	10,40	15,75
8,35	11,40	10,45	15,85
8,40	11,50	10,50	16,00

Tabla 3.2.
Correlación entre diferencia de los puntos de ebullición del agua y del vino ($DT=T_1-T_2$) y el grado alcohólico volumétrico (GAV).

También se puede calcular el GAV substituyendo los valores de las diferencias entre los puntos de ebullición del agua destilada del vino (DT) en la fórmula siguiente:

$$GAV, \% \text{ vol} = (0{,}1036 \times DT^2) + (0{,}1729 \times DT) + 2{,}7447$$

Algunos autores utilizan el ebullómetro en vinos dulces aplicando el siguiente factor de corrección:

$$\% \text{ vol} = \% \text{ vol}_{ebull.} - (0{,}005 \times A)$$

A = azúcar total en g/L

Legislación

Los límites legales respecto al grado alcohólico volumétrico en algunas bebidas alcohólicas son los expresados en la Tabla 3.3.

Tipo de vino	GAV % vol
tranquilo	≥9* - <15
mosto de uva apagado con alcohol	12 - <15
de licor	15 - 22
base para espumoso[3]	9,5 - 11,5
espumoso[3]	10,8 - 12,8
gasificado[4]	≥9,5
Vinagre[1]	≥0,5
refresco de vino (wine coolers)[2]	3 - 7
sangría	7 - 14
aromatizado	15 - 23

Tabla 3.3.
Límites legales del GAV según tipo de vino.

** Excepto para vino de ciertas zonas vitícolas ≥8,5% vol.*
[1] Orden 29127 BOE núm. 293 del 08.10.93
[2] Orden 33109 BOE núm. 304 del 20.12.86
[3] Orden 28079 BOE núm. 278 del 20.11.91
[4] BOE núm. 189 del 20.07.72

Bibliografía

- **AMERINE M.A. Y C.S. OUGH.**
  Análisis de vinos y mostos. 46-59 (1976).
- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 35-49 (1990).
- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 59-84 (1990).
  MARCO O. y B. LEOCI. Riv. Vitic. Enol. 28, 145-161 (1975).
- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 78-109 (1993).

4. Acidez Total

Introducción

La ***acidez total*** (AT) es la suma de los ácidos valorables del vino y mosto cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución de hidróxido de sodio, aunque organismos internacionales como la AOAC aconsejan a 8,2 en lugar de 7, por tratarse de una valoración de ácidos débiles con una base fuerte.

Los ácidos más frecuentes del vino son el ***tartárico***, el ***málico*** y el ***láctico***, todos ellos desempeñan un papel importante en las características organolépticas del vino. Los ácidos tartárico y málico proceden de la uva, y el láctico proviene de la fermentación maloláctica del vino. Otros ácidos presentes en el vino, aunque de forma minoritaria son el cítrico, el acético, el glucónico, el ascórbico, el succínico, etc.

Tanto el ***dióxido de carbono*** (CO_2) como el ***dióxido de azufre*** (SO_2) no se incluyen en la AT.

La determinación de la ***acidez total*** del mosto, conjuntamente con la del ***azúcar***, permite calcular el ***índice de maduración*** de la uva (azúcar/acidez total), necesario para fijar el momento adecuado de la vendimia ($\cong$38).

La AT de un vino es más baja que la del mosto del que procede, ya que el ácido tartárico precipita en forma de ***bitartrato de potasio y tartrato de calcio***. Esta precipitación es provocada por la disminución de la solubilidad al aumentar el porcentaje de alcohol y disminuir la temperatura (estabilización por frío).

Determinación de la acidez total

Fundamento

Valoración potenciométrica o en presencia de ***azul de bromotimol*** como indicador del punto final de la valoración ácido-base.

Material y reactivos

pHTester® 3 de Chemetrics. pHmetro de gran exactitud, impermeable y a prueba de partículas de polvo. Código: I-1000RK

- pHmetro.
- Erlenmeyer de 200 mL.
- Pipeta de 10 mL.
- Bureta de 10 mL.
- Tampón solución pH 7,00 ± 0,02 (20 ºC) ST, *Código 272170*.
- Tampón solución pH 4,00 ± 0,02 (20ºC) ST, *Código 272168*.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Potasio Cloruro PA-ACS-ISO, *Código 131494*.
- Potasio Cloruro 3 mol/L RV, *Código 282775*.
- Azul de Bromotimol solución 0,4% VINIKIT, *Código 624566*.
- Sodio Hidróxido 0,1332 mol/L (0,1332N) VINIKIT, *Código 624835*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Procedimiento

Si el vino o el mosto contiene cantidades importantes de dióxido de carbono y dióxido de azufre, se han de eliminar por agitación o haciendo el vacío.

El pH-metro se ha de calibrar mediante las soluciones tampón de pH 7 y 4.

10 mL de muestra se colocan en un erlenmeyer, se añade 10 mL de agua destilada y se valora lentamente con hidróxido de sodio 0,1332M, agitando constantemente hasta ***pH = 7*** o color ***verde-azulado*** en el caso de haber añadido unas gotas de azul de bromotimol. El ***patrón de coloración*** verde-azulado se prepara substituyendo los 10 mL de muestra por la solución tampón de pH = 7.

Cálculo

La AT en vino y mosto se expresa en g/L de ácido tartárico y con un decimal.

$$\text{Acidez total g/L} = \frac{v \times 0{,}1332 \times 75}{10} = v$$

v = mL de hidróxido de sodio 0,1332*M* consumidos en la valoración
Pm ácido tartárico = 150 g/mol
1 mL ≡ 1 g/L

Legislación

En la Tabla 4.1 se muestran los límites de la acidez total.

Tipo de muestra	Acidez total g/l
zumo de uva[1]	3,5-10
sangría	3,6-10
refresco de vino (wine coolers)[2]	4-8
vino tranquilo[3]	≥4,5
vino base para espumoso[4]	≥5,5
vino espumoso[4]	≥5,5

Tabla 4.1.
Límites legales de acidez total, expresado en g/L de ácido tartárico.

[1] Orden 20232 BOE núm. 207 del 29.08.87
[2] Orden 33109 BOE núm. 304 del 20.12.86
[3] Reglamento CEE 557/94 de 14.03.94
[4] Orden 28079 BOE núm. 278 del 20.11.91

Bibliografía

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 81-83 (1990).
- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes inter-nationales d'analyse des vins et des moûts. 155-158 (1990).
- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 148-151 y 387-388 (1993).

5. Acidez Volátil

Introducción

La ***acidez volátil*** (AV) es el conjunto de ácidos grasos de la serie acética que se hallan en el vino libres o combinados formando sales. El más importante es el ácido acético.

El olor desagradable a "picado" de algunos vinos es debido principalmente al ***ácido acético*** y al ***acetato de etilo***. El nivel sensorial de estos compuestos es del orden de 0,6 g/L para el ácido acético y 0,1 g/L para el acetato de etilo.

Método García-Tena

Fundamento

Se basa en una destilación fraccionada del vino una vez eliminado el dióxido de carbono y una posterior valoración ácido-base de la segunda porción del destilado.

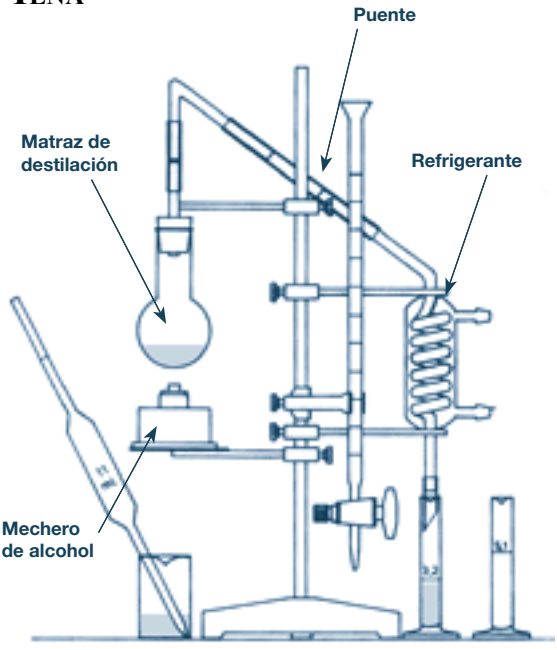


Figura 5.1.
Aparato de destilación para la determinación de la acidez volátil (volatímetro).

Material y reactivos

- Microdestilador o volatímetro (Fig. 5.1) compuesto por:
  - Matraz de destilación.
  - Puente de unión.
  - Refrigerante.
  - Mechero de alcohol.
- Probetas de 5,1 mL y 3,2 mL.
- Erlenmeyer de 50 mL.
- Pipeta de 11 mL.
- Bureta de 10 mL.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Fenolftaleína solución 1% VINIKIT, *Código 621327*.
- Sodio Hidróxido 0,02 mol/l (0,02N) VINIKIT, *Código 623397*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Procedimiento

En el matraz de destilación se colocan 11 mL de vino desprovisto de dióxido de carbono y se conecta al aparato de destilación. A la salida del refrigerante se coloca la probeta de 5,1 mL y se procede a la destilación. Cuando el destilado alcanza el

trazo superior de la probeta se sustituye por la de 3,2 mL, dándose por terminada la destilación cuando se alcanza este volumen.

El destilado recogido en la probeta de 3,2 mL se vierte en un erlenmeyer y se valora con la solución de hidróxido de sodio 0,02M, en presencia de unas gotas de fenolftaleína, hasta obtener un color ligeramente rosado. Sea v el volumen de hidróxido de sodio consumido.

Cálculo

La acidez volátil se expresa en g/L de ácido acético y con dos decimales.

$$\text{Acidez volátil g/L} = 0{,}366 \times v$$

v = mL de hidróxido de sodio 0,02M consumidos en la valoración

La acidez volátil de los vinos puede variar entre 0,20 y 0,60 según el tipo de vino y del proceso de elaboración seguido.

Legislación

En la Tabla 5.1 se muestran los límites legales de la acidez volátil.

Tipo de muestra	Acidez volátil g/l
zumo de uva	≤0,12
vino ecológico	≤0,7
vino blanco y rosado[1]	≤1,08
vino tinto[1]	≤1,2
vino base para espumoso[2]	<0,60
vino espumoso[2]	<0,65
vino gasificado	<0,9
refresco de vino (wine coolers)[3]	≤0,3
vino aromatizado	≤1
biter-soda	≤0,5
sangría	≤0,6

Tabla 5.1. Límites legales de acidez volátil, expresado en g/L de ácido acético.

[1] Reglamento CE 1493/99 de 17.05.99
[2] Orden 28079 BOE núm. 278 del 20.11.91
[3] Orden 33109 BOE núm. 304 del 20.12.86

Bibliografía

- **GARCÍA J.**
  Metodología de análisis de vinos y derivados. 92 (1976).
- **GARCÍA J.**
  Técnicas analíticas para vinos. 1.20-1.21 (1990).
- **J. RIBÉREAU-GAYON, E. PEYNAUD, P. SUDRAUD I P. RIBÉREAU-GAYON.**
  Tratado de enología. Ciencias y técnicas del vino. Análisis y control de los vinos. 2, 113-116 (1972).

6. Ácido Tartárico

Introducción

El ***ácido L(+)tartárico*** ($COOH–(CHOH)_2–COOH$) es el ácido orgánico más fuerte de los presentes en la uva, por lo que es de gran importancia en el pH, características organolépticas, equilibrio ácido-base, matiz de color e índice de maduración. Se determina principalmente en mostos y vinos, ya que representa aproximadamente del 50 al 70% de la acidez total dependiendo de la variedad de uva y su estado de madurez. Su contenido puede variar entre 2 y 6 g/L dependiendo de la época del año, de la región, de la uva o del mosto.

Método REBELEIN modificado (1973)

Fundamento

El método se basa en la ***determinación espectrofotométrica*** a la longitud de onda de ***500 nm*** por formación de un ***compuesto cromóforo*** amarillo-naranja, al reaccionar el ***ácido tartárico*** con el ***metavanadato*** en medio ácido.

En el caso concreto de los ***vinos tintos*** se ha de eliminar la posible ***interferencia*** de las ***antocianinas*** midiendo el color del vino al mismo pH de la reacción.

Material y reactivos

- Espectrofotómetro VIS que permita medir la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm.
- Cubetas de 10 mm de trayecto óptico.
- Balanza analítica.
- Micropipeta de volumen variable entre 100-1000 µL. *Código 825.1000RI.*
- Pipetas de vidrio de doble enrase de 5, 10, 20, 25, 30 y 50 mL.
- Matraces aforados de 100, 200 y 1000 mL.
- Puntas para la micropipeta.
- Agua PA-ACS, *Código 131074.*
- Ácido acético glacial PA-ACS-ISO, *Código 131008*.
- Hidróxido de sodio 1*M*, *Código 181691*.
- Acetato Sodio anhidro PA-ACS, *Código 131633*.
- Solución de acetato de sodio al 27%. Disolver 54 g de acetato de sodio en 200 mL de agua destilada.
- Metavanadato Amonio PA-ACS, *Código 132352*.
- Cloruro Amonio PA-ACS-ISO, *Código 131121.*
- Solución 1: ácido acético al 30% (v/v). En un matraz aforado de 1 L, introducir 300 mL de ácido acético y añadir agua destilada hasta 1 L.
- Solución 2: disolver 10 g de metavanadato de amonio en 150 mL de hidróxido de sodio 1*M*, añadir 200 mL de la solución de acetato de sodio al 27% y enrasar a 1 L con agua destilada.

Micropipeta electrónica Acura® 825. Diseñada y fabricada con el máximo cuidado hasta en los detalles más pequeños, Acura® 825 es una herramienta cómoda y de alto nivel profesional que satisface las más estrictas exigencias del pipeteado.

- Solución 3: disolver 4,5 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) en 150 mL de hidróxido de sodio 1*M*, adicionar 200 mL de la solución de acetato de sodio al 27%, 300 mL de ácido acético y enrasar a 2 L con agua destilada. El pH de esta solución debe ajustarse al mismo valor que el de una mezcla a volúmenes iguales de la solución 1 y 2 con una solución de hidróxido de sodio 1*M*.
- Ácido L(+)-Tartárico PA-ACS-ISO, *Código 131066*.
- Solución patrón de ácido tartárico de 10 g/L.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Obtención de la curva patrón

Verter 5, 20, 35, 50, 65 y 80 mL de la solución patrón de ácido tartárico (10 g/L) en matraces aforados de 100 mL y enrasar con agua destilada. Las concentraciones corresponden a 0.5, 2, 3.5, 5, 6.5 y 8 g de ácido tartárico por litro.

Procedimiento

La determinación se realiza en las cubetas espectrofotométricas de 10 mm de recorrido óptico según el esquema siguiente:

Pipetear ml	Cubeta A	Cubeta B	Cubeta C	Cubeta D
Sol. patrón o vino o mosto	0,1	0,0	0,1	0,0
Agua destilada	0,0	0,1	0,0	0,1
Solución 1	1,0	1,0	0,0	0,0
Solución 2	1,0	1,0	0,0	0,0
Solución 3	0,0	0,0	2,0	2,0
Mezclar y dejar reaccionar durante 15 min.				
Leer absorbancia 500 nm y cubeta de 10 mm	A_A	A_B	A_C	A_D

En el caso del ***vino blanco, mosto*** y ***patrones*** tan solo se han de realizar las reacciones de las cubetas A y B; a diferencia del vino tinto que se han de realizar las cuatro (A, B, C i D).

Cálculo

La recta de calibración se ha de construir a partir de la diferencia entre las absorbancias de las cubetas A y B y de los patrones ($A_A - A_B$).

Para calcular la concentración de ácido tartárico en mosto y vino blanco se ha de interpolar en la recta de calibración ***la diferencia entre las absorbancias de las cubetas A y B*** ($A_A - A_B$). En el caso del ***vino tinto*** se ha de interpolar el resultado de ***[($A_A - A_B$) - ($A_C - A_D$)]***.

El contenido se ha de expresar en ***g/L*** de ácido tartárico con ***1 cifra decimal***.

Bibliografía

- **AMERINE M.A. Y C.S. OUGH.**
  Methods for Analysis of Must and Wines (1980).
- **REBELEIN H.**
  Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 2, 33-38 (1973).

7. pH

Introducción

La determinación del ***pH*** en el mosto y el vino es una medida complementaria de la acidez total porque nos permite medir la fuerza de los ácidos que contienen.

Por definición el pH es el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno:

$$pH = -\log [H^+]$$

La estabilidad de un vino, la fermentación maloláctica, el sabor ácido, el color, el potencial redox y la relación de dióxido de azufre libre y total estan estrechamente relacionados con el pH del vino.

Determinación por potenciometría

Fundamento

Medida de la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el de lectura de pH propiamente dicho sumergidos en el vino.

Material y reactivos

- pHmetro.
- Electrodo combinado de calomelanos saturado o el de Ag/AgCl.
- Termómetro contrastado de 0-35 ºC, con apreciación 0,5 ºC.
- Vaso de precipitados de 100 mL.
- Tampón solución pH 7,00 ± 0,02 (20 ºC) ST, *Código 272170*.
- Tampón solución pH 4,00 ± 0,02 (20 ºC) ST, *Código 272168*.
- Potasio Cloruro PA-ACS-ISO, *Código 131494*.
- Potasio cloruro 3 mol/L RV, *Código 282775*.
- Agua PA-ACS, Código 131074.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Procedimiento

Primero se ha de calibrar el pHmetro con las soluciones tampón de pH 7 y 4 según el manual del instrumento. Una vez calibrado se puede realizar la medida del pH sumergiendo el electrodo en el vino durante unos 15 s a una temperatura lo más cercana a 20 ºC porque el pH está muy influenciado por la temperatura.

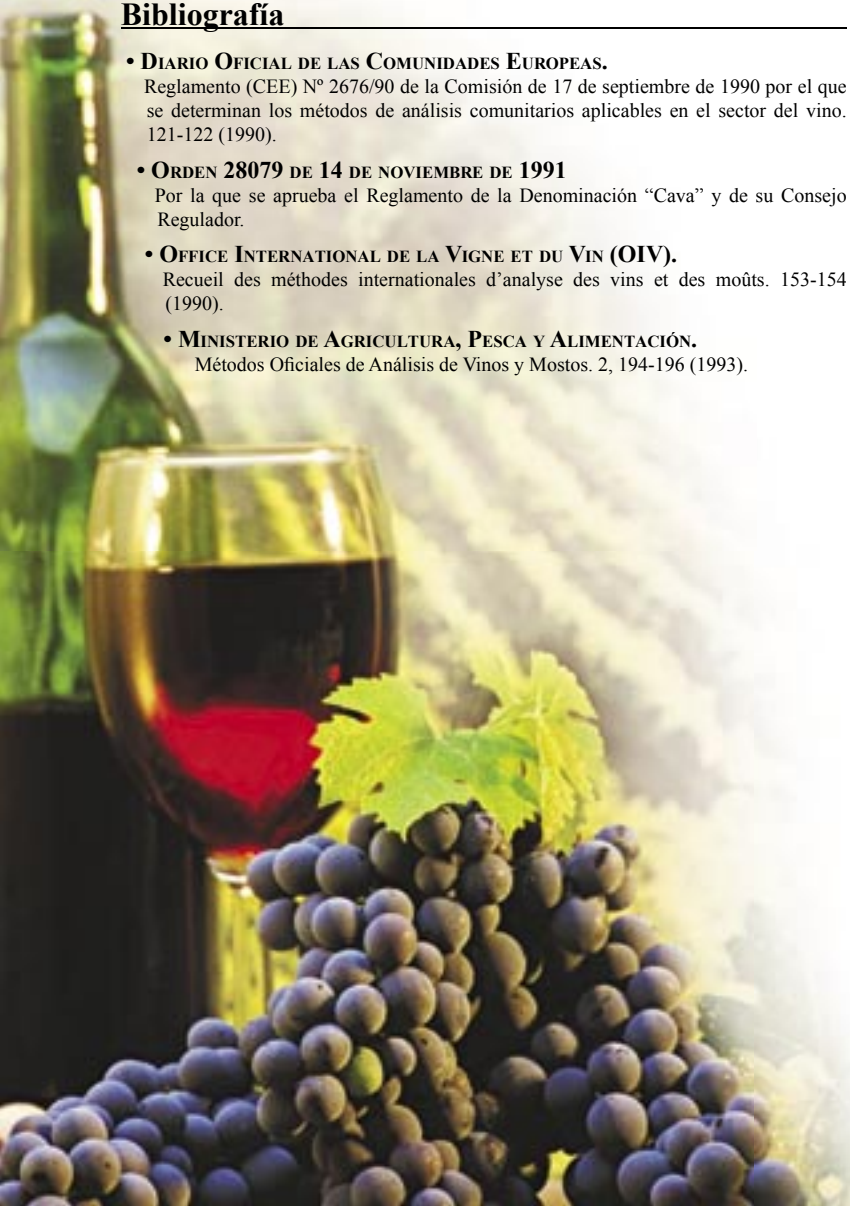
Entre lectura y lectura se lava el electrodo con agua destilada y se seca con papel de filtro con cuidado para no dañar la membrana del electrodo. El electrodo se ha de rellenar periódicamente con la solución de cloruro de potasio 3*M*.

Cálculo

La ***lectura de pH es directa*** y se expresa con ***dos decimales***. El pH usual de un vino puede variar entre 2,7 y 3,8 dependiendo de si es blanco o tinto.

Legislación

Tanto el vino base para la elaboración de espumoso como el espumoso propiamente dicho ha de tener un pH entre 2,8 y 3,4.



Bibliografía

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 121-122 (1990).
- **ORDEN 28079 DE 14 DE NOVIEMBRE DE 1991**
  Por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación "Cava" y de su Consejo Regulador.
- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 153-154 (1990).
- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 194-196 (1993).

8. Extracto Seco Total y Extracto Seco sin Azúcar (ESSA)

Introducción

El ***extracto seco total*** (EST) es el conjunto de todas las substancias que no se volatilizan a 100 ºC y el ***extracto seco sin azúcar*** (ESSA) es la diferencia entre el EST y el azúcar total.

Método densimétrico

Fundamento

El extracto seco total se calcula indirectamente a partir de la masa volúmica y el grado alcohólico volumétrico del vino.

Material y reactivos

- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Patrónes de Referencia para Enología (Vino Blanco y Tinto)

Procedimiento

Se ha de determinar la masa volúmica y el grado alcohólico volumétrico del vino según los procedimientos anteriormente descritos para que posteriormente podamos calcular el EST y el ESSA.

Cálculo

El extracto seco total (EST) y el extracto seco sin azucar (ESSA) se expresan en ***g/L de sacarosa y con un decimal***. Se calculan a partir de las fórmulas siguientes que han sido deducidas a partir de las Tablas de EST del Método Oficial:

$$EST\ g/L = (2589{,}8 \times MV) - (0{,}026 \times GAV^2) + (3{,}64 \times GAV) - 2584{,}2$$

$$ESSA = EST - A$$

MV = masa volúmica, g/mL
GAV = grado alcohólico volumétrico, % vol
A = azúcar total, g/L

Los valores habituales de ESSA en vino seco están entre 16 y 23 para blanco y entre 22 y 30 para tinto.

Los valores habituales de ESSA en vino están entre 14 y 21 para blanco y entre 20 y 25 para tinto.

Legislación

En la Tabla 8.1 se muestran los límites del ESSA.

Bibliografía

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 50-51 (1990).
- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 85-89 (1990).
- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 110-112 (1993).

Tipo de muestra	Extracto seco sin azúcar (ESSA) g/l
vino base para espumoso[1]	13-22
vino espumoso[1]	13-22
vino aromatizado	≥13
sidra	≥13

Tabla 8.1.
Límites legales del Extracto seco sin azúcar (ESSA).

[1] Orden 28079 BOE núm. 278 del 20.11.91

9. Azúcar Total

Introducción

Los azúcares predominantes en la uva de las diferentes variedades de vid (*Vitis vinifera*) y por consiguiente del vino y derivados son la ***glucosa*** y la ***fructosa***. También se puede encontrar en el vino otros azúcares, pero de forma minoritaria como pentosas (arabinosa, xilosa y ribosa), galactosa, sacarosa, etc.

Esta determinación tiene por objeto conocer la concentración de azúcar en la uva, mosto y vino para prever mediante el índice de maduración (azúcar/acidez total) el ***tiempo óptimo de vendimia***, seguir la fermentación alcohólica, el control del tiraje y la clasificación de los vinos (Tabla 9.1 y 9.2).

Tipo de vino	Azúcar total g/l
seco	≤4 o ≤9*
semi seco	≤12
semi dulce	>12 y ≤45
dulce	>45

Tabla 9.1. Clasificación de los vinos tranquilos según su concentración en azúcar.

Reglamento CEE 997/81 del 26.03.81

** En el caso de que los azúcares totales – acidez total ≤2*

Tabla 9.2. Clasificación de los vinos espumosos según su concentración en azúcar.

Reglamento CEE 1493/99 del 17.05.99

Tipo de vino espumoso y gasificado	Azúcar total g/l
brut nature	<3
extra brut	≤6
Brut	<15
extra seco	12-20
Seco	17-35
semi seco	33-50
Dulce	>50

Método REBELEIN

Fundamento

Se basa en las propiedades reductoras de la glucosa y la fructosa sobre las sales cúpricas. Estos azúcares son oxidados a la temperatura de ebullición por un exceso de solución alcalina de Cu^{2+} que contiene tartrato para mantener el metal en solución. El Cu^{2+} es reducido a Cu^{+} y el Cu^{2+} en exceso se puede determinar por yodometría después de adicionar exceso de KI y acidular. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:

$$\textbf{Azúcar} + Cu^{2+} \rightleftharpoons \text{Azúcar}_{ox.} + Cu^{+} + Cu^{2+}_{exc.}$$

$$2\ Cu^{2+}_{exc.} + 2\ e^{-} \rightleftharpoons 2\ Cu^{+}$$

$$2\ I^{-} \rightleftharpoons I_2 + 2\ e^{-}$$

$$2\ Cu^{2+} + 2\ I^{-} \rightleftharpoons 2\ Cu^{+} + I_2$$

$$I_2 + 2\,e^- \rightleftharpoons 2\,I^-$$
$$2S_2O_3^{2-} \rightleftharpoons S_4O_6^{2-} + 2\,e^-$$
$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightleftharpoons 2I^- + S_4O_6^{2-}$$

En este método también se realiza la hidrólisis de la posible sacarosa presente en la muestra en glucosa y fructosa antes de las reacciones redox.

Material y reactivos

- Placa calefactora.
- Reactor: matraz erlenmeyer de 200 mL con tapón y embudo de vidrio acoplado (Fig. 9.1).
- Pipetas de 2 y 10 mL.
- Probeta de 10 mL.
- Bureta de 30 mL.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Kit de REBELEIN VINIKIT, Código 624901, que se compone de:
  - Solución Cúprica 0,168 mol/L VINIKIT, *Código 624582*.
  - Solución Alcalina (potasio sodio tartrato) 0,886 mol/l VINIKIT, *Código 624573*.
  - Piedra Pómez gránulos QP, *Código 211835.*
  - Potasio Yoduro solución 30% p/v VINIKIT, *Código 624572*.
  - Ácido Sulfúrico solución 16% v/v VINIKIT, *Código 624570*.
  - Almidón solución 2% VINIKIT, *Código 624567*.
  - Sodio Tiosulfato 0,0551 mol/L (0,0551N) VINIKIT, *Código 624576*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

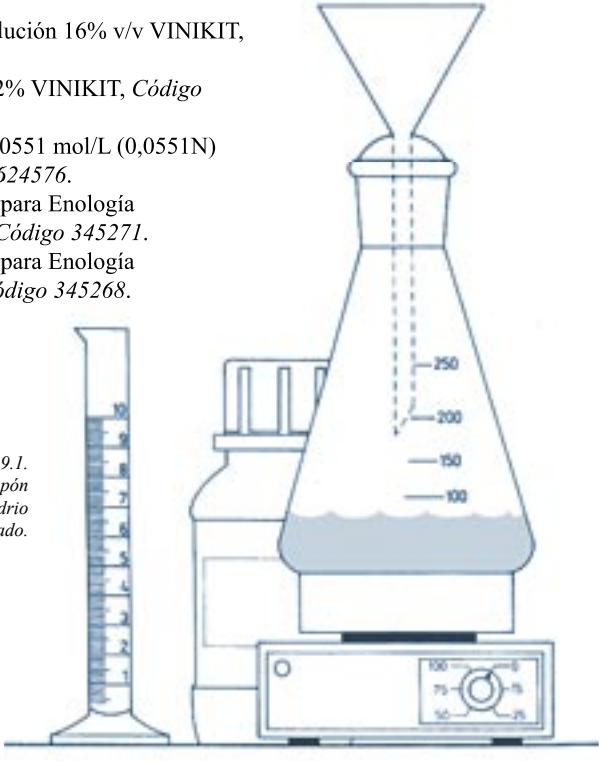


Figura 9.1. Matraz erlenmeyer con tapón esmerilado y embudo de vidrio acoplado.

Procedimiento

En un matraz erlenmeyer se introducen de forma sucesiva ***2 mL de vino***, ***10 mL de solución cúprica*** y ***5 mL de la solución alcalina***, algunos gramos de ***piedra pómez***, se tapa el erlenmeyer y se calienta sobre la placa calefactora hasta ***ebullición*** que se mantiene durante ***3 min***. Se enfría bajo el chorro del grifo y se añade de forma sucesiva con la probeta ***10 mL de la solución de yoduro de potasio, 10 mL solución de ácido sulfúrico y 10 mL de solución engrudo de almidón***.

Se hace un blanco con todos los reactivos excepto el vino que se substituye por agua destilada. La valoración se realiza con la solución de ***tiosulfato*** hasta ***coloración amarillo crema***. Sean v los mL de tiosulfato gastados en el blanco y v' los del problema. Antes de realizar el análisis es necesario conocer la cantidad aproximada de azúcar reductor de la muestra que debe ser ≤ 28 g/L. En caso contrario será necesario diluir la muestra.

En el caso de los vinos tintos es conveniente defecarlos o decolorarlos antes del análisis para evitar la interferencia de otras sustancias con propiedades reductoras como son los polifenoles. Para ello se puede utilizar cualquier de los productos siguientes polivinilpirrolidona (PVPP), ferrocianuro de zinc, etc.

Cálculo

La diferencia entre el volumen v de tiosulfato gastado en el blanco y el v' gastado en la muestra nos da el contenido de azúcar expresado en ***g/L*** (con ***un decimal***).

$$\text{Azúcar total, g/L} = (v - v')$$

En el caso de vinos con elevado contenido de azúcar deben tenerse en cuenta las diluciones efectuadas. De forma experimental se ha podido comprobar que entre este método y el enzimático existe una diferencia de ≃1,7 g/L

$$\text{Azúcares totales (glucosa + fructosa), g/L} = \text{Azúcar total} - 1{,}7$$

Legislación

Los vinos tranquilos y espumosos se pueden clasificar según su concentración de azúcar, como se indica en las Tablas 9.1 y 9.2.

Bibliografía

- **Diario Oficial de las Comunidades Europeas.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 52-57 (1990).
- **García J.**
  Técnicas analíticas para vinos. 5.10-5.11 (1990).
- **Office International de la Vigne et du Vin (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 91-96 (1990).
- **Rebelein.**
  Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 2, 112-121 (1973).
- **Tusseau D. y M. Valade.**
  Estimer la teneur en sucres des vins. Le Vigneron Champenois. 54-63 (1998).

10. Dióxido de Azufre

Introducción

El ***dióxido de azufre*** es el principal *conservador* de vinos y mostos, debido a sus *propiedades antisépticas* sobre levaduras y bacterias. También tiene a*ctividad antioxidante* y *mejora de las características organolépticas* del vino.

El dióxido de azufre presente en el vino procede de la práctica enológica llamada "*sulfitado*" y está en parte como *gas* (SO_2), *bisulfito* (HSO_3^-) y *sulfito* (SO_3^{2-}) constituyendo el llamado ***dióxido de azufre libre*** y en parte *combinado* con el aldehído acético, azúcares, taninos, colorantes, etc., y constituye el ***dióxido de azufre combinado***. Esta distinción es importante para efectos prácticos ya que el dióxido de azufre con ***acción antiséptica es el libre***, mientras que el combinado constituye la reserva necesaria para la fracción libre. Es decir las dos formas están en equilibrio, sobre el que influye el pH y la temperatura. A menor pH y mayor temperatura mayor proporción de dióxido de azufre libre.

$$SO_2\ (gas) \rightleftharpoons SO_2\ (dis.)$$

$$SO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2SO_3$$

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons \mathbf{HSO_3^-} + H^+$$

La suma del dióxido de azufre libre y del combinado nos da el ***dióxido de azufre total***.

10.1 Método PAUL (método de referencia)

Fundamento

El ***dióxido de azufre*** de un vino o mosto se libera, después de acidular, por arrastre con una corriente de aire y se oxida a ácido sulfúrico haciéndolo borbotear a través de una solución diluida y neutra de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada). El ácido sulfúrico formado se determina con una solución estandarizada de hidróxido de sodio.

La liberación en frío (20 ºC) asegura la extracción del dióxido de azufre libre y en caliente (100 ºC) la del dióxido de azufre combinado.

Material y reactivos

- Compresor de aire, capaz de suministrar un flujo de ≈1 L/min.
- Dosificador del ácido fosfórico de 10 mL.
- Manta calefactora.
- Matraz de fondo redondo de 100 mL.
- Refrigerante.
- Borboteador con un aforo de 10 mL y tubo de conducción de los gases terminado en una placa de vidrio fritado para garantizar la formación de un gran número de pequeñas burbujas, facilitando el contacto de las fases gaseosa y líquida (Fig. 10.1).
- Pipetas de 10 y 30 mL.
- Bureta de 25 mL.

- Ácido orto-Fosfórico 85% PA-ACS-ISO, *Código 131032*.
- Hidrógeno Peróxido 0,9% p/v (3 vol) VINIKIT, *Código 624904*.
- Indicador Mixto I (Indicador de Tashiro) VINIKIT, *Código 624905*.
- Sodio Hidróxido 0,01 mol/L (0,01N) VINIKIT, *Código 621845*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

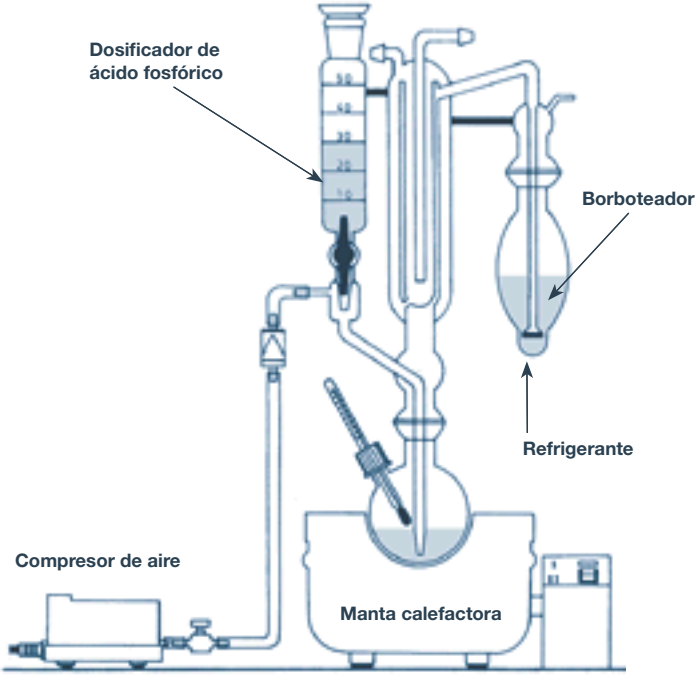


Figura 10.1.
Equipo de arrastre para la liberación, fijación y oxidación del dióxido de azufre.

Procedimiento

a) Dióxido de azufre libre

Se colocan en el borboteador ***10 mL*** de la solución de ***peróxido de hidrógeno***, ***3 gotas del indicador*** y se neutraliza con la ***solución de hidróxido de sodio 0,01M*** hasta color ***verde oliva***.

En el matraz de 100 mL de fondo redondo se introducen ***30 mL de vino***, se conecta con el sistema de arrastre y desde el dosificador de ***ácido fosfórico*** se introducen ***10 mL***. Se hace borbotear el ***aire*** mediante el compresor durante ≃***20 min***. El ácido sulfúrico formado por oxidación del dióxido de azufre se valora con la ***solución de hidróxido de sodio 0,01M*** hasta color ***verde oliva***. Sea ***v*** el volumen gastado.

b) Dióxido de azufre combinado

Se vuelve a conectar el borboteador y el matraz que contiene el vino se lleva a ebullición usando la manta calefactora y se mantiene ésta mientras se hace pasar la corriente de aire durante ≃***20 min.*** más.

El ácido sulfúrico formado se valora con ***la solución de hidróxido de sodio 0,01M*** hasta color ***verde oliva***. Sea v' el volumen gastado.

Si sólo interesa el *dióxido de azufre total* desde un principio la determinación se realiza en caliente.

Cálculo

El dióxido de azufre se expresa ***sin decimales*** en ***mg/L***.

$$SO_2 \text{ libre, mg/L} = \frac{v \times 0{,}01 \times 32 \times 1.000}{30} = 10{,}7 \times v$$

$$SO_2 \text{ combinado, mg/L} = \frac{v' \times 0{,}01 \times 32 \times 1.000}{30} = 10{,}7 \times v'$$

$$SO_2 \text{ total, mg/L} = \frac{(v + v') \times 0{,}01 \times 32 \times 1.000}{30} = 10{,}7 \times (v + v')$$

v = mL hidróxido de sodio 0,01M consumido en la valoración del SO_2 libre
v' = mL hidróxido de sodio 0,01M consumido en la valoración del SO_2 combinado

10.2 MÉTODO RIPPER (MÉTODO USUAL)

Fundamento

La determinación del dióxido del azufre se basa en una valoración de oxido-reducción con I_2 como reactivo valorante en medio ácido y en presencia de almidón como indicador.

Las reacciones que se producen son:

$$\mathbf{SO_2} + H_2O \rightleftharpoons SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^-$$
$$\mathbf{I_2} + 2e^- \rightleftharpoons 2I^-$$

$$\mathbf{SO_2} + H_2O + \mathbf{I_2} \rightleftharpoons SO_4^{2-} + 2H^+ + 2I^-$$

Material y reactivos

- Matraz erlenmeyer de 250 mL.
- Pipetas de 5, 10, 20 y 50 mL.
- Bureta de 25 mL.
- Propanal PS, *Código 15A856*.
- Solución de propanal de 10 g/L.
- Potasio Hidróxido 1mol/L (1*N*), *Código 621517*.
- Ácido sulfúrico ⅓ p/v VINIKIT, *Código 621062*.
- Almidón solución 2% VINIKIT, *Código 624567*.
- Yodo 0,01 mol/L (0,02*N*), *Código 621969*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Procedimiento

a) Dióxido de azufre libre

En un matraz se introducen ***50 mL de vino***, con una pipeta seca o lavada con el propio vino, ***5 mL de ácido sulfúrico*** y ***1 mL de solución de almidón*** . Se valora con la solución de yodo 0,01*M* hasta coloración azul que persista durante 15 s.

En el caso de vinos tintos es necesario diluir la muestra con agua destilada y un Erlenmeyer grande para observar mejor el viraje del indicador.

Sea v el volumen de yodo consumidos en la valoración (mL). En el caso de mostos sulfitados o de vinos con una gran cantidad de SO_2 (>300 mg/L) se recomienda diluir la muestra.

b) Dióxido de azufre total

En un erlenmeyer se introducen ***10 mL de hidróxido de potasio 1M*** y ***20 mL de vino*** introduciendo la punta de la pipeta dentro del hidróxido de potasio para evitar la perdida de SO_2 gas, se tapa, se agita y ***se deja en reposo durante 15 min*** para realizar la hidrólisis alcalina de los complejos entre el SO_2 y algunos componentes del vino como el acetaldehído.

Pasado este tiempo, se añaden ***5 mL de ácido sulfúrico***, ***1 mL de la solución de almidón*** y se valora rápidamente con la solución de yodo hasta la aparición de la coloración azul persistente (15 s).

Sea v' el volumen de yodo gastado.

Cálculo

$$SO_2 \text{ libre, mg/L} = \frac{(v - v'') \times 0{,}02 \times 32 \times 1.000}{50} = (v - v'') \times 12{,}8$$

$$SO_2 \text{ total, mg/L} = (v'/20 - v''/50) \times 0{,}02 \times 32 \times 1.000 = [v' - (0{,}4 \times v'')] \times 32$$

$$\text{Ácido ascórbico, mg/L} = \frac{v'' \times 0{,}02 \times 88 \times 1.000}{50} = v'' \times 35{,}2$$

v = mL de yodo 0,01*M* consumidos en la valoración de SO_2 libre

v' = mL de yodo 0,01*M* consumidos en la valoración de SO_2 total

v'' = mL de yodo 0,01*M* consumidos en la valoración de ácido ascórbico

Observaciones:

En el caso de vino con niveles altos de ácido ascórbico (vitamina C) se ha de determinar también el ácido ascórbico porque su presencia puede inducir a error en la cuantificación del SO_2 ya que se trata de una substancia reductora, que al igual que el SO_2 consume yodo en la valoración.

En un erlenmeyer se introducen 50 mL de vino y 5 mL de la solución de propanal. Se tapa, se homogeneiza y se deja en reposo durante 30 min.

Transcurrido este tiempo, se añade 5 mL de ácido sulfúrico, 1 mL de solución de la solución de almidón y 30 mg de EDTA Na_2. Se valora con yodo hasta la aparición de la coloración azul persistente (15 s). Sea v'' el volumen de yodo consumido.

Legislación

El límite máximo permitido de ácido ascórbico por la legislación es de 150 mg/L de vino. Los límites máximos de dióxido de azufre total permitidos se encuentran consignados en la Tabla 10.1.

Es recomendable que el vino siempre contenga un remanente de dióxido de azufre libre (10-15 mg/L), porque es su forma activa.

Tabla 10.1. Límites máximos de dióxido de azufre total permitidos por la legislación.

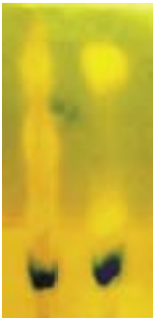
Tipo de muestra			SO_2 total mg/l
vino blanco y rosado[1]	≤5 g/L azúcares reductores		≤210
	>5 g/L azúcares reductores		≤260
vino tinto[1]	≤5 g/L azúcares reductores		≤160
	>5 g/L azúcares reductores		≤210
vino base para espumoso[2]			140
vino espumoso[2]			160
vino ecológico	tinto		70
	blanco y rosado	seco	80
		dulce y abocado	100
		generoso y licoroso	80
		espumoso	50
refresco de vino (wine coolers)[3]			80
sangría			300
vinagre[3]			170
sidra			320
zumo de uva[4]			10
vino gasificado			200
biter-soda			150
vino aromatizado			200

[1]Reglamento CE 1493/99 de 17.05.99
[2]Orden 28079 BOE núm 278 del 20.11.91
[3]Orden 33109 BOE núm 304 del 20.12.86
[4]Orden 29127 BOE núm 293 del 8.12.93
[5]Real Decreto 20232 BOE núm 207 del 29.08.87

Bibliografía

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 123-130 (1990).
- **GARCÍA J.**
  Técnicas analíticas para vinos. 3.5-3.10 (1990).
- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 271-278 (1990).
- **PAUL F.**
  Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein, A, 8, 21 (1958).
- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 197-207 (1993).
- **RIPPER M. J.**
  Prakt. Chem. 46, 428 (1892).

11. Seguimiento de la Fermentación Maloláctica (FML)



Cromatograma.

Introducción

El ***ácido málico*** es uno de los ácidos predominantes en la uva y su concentración se ve afectada por la variedad, tipo de suelo, características climáticas y prácticas culturales de la vid. Por ejemplo, los niveles de ácido málico son más elevados en mostos procedentes de zonas frías.

Durante la fermentación maloláctica (FML), el ácido málico es metabolizado a ***ácido láctico*** de ahí el interés de su determinación.

Determinación cualitativa por Cromatografía en capa fina (TLC)

Se realiza una *cromatografía de reparto*. Como eluyente (fase móvil) se usa una solución hidroalcohólica y como fase estacionaria la celulosa.

Es una determinación relativamente rápida y de fácil ejecución que permite *comprobar si el vino ha sufrido o no la FML*.

Fundamento

Separación de los ácidos sobre cromatoplaca de *celulosa*, *visualización* mediante azul de bromofenol –indicador de pH introducido en el eluyente– e *identificación* mediante el R_f.

Material y reactivos

• Kit Malo-Láctico VINIKIT, *Código 625079*:
- Microplacas.
- Soporte guía.
- Cucharilla.
- Cámara de desarrollo.
- Micropipeta.
- Auxiliar para micropipeta.
- Resina.
- Solución patrón.
- Tubo vacío con tapón de rosca.
- Pipeta Pasteur.
- Eluyente para kit Malo-Láctico VINIKIT, *Código 625108*.

Procedimiento

Primero, se satura la ***cámara de desarrollo***, con el ***eluyente (8 mL) durante 30 min***. Segundo, ***1 mL de muestra*** o ***solución patrón*** se introduce en un tubo con rosca de 10 mL y se añade una ***punta de espátula de resina*** con objeto de liberar los ácidos. Se ***agita durante 10 s***, se vuelve a ***añadir otra punta de espátula de resina*** y ***se agita otros 10 s***. El recipiente que contiene la resina se ha de mantener cerrado para evitar que se seque.

Con ayuda del soporte guía –haciendo coincidir la concavidad con el borde inferior de la microplaca– y de un capilar con micropipeteador se aplica ***1µL de muestra*** o ***de una solución patrón*** en la parte inferior de la cromatoplaca (línea de base) lo más puntualmente posible y se dejan secar para evitar fenómenos de difusión (Fig. 11.1). Se marcan con un lápiz el patrón y las muestras en la parte superior de la cromatoplaca.

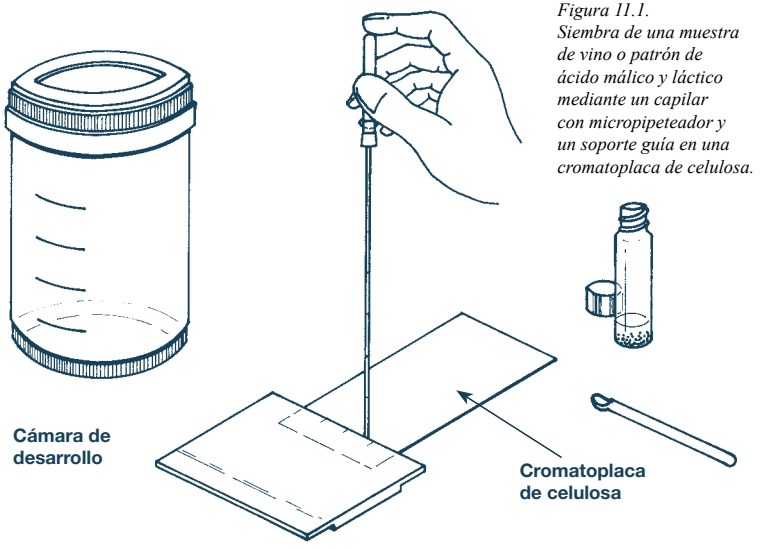


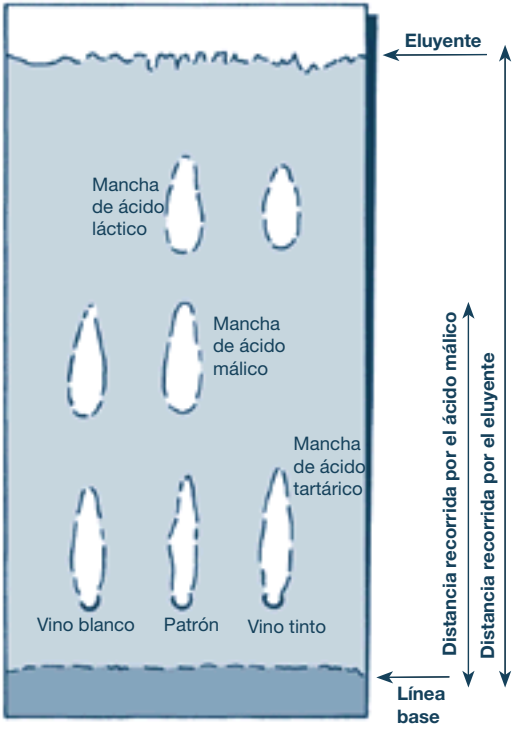
Figura 11.1. Siembra de una muestra de vino o patrón de ácido málico y láctico mediante un capilar con micropipeteador y un soporte guía en una cromatoplaca de celulosa.

Se introduce la cromatoplaca en la cámara de desarrollo de modo que la parte inferior se sumerja en el eluyente pero sin llegar a mojar la línea de base, con lo que este por capilaridad asciende hacia la parte superior de la cromatoplaca. Los compuestos aportados por la FML se separan según su diferente afinidad por la fase estacionaria. Cuando el eluyente alcanza unos ***7 cm (≅20 min)***, s***e extrae la placa de la cámara*** y aún húmeda se marca con un lápiz la línea alcanzada por el eluyente. Se dejan secar y se procede a la identificación de las manchas, que aparecen amarillas sobre fondo azul.

Cálculo

La identificación de las manchas correspondientes a los ácidos se efectúa por la comparación del desplazamiento de los patrones con las de los vinos. Los componentes quedan separados a lo largo de la cromatoplaca a una distancia característica o R_f que se puede definir como la relación entre la distancia recorrida por la substancia y la distancia recorrida por el frente del eluyente medida a partir del punto de aplicación de la muestra (Fig. 11.2).

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la substancia}}{\text{distancia recorrida por el eluyente}}$$



El R_f del ácido málico y del láctico es aproximadamente del orden de 0,5 y 0,8. Este factor se ha de comprobar periódicamente en cada laboratorio.

También se puede tener una orientación sobre las concentraciones de ácido málico y láctico por comparación del tamaño e intensidad de las manchas de las muestras con las de los patrones.

La disminución, seguida de la desaparición de la mancha amarilla correspondiente al ácido málico y aparición de la del ácido láctico confirma el inicio y finalización de la FML.

Figura 11.2.
Cromatoplaca de celulosa, en la cual se analiza la posible FML de un vino blanco y otro tinto por comparación del desplazamiento del ácido málico y láctico de un patrón por cromatografía en capa fina (TLC).

Bibliografía

Amerine M.A. y C.S. Ough.
Análisis de vinos y mostos. 37-38 (1976).

García J.
Técnicas analíticas para vinos. 2.56-2.59 (1990).

Kunkee R.E.
Wines Vines 49 (3), 23-24 (1968).

Tanner H., M. Sandoz, y Z. Schweiz.
Obst.-Weinbau 108, 210-217 (1972).

Usseglio-Tomasset L.
Chimie oenologique, 160-161 (1978). Figura 1. Transformación del ácido málico en ácido láctico en la FML.

12. POLIFENOLES TOTALES

Introducción

Los ***polifenoles*** están formados por una o más moléculas de *fenol* y contribuyen de forma notable en las características organolépticas del vino (color, astringencia, etc.). Los vinos blancos contienen menos polifenoles que los tintos, porque en su proceso de elaboración no se incluye la *maceración* del mosto con la piel y partes sólidas de la uva, principal origen de los polifenoles. Los principales métodos de medida de los polifenoles son el ***índice de Folin-Ciocalteu (IFC)*** y ***el índice de polifenoles totales (IPT)***.

12.1 ÍNDICE DE FOLIN-CIOCALTEU (IFC)

Fundamento

El conjunto de los compuestos polifenólicos del vino se oxida por el reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolíbdico), dando una coloración azul directamente proporcional al contenido de polifenoles y medible a 750 nm.

Material y reactivos

- Espectrofotómetro UV-VIS que permita realizar lecturas a 750 nm de longitud de onda.
- Cubeta de vidrio de 10 mm de recorrido óptico.
- Pipetas de 1, 5, 20 y 50 mL.
- Matraz aforado de 100 mL.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu VINIKIT, *Código 621567*.
- Sodio Carbonato anhidro PA-ACS-ISO, *Código 131648*.
- Solución al 20% (p/v) de carbonato de sodio.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Procedimiento

a) Vino blanco

En un matraz aforado de 100 mL, se introducen respetando el orden, ***1 mL*** de ***vino***, ***50 mL*** de **a*gua destilada***, ***5 mL*** de ***reactivo de Folin-Ciocalteu***, ***20 mL*** de la ***solución de carbonato de sodio*** y se enrasa a 100 mL con agua destilada.

Se agita el matraz para ***homogeneizar***, se espera ***30 min*** para ***estabilizar*** la reacción y se mide la ***absorbancia*** a ***750 nm*** (A_{750}) con una cubeta de 1 cm frente a un blanco preparado con agua destilada.

b) Vino tinto

Se debe trabajar igual que en el caso del vino blanco, pero ***diluyendo*** la muestra ***5 veces*** con agua destilada.

Observaciones

La muestra de mosto concentrado rectificado se ha de estandarizar previamente a 25±0,5 ºBrix por dilución con agua destilada.

Cálculo

a) Vino blanco

Índice de Folin-Ciocalteu = $A_{750} \times 20$

b) Vino tinto

Índice de Folin-Ciocalteu = $A_{750} \times 100$

12.2 Índice de polifenoles totales (IPT)

Fundamento

Es un índice que se obtiene por la medida de la absorbancia del vino a ***280 nm*** (UV), porque el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda.

Material y reactivos

- Espectrofotómetro UV-VIS que permita realizar lecturas a 280nm de longitud de onda.
- Cubetas de cuarzo de 0,1, 1 y 10 mm de recorrido óptico.
- Pipeta de 1 mL.
- Matraces aforados de 20 y 100 mL.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Procedimiento

El vino ***diluido 20 (vino blanco)*** o ***100 veces (vino tinto)*** con agua destilada se introduce en la ***cubeta de cuarzo*** y se realiza la lectura de la ***absorbancia a 280 nm*** (A_{280}), utilizando como blanco agua destilada.

Observaciones

Para una mejora en la precisión de las medidas de las absorbancias es aconsejable no diluir las muestras de vino y sí utilizar las cubetas de 0,1 y 1 mm de trayecto óptico para vinos tintos y de 10 mm para vinos blancos. El resultado se expresa en Unidades de Absorbancia (UA) referidas a 10 mm de trayecto óptico.

Cálculo

a) Vino blanco

IPT = A280 × 20

b) Vino tinto

IPT = A280 × 100

Los valores más habituales del IPT son 4-10 para vino blanco, 20-25 para rosados, 35-60 para tintos y 50-100 para crianza y reserva.

Bibliografía

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 178-179 (1990).
- **GARCÍA J.**
  Técnicas analíticas para vinos. 8.8-8.9 (1990).
- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 155-158 (1990).
- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 148-151 y 387-388 (1993).
- **M. RUIZ.**
  Crianza y envejecimiento del vino tinto. 40-42 (1994).

13. Características Cromáticas

Introducción

Aunque con rigor científico se consideran características cromáticas de un vino o mosto a la claridad: L*, el verde/rojo: a*, el azul/amarillo: b*, la cromaticidad: C* y el tono: H* (Comisión Internacional del Alumbrado, CIELab); convencionalmente y por razones de simplicidad en este manual las características cromáticas serán definidas por la ***intensidad colorante (I)*** –índice de color o puntos de color– y ***la tonalidad (N)***. En muchos casos la Intensidad colorante de un vino es considerada como un incentivo en las transacciones comerciales.

Estas medidas de control rutinario se realizan a tres longitudes de onda 420, 520 y 620 nm. La lectura a 420 nm está relacionada con el color amarillo y el pardeamiento de los vino blancos, en cambio las de 520 (rojo) y 620 (azul-violeta) con el color de los vinos tintos.

Determinación por espectrofotometría

Fundamento

La ***intensidad colorante (I)*** viene dada por la suma de las absorbancias medidas en cubetas de 10 mm o 1 mm de trayecto óptico a las longitudes de onda de ***420, 520*** y ***620 nm***.

La ***tonalidad (N)*** se expresa por la ***relación*** entre la absorbancia a ***420 nm*** y la absorbancia a ***520 nm***.

Material y reactivos

- Espectrofotómetro VIS que permita medir la absorbancia a las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm.
- Cubetas de vidrio o plástico de 1 y 10 mm de recorrido óptico, disponibles en parejas.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Procedimiento

Si el vino o el mosto presentan una turbidez, deben ser clarificados por centrifugación (≃3500 rpm) o por filtración a través de una membrana de 0,45 µm de tamaño del poro.

Si el vino o el mosto contienen cantidades importantes de dióxido de carbono (vino joven y espumoso), se ha de eliminar mediante agitación al vacío o por ultrasonidos.

El ***trayecto óptico de la cubeta*** a utilizar se ha de elegir de forma que la absorbancia medida esté comprendida en el ***intervalo óptimo de 0,3-0,7 UA***. A título indicativo, es aconsejable utilizar ***cubetas de 10 mm*** de trayecto óptico para ***vinos y mostos blancos y rosados***, y ***cubetas de 1 mm*** para ***vinos tintos***. ***En ningún caso se podrá diluir*** la muestra con agua destilada para conseguir que la lectura espectrofotométrica se encuentre en el intervalo óptimo.

Como ***líquido de referencia*** se usa ***agua destilada***.

Cálculo

Los valores obtenidos para cada absorbancia (A_{420}, A_{520} y A_{620}), se expresan en ***UA*** y con ***3 cifras decimales***. Si la lectura se realiza en una ***cubeta*** de ***1 mm*** de trayecto óptico el valor se ha ***multiplicar*** por ***10***.

Convencionalmente, el concepto de ***intensidad colorante (I)*** y ***tonalidad (N)*** vienen definidos por las fórmulas siguientes:

$$I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$N = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

Bibliografía

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 3-14 (1990).
- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 41-58 (1990).
- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 39-56 (1993).

14. Calcio

Introducción

En enología, el conocer la concentración de ***calcio*** es de sumo interés, porque un exceso de este catión puede generar en la botella un precipitado cristalino de ***tartrato de calcio***. El Ca en el vino procede del suelo, tratamientos enológicos, conservación en tanques de hormigón, etc. La precipitación del tartrato de calcio se encuentra afectada por factores como el pH, la temperatura y el grado alcohólico.

Determinación

Fundamento del método

La determinación se basa en la valoración complexométrica con la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (Na_2 EDTA) usando calceína como indicador.

Material y reactivos

- Espátula.
- Pipeta de 20 mL.
- Matraz aforado de 100 mL.
- Erlenmeyer de 250 mL.
- Bureta de 10 mL.
- Papel de filtro.
- Carbón activo PA, *Código 121237*.
- Sodio Hidróxido 1 mol/L (1N) SV, *Código 181691*.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Ácido Etilendiaminotetraacético sal Disódica 0,01 mol/L (0,01M) SV, *Código 181671*.
- Calcio Indicador, tabletas VINIKIT, *Código 625516*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Procedimiento

A ***20 mL*** de ***vino*** se añade ***80 mL*** de ***agua destilada*** y ***1 g*** de ***carbón activo*** para decolorarlo. La suspensión se lleva a ***ebullición*** y se ***filtra*** en caliente por papel de

filtro. A ***50 mL*** del ***filtrado*** se añade ***10 mL*** de ***hidróxido de sodio 1M*** y 2 ***tabletas indicadoras***, tomando la solución una coloración ***verde fluorescente***. Se valora con ***Na_2 EDTA 0,01M*** hasta viraje a color ***violeta claro***.

También se ha de realizar un ensayo en blanco con agua destilada. Sea ***v*** los mL de Na_2 EDTA 0,01M consumidos en la valoración del vino y ***v'*** los del blanco.

Cálculo

El calcio se expresa en mg/L y sin decimales.

$$\text{Ca mg/L} = \frac{(v - v') \times 0{,}01 \times 40 \times 100 \times 1000}{50 \times 20} = (v - v') \times 40$$

Pm Ca= 40 g/mol

Los niveles de Ca más habituales en vino se encuentran entre 70 y 100 mg/L.

Bibliografía

- **BURRIEL F., F. ARRIBAS Y J. HERNÁNDEZ.**
  Química analítica cuantitativa. (1985).
- **BLOUIN J.**
  Tecniques d'analyses des môuts et des vins. 131-134 (1992).
- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 140-141 (1990).
- **GARCÍA J.**
  Técnicas analíticas para vinos. 12.20-12.23 (1990).
- **PEYNAUD, E.**
  Enología Práctica. 339-345 (1983).

15. HIERRO

Introducción

Aunque en la elaboración moderna los niveles de hierro son reducidos, el enólogo debe tener en consideración que niveles superiores a 8-10 mg/L pueden causar enturbiamientos debido a precipitaciones férricas (***casse blanca***), o cambios de color ya que interviene en los fenómenos de oxidación de los vinos.

MÉTODO DE FERRE MICHEL

Fundamento

El método analítico se basa en la determinación colorimétrica, previa oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} mediante el peróxido de hidrógeno en medio ácido, con tiocianato de potasio formándose complejos de tiocianato de hierro [$Fe(SCN)_6^{3-}$ o $Fe(SCN)^{2+}$] de color rojizo. La determinación es directa en el caso de vino blanco, o por extracción del color con eter tert-butil metílico, en el caso de vino tinto.

Material y reactivos

- Espectrofotómetro VIS, que permita medir la absorbancia a las longitudes de onda 480 o 580 nm.
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL.
- Tubos de ensayo con tapón de rosca.
- Cuentagotas de 25 gotas/mL.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Hidrógeno Peróxido 10% p/v (33 vol) VINIKIT, *Código 625513*.
- Solución patrón de Fe 125 mg/L VINIKIT, *Código 625515*.
- Ácido Clorhídrico-Agua solución 50:50 VINIKIT, *Código 624574*.
- Potasio Tiocianato solución 20% p/v VINIKIT, *Código 625514*.
- Eter ter-Butil Metílico PA, *Código 123312*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, *Código 345271*.
- Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, *Código 345268*.

Procedimiento

a) Vino blanco

En dos tubos de ensayo se añaden ***1 mL*** de ***ácido clorhídrico*** y ***1 mL*** de ***tiocianato de potasio***. En el primer tubo se añade ***5 mL*** de ***vino*** y en el segundo ***5 mL*** de ***agua destilada*** y ***4 gotas*** de ***peróxido de hidrógeno*** en cada tubo. Se agitan ambos tubos y el tubo que contiene el vino quedará más o menos coloreado.

Sobre el tubo de ensayo que contiene el agua se irá añadiendo gota a gota la solución patrón de Fe, agitando después de cada adición hasta que la coloración del tubo sea lo más parecido al del vino.

Sea ***n*** el número de gotas gastadas para equilibrar el color de ambos tubos de ensayo.

b) Vino tinto

En el caso de vino tinto se procede de forma similar a la del vino blanco pero extrayendo el color con ***10 mL*** de ***éter ter-butil metílico***. En el tubo con agua destilada también se añaden ***10 mL*** de ***éter ter-butil metílico*** que cada vez que se añade una ***gota*** de la ***solución patrón de hierro*** es necesario agitar y dejar reposar para que se separe la capa orgánica coloreada (capa superior) y poder así comparar el color entre los dos tubos.

Una posible variante de este método sería la de medir el color de la reacción con un espectrofotómetro a ***480*** o ***508*** nm y compararlo con una curva patrón.

Es muy importante que los tubos de ensayo estén bien lavados porque pequeñas trazas de hierro pueden dar interferencias en la determinación, por la gran sensibilidad del método.

Cálculo

La concentración de hierro, expresada en mg/L, será:

$$\text{Fe, mg/L} = \frac{n \times 125 \times 1 \times 1000}{25 \times 1000 \times 5} = n$$

n = número de gotas de la solución patrón de hierro

1 gota = 1 mg/L de Fe

Bibliografía

- **AMERINE M.A. Y C.S. OUGH.**
  Análisis de vinos y mostos. 129-130 (1976).
- **DIARIO OFICIAL DE LA COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 142-144 (1990).
- **GARCÍA J.**
  Técnicas analíticas para vinos. 12.27-12.30 (1990).
- **PANREAC.**
  Productos derivados de la uva, aguardientes y sidras. 47-48 (1996).

16. Sobrepresión de Dióxido de Carbono

Introducción

El ***dióxido de carbono*** es el gas más frecuente en enología. Se produce en gran proporción en la ***fermentación alcohólica***, ***fermentación maloláctica*** y sobre todo en la ***2ª fermentación*** del vino base (***tiraje***) para espumoso y de aguja.

Determinación

Fundamento

La medida de la sobrepresión de dióxido de carbono en vino espumoso y de aguja se realiza directamente en la botella utilizando un afrómetro (método manométrico).

Material y reactivos

- Afrómetro (aguja perforadora y manómetro) graduado en kilopascal (kPa) o bar que según el tapón de la botella (corona, corcho, etc.) se utiliza un modelo u otro (Fig. 16.1).
- Termómetro contrastado de 0-35 ºC, con apreciación 0,5 ºC.

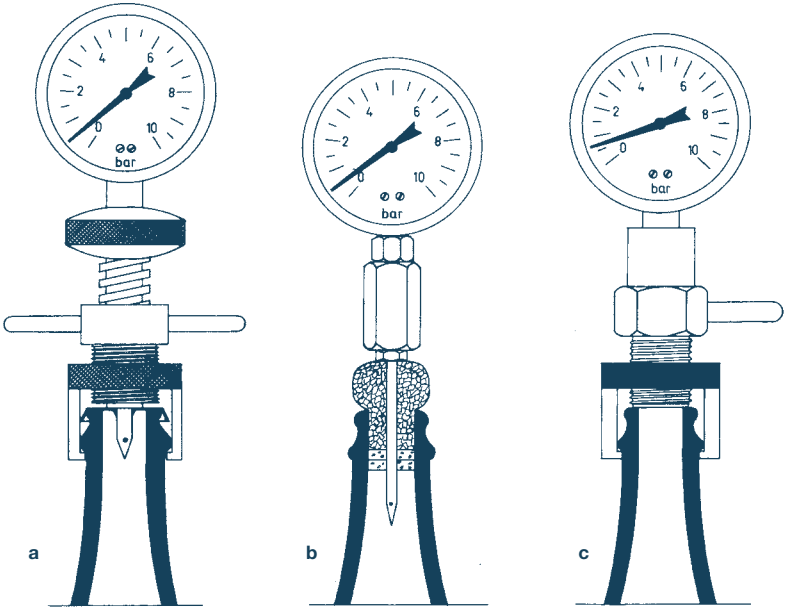


Figura 16.1.
Diferentes tipos de afrómetros según el tipo de tapón a perforar: sobre corona y obturador (a), sobre tapón de corcho y plaqueta con morrión (b) y directamente sobre botella (c)

Procedimiento

La medida debe efectuarse en botellas cuya temperatura esté estabilizada 24 h antes a unos 20 ºC.

Tras haber perforado el tapón, procurando evitar cualquier pérdida de gas, la botella debe agitarse vigorosamente hasta obtener una presión constante para efectuar la lectura.

Cálculo

La sobrepresión a 20 ºC ($Paph_{20}$) se expresa en kPa o bar con un decimal.

Cuando la temperatura de medida difiera de 20 ºC, se ha de corregir la sobrepresión medida ($Paph_t$) por el factor de corrección (c) de la Tabla 16.1 según la fórmula siguiente:

$$Paph_{20} = Paph_t \times c$$

Temperatura ºC	c
15	1,16
16	1,13
17	1,09
18	1,06
19	1,03
20	1,00
21	0,97
22	0,95
23	0,93
24	0,91
25	0,88

Tabla 16.1.
Factores de corrección (c) de la sobrepresión de dióxido de carbono según la temperatira de lectura.

La concentración de dióxido de carbono (CO_2) en vino espumoso y de aguja se puede calcular por la siguiente relación:

$$CO_2\ g/L = 1{,}951 \times (Paph_{20} + 1) \times (0{,}86 - 0{,}01 \times GAV) \times (1 - 0{,}00144 \times A)$$

GAV = grado alcohólico volumétrico, % vol
A = azúcar total, g/L

Tipo de vino	Sobrepresión de dióxido de carbono bar
tranquilo	<0,5
de aguja	1–2,5
espumoso[1]	≥3,5

Tabla 16.2.
Límites legales de la sobrepresión de dióxido de carbono.

[1]*Ley 15/2002, de 27.06.02, de ordenación vitivinícola*

Legislación

En la Tabla 16.2 se muestran los límites legales de la sobrepresión de dióxido de carbono.

Bibliografía

- **DIARIO OFICIAL DE LA COMUNIDADES EUROPEAS.**
  Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 157-161 (1990).
- **OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV).**
  Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. 279-286 (1990).
- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.**
  Métodos Oficiales de Análisis de Vinos y Mostos. 2, 148-151 y 317-317 (1993).

17. Dióxido de Carbono

Introducción

Este método permite de forma sencilla la medida del ***dióxido de carbono (CO_2)*** en ***vinos tranquilos*** y de ***aguja***.

La formación de dióxido de carbono se debe a la oxidación biológica de los azúcares por las levaduras o a la descomposición bacteriana de otras fuentes de carbono.

Determinación mediante la probeta de Veitshöchheim

Fundamento

La medida del dióxido de carbono del vino se realiza mediante una Tabla de conversión (Tabla 17.1) a partir de la temperatura y del volumen de vino desplazado en la probeta de Veitshöchheim (Fig. 17.1).

Material y reactivos

- Probeta de Veitshöchheim.
- Tubo de desplazamiento incorporado en el tapón de la probeta y válvula de pinza en la parte superior del tubo.
- Termómetro contrastado de 0-35 ºC, con apreciación 0,5 ºC.

Procedimiento

La medida debe efectuarse en un vino cuya temperatura se haya estabilizado en nevera durante 24 h, a unos 4-10 ºC.

Abrir la botella sin agitar. ***Verter con sumo cuidado 100 mL de muestra*** por las paredes de la probeta inclinada para evitar el desprendimiento de dióxido de carbono. El tubo de desplazamiento puede utilizarse a modo de pipeta para facilitar el enrase.

Tras haber sacado el tapón de la botella, con sumo cuidado y sin agitar, se ***vierten 100 mL de muestra*** por las paredes de la probeta inclinada. Con objeto de evitar el desprendimiento momentáneo de dióxido

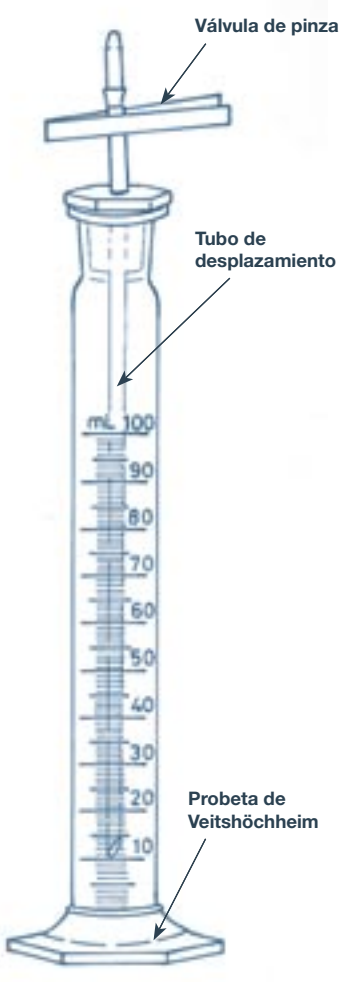


Figura 17.1.

Probeta de Veitchöchheim, tubo de desplazamiento, tapón y válvula de pinza.

de carbono. El tubo de expulsión se puede utilizar a modo de pipeta para facilitar el enrase.

Una vez enrasado se cierra el dispositivo con el tapón unido al tubo de desplazamiento y se procede a ***agitar alternativamente*** la probeta como se indica en la Fig. 17.2 para evitar la caída del tapón. ***Esperar el desprendimiento del gas*** y proceder a la **obertura de la válvula** de pinza para permitir salir el vino de la probeta desplazado por la presión del gas. Repetir el proceso hasta la ***eliminación total del dióxido de carbono***, que se observa por el cese de salida del vino por la punta del tubo de desplazamiento.

Es importante recordar que durante todo el proceso el tubo de desplazamiento ha de estar sumergido en el vino para evitar la perdida de dióxido de carbono.

Una vez finalizado el proceso se abre el dispositivo y se saca el tubo. Una vez eliminada la espuma generada se mide ***el volumen de vino*** y ***su temperatura.***

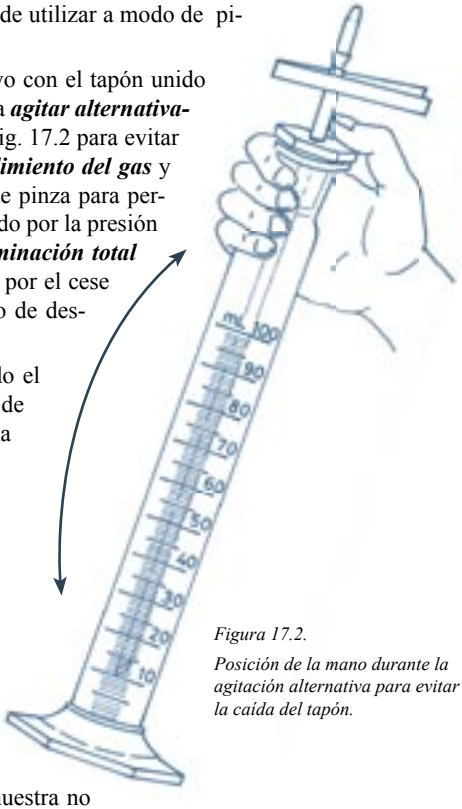


Figura 17.2.

Posición de la mano durante la agitación alternativa para evitar la caída del tapón.

Cálculo

La concentración inicial de dióxido de carbono en el vino se calcula interpolando el resultado del volumen de la muestra no desplazada y su temperatura como se indica en la Tabla 17.1.

Por ejemplo el contenido original de dióxido de carbónico de un vino que después del análisis tiene como valores 84 mL de vino no desplazado y una temperatura de 9 ºC sería de 1,1 g/L.

Legislación

En la Tabla 16.2 se muestran los límites legales de la sobrepresión de dióxido de carbono.

Bibliografía

• **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.**
Reglamento (CEE) Nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 157-161 (1990).

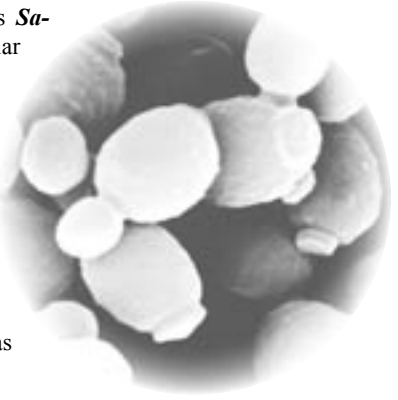
Volumen no desplazado	Temperatura										
mL	5 °C	6 °C	7 °C	8 °C	9 °C	10 °C	11 °C	12 °C	13 °C	14 °C	15 °C
98	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
97	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
96	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4
95	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
94	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5
93	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
92	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
91	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
90	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
89	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
88	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8
87	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
86	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9
85	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
84	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0
83	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
82	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1
81	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
80	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2
79	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2
78	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3
77	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3
76	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
75	1,7	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4
74	1,7	1,7	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4
73	1,7	1,7	1,7	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5
72	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5
71	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7	1,7	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
70	1,9	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7	1,7	1,7	1,6	1,6	1,6
69	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,6
68	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
67	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7	1,7
66	2,0	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,7
65	2,1	2,0	2,0	2,0	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8
64	2,1	2,1	2,0	2,0	2,0	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8
63	2,2	2,1	2,1	2,0	2,0	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8
62	2,2	2,1	2,1	2,1	2,0	2,0	2,0	1,9	1,9	1,9	1,9
61	2,2	2,2	2,1	2,1	2,1	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9	1,9
60	2,3	2,2	2,2	2,1	2,1	2,1	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9

Tabla 17.1.

Contenido de dióxido de carbono según el volumen de vino no desplazado y la temperatura.

18. RECUENTO DE LEVADURAS

Introducción



La levadura más frecuente en enología es ***Saccharomyces cerevisiae*** –hongo unicelular eucariota de 2-10 µm de tamaño– que suele ser el principal responsable de la ***fermentación alcohólica*** y de la ***generación de aromas secundarios*** en el vino.

El recuento de levaduras se realiza en el control de los vinos, pero de forma más generalizada en "***pie de cuba***" y en el "***tiraje***" para la elaboración de vino espumoso. Asimismo por medio de tinciones adecuadas se pueden identificar las levaduras viables.

RECUENTO

Fundamento

El recuento de levaduras totales y viables se realiza por microscopia mediante la tinción con ***azul de Evans*** y/o ***azul de metileno***.

Material y reactivos

- Microscopio de 600-900 aumentos.
- Cámara de recuento Thoma o Neubauer (Fig. 18.1, 18.2 y 18.3).
- Cubreobjetos.
- Pipeta semiautomática de volumen variable de 100 µL.
- Pipeta semiautomática de volumen variable de 1000 µL.
- Microtubo de 500 µL.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Etanol 96% v/v PA, *Código 121085*.
- Azul de Evans DC, *Código 255486*.
- Azul de Metileno Fenicado según Khüne DC, *Código 251172*.

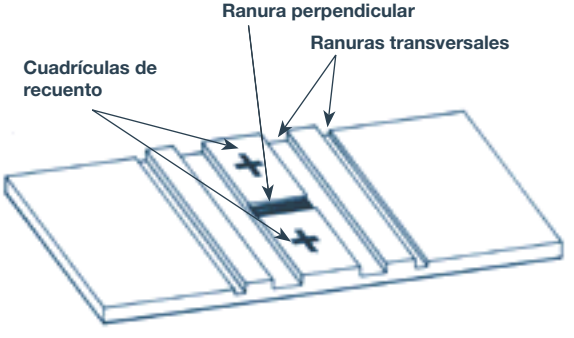


Figura 18.1.

Portaobjetos de las cámaras de recuento Thoma y Neubauer: portaobjetos de ≅5mm de grosor con 4 ranuras transversales y 1 perpendicular para recoger el líquido sobrante. En el segmento central rebajado 0,1mm, se encuentran grabadas las 2 cuadrículas de recuento con ligeras variaciones entre ellas.

Procedimiento

Todo el material de vidrio que se utilice ha de ser lavado con agua destilada y alcohol del 96%.

Se colocan ***400 µL de muestra*** homogeneizada en un microtubo y se añaden ***40 µL de azul de Evans o azul de metileno fenicado***. La muestra y el colorante se mezclan y se ***dejan en reposo*** a temperatura ambiente durante ***5 min***. Se ***deposita una gota en una de las 2 cuadrículas del portaobjetos*** procurando que quede llena la superficie y se tapa con el cubreobjetos evitando la presencia de burbujas de aire. La cámara de recuento se ha de fijar en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica.

El enfoque del microscopio se empieza con un objetivo de pocos aumentos que posteriormente pasaremos a uno de más. Se coloca el objetivo lo más cerca posible del cubreobjetos pero sin tocarlo y posteriormente se irá alejando hasta que la imagen sea lo más clara y nítida posible.

Sea cual fuese el modelo de cámara empleado, el procedimiento es el mismo, el recuento se realizará sobre 20 de los 400 (20 x 20) cuadrados pequeños de 0,0025 mm^2 (volumen total de 0,1 mm^3) elegidos al azar. Si el número de células/cuadrado es >10 es conveniente diluir la muestra.

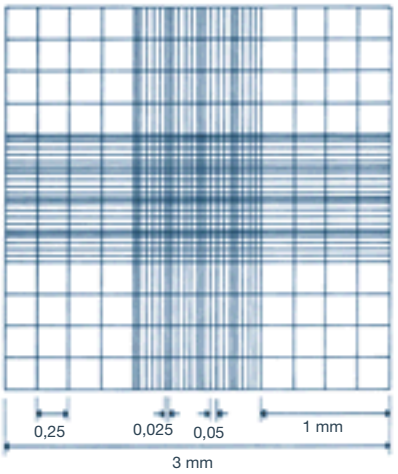


Figura 18.2.

Detalle del cuadriculado de la cámara de recuento de Thoma.

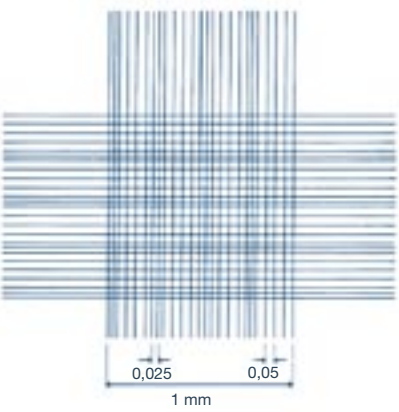


Figura 18.3.

Detalle del cuadriculado de la cámara de recuento de Thoma.

Por convenio para evitar contar dos veces la misma levadura, consideraremos que las levaduras que se encuentren en la intersección de una cuadrícula se apuntarán a la de abajo y a la de la izquierda, y las gemaciones se cuentan como ½ levadura.

Las levaduras vivas se pueden diferenciar de las muertas porque el azul de Evans colorea las células viables mientras que el azul de metileno sólo colorea las no viables. Sea n el número total de levaduras en las 20 cuadrículas.

Cálculo

$$\text{Recuento levaduras totales/mL} = \frac{n \times 20 \times 1000 \times f}{0{,}1} = n \times 200.000 \times f$$

f = factor de dilución

$$\%\ \text{levaduras viables} = \frac{\text{Recuento levaduras viables} \times 100}{\text{Recuento levaduras totales}}$$

Los valores de carácter orientativo del recuento de levaduras totales en un "***pie de cuba***" son de ≅80 millón/mL, con ≥70% de viables; y en el caso del "***tiraje***" 1-2 millón/mL con ≥60% de viables.

Bibliografía

- **DELFI C.**
  Scienza e tecnica di microbiologia enologica. 33-55 (1995).
- **MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. INSTITUTO NACIONAL DE SANIDAD.**
  Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. 16-17 (1982).

19. Grado Acético en Vinagre

Introducción

El ***grado acético*** (GA) es la totalidad de los ácidos volátiles y fijos que contiene el *vinagre*, expresado en gramos de ácido acético por 100 mL de vinagre (%).

El ácido más frecuente en el vinagre es el acético.

Determinación

Fundamento

Volumetría de neutralización en presencia de fenolftaleina como indicador del punto final de la valoración (pH = 8,2).

Material y reactivos

- Erlenmeyer de 250 mL.
- Pipeta de 10 mL.
- Bureta de 15 mL.
- Agua PA-ACS, *Código 131074*.
- Fenolftaleína solución 1% VINIKIT, *Código 621327*.
- Sodio hidróxido 1,666*M* SV, *Código184836*.

Procedimiento

10 mL de vinagre, previamente filtrado, se colocan en un erlenmeyer, se añade ***100 mL de agua destilada***, ***seis gotas de la solución de fenolftaleína*** y se valora lentamente con ***hidróxido de sodio 1,666M***, agitando constantemente hasta ***coloración rosa*** (pH 8,2 – 10).

Cálculo

El GA de vinagre se expresa en ***g de ácido acético en 100 mL*** (%) de vinagre y con ***1 cifra decimal***.

$$\text{Grado acético \%} = \frac{v \times 1{,}666 \times 60 \times 100}{10 \times 1000} = v$$

v = mL de hidróxido de sodio 1,666*M* consumidos en la valoración
Pm del ácido acético = 60 g/mol
1 mL ≡ 1%

Legislación

En la Tabla 19.1 se muestran los límites del grado acético.

Tipo de Vinagre	Grado Acético %
para el consumo humano[1]	≥6,0
para la industria	8,0-11,0

Tabla 19.1.

Límites legales del grado acético, expresado en % de ácido acético

[1]Orden 29127 BOE núm. 293 del 8.12.93

Bibliografía

- **INSTITUTO DE RACIONALIZACIÓN DEL TRABAJO. UNE 33-101-73 (I).** Métodos de ensayo del vinagre vínico. Determinación de los componentes fundamentales.
- **BOE NÚM. 293. 29127 REAL DECRETO 2070/1993, DE 26 DE NOVIEMBRE,** por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y comercialización de los vinagres.

REACTIVOS

Ácido acético glacial PA-ACS-ISO, Código 131008.
Ácido Clorhídrico 37% PA-ACS-ISO, Código 131020.
Ácido Clorhídrico-Agua solución 50:50 VINIKIT, Código 624574.
Ácido Etilendiaminotetraacético sal Disódica 0,01 mol/l (0,01M) SV, Código 181671.
Ácido Etilendiaminotetraacético sal Disódica 2-hidrato PA-ACS, Código 131669.
Ácido L(+)-Tartárico PA-ACS-ISO, Código 131066.
Ácido orto-Fosfórico 85% PA-ACS-ISO, Código 131032.
Ácido sulfúrico ⅓ p/v VINIKIT, Código 621062.
Ácido Sulfúrico solución 16% v/v VINIKIT, Código 624570.
Agua PA-ACS, Código 131074.
Alcohol 96% v/v PA, Código 121085.
Almidón solución 2% VINIKIT, Código 624567.
Amonio Cloruro PA-ACS-ISO, Código 131121
Amonio Metavanadato PA-ACS, Código 132352
Azul de Bromotimol solución 0,4% VINIKIT, Código 624566.
Azul de Evans DC, Código 255486.
Azul de Metileno Fenicado según Khüne DC, Código 251172.
Calcio Hidróxido 2 mol/L (suspensión) VINIKIT, Código 625409.
Calcio Indicador, tabletas VINIKIT, Código 625516.
Calcio Óxido natural, trozos QP, Código 211234.
Carbón activo PA, Código 121237.
Derquim LM 01 Alcalino, Líquido, Código 502600.
Eluyente para kit Malo-Láctico VINIKIT, Código 625108.
Etanol 96% v/v PA, Código 121085.
Eter ter-Butil Metílico PA, Código 123312.
Fenolftaleína solución 1% VINIKIT, Código 621327.
Hidrógeno Peróxido 0,9% p/v (3 vol) VINIKIT, Código 624904.
Hidrógeno Peróxido 10% p/v (30 vol), Código 625513.
Hidróxido de sodio 1M, Código 181691.
Indicador Mixto I (Indicador de Tashiro) VINIKIT, Código 624905.
Kit de REBELEIN VINIKIT, Código 624901
Kit Malo-Láctico VINIKIT, Código 625079
Patrón de Referencia para Enología (Vino Blanco) CRS, Código 345271.
Patrón de Referencia para Enología (Vino Tinto) CRS, Código 345268.
Piedra Pómez gránulos QP, Código 211835.
Potasio Cloruro 3 mol/L RV, Código 282775.
Potasio Cloruro PA-ACS-ISO, Código 131494.
Potasio Hidróxido 1mol/L (1N), Código 621517.
Potasio Hidróxido 85% lentejas PA, Código 121515.
Potasio Tiocianato solución 20% p/v VINIKIT, Código 625514.
Potasio Yoduro solución 30% p/v VINIKIT, Código 624572.
Propanal PS, Código 15A856.
Reactivo de Folin-Ciocalteu VINIKIT, Código 621567.
Sacarosa solución 14,9% p/p VINIKIT, Código 624867.
Sacarosa solución 19,4% p/p VINIKIT, Código 624868.
Sacarosa solución 23,8% p/p VINIKIT, Código 625241.

Sacarosa, pack de soluciones (14,9% p/p, 19,4% p/p, 23,8% p/p) VINIKIT, Código 625484.
Silicona líquida antiespumante QP, Código 211628.
Sodio Acetato anhidro PA-ACS, Código 131633
Sodio Carbonato anhidro PA-ACS-ISO, Código 131648.
Sodio Hidróxido 0,01 mol/L (0,01N) VINIKIT, Código 621845.
Sodio Hidróxido 0,02 mol/L (0,02N) SV VINIKIT, Código 623397.
Sodio Hidróxido 0,1332 mol/L (0,1332N) VINIKIT, Código 624835.
Sodio Hidróxido 1,666M SV, Código184836.
Sodio Hidróxido 1 mol/L (1N) SV, Código 181691.
Sodio Hidróxido lentejas PA-ACS-ISO, Código 131687.
Sodio Tiosulfato 0,0551 mol/L (0,0551N) VINIKIT, Código 624576.
Solución al 20% (p/v) de carbonato de sodio.
Solución Alcalina (potasio sodio tartrato) 0,886 mol/l VINIKIT, Código 624573.
Solución Cúprica 0,168 mol/L VINIKIT, Código 624582.
Solución Hidroalcohólica 8,5% v/v VINIKIT, Código 625337.
Solución Hidroalcohólica 11% v/v VINIKIT, Código 625338.
Solución Hidroalcohólica 13,5% v/v VINIKIT, Código 625339.
Solución Hidroalcohólica 16% v/v VINIKIT, Código 625434.
Solución Hidroalcohólica 20% v/v VINIKIT, Código 625435.
Solución patrón de Fe 125 mg/L VINIKIT, Código 625515.
Tampón solución pH 4,00 ± 0,02 (20ºC) ST, Código 272168.
Tampón solución pH 7,00 ± 0,02 (20ºC) ST, Código 272170.
Yodo 0,01 mol/L (0,02N), Código 621969.