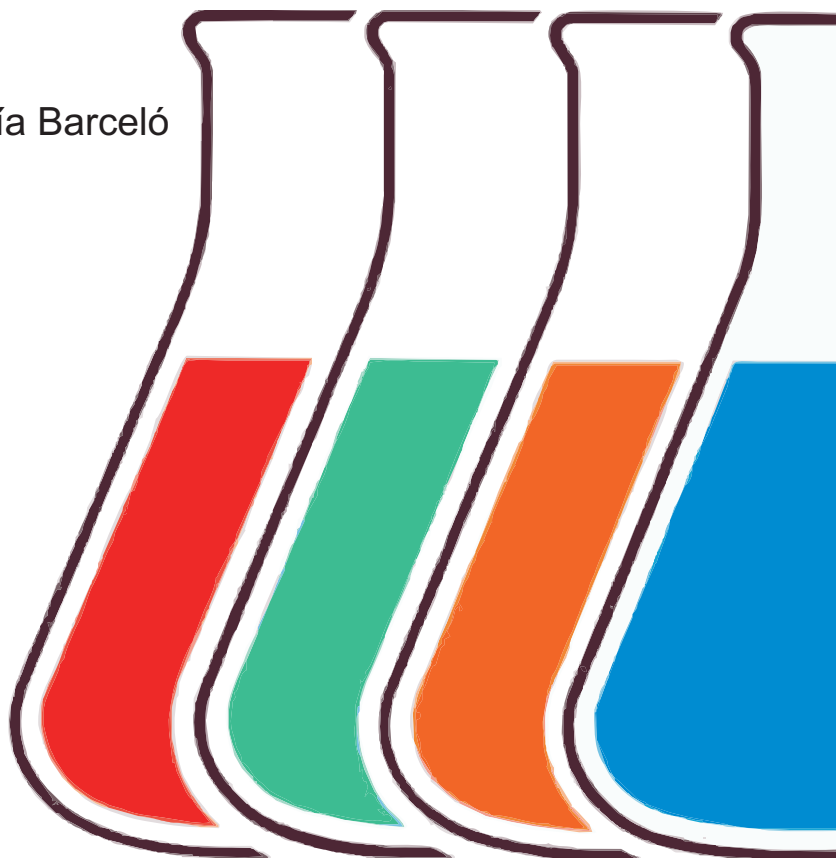


TECNICAS ANALITICAS PARA VINOS

Juan García Barceló



TECNICAS ANALITICAS PARA VINOS

TECNICAS ANALITICAS PARA VINOS

Juan García Barceló



Presentación

Todas las obras deben ser fruto de una experiencia, de un conocimiento y de una reflexión. En esta ocasión el lector tiene en sus manos un libro que reúne los tres requisitos apuntados. Además tiene como mérito que ha sido elaborado para servir a un profesional que hace de su quehacer diario un arte: el enólogo.

Con el interés, por consiguiente, que fuera útil en la bodega, este libro posee la ventaja de haber sido escrito por un enólogo que ha prestado servicio a un buen número de bodegas, que ha vivido vendimias y vinificaciones, y conocido la utilidad del control analítico sobre un producto en periodo de evolución.

Una obra como esta, no se escribe sin un buen bagaje de conocimientos. El autor que ha desarrollado sus conocimientos como técnico analista durante muchos años, en una Estación de Viticultura y Enología, concretamente en la de Vilafranca del Penedès, es claro ejemplo del servicio que estas instituciones, repartidas por todo el territorio español, ofrecen al sector vitivinícola.

En las Estaciones Enológicas la función de los técnicos, como el autor, no se circunscribe tan solo en realizar su trabajo de analista, debe también ejercer otras funciones: estar debidamente informado de las novedades analíticas, de los problemas que vive el sector y de sus posibles soluciones, transmitir la información a la institución, colaborar en los proyectos de investigación o experimentación y también, en la medida de lo posible, crear escuela.

Publicado por:
GAB
C/ Sant Jordi, 30 - Tel. (+34) 93 817 18 42 - Fax. (+34) 93 817 14 36
08734 MOJA-OLÈRDOLA (Barcelona)

1ª Edición - Octubre 1990
ISBN 84-404-7827-5
Depósito Legal B-36.850/90

Diseño:
NEXOS I. &S.

Fotocomposición y montaje:
Penedès Edicions, S.A. - Vilafranca del Penedès

Impreso por:
Romanyà/Valls, S.A. - Capellades

La personalidad del autor de este libro, le ha permitido cumplir con creces muchos de estos encargos tácitos, siendo además evidente su inquietud por ampliar conocimientos y transmitirlos, hecho que todos los que con él nos relacionamos podemos constatar.

Este minucioso trabajo es también consecuencia de la reflexión que conlleva el conocer, profundamente, a quién va dirigido. Es fácil localizar en la memoria del lector, tres obras de este autor que han formado parte de la biblioteca de numerosos laboratorios enológicos. Debe hacerse mención también que esta obra adquiere un nivel óptimo, en cuanto a metodologías actuales en análisis de control rutinario y de investigación. Es decir sirve al enólogo en su labor diaria y permite, a él y a otros estudiosos, penetrar en trabajos de control mucho más sofisticados y con técnicas más fiables.

Se recogen en esta obra, los métodos analíticos de la mayoría de compuestos que pueden formar parte de una caracterización enológica, tanto aquellos que se encuentran tras un proceso normal de vinificación como aquellos que son contaminantes, bien sean accidentales (estireno, residuos antocriptogámicos, etc.) o voluntarios (ácido salicílico, edulcorantes sintéticos, etc.).

No están contemplados todos los componentes del vino porque ello supondría entrar dentro del ámbito de la investigación, utilizando el análisis como finalidad más que como herramienta para el apoyo a la producción. Aunque la componente práctica de la obra resalta en cualquiera de sus páginas, hace despertar en las personas más receptivas, la inquietud hacia el mundo de la enología y les introduce en la complejidad de los productos vitivinícolas, cuyo máximo exponente es el vino, y siempre en constante evolución bioquímica.

Con relación a sus trabajos anteriores el autor en esta obra da entrada a métodos instrumentales: cromatografía de gases, espectrofotometría de absorción atómica, espectrofotometría visible y ultravioleta, etc. Es decir, aquellas metodologías que ya comienzan a estar presentes en laboratorios de grandes empresas y de todos los centros oficiales. Otras técnicas, incluida la cromatografía líquida de alta resolución, espectrofotometría de infrarrojo, etc. han sido soslayadas por el autor y límites de esta obra.

La situación política en la que está inmersa nuestra comunidad vitivinícola, hace que las referencias a los métodos oficiales, deban surgir de su misma organización. Por ello, todo tratado como éste, que

se precie de actual, debe recoger la metodología analítica de la Comunidad Económica Europea, cuyos métodos son en su mayor parte propuestos o aprobados por la Oficina Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V.).

Como toda obra de éste carácter es difícil decir que un trabajo ha salido a la luz totalmente a gusto del autor y actualizado al máximo. Sin embargo, este libro aporta una de las recopilaciones más exhaustivas que sobre análisis de productos vinícolas se han realizado en los últimos tiempos. Es a mi modo de entender un buen trabajo, un buen servicio a la enología y a la analítica y un magnífico nexo de unión entre ambas.

Santiago Mínguez Sanz
Estación de Viticultura y Enología
Institut Català de la Vinya i el Vi

Vilafranca del Penedès, mayo de 1990.

Introducción

Este libro pretende ser una ayuda al analista de vinos, enólogo y bodeguero, al presentar una serie de metódicas que han sido escogidas, de las múltiples que existen, pensando en la exactitud y sencillez de trabajo. Se ha procurado evitar las técnicas instrumentales más complejas, como: Resonancia Magnética Nuclear, Espectrofotometría en Infrarrojo, Radioquímica y en ella se incluirían las técnicas con el carbono radioactivo (C_{14}), etc. A pesar de ello, es de esperar que cumpla con la idea en la que fue concebido este libro: ser útil.

La disposición de los capítulos se ha efectuado por orden alfabético de temas globales de análisis. En cada uno de ellos se describen varias técnicas analíticas que pueden ser aplicadas según las disponibilidades de equipo y personal.

En cuanto se refiere a la distribución de cada análisis, se ha procurado separar perfectamente el principio del método, los reactivos necesarios, la técnica operativa y los cálculos. En algunas técnicas, se ha introducido un apartado de comentarios, para ampliar el tema tratado. También se resumen algunas notas aclaratorias del autor, en el apartado de observaciones.

En lo referente a reactivos, los productos que se indican deberán ser de la calidad: reactivo para análisis. Cuando se hace referencia al agua, para diluciones u otras aplicaciones, siempre se refiere a: agua destilada.

Todos los volúmenes que deben medirse con exactitud, en el libro se expresan con dos decimales, por ejemplo: 10.00 mL.

Al final del texto, se recogen una serie de tablas que pueden ser de gran ayuda para el lector.

He de agradecer, sobremanera, a D. Santiago Minguez Sanz, Doctor Ingeniero Agrónomo, Director de la Estación de Viticultura y Enología de Vilafranca del Penedès, el aceptar presentar esta humilde aportación, a la ardua labor del analista.

El Autor

INDICE GENERAL

ACIDEZ	CAPITULO 1
ACIDOS	CAPITULO 2
ADITIVOS QUIMICOS	CAPITULO 3
ALCOHOLES	CAPITULO 4
AZUCARES	CAPITULO 5
CARACTERISTICAS CROMATICAS	CAPITULO 6
COMPUESTOS CARBONILICOS	CAPITULO 7
COMPUESTOS FENOLICOS	CAPITULO 8
COMPUESTOS NITROGENADOS	CAPITULO 9
ESTERES	CAPITULO 10
GASES	CAPITULO 11
METALES	CAPITULO 12
OTROS COMPUESTOS	CAPITULO 13
REGLAS ENOQUIMICAS	CAPITULO 14
SOLIDOS SOLUBLES	CAPITULO 15
UNIDADES INTERNACIONALES	CAPITULO 16
PESTICIDAS Y FUNGICIDAS	CAPITULO 17
TABLAS	

1. ACIDEZ

ACIDEZ TOTAL	1.5
METODO CEE, referencia	1.6
METODO CEE, usual	1.7
METODO DE LA A.O.A.C	1.9
METODO INSTRUMENTAL	1.11
METODO RAPIDO APROXIMADO	1.11
TABLA DE EQUIVALENCIAS DE ACIDOS	1.13
ACIDEZ VOLATIL	1.14
METODO UNICO DE LA C.E.E	1.15
METODO GAB	1.19
METODO GARCIA-TENA	1.20
METODO A.O.A.C	1.21
METODO GAS CROMATOGRAFICO	1.24
METODO ENZIMATICO	1.27
METODO CON AUTOANALIZADOR	1.28
MEDICION DEL pH	1.30
METODO UNICO DE LA CEE	1.31
ACIDEZ FIJA	1.34

Acidez total

COMENTARIOS

La acidez total es la suma de todas las acideces valorables que contiene el mosto o el vino. Debe excluirse de ella las acideces de adición, como son: el dióxido de carbono (carbónico) y el dióxido de azufre (sulfuroso).

En el vino se hallan los ácidos procedentes del mosto, además de muchos más, formados durante el proceso de fermentación, como son: acético, propiónico, láctico, succínico, pirúvico, glicólico, galacturónico, fumárico y otros. El contenido en ácido málico es considerablemente mayor en los mostos de uva no madura.

Los ácidos que se valoran son los siguientes: tartárico, málico, láctico, succínico, acético, etc. Todos estos ácidos orgánicos citados son relativamente débiles, por ello la neutralización con una base fuerte, como lo es el hidróxido sódico, debe hacerse a valores de pH superiores al 7.00. La AOAC' ha fijado el valor en pH = 8.2 como punto final en la determinación de la acidez total y éste corresponde al viraje de color de la fenolftaleína.

Sin embargo la O.I.V., define la acidez total, como suma de los ácidos valorables, hasta pH 7.0, por adición de solución de hidróxido só-

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.

1.5

dico. El ácido carbónico y el dióxido de azufre no se deben incluir en la expresión de la acidez total.

METODO CEE, referencia² _____

Principio del método

Valoración potenciométrica.

Técnica operativa

1. Se eliminará, previamente, el gas carbónico y el dióxido de azufre que se halle en el vino o mosto.
2. Colocar 100 mL de la muestra en un matraz de 500 mL, provisto de un refrigerante de reflujo.
3. Se hace pasar una corriente de gas nitrógeno por el interior, para la eliminación del aire.
4. El matraz se calienta hasta ebullición, que se mantendrá durante una hora, con una circulación lenta de nitrógeno.
5. Déjese enfriar hasta la temperatura ambiente, sin interrumpir el paso del gas nitrógeno.
6. En un vaso de precipitados de 100 ó 250 mL, se colocan 20.00 mL³ de la muestra desgasificada.
7. Se procede a la valoración, con hidróxido sódico 0.1 M, contenido en una bureta, midiendo simultáneamente el pH de la solución con un electrodo sumergido en la misma, y conectado a su correspondiente medidor.
8. Cuando se alcance el valor de pH 7.0 a la temperatura de 20°C, se detendrá la adición del reactivo. Sean el volumen de reactivo gastado.

2. Journal officiel des Communautés européennes, Revisión 1 de 17 de diciembre de 1987. Todas las metodías CEE que se citan en este libro, han sido tomadas de la Revisión indicada.

3. En este manual, los volúmenes de líquido que deben ser medidos exactamente serán presentados con dos decimales (ejemplo 20.00).

Cálculos

La fórmula para el cálculo, en miliequivalentes por litro es:

$$\text{Acidez} = 10 \times n$$

Para expresar la acidez en gramos de ácido tartárico por litro, la fórmula a aplicar es:

$$\text{Acidez} = 0.75 \times n$$

Observaciones

La adición del líquido de valoración (hidróxido sódico 0.1 M), deberá hacerse lentamente y mantener la solución en constante agitación. El tiempo de valoración debe durar, por lo menos, unos 5 minutos aproximadamente.

METODO CEE, usual _____

Se elimina el gas carbónico del vino, por agitación de 50 mL en un matraz de un litro, al propio tiempo que se procede a un vacío con una trompa de agua. La agitación debe durar de 1 a 2 minutos, hasta que el desprendimiento de gas disuelto, haya cesado. De este vino se tomarán 10.00 mL para la determinación de la acidez total y 20.00 mL para la acidez volátil⁴.

Principio del método

La acidez total del vino, medida a pH 7.00, se efectúa con el empleo de azul de bromotimol como indicador. Un ensayo previo, permite establecer un patrón de color ajustado a pH 7.00. La acidez del dióxido de azufre libre y combinado, viene corregida por la fórmula establecida, utilizando los volúmenes de n' y n'' de iodo 0.005 M, gastados para la oxidación del dióxido de azufre libre y combinado, obtenidos al valorar el destilado de la acidez volátil, a partir de 20.00 mL de vino.

4. Véase la técnica en el análisis correspondiente a este método de CEE.

Reactivos

HIDROXIDO SODICO 0.05 M, exento de CO₂.

INDICADOR DE AZUL DE BROMOTIMOL. Se prepara disolviendo 4 gramos de indicador, colocándolos en un matraz de un litro, con 200 mL de alcohol etílico neutro, añadiéndole hidróxido sódico 1 M hasta coloración azul-verde (ésta será la del pH 7.00) y enrasando a volumen con agua destilada exenta de CO₂.

SOLUCION TAMPON de pH 7.00. Preparada con 107.3 gramos de fosfato monopotásico, 500 mL de hidróxido sódico 1 M y agua destilada hasta un litro. Puede utilizarse un tampón comercial.

Técnica operativa

Preparación del patrón de coloración

1. En un cristalizador de 12 cm de diámetro, se colocan 25 mL de agua destilada hervida, 1 mL de la solución de azul de bromotimol y 10.00 mL de la muestra desgasificada.
2. Neutralizar, mediante el empleo de la solución de hidróxido sódico 0.1 M, en cantidad suficiente, para que adquiera una coloración verde azulada.
3. Añadir a continuación 5 mL de la solución tampón de pH 7.0.

Análisis propiamente dicho

4. En un cristalizador de 12 cm de diámetro, colocar 30 mL de agua destilada hervida.
5. Se añade 1 mL de azul de bromotimol y 10.00 mL de la muestra desgasificada.
6. A continuación se procede a la valoración, con la solución de hidróxido sódico 0.1 M contenida en la bureta, hasta que se alcance una coloración idéntica a la obtenida en el ensayo precedente y en las mismas condiciones de observación.
7. El volumen de reactivo gastado de la bureta, se asigna como: n.

Cálculos

La acidez total, se expresa en miliequivalentes por litro, según la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez} = 10 \times n$$

o bien en gramos de ácido tartárico por litro de muestra, según:

$$\text{Acidez} = 0.75 \times n$$

Observaciones

Si se analizan varios vinos del mismo origen, es suficiente un solo patrón de color. Si existen dudas sobre el viraje de la valoración, puede comprobarse que no se producirá cambio de color, al añadir algunos mililitros de la solución tampón de pH 7.0.

METODO DE LA A.O.A.C.⁵ _____

Principio del método

La valoración se efectúa con el indicador de fenolftaleína. La presencia de gran cantidad de agua caliente minimiza el error debido al contenido de dióxido de carbono. Se procede sin desgasificar la muestra, si ésta corresponde a un vino tranquilo.

Reactivos

SOLUCION DE FENOLFTALEINA al 1%, preparada con alcohol del 70%.

HIDROXIDO SODICO 0.0667 M.

Técnica operativa

Desgasificación de la muestra

Si el vino contiene apreciable cantidad de CO₂, conviene eliminarlo por cualquiera de los dos métodos siguientes:

5. Assoc. Off. Analytic Chemists, número 962.12, página 744, (1990).

(1) Colocar 25 mL de la muestra en un pequeño erlenmeyer y conectarlo a una trompa de succión por agua. Agitar 1 minuto bajo vacío. (2) En un erlenmeyer de 100 mL, colocar 25 mL de muestra. Calentar a incipiente ebullición y dejarlo así durante 30 segundos, agitar y esperar a que alcance la temperatura ambiente.

1. En un erlenmeyer de 500 mL, se hierven 200 mL de agua destilada.
2. Se detiene la ebullición y, todavía caliente, se añade 1 mL de la solución indicadora de fenolftaleína.
3. Con la solución de hidróxido sódico, se neutraliza hasta alcanzar un color rosado.
4. A continuación se añaden 5.00 mL de la muestra de vino o mosto.
5. Desde una bureta, se adiciona la solución de hidróxido sódico, que se ha utilizado anteriormente, hasta lograr el mismo color inicial.

Cálculos

El cálculo de la acidez total, expresada en gramos de ácido tartárico por litro de vino, es igual al número de mililitros de reactivo de hidróxido sódico, gastados en la valoración.

Si se utiliza una solución de hidróxido sódico 0.1 M, la acidez se halla por la siguiente fórmula:

Acidez = mL álcali x 0.1 x 0.075 x 1000/5 g tartárico/L
abreviadamente, acidez total, en g/L = mL álcali x 1.5.

Observaciones

- a) Se procurará efectuar la valoración en lugar bien iluminado y sobre fondo blanco.
- b) Los ácidos orgánicos presentes en el vino (tartárico, málico, láctico, acético, etc.) son, relativamente, ácidos débiles frente al reactivo de valoración (hidróxido sódico), por ello el empleo de fenolftaleína como indicador.
- c) Cuando estos ácidos son neutralizados con álcali, como el empleado en este análisis, el verdadero punto final de la neutralización es mayor que pH 7.00, generalmente se halla entre el 7.80 y el 8.30.

La American Society of Enologists, han aceptado como punto final de valoración de los vinos y mostos, el valor de pH = 8.20.

d) Por lo tanto, si se efectúa una valoración potenciométrica, el punto final deberá situarse en el valor 8.20 de pH.

METODO INSTRUMENTAL

Principio del método

Valoración potenciométrica a pH = 8.20.

Reactivos

HIDROXIDO SODICO 0.0667 M.

Técnica operativa

1. Se seguirán las instrucciones del instrumento empleado, en lo que se refiere a la calibración y contraste de los electrodos del medidor.
2. Efectúese la adición del álcali de la bureta, con agitación de la muestra, hasta alcanzar la lectura de pH 8.2 en el medidor. Este será el punto final de la reacción.
3. Caso de emplear un valorador automático, el procedimiento es muy similar, debiéndose fijar en el aparato, el valor de punto final de la reacción.

METODO RAPIDO APROXIMADO⁶

COMENTARIOS

Es un método muy rápido, aunque de resultado aproximado. Es, tal vez, la metódica que se emplea en toda bodega por su facilidad.

6. J. García Barceló, *Metodología de análisis de vinos y derivados* (1976).

Principio del método

De hecho es una alcalimetría realizada directamente sobre el vino y, en muchos casos, si el vino es tranquilo, sin eliminación del carbónico presente ni del sulfuroso. La solución alcalina está preparada de forma, que operando sobre 10.00 mL de la muestra, cada mililitro de reactivo gastado equivale a un gramo de acidez, expresada en ácido sulfúrico.

Reactivos

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 0.2041 M.

SOLUCION DE FENOLFTALEINA al 2%.

Técnica operativa

1. Colóquese en un vaso de 100 mL, 10.00 mL de la muestra de vino o mosto, medidos con una pipeta limpia y seca, o lavada con el propio vino.
2. Si el vino es blanco se añaden dos o tres gotas de fenolftaleína. Si el vino es tinto, no es necesario añadir el indicador.
3. Se vierte, gota a gota, la solución de hidróxido sódico 0,204 M contenida en una bureta, procurando imprimir al vaso un movimiento giratorio, hasta alcanzar una coloración rosa. En los vinos tintos el color es verdoso.
4. Se apreciará el viraje definitivo, por toque con un papel de tornasol azul, dejando de añadir reactivo cuando dicho papel deja de enrojecer.

Cálculos

La cantidad de mililitros y décimas de reactivo gastados, nos indicará el número de gramos y décimas, de acidez total expresada en ácido sulfúrico.

Sí se desea expresar la acidez hallada en tartárico, se multiplicará el volumen gastado por 1.53. Si el valor quiere expresarse en miliequivalentes/litro, se multiplica la acidez sulfúrica por 20.4.

Observaciones

a) En algunos vinos blancos, no se destaca netamente el color rosa cuando se emplea la fenolftaleína; es preferible controlar el punto

final de la neutralización con la ayuda de papel de tornasol.

b) La inmersión de estos papeles reactivos en el vino, no debe ser instantánea, próximo al final de la operación, requieren permanecer en el vino 10 ó 20 segundos.

TABLA DE EQUIVALENCIAS DE ACIDOS _____

Expresado como:	Tartárico	Málico	Cítrico	Láctico	Sulfúrico	Acético
Tartárico	1.000	0.893	0.943	1.200	0.650	0.800
Málico	1.119	1.000	1.055	1.343	0.731	0.896
Cítrico ⁷	1.071	0.957	1.000	1.286	0.766	0.938
Láctico	0.833	0.744	0.777	1.000	0.544	0.667
Sulfúrico	1.530	1.367	1.428	1.837	1.000	1.224
Acético	1.250	1.117	1.166	1.500	0.817	1.000

7. Los valores de este ácido corresponden al cítrico monohidrato, no al anhidro.

Acidez volátil

COMENTARIOS

En los vinos, se define como acidez volátil al contenido de ácidos grasos, cómo: acético, fórmico, propiónico, butírico, etc. No deben consignarse en este dato los ácidos que son arrastrables por el vapor, cómo: láctico, succínico, sórbico, ni tampoco el dióxido de carbono y dióxido de azufre. La determinación precisa de la acidez volátil en los vinos es de gran importancia en la industria enológica.

Si los valores de la acidez volátil son elevados, indica que el vino ha sufrido la acción de los microorganismos, principalmente por el *Acetobacter*.

Cantidades de 0.3 a 0.8 g/L, expresado en ácido acético, pueden considerarse normales. La legislación actual no permite valores superiores a 1 g/L. La bacteria que provoca la fermentación maloláctica, puede también producir pequeñas cantidades de ácido acético. Los vinos procedentes de mostos con elevado contenido de azúcar tienen, en general, mayor acidez volátil.

El constituyente principal de la acidez volátil es el ácido acético, aunque algunas veces estén presentes pequeñas cantidades de los ácidos propiónico, butírico y valérico. Estos ácidos son también arrastrables con el vapor. Las métodos analíticas eluden las interferencias de los ácidos láctico y sórbico, principalmente, así como los dióxidos de carbono y azufre.

1.14

METODO UNICO DE LA C.E.E. _____

Principio del método

La separación de los ácidos volátiles se efectúa por el arrastre con el vapor de agua y la rectificación de los vapores. La muestra de vino se acidifica con ácido tartárico (aproximadamente 0.5 gramos para 20 mL de vino, antes del arrastre). Se deben tomar todas las precauciones necesarias, para evitar la presencia del gas carbónico en el destilado. El indicador empleado es la fenoltaleína. La acidez del dióxido de azufre libre y combinado, destilado, no debe figurar en el valor de la acidez volátil y se restará de la misma, así como también la acidez debida al ácido sórbico, eventualmente presente.

Aparato y su control. Se compone de un generador de vapor de agua, de un borboteador en donde se coloca el vino, de una columna rectificadora y de un refrigerante. Dada la gran variedad de aparatos propuestos para tal finalidad, y ante la dificultad que presenta la adopción obligatoria de un mismo aparato para los usuarios de todos los países, es preferible y racional fijar de la forma siguiente las condiciones mínimas que debe reunir un aparato, que permita efectuar la técnica de la acidez volátil con exactitud. Estas condiciones son:

1. El vapor de agua producido por el generador debe estar lo suficientemente exento de CO₂, como para que 250 mL del vapor condensado, adicionado de 0.1 mL de hidróxido sódico 0.1 M y dos gotas de fenoltaleína al 1 %, presente una coloración rosada estable, por lo menos durante 10 segundos.

2. En las condiciones normales de empleo, como mínimo el 99.5% del ácido acético en solución acuosa, colocado en el borboteador en lugar del vino, debe encontrarse en el destilado.

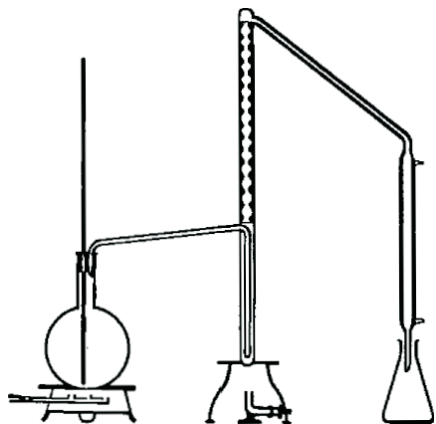
3. Si se coloca una solución normal de ácido láctico en lugar del vino, solamente el 5 por mil, como máximo, se debe encontrar en el destilado obtenido en las mismas condiciones que en el caso anterior.

Todo aparato o toda técnica que cumpla los tres requisitos citados, constituye un aparato o técnica oficial internacional. Los dos aparatos que a continuación se describen, cumplen con las condiciones descritas.

1.15

Aparato pequeño. El vapor se produce en un balón de 1500 mL. El borboteador está constituido por un tubo cilíndrico de 3 cm de diámetro y 27 cm de largo. Este tubo se calienta eléctricamente o con una llama de gas, que incide sobre un disco de hierro de 15 cm de diámetro, con un orificio central de 29 mm de diámetro, que es donde se apoya el tubo. Este dispositivo evita la pirogenación de las materias extractivas del vino. Este calentamiento debe ser regulado de forma tal que, el volumen de vino en su interior, ni aumente ni disminuya en unos mL durante el curso del arrastre de vapor. El tubo interior de entrada del vapor debe hallarse a un cm del fondo del tubo exterior.

El vapor, con los ácidos volátiles, pasa a la columna rectificadora, formada por un tubo cilíndrico de 20 mm de diámetro y 50 cm de longitud, en cuyo interior hay una hélice de acero inoxidable con un paso de 15 mm. Un refrigerante de West de 40 cm de longitud, completa el aparato.



Reactivos

ACIDO TARTARICO.

ACIDO CLORHIDRICO concentrado.

HIDROXIDO SODICO 0.1 M.

INDICADOR FENOLFTALEINA al 1 %.

INDICADOR DE ALMIDON.

iodo 0.005 M.

SOLUCION DE BORAX saturada.

Técnica operativa

1. Colocar en el generador de vapor, agua de cal o de barita, filtrada.
2. En el borboteador se colocan 20.00 mL de vino, previamente desprovisto de gas carbónico, por agitación al vacío a la temperatura ambiente.
3. Se adiciona 0.5 gramos aproximadamente de ácido tartárico a la muestra de vino.
4. Se inicia la destilación y se recogen 250 mL del destilado, en un tiempo que debe oscilar alrededor de 12 a 15 minutos como máximo.
5. Se valora la acidez del destilado, con solución de hidróxido sódico 0.1 M, en presencia de 2-3 gotas de fenolftaleína al 1 %.
6. El volumen gastado en esta primera valoración se designa como n.
7. Terminada la anterior valoración, se añade al líquido una gota de ácido clorhídrico concentrado, para pasar del medio neutro al ácido.
8. Seguidamente se añaden 2 mL de indicador de almidón, un pequeño cristal de yoduro potásico y se valora el dióxido de azufre libre, con una solución de yodo 0.005 M.
9. Sea n' el volumen empleado en esta segunda valoración.
10. Se añaden a continuación 20 mL de solución saturada de bórax (el color de la solución se vuelve rosa) y se valora de nuevo con yodo 0.005 M, hasta el viraje del almidón.
11. El volumen del líquido gastado en esta última valoración se le asigna como n'', que corresponde al SO₂ combinado.

Cálculos

La acidez volátil se expresa en miliequivalentes por litro, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$5 (n - 0.1n' - 0.05n'')$$

La acidez volátil expresada en gramos de ácido acético por litro de vino, se calcula por la fórmula:

$$0.300 (n - 0.1n' - 0.05n'')$$

Observaciones

a) En el caso de que las muestras de vino estén estabilizadas con ácido salicílico, este ácido, que también es arrastrado, se deberá determinar por colorimetría a pH 3 y con precisión de ± 0.5 . Debe restarse de la cifra hallada anteriormente.

b) En los vinos adicionados de ácido sórbico, es conveniente determinar este ácido en una parte alícuota del destilado obtenido, antes de efectuar toda la valoración, ya que prácticamente destila simultáneamente con el ácido acético.

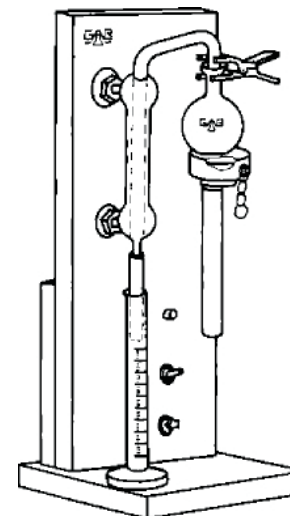
c) Se describe la determinación del ácido sórbico: Se toma 0.5 mL del destilado, se coloca en una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso de luz y se sitúa en el espectrofotómetro; se añaden 1.5 mL de la siguiente solución cuya composición es: bicarbonato sódico 0.5 g, sulfato de cobre pentahidrato 0.001 g y agua destilada hasta un litro. Se deja la cubeta al aire durante unos minutos y luego se mide la absorbancia a 256 nm, en comparación con el agua destilada. El espectrofotómetro ha sido previamente calibrado con una solución de ácido sórbico de 20 mg por litro.

d) Este método es válido para concentraciones de ácido sórbico entre 10 y 300 miligramos por litro. El error en esta determinación es del 1 % aproximadamente. Un gramo de ácido sórbico corresponde a 8.92 mL de solución molar de hidróxido sódico y a 0.438 g de ácido sulfúrico. Un vino adicionado con 200 mg de ácido sórbico por litro, deberá restarse del valor de la acidez volátil hallada la cantidad de 1.7 miliequivalentes por litro.

METODO GAB

Principio del método

Se fundamenta en la metódica número 11.047 de la A.O.A.C. con la modificación de sustituir el destilador de arrastre de vapor por una placa calefactora eléctrica y destilación directa. El calefactor está previsto para la destilación de pequeños volúmenes y el conjunto destilador y refrigerante, proyectado igualmente para la misma finalidad. La adición de sulfato mercurico, bloquea totalmente el dióxido de azufre presente.



Reactivos

SOLUCION SULFATO MERCURICO al 1 %.
SOLUCION DE FENOLFTALEINA al 1%.
HIDROXIDO SODICO 0.0167 M.

Técnica operativa

1. Se deberá conectar el aparato a la red y accionar el interruptor, para que se ponga en marcha, 15 minutos antes del primer análisis, con objeto de que el calefactor alcance la temperatura adecuada.

2. Se miden 10.00 mL de vino y se colocan en el matraz de destilación.
3. Con una pipeta Pasteur de plástico, se toman 2 mL de la solución mercúrica y se vierten en el matraz, además de uno o dos trozos de piedra pómez.
4. Se coloca el matraz en el destilador y la probeta de 10 mL a la salida del refrigerante.
5. Se coloca la placa calefactora bajo el matraz, procurando que el fondo del mismo, asiente perfectamente.
6. Cuando se hayan recogido los 10 mL de destilado, se retira la placa, sin desconectarla, si deben realizarse otros análisis.
7. El líquido de la probeta se coloca en un vaso y se valora con solución de hidróxido sódico, en presencia de unas gotas de fenolftaleína.

Cálculos

Cada mililitro de solución de hidróxido sódico, equivale a 0.10 gramos de ácido acético, por litro de vino. Este valor equivale a la acidez volátil real

METODO GARCIA-TENA _____

Principio del método

Se basa en una destilación fraccionada del vino, y valoración separada de las fracciones recogidas. El primer volumen se recoge en una probeta de 5.1 mL y el segundo en probeta de 3.2 mL. Se emplea el mismo aparato destilador del método GAB, con placa calefactora eléctrica.

Reactivos

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 0.0204 M.

SOLUCION DE FENOLFTALEINA al 1 %.

Técnica operativa

1. En el matraz de destilación se colocan 11.00 mL de la muestra de vino y un trozo de piedra pómez.
2. Se colocará a la salida del refrigerante, la probeta de 5.1 mL.
3. Supuesto caliente el calefactor, se coloca bajo el matraz, procurando que asiente perfectamente.
4. Cuando el líquido alcance el trazo superior de la probeta, se retira, e inmediatamente se sustituye por la probeta más pequeña (3.2 mL).
5. Una vez el líquido llegue al trazo superior de la probeta, se retira la placa calefactora y se da por terminada la destilación.
6. El líquido de la probeta se vierte en un vaso y se valora con la solución alcalina, en presencia de unas gotas de fenolftaleína, hasta obtener un color ligeramente rosado. Se toma nota del volumen gastado y se asigna como N.
7. A continuación se valora el líquido de la probeta pequeña, como se ha indicado anteriormente, y se asigna como N'.

Cálculos

El número de mililitros gastados para valorar el líquido de la probeta pequeña nos dará el valor de la acidez volátil real según la fórmula:

$$\text{Acético} = N' \times 0.366 \text{ en g/L}$$

Para hallar la acidez volátil aparente, se suma a la real el valor hallado multiplicando $N \times 0.122$.

Puede también utilizarse la tabla I.

METODO A.O.A.C.⁸ _____

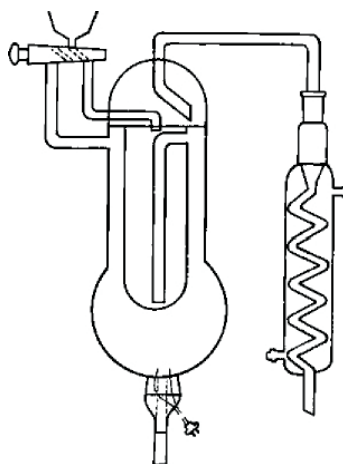
Principio del método

El mismo que el anterior, empleando el vapor de agua para el arrastre de los ácidos.

8. Ass. Off. Analyt. Chemists, número 964.08. página 744, (1990).

Aparato destilador

Consiste en un matraz de aproximadamente 1.500 mL, con una cámara interior en donde se sitúa la muestra, una trampa de vapores, un grifo de dos pasos, una resistencia eléctrica en el interior del matraz y un grifo de descarga. Todo ello construido en una sola pieza en vidrio Pyrex. El residuo de vino que queda en la cámara interior, es eliminado automáticamente por acción del vacío, cuando se desconecta el aparato. Al añadir agua por un grifo que comunica con el borboteador, sirve para lavarlo y dejarlo de nuevo dispuesto para una nueva muestra a analizar. El grifo de dos pasos, sirve para la entrada de la muestra y para la salida del aire y CO₂, cuando se inicia la ebullición, según la posición de la misma.



Reactivos

HIDROXIDO SODICO 0.1 M.

INDICADOR FENOLFTALEINA, al 1%

Técnica operativa

1. Es necesario eliminar el CO₂ de la muestra, mediante agitación con aspiración, o bien, por incipiente ebullición, con columna condensadora y enfriado inmediato.

2. El aparato destilador se carga con agua destilada, hasta que cubra la resistencia calefactora.
3. Por el grifo se adicionan 25.00 mL del vino previamente desgasificado.
4. El aparato se conecta y se inicia la ebullición, con el grifo de doble paso comunicado con el exterior. Se mantiene ésta durante 3 minutos. De esta forma se eliminará el carbónico que se halla disuelto en el agua.
5. Se cierra el grifo y el vapor de arrastre borboteará a través de la muestra.
6. Durante la destilación se recogen unos 300 mL en el erlenmeyer situado a la salida del refrigerante.
7. Se desconecta el aparato, se vacía el destilador, y se lava la cámara interior con agua destilada, y automáticamente tendrá lugar el vaciado del aparato.
8. Al destilado, contenido en el erlenmeyer, se añade 1 mL de solución alcohólica de fenolftaleína al 1 %.
9. Se valora seguidamente con solución de hidróxido sódico 0.1 M, hasta coloración rosada, persistente.

Cálculos

Para expresar los resultados en gramos de ácido acético por litro de vino, se multiplicarán los mililitros gastados de solución de hidróxido sódico 0.1 M, por 0.006 y por 40 (factor global igual a 0.24).

Este análisis representa la acidez volátil aparente, ya que no se ha hecho ninguna corrección del dióxido de azufre presente en la muestra de vino.

METODO GAS CROMATOGRAFICO⁹

COMENTARIOS

Los métodos comunmente usados en el análisis de la acidez volátil de los vinos, incluyen la destilación con arrastre de vapor de agua y posterior valoración alcalimétrica. Influyen en estas metodías, la presencia de otros ácidos volátiles, como: sórbico, fáltico, sulfuroso y carbónico, que luego hay que deducir del valor hallado.

Dado que el componente mayoritario de la acidez volátil, es el ácido acético, es a este compuesto donde la mayoría de las técnicas deben dirigirse, procurando prescindir de todas las sustancias interferentes. Ya que la cromatografía es una técnica de separación por excelencia, es perfectamente posible su aplicación a éste análisis del ácido acético. Lo más destacable de este método descrito a continuación, es que el vino objeto de análisis, no se somete a ningún tratamiento, por el cual podrían existir contaminaciones o transformaciones. Sólo es necesario una dilución del mismo, con el propio patrón interno empleado en la determinación.

El vino, por su compleja constitución, presenta problemas en el análisis cromatográfico cuando se utiliza la inyección directa de la muestra. Estos problemas se refieren solamente a deterioro de la columna, pero nunca en el resultado del análisis. La fase estacionaria de la columna, se hidroliza a causa de las inyecciones acuosas, sangrados del ácido fosfórico y por la temperatura elevada de la misma. También los componentes no volátiles del vino, como son: azúcares, materias colorantes, proteínas, etc., tienen un efecto perjudicial sobre el relleno de la columna. En esta técnica se soslayan estas dificultades, por la dilución de la muestra, por el escaso volumen de inyección (0.5 microlitros) y por la mezcla adecuada de las fases estacionarias.

La resolución del pico de ácido acético es perfecta y, por ello, la exactitud de esta determinación. Comparativamente con los métodos de arrastre por vapor de agua, cabe destacar que el ácido acéti-

co no es arrastrado en su totalidad en los métodos por destilación, además de las interferencias de otros compuestos volátiles, problemas que no presenta el método gas cromatográfico que se describe a continuación.

Principio del método

Se analiza el ácido acético contenido en el vino, por cromatografía gas-líquido. La separación tiene lugar en una columna rellena de Carbowax 20 M y ácido fosfórico, como fases estacionarias combinadas. Se emplea ácido propiónico como patrón interno. El método es muy fácil de realizar y se presta a la automatización. El tubo de vidrio del bloque de inyección del cromatógrafo, es conveniente cambiarlo cada 70 inyecciones aproximadamente. Con esta precaución, la columna permite hasta 16 000 determinaciones, sin pérdida apreciable de la fase estacionaria. El tiempo de análisis es de unos 6 minutos.

Aparato y materiales

Es necesario un cromatógrafo de gases, equipado con detector F.I.D. y con tubo de vidrio de reducido volumen en el bloque de inyección. La columna para el análisis, será un tubo de vidrio de 2 m de longitud y 2 mm de diámetro, rellena de Carbopack C de 60/80 mallas, con 0.3% de Carbowax 20 M y 0.1 % de ácido fosfórico (H₃PO₄). Se emplea helio como gas portador.

Reactivos

SOLUCION DE ACIDO PROPIONICO de stock. Se pesa 1 g de ácido propiónico puro, para análisis, y se coloca en un matraz de 100 mL, se disuelve con agua destilada y se completa a volumen.

PATRON INTERNO, preparado por mezcla de 5.00 mL de la solución de stock de propiónico, 2 mL de ácido fosfórico al 70% y agua destilada hasta un volumen de dos litros.

Técnica operativa

1. Procédase al ajuste de los parámetros del cromatógrafo, de acuerdo a los siguientes datos:

Temperatura del inyector, 175 °C.
Temperatura de la columna, 90 °C.

⁹ B. Trombella y A. Ribeiro, *Amer. J. Enol. Vitic.*, 31, 3, páginas 294-297, (1980).

Temperatura del detector, 200 °C.
Flujo de gas portador, 32 mL/min.
Flujo de hidrógeno y aire, los necesarios para una llama correcta.
Volumen de la muestra a inyectar, 0.5 microlitros.

2. Se toman 0,15 mL del vino a analizar y se diluyen con solución de patrón interno hasta 2 mL. Esta dilución se realiza con suma facilidad con un aparato diluidor Fisher o similar. Esta es toda la preparación que requiere la muestra.
3. De la dilución anterior, se toma con la microjeringa 0.5 microlitros y se inyecta en el cromatógrafo o se colocan muestras en el dispensador automático del cromatógrafo.

Cálculos

Con el empleo del integrador, es muy fácil la cuantificación del análisis, efectuando comparación con un patrón de ácido acético puro, para análisis, en cantidad adecuada para la determinación. Es aconsejable una solución patrón, cuya concentración sea de 0.5 gramos de acético por litro. El diluyente utilizado para este patrón, será alcohol etílico al 10% en volumen.

Observaciones

- a) Es muy interesante, para mejorar la metódica, que la columna de vidrio, antes de efectuar el relleno con el soporte indicado, se mantenga durante una noche totalmente llena de una solución de ácido fosfórico al 1 % y secarla antes del uso, sin enjuague posterior.
- b) Si el gas portador, helio, se satura de ácido fórmico, mejora sensiblemente el análisis¹⁰
- c) Seguidamente a una determinación, puede inyectarse de nuevo otra muestra, tan pronto haya salido el pico del patrón interno de propiónico, con ello se proporciona un gran ahorro de tiempo.

10. S.A. Kupina, J.L. Kutschinski y otros, *Am. J. Enol. Vitic.*, 33, 2, páginas 67-74 (1982).

METODO ENZIMATICO¹¹

COMENTARIOS

Todo lo explicado en los comentarios del análisis anterior, son perfectamente aplicables a ésta técnica enzimática, con ventajas muy superiores al método gas cromatográfico.

Dado que el análisis enzimático es muy específico, se presta, con gran exactitud, a la determinación del ácido acético en el vino, eliminando totalmente las interferencias y por ello el resultado exclusivo del componente indicado. Presenta la ventaja sobre el método gas cromatográfico, en la mayor economía de instrumentación, ya que el espectrofotómetro necesario para las determinaciones enzimáticas, es mucho más barato que el cromatógrafo, aparte la facilidad de su mantenimiento.

Principio del método

El ácido acético (acetato) se transforma, en presencia de la enzima acetil-CoA-sintetasa (ACS) con adenosina-5-trifosfato (ATP) y coenzima A (CoA), en acetil-CoA. Esta reacciona con el oxalacetato a citrato, en presencia de citrato sintetasa (CS).

La determinación se basa en la formación de NADH, medida por el aumento de la absorbancia a 340 nm. La cantidad de NADH formada, es la que sirve para medir la concentración de ácido acético. La presencia del alcohol retarda la reacción del acetato, por ello, la lectura de la absorbancia se efectúa después de 20 minutos.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número de catálogo 148261, para 30 análisis. Contiene 4 frascos con reactivos, alguno de los cuales se deben reconstituir con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como su reconstitución, se indican en el folleto que acompaña a cada test analítico.

11. Boehringer Mannheim, *Análisis enzimáticos de los alimentos, 1989*

Técnica operativa

1. Se preparan las cubetas de 10 mm de paso de luz, que se recomiendan sean de plástico para un sólo uso, con objeto de evitar contaminaciones. El espectrofotómetro con lámpara de tungsteno, se sitúa a 340 mm de longitud de onda.
2. Se efectuará una dilución del vino, colocando 10.00 mL en un matraz aforado de 100 mL y completando el volumen con agua destilada. Si el vino tiene una acidez acética superior a 1.5 g/L, se efectuará una dilución mayor, empleando 1.00 mL de muestra de vino, en lugar de los 10 mL indicados anteriormente.
3. Seguir paso a paso las indicaciones del folleto adjunto al test de análisis.

Cálculos

El cálculo de la concentración de ácido acético se determina por la diferencia de las absorbancias leídas, siguiendo las instrucciones detalladas en el folleto.

La diferencia de absorbancias, se indica por A_c y la concentración en gramos de ácido acético por litro, se deduce por la fórmula:

$$c = 0.308 \times A_c \text{ g/L}$$

el resultado deberá multiplicarse por el factor de dilución, o sea por 10 en el primer caso de la muestra que no supere los 1.5 g/L en acético, y por 100 en el segundo caso.

METODO CON AUTOANALIZADOR _____

Principio del método

Los ácidos grasos de la serie acética, se separan del vino por destilación, bajo corriente de nitrógeno. La acidez del destilado, se mide por la coloración del indicador de pH, azul de bromofenol. Las determinaciones colorimétricas, se efectúan a la longitud de onda de 460 mm.

Reactivos

SOLUCION DE ACIDO TARTARICO a/ 2.5%, preparada por disolución de 25 gramos de ácido tartárico, reactivo para análisis y agua destilada hasta un litro.

SOLUCION DE BORATO SODICO 0.1 M. Disolver con agua destilada, en un matraz aforado de 100 mL, 3.814 gramos de tetraborato sódico.

SOLUCION DE FOSFATO POTASICO 0.1 M, disolviendo en un matraz de un litro, 123.6 gramos de fosfato monopotásico, reactivo análisis y completar con agua.

SOLUCION DE INDICADOR. En un matraz de 1 litro, se introducen 330 miligramos de azul de bromofenol, 100 mL de solución de fosfato potásico 0.1 M y se completa con agua destilada.

AGUA OXIGENADA, de 0.1 volúmenes.

Técnica operativa

Se detallan en el manual de instrucciones del aparato.

Observaciones

a) Permite el análisis de un buen número de muestras por hora, de forma automatizada. El límite de concentración permitida por el análisis va desde 0 a 1 g/L, expresado en ácido sulfúrico, o sea un máximo de 1.23 gramos de ácido acético por litro.

b) Con esta metódica, las interferencias son muy pequeñas. El dióxido de azufre, se oxida fácilmente con el agua oxigenada. Las cantidades de SO_2 empleadas en enología no influyen en el análisis. Tampoco interfiere el gas carbónico. El ácido láctico se elimina por rectificación, durante la destilación de la muestra.

Medición del pH

De las bebidas naturales, el vino es la que tiene el valor de pH más próximo al jugo gástrico.

COMENTARIOS

La medición del pH en el vino o mosto, tiene un marcado interés, pues este dato es importante por su efecto sobre: microorganismos, matiz del color, sabor, potencial redox, relación entre el dióxido de azufre libre y combinado, quiebras debidas al fosfato de hierro y, otros más.

El valor de pH de los mostos destinados a los vinos de mesa, oscila entre 2.7 y 3.8, dependiente principalmente, del grado de madurez de la uva de que proceden. No existe una relación directa entre el pH y la acidez total valorable. Sin embargo, sí existe una dependencia empírica, entre el pH y la relación bitartrato potásico/ácido tartárico. No hay correlación entre el pH y el ácido málico.

La impresión organoléptica de la astringencia y acidez, es más dependiente del pH, que de la acidez total. La tonalidad y vivacidad del color de los vinos tintos, depende de su pH. Los ataques bacterianos son posibles cuanto más elevado es el pH. Por ejemplo, la descomposición del ácido tartárico tiene lugar a valores superiores a pH 3.6. Las precipitaciones o quiebras metálicas, son más difíciles de suceder, cuanto más bajo es el pH. El poder antiséptico del sulfuroso aumenta, cuando el pH es bajo, debido a que el SO₂ libre es mayor. El pH óptimo para la precipitación de bitartrato potásico, genera una disminución de la acidez total y un aumento de la concentración de iones hidrógeno, o sea una disminución del pH.

1.30

METODO UNICO DE LA CEE _____

Principio del método

Es la medición de la diferencia de potencial entre dos electrodos, sumergidos en el vino. Uno de los electrodos adquiere un potencial, que es una función definida del pH del líquido a medir, éste es el electrodo de vidrio. El otro electrodo, tiene un potencial fijo y de ahí su nombre de electrodo de referencia. La precisión en la medida del pH debe ser de 0.05 unidades.

Aparatos

Medidor de pH de lectura digital, con precisión de 0.01 unidades. Electrodo de vidrio, en general se utiliza el electrodo combinado, por contener en una sola pieza el electrodo de vidrio y el de referencia. Se deberá conservar sumergido en una solución 3 M o bien una saturada de cloruro potásico.

Reactivos

SOLUCION 0.1 M DE FTALATO ACIDO DE POTASIO preparada por disolución de 20.42 gramos por litro, en agua destilada.

SOLUCION DE ACIDO CLORHIDRICO 0.1 M.

SOLUCIONES PATRON:

- 1) Solución saturada de bitartrato potásico, preparada con una cantidad mínima de 5.7 g/L a 20 °C. Se conserva esta solución unos dos meses, con el empleo de 0.1 g de timol para 200 mL.

1.31

Los valores de este patrón son:

3.57 a 20 °C.

3.56 a 25 °C.

3.55 a 30 °C.

2) Solución 0.05 M de ftalato ácido de potasio, pesando exactamente 10.211 gramos del producto puro y seco, en un litro de agua destilada. Se conserva unos dos meses.

Los valores de pH son:

3.998 a 10 °C

3.999 a 15 °C

4.003 a 20 °C

4.008 a 25 °C

4.015 a 30 °C

3) Solución preparada de la siguiente forma: 3.402 gramos de fosfato monopotásico, 4.354 gramos de fosfato dipotásico y agua destilada hasta completar un litro.

Este patrón tiene los siguientes valores de pH.

6.90 a 15 °C

6.88 a 20 °C

6.86 a 25 °C

6.85 a 30 °C

A pesar de lo indicado anteriormente, se recomienda adquirir del mercado, las soluciones patrón ya preparadas, pues se conservan en muy buenas condiciones y son de valores muy fiables.

Técnica operativa

1. Puesta a cero del aparato, de acuerdo a las instrucciones que lo acompañan.
2. Contrastado del medidor. Se sumergen los electrodos en la solución patrón de pH 7.00 a 20 °C. Con el mando correspondiente de calibración, se sitúa el valor de pH del patrón en la pantalla del aparato.
3. Se retira la solución patrón y se lavan los electrodos con agua destilada.

4. Se cambia el patrón por otro de 3.00 ó 4.00, a la misma temperatura y se comprueba si el medidor indica correctamente éste valor, en caso contrario con el mando corrector de la pendiente del electrodo, se lleva al valor teórico del patrón.

5. El electrodo se lava con agua destilada.

6. Se sumergen los electrodos en el vino o mosto a la temperatura comprendida entre 20 y 25 °C. Es importante que la temperatura sea lo más próxima posible a la que se tenía en el calibrado con los patrones.

7. El display del aparato indicará el valor de pH de la muestra.

8. Los medidores de pH que incorporan en su circuito microprocesadores, efectúan el calibrado y control de los electrodos, automáticamente. Se recomienda el empleo de éste tipo de aparatos.

9. El resultado se expresa con dos decimales.

Acidez fija

COMENTARIOS

El dato analítico de la acidez fija, puede tener interés en la legislación de algunos países europeos, con objeto de detectar la adición de agua al vino. Aunque durante la fermentación y posterior a ella, suceden transformaciones profundas, el valor de la acidez fija se aproxima al de la acidez total del mosto original.

En algunas regiones, existen limitaciones legales a los valores de la acidez fija. Por ejemplo, en California, para los vinos de postre existe un nivel mínimo de 2.5 g/L.; 3.0 g/L para los vinos blancos y 4.0 g/L para los tintos. Estas cantidades son expresadas como ácido tartárico.

Cálculo

Se halla el valor de la acidez fija, por diferencia entre la acidez total y la acidez volátil, expresadas las dos en ácido tartárico. Esto quiere decir, que la acidez volátil, que generalmente está expresada en ácido acético, deberá calcularse en ácido tartárico, multiplicando su valor acético por el factor 1.25.

2. ACIDOS

TARTARICO	2.5
METODO C.E.E., referencia	2.6
TEST VOLUMETRICO DE COMPARACIÓN	2.7
METODO REBELEIN	2.9
METODO REBELEIN modificado	2.10
METODO RAPIDO O.I.V	2.12
METODO COLORIMETRICO	2.14
CITRICO	2.16
METODO UNICO DE LA C.E.E	2.16
METODO SCHNEYDER	2.21
METODO ENZIMATICO	2.22
MALICO	2.24
METODO AMERICAN SOCIETY OF ENOLOGISTS	2.25
METODO O.1 V (Af 33)	2.26
METODO ENZIMATICO	2.28
LACTICO	2.31
METODO AMERICAN SOCIETY OF ENOLOGISTS	2.31
METODO ENZIMATICO	2.33
ASCORBICO	2.35
METODO C.E.E. ascórbico total	2.35
METODO C.E.E., rápido	2.39
METODO ENZIMATICO	2.40
SUCCINICO	2.43
METODO PEYNAUD-LAFON	2.43
METODO M. CASTINO	2.45
METODO ENZIMATICO	2.48
ACIDO GLUCONICO	2.50
METODO PEYNAUD Y CHARPENTIE	2.50
METODO ENZIMATICO	2.54
VARIOS ACIDOS A LA VEZ	2.56
METODO KUNKEE	2.56
METODO DE CAPA FINA	2.58

Tartárico

COMENTARIOS

La mayor parte de la cantidad de los ácidos contenidos en la uva y en el vino, corresponde al ácido tartárico. Más de la mitad de la acidez total, es debida a este ácido y a sus sales. Concretamente, a un pH de 2.98, de la totalidad del ión tartrato presente, el 50% se halla en forma de ácido libre.

Es el más fuerte de los ácidos existentes en las uvas, y por ello, tampona el valor de pH del mosto o vino. Esta propiedad, es de gran importancia para la resistencia a las enfermedades, en el color y, en el sabor ácido del vino.

El contenido de tartratos en la uva o en el mosto, es muy variable y depende de la variedad, estado de madurez y región geográfica o climatológica de su cultivo. Los límites extremos, pueden oscilar entre 2 y 9 gramos por litro, expresados como ácido tartárico.

METODO CEE, referencia _____

Principio del método

El ácido tartárico, es valorado por pesada del racemato cálcico precipitado. Esta determinación, puede completarse por otra volumétrica de comparación. Deben existir ciertas condiciones para la precipitación, como son: pH, volumen total empleado, y concentración de iones precipitantes, de tal manera, que la precipitación del racemato sea total y, el levotartato de calcio, permanezca en solución. Si el vino ha sido adicionado de ácido metatartárico, será necesaria una hidrólisis previa.

Reactivos

SOLUCION DE ACETATO CALCICO que contenga 10 gramos de calcio por litro. Se prepara con 25 gramos de carbonato cálcico, 40 mL de ácido acético, reactivo análisis y suficiente agua destilada hasta el volumen de un litro.

RACEMATO DE CALCIO CRISTALIZADO. Se colocan en un vaso de 400 mL, 20 mL de una solución de ácido tartárico dextro de 5 g/L, 20 mL de una solución de tartrato amónico levo a 6.126 g/L y 6 mL de solución de acetato cálcico de 10 g de calcio por litro. Dejar en reposo, para que precipite, durante dos horas. Recoger el precipitado en un embudo filtrante de vidrio poroso número 4, lavar por tres veces consecutivas con 30 mL de agua destilada. Secar a la estufa a 70 °C, hasta peso constante. Con las cantidades de reactivo indicadas, se obtienen aproximadamente 340 mg de racemato cálcico cristalizado. Conservar en frasco tapado.

SOLUCION DE PRECIPITACION (pH.= 4.75). Se prepara con 150 miligramos de tartrato amónico levo, que se disuelven en 900 mL de agua, se añaden 8.8 mL de solución de acetato de calcio de 10 g de Ca por litro y completar a un litro con agua. Dado que el racemato es ligeramente soluble en esta solución, se procede a saturarlo de la siguiente forma: añadir 5 miligramos de racemato de calcio al volumen anterior, agitar y dejar reposar 12 horas y filtrar.

Técnica operativa

1. Se colocan en un vaso de vidrio de unos 600 mL, 500 mL de solución de precipitación y 10.00 mL de la muestra del vino a analizar.
2. Con el extremo de una varilla de vidrio, fróntense las paredes del vaso. Se deja en reposo durante 12 horas.
3. Filtrar sobre filtro de vidrio poroso número 4, previamente tarado y situado en un erlenmeyer Kitasato, para poder filtrar al vacío, por succión con una trompa de agua. Lavar el vaso con el mismo líquido filtrado, repetidamente, hasta que todo el precipitado se haya pasado al filtro.
4. Secar en estufa a 70 °C, hasta peso constante.
5. Pesar el precipitado y sea P el peso del racemato de calcio ($\text{CaC}_4\text{O}_6\text{H}_4$), cristalizado con 4 moléculas de agua.

Cálculos

Una molécula de racemato cálcico, corresponde a media molécula de ácido tartárico dextro, en el vino.

La cantidad de ácido tartárico presente en el vino, viene determinada por las siguientes fórmulas:

$384.50 \times P$ se expresa en miliequivalentes del ácido tartárico por litro de vino.

$28.84 \times P$ se refiere en gramos de ácido tartárico por litro de vino.

$36.15 \times P$ expresado en gramos de bitartrato potásico por litro de vino.

TEST VOLUMETRICO DE COMPARACION _____

Reactivos

ACIDO CLORHIDRICO DILUIDO 1:5 (v/v), equivalente aproximadamente a 82 g/L.

SOLUCION DE EDTA 0.05M. Se emplea la sal disódica del ácido etilendiamino tetracético o complexon III. Se pesan 18.61 gramos y se disuelven en agua destilada hasta un litro.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO a/ 40% (p/v).

INDICADOR ACIDO CALCONCARBONICO, preparado con 1 gramo de 2-hidroxi-4sulfo-1-naftilazo-3-naftoico y 100 gramos de sulfato sódico anhidro. Mézclase íntimamente en el mortero.

Técnica operativa

1. El embudo filtrante del análisis anterior, después de haber tomado nota de su peso, se coloca sobre un erlenmeyer y se añaden 10 mL de ácido clorhídrico diluido, para disolver el precipitado.
2. Se lava el filtro con 50 mL de agua destilada. Se añaden 5 mL de solución de hidróxido sódico al 40% y 30 miligramos del indicador.
3. Valorar con la solución de EDTA 0.05 M, hasta viraje del indicador. Sea n el número de mililitros gastados.

Cálculos

La cantidad de ácido tartárico por litro de vino, se halla por las siguientes fórmulas:

$5 \times n$ si se expresa en miliequivalentes por litro.

$0.375 \times n$ expresado en gramos de ácido tartárico/L.

$0.470 \times n$ expresado en gramos de bitartrato potásico por litro de vino.

METODO REBELEIN¹

Principio del método

Puede utilizarse tanto para mostos, como para vinos. Al vino se añade directamente: nitrato de plata, vanadato amónico, carbón decolorante y subsiguiente filtración. Se eliminan así las sustancias colorantes y el exceso de vanadato. No se perjudica en absoluto la coloración rosa, debida a la reacción entre el ácido tartárico y el vanadato. La reacción coloreada se mantiene estable durante algunas horas. La gran ventaja de este método, aparte la rapidez, es que los azúcares, alcohol, ácidos orgánicos e inorgánicos presentes en el vino, no interfieren en la determinación. Es muy específico del ácido tartárico. Esta técnica se recomienda como método de control, dada su rapidez, exactitud y facilidad de realización.

Reactivos

SOLUCION DE NITRATO DE PLATA 0.1 M, en ácido acético al 30%.

SOLUCION DE VANADATO AMONICO al 1 %, preparada con 10 gramos de vanadato amónico, disueltos en 150 mL de hidróxido sódico 1 M, 200 mL de acetato sódico al 27% y completar el volumen a un litro, con agua destilada.

Técnica operativa

1. En un erlenmeyer de 200 mL se vierten 10.00 mL del vino a ensayar o 3.00 mL si es mosto. A continuación 15.00 mL de solución de nitrato de plata 0.1 M y 0.5 g de carbón decolorante.
2. Agítase unos 15 segundos. A continuación, sin dejar de agitar, se añaden 15 mL de solución de vanadato amónico.
3. Filtrar a través de un filtro de papel, despreciando los 5 mL primeros, luego se recogen 10 mL y se dejan reposar 30 minutos.

1. H. Rebelein, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 2, páginas 33-38, (1973).

4. Se prepara el espectrofotómetro, para determinar la densidad óptica en una cubeta de 10 mm de paso de luz, a la longitud de onda de 530 nm.
5. Se realiza un ensayo en blanco, con el empleo de agua destilada en vez de vino.
6. Deberá confeccionarse una curva patrón, con soluciones de ácido tartárico, reactivo análisis, de concentraciones conocidas.
7. Se coloca el líquido a analizar en una cubeta y se mide la densidad óptica. El valor se compara con la gráfica obtenida con las soluciones patrón.

Cálculos

Sólo es necesario comparar las lecturas de la densidad óptica y pasarlas a la gráfica patrón, leyendo la concentración del ácido tartárico.

METODO REBELEIN modificado² _____

Principio del método

Es un perfeccionamiento del método anterior, para eliminar las interferencias debidas a la presencia de antocianinas en los vinos tintos. Esencialmente es una corrección del color del vino, con lo que se evita el empleo del carbón, para eliminar el color.

Reactivos

SOLUCION ACETATO SODICO al 27%. Se pesan 270 gramos de acetato sódico para análisis y se disuelve con agua hasta completar un litro.

SOLUCION 1. Acido acético al 30 por ciento.

SOLUCION 2. Solución de metavanadato. Disolver 10 gramos de metavanadato amónico en 150 mL de hidróxido sódico 1 M. añadir 200 mL de solución de acetato sódico al 27% y completar con agua destilada hasta un litro.

SOLUCION 3. Disolver 4.5 gramos de cloruro amónico en 150 mL de hidróxido sódico M y 200 mL de solución de acetato sódico al 27% y agua destilada hasta un litro. Mézclense volúmenes iguales de esta solución y la de ácido acético al 30%. Se corrige el pH al mismo valor que el que tenga una mezcla de volúmenes iguales de ácido acético al 30% y solución 2, mediante el empleo de una solución de hidróxido sódico 1 M.

Técnica operativa

1. Se preparan cuatro tubos de ensayo, asignados como A, B, C y D.
2. A cada uno de los tubos se añaden los volúmenes que se indican en el siguiente cuadro:

	Cantidad en mL			
	A	B	C	D
Vino o mosto	1	0	1	0
Agua	0	1	0	1
Solución 1	10	10	0	0
Solución 2	10	10	0	0
Solución 3	0	0	20	20

3. Mézclase bien cada tubo y déjese reposar durante 15 minutos. Se procede a la determinación de la densidad óptica en el espectrofotómetro, en la longitud de onda de 530 nm y con cubetas de 10 mm de paso de luz.
4. Preparación de las soluciones patrón para el trazado de la gráfica. Se prepara una solución standard con 10 gramos de ácido tartárico, reactivo análisis, disueltos en un litro de agua destilada. En 10 matraces aforados de 100 mL, se vierten en cada uno de ellos 5.00, 10.00, 20.00, 30.00....90.00 mL de la solución standard, completando con agua hasta el enrase. La solución de cada matraz tendrá una concentración

² M. Vidal y J. Blouin, Ref. *Fr. Oenol.*, 70, páginas 39-46, (1978).

de ácido tartárico de: 0.5, 1.0, 2,....9 gramos por litro. La solución standard sin diluir, corresponde a una concentración de tartárico de 10 gramos por litro.

5. Se prepara una curva con patrones desde 0 a 5 gramos de ácido tartárico por litro. Las soluciones de los tubos B y D no son necesarias, si el vino es blanco o, cuando se emplean los patrones.

Cálculos

Para el cálculo de la absorbancia, hay que anotar la diferencia entre las absorbancias A y C (o sea A - C), en el caso de vinos blancos. En vinos tintos, la absorbancia o densidad óptica a considerar será:

$$(A-B)-(C-D).$$

METODO RAPIDO O.I.V.³ _____

Principio del método

Se puede determinar el ácido tartárico, por precipitación en forma de tartrato ácido de potasio, en condiciones tales, que se reduzca al mínimo su solubilidad.

Reactivos

ACIDO ACETICO CONCENTRADO.

SOLUCION DE PRECIPITACION, obtenida colocando en un matraz aforado de un litro, 300 g de cloruro potásico puro, 5.75 g de sal de Seignette (tartrato de sodio y potasio) 1.25 g de oxalato potásico, disolver con agua destilada y completar a volumen. Si la temperatura es baja, pueden aparecer cristales en el fondo del envase, que deberán redisolverse calentando ligeramente, antes del uso.

ALCOHOL ETILICO 96%.

SOLUCION DE LAVADO, preparada en un matraz aforado de un litro, disolviendo 150 g de cloruro potásico, 200 ml alcohol etílico y completar a volumen con agua destilada.

AZUL DE BROMOTIMOL, disolviendo 1 g del indicador en 100 mL de alcohol etílico.

HIDROXIDO SODICO 0.1 M.

Técnica operativa

1. En un tubo de centrifuga, se colocan 10.00 mL de vino, 0.4 mL de ácido acético, 7.5 mL de solución de precipitación y 2 mL de etanol.
2. Con un agitador de vidrio, se agita hasta que aparezca un enturbiamiento cristalino. Esto requiere aproximadamente unos 10 minutos.
3. Dejar el tubo en reposo durante una hora, a la temperatura de 8 °C, aproximadamente.
4. Después de transcurrido el tiempo, se agita con un agitador de vidrio, teniendo cuidado de mezclar el precipitado con el líquido. Esta agitación es indispensable para obtener una precipitación completa.
5. Dejarlo una hora en el frigorífico.
6. A la salida del refrigerador, se centrifuga y se decanta el líquido que sobrenada, que debe estar perfectamente límpido.
7. Lavar el precipitado, dos veces, con aproximadamente 2 mL de la solución de lavado.
8. Centrifugar otra vez y desprejar el líquido.
9. Pasar el precipitado, con ayuda de un chorro de agua destilada, a un vaso.
10. El bitartrato potásico se analiza por alcalimetría, con la solución 0.1 M de hidróxido sódico, en presencia de unas gotas de indicador de azul de bromotimol (cambio de color de amarillo a azul).

³ P. G. Garoglio, *Enc. Vitic. Mond.*, vol. 5, página 63, (1973).

Cálculos

Si el volumen gastado de hidróxido sódico 0.1 M es n, la cantidad de ácido tartárico se halla por las fórmulas:

1.5 x n - 2 en gramos tartárico por litro.

13.33 (1.5 x n - 2) en miliequivalentes por litro.

1.254 (1.5 x n - 2) en bitartrato potásico.

METODO COLORIMETRICO⁴ _____

Principio del método

Es esencialmente un método colorimétrico, fundamentado en el método de Matchett y otros⁵ por reacción del ácido tartárico y el metavanadato. Esta modificación presenta un método que mejora su precisión.

Reactivos

RESINA ANIONICA DUOLITE A101D.

ACIDO ACETICO CONCENTRADO.

SOLUCION ACIDO ACETICO a/ 30%.

SOLUCION SULFATO SODICO 0.5 M.

SOLUCION METAVANADATO SODICO al 3 %.

Técnica operativa

1. Preparar una columna de vidrio Pyrex de 500 mm de longitud y 12 mm de diámetro.
2. Cargar la columna utilizando 20 mL de la resina, mezclada con 20 veces su volumen de ácido acético al 30%.

3. Preparar el grifo de salida de la columna, de modo que el flujo de salida del líquido sea de 2.5 a 5 mL por minuto. Lavar la resina con 30 mL de ácido acético al 0.5% y finalmente con 50 mL de agua destilada.
4. Colocar en la cabeza de la columna, 10.00 mL de vino y arrastrar la muestra con 25 mL de ácido acético al 0.5%.
5. Lavar con 50 mL de agua destilada.
6. Eluir los ácidos adsorbidos con solución de sulfato sódico 0.5 M.
7. El ácido láctico eluye en los primeros 30 mL y el ácido tartárico en la fracción comprendida entre los 46 y 75 mL.
8. Recoger las muestras en probetas graduadas.
9. Colocar en un matraz aforado de 50 mL, 25.00 mL de la fracción recogida entre 46 y 75 mL bien mezclada, que contiene el ácido tartárico.
10. Añadir 0.5 mL de ácido acético concentrado y 2 mL de la solución de metavanadato sódico y completar a volumen con agua destilada.
11. Se mezcla bien y se deja en reposo durante unos 80 minutos a la temperatura ambiente.
12. Se mide la absorbancia a través de una cubeta de 10 mm de paso de luz y en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 480 nm.
13. Realícese un ensayo en blanco, con 25.00 mL de solución de sulfato sódico 0.5 M, 0.5 mL de ácido acético concentrado y 2 mL de solución de metavanadato, diluido con agua hasta 50 mL.
14. Se prepara una gráfica con soluciones patrón de ácido tartárico y la absorbancia de la muestra se compara con los valores de la gráfica.

4. G. Hill y A. Caputi Jr., *Am. J. Enol. Vitic.*, 21, páginas 153-161, (1970).

Cítrico

plomo IV, formándose en presencia del ácido diazosulfanílico, un compuesto amarillo, que se cuantifica colorimétricamente a 420 nm.

COMENTARIOS

La presencia de este ácido en las uvas es muy escasa, de un orden máximo de 0.08%. En los vinos normales, es muy extraño hallar valores superiores a 0.5 g/L. En general oscilan entre 0.1 a 0.3 gramos por litro.

En algunos países, está limitada la cantidad de ácido cítrico presente en los vinos. La legislación española y la de la CEE, no permiten cantidades superiores a un gramo de ácido cítrico por litro de vino. El ácido cítrico, es un producto que se añade a los vinos para aumentar la acidez y para complejar el hierro presente, evitando con ello posibles enturbiamientos.

METODO UNICO DE LA CEE _____

Principio del método

El ácido cítrico, es precipitado por el ión bario, en medio hidroalcohólico y alcalino. Después de la decoloración de la solución acuosa del precipitado bórico, por el carbón activo, se oxida con el acetato de

Reactivos

AMONIACO CONCENTRADO (densidad = 0.910).

SOLUCION DE CLORURO BARICO al 20%, preparada por disolución de 20 gramos de cloruro de bario, reactivo análisis, en agua destilada, enrasando a volumen de 100 mL.

SOLUCION DE LAVADO. Mezclar 140 mL de agua destilada con 300 mL de alcohol de 96%.

SOLUCION DE SULFATO SODICO al 7.1 %, por disolución de 71 gramos de sulfato sódico anhidro, reactivo análisis, en agua destilada hasta un litro.

CARBON ACTIVO.

SOLUCION DE ACETATO SODICO al 27%, obtenida por disolución de 270 gramos de acetato sódico anhidro, reactivo análisis, en agua destilada hasta el volumen de un litro.

SOLUCION DE NITRITO SODICO al 2%, por disolución de 2 gramos de nitrito sódico cristalizado, reactivo análisis, en agua hasta 100 mL (ésta solución se conserva por algún tiempo en frascos de color topacio).

SOLUCION DE ACIDO SULFANILICO. Disolver 1.5 gramos de ácido sulfanílico, en 50 mL de ácido acético concentrado y llevar a volumen de 250 mL con agua destilada. Agitar frecuentemente después de la preparación, y dejar en reposo durante una noche. Manténgase en frascos oscuros y en estas condiciones su conservación es ilimitada.

SOLUCION SATURADA DE ACETATO DE PLOMO IV. Se colocan en un erlenmeyer de 500 mL unos 50 gramos, aproximadamente, de acetato de plomo IV (plomo tetracetato humectado en ácido acético cristalizante) y se añaden 250 mL de ácido acético también cristalizante. Se deja en reposo hasta que aparezca un líquido claro sobrenadante. Esta solución mantenida en frasco oscuro, se conserva indefinidamente.

damente. En el análisis sólo se emplea el líquido claro, por ello se deberá añadir, cuando sea necesario, una cantidad de ácido acético, con objeto de mantener la solución saturada, disponible para el análisis.

SOLUCION DE ACETAT DE PLOMO IV al 1 %, preparada con 5 mL de la solución anterior, que se colocan en un erlenmeyer de 250 mL, al que se añadirán, con rapidez, 50 mL de una solución de ioduro potásico al 10%. Valorar inmediatamente, con una solución 0.05 M de tiosulfato sódico, en presencia de engrudo de almidón, como indicador. Sea n el número de mililitros gastados.

Tomar un volumen de la solución saturada de acetato de plomo IV, igual a la cifra resultante de la siguiente fórmula:

$$2.25 \times 1000/n \text{ en mL}$$

y colocarlo en un matraz aforado de 1 litro, completando el volumen con ácido acético puro. Guardada en frascos oscuros, esta solución se conserva indefinidamente.

Técnica operativa

1. Introducir en un tubo de centrifuga, de una capacidad de 40 a 50 mL. 5.00 mL del vino o mosto a analizar, 1 mL de amoníaco concentrado y 1 mL de solución de cloruro bórico al 20%. Mezclar bien, mediante el empleo de una varilla de vidrio. Después de aproximadamente dos minutos de agitación, se añaden 15 mL de alcohol de 96%, mezclar bien de nuevo con la varilla y dejar reposar 5 minutos.
2. Centrifugar durante 3 a 4 minutos. Despreciar el líquido sobrenadante y lavar el precipitado de la forma siguiente: tomar 2 mL de solución de lavado con una pipeta de 2 mL, apoyar la punta de la misma en la parte superior interior de la pared del tubo y verter el líquido soplando por la pipeta, imprimiendo al mismo tiempo un movimiento de rotación del tubo alrededor de su eje. Poner en suspensión el precipitado, empleando una varilla de vidrio con goma en la punta. Lavar la varilla por dos veces con 2 mL de solución de lavado cada vez, de forma, que no quede ninguna partícula del precipitado adherido a la goma de la varilla. Centrifugar de nuevo.

3. Tirar el líquido y efectuar un segundo lavado del precipitado de igual forma.
4. El precipitado, todavía húmedo, del líquido de lavado, se recubre con unos 10 mL de la solución de sulfato sódico al 7.1 %. Se coloca el tubo en un baño de agua hirviente, durante 10 minutos, agitando con una varilla, de manera que no se formen grumos en el precipitado.
5. Todavía caliente, el contenido del tubo se pasa cuantitativamente a un matraz de 50 mL, con la ayuda de la solución de sulfato sódico al 7.1 %. Se deja enfriar y se lleva a volumen con la misma solución. Se mezcla bien.
6. Se pasa el líquido a un erlenmeyer de 100 mL, que contiene 0.2 gramos de carbón activo. Agitar. Se deja en reposo durante 5 minutos y se filtra sobre papel tupido.
7. Esta es la solución que se emplea para el análisis, que representará el ácido cítrico del vino o del mosto, diluida diez veces.
8. Se emplean dos erlenmeyers de 50 mL, asignados como A y B, que contienen cada uno, 10 mL de solución de acetato sódico al 27%. Añadir a cada uno de ellos, 2.00 mL de la solución a analizar.
9. Preparar en un tubo, la solución de diazoación, añadiendo, con agitación, 5 mL de la solución de ácido sulfanílico y 1 mL de la solución de nitrito sódico. Con agitación, verter en el erlenmeyer A, 2 mL de esta solución recién preparada y 5 mL de ácido acético cristalizante. En el erlenmeyer B, se vierten 2 mL de la solución de diazoación y 5 mL de solución de acetato de plomo IV al 1 % y poner en marcha, inmediatamente, un reloj avisador para 13 minutos.
10. Aproximadamente a los 5 minutos, filtrar el contenido de los erlenmeyers, sobre filtro de papel plegado. Poco tiempo antes de los 13 minutos, verter los líquidos filtrados en las cubetas espectrofotométricas de 30 mm de paso de luz y colocarlas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 420 nm. Cuando se cumpla el tiempo de 13 minutos, se toma la lectura de la densidad óptica de la cubeta B, actuando la cubeta A como ensayo en blanco.

11. Si la solución a analizar es muy concentrada en ácido cítrico y la absorbancia es elevada, diluirla con solución de sulfato sódico al 7.1 %. Las lecturas se contrastan con la curva de calibrado, que indicará la cantidad de ácido cítrico en gramos por litro de vino.

12. En un matraz de 100 mL, se disuelven 273.4 miligramos de ácido cítrico monohidrato (equivalente a 250 mg de ácido cítrico anhidro) con solución de sulfato sódico al 7.1 %, llevar a volumen con la misma solución. Tomar 10.00 mL de esta solución obtenida, pasarla a un matraz de 100 mL y enrasar a volumen con solución de sulfato sódico. Con esta solución preparar las siguientes diluciones, empleando el sulfato sódico al 7.1 % como disolvente:

5.00 mL se completan a volumen de 200 mL			
5.00 mL	id	id	100 mL
5.00 mL	id	id	50 mL
10.00 mL	id	id	50 mL
20.00 mL	id	id	50 mL

Estas diferentes diluciones, corresponden a las soluciones a analizar, equivalentes a vinos que contengan 0.065, 0.125, 0.250, 0.500 y 1 gramos por litro.

13. Tómanse 2.00 mL de cada una de estas diluciones, que se colocan en los erlenmeyers marcados A y B, procediendo al análisis tal como se ha indicado anteriormente. El punto cero de la curva de tarado, se obtiene colocando en los citados erlenmeyers, solamente solución de sulfato sódico. La representación gráfica de las absorbancias, en función de la concentración de ácido cítrico, no es lineal y presenta una ligera curvatura.

METODO SCHNEYDER⁶

Principio del método

El vino tratado con una solución acuosa de bromuro potásico y otra ácida de bromato, forma un precipitado que se elimina por centrifugación. Al líquido claro, se vuelven a añadir de nuevo, las soluciones anteriores más una de anhídrido vanádico. En caliente, se forma una opalescencia, que se mide con el espectrofotómetro a 590 nm. Mediante una gráfica de tarado, se halla la concentración de ácido cítrico.

Reactivos

SOLUCION A. Disolver 10 g de bromuro potásico en agua destilada, contenida en un matraz aforado de 100 mL y enrasar.

SOLUCION B. En un matraz de 100 mL, se disuelven 2.5 gramos de bromato potásico, con unos 50 mL de agua destilada, se añaden 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se completa, cuando esté frío, con agua destilada.

SOLUCION C. Disolver 1 gramo de anhídrido vanádico, en 25 mL de ácido sulfúrico concentrado. Verter esta solución, poco a poco y con agitación, sobre 75 mL de agua destilada.

Técnica operativa

1. En un tubo de centrifuga, se vierten 10.00 mL de vino, 2.5 mL de solución A y 2.5 mL de solución B.
2. Se tapa el tubo y se agita durante 20 minutos. Durante este tiempo tiene lugar la reacción.
3. Se centrifuga a 2000 r.p.m., durante 10 minutos.
4. Se toman 2 mL del líquido claro y se introducen en un tubo de ensayo, con adición de 1 mL de la solución A, 1 mL de la B y 2.5 mL de la solución C, agitando después de cada adición. Se tapa y se sumerge en un baño de agua a 25 °C.

⁶ J. Schneyder, *Mitt. Robe Wein Obstau, Fruechterevert.* (Klosterneuburg), 19, páginas 122-123, (1955).

5. La opalescencia formada, se mide en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 590 nm, en comparación con agua destilada.
6. Se prepara una gráfica de tarado, empleando soluciones patrón entre 0.1 a 0.5 gramos de ácido cítrico por litro. La densidad óptica medida en el análisis del vino, se compara con los valores de la curva patrón.
7. El vino a analizar, no debe contener una cantidad mayor de 0.5 gramos de ácido cítrico por litro.

METODO ENZIMATICO _____

Principio del método

El ácido cítrico, o sus sales, se convierten en oxalacetato, reacción que es catalizada por la enzima citrato liasa (CL). La cantidad de NADH oxidada, se corresponde cuantitativamente, con la cantidad de citrato. Se mide a la longitud de onda de 340 nm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número de catálogo 139076, para 30 determinaciones, que contiene lo siguiente: 2 frascos con reactivos, que deberán reconstituirse con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como su reconstitución, se indica en el folleto que acompaña a cada test.

Técnica operativa

1. La determinación del ácido cítrico libre, que es la forma normal en que se encuentra el ácido en el vino, puede realizarse en vinos blancos o tintos sin dilución ni decoloración alguna.
2. Se preparan las cubetas de 10 mm de paso de luz, que se recomiendan sean de plástico para un solo uso con objeto

de evitar contaminaciones. El espectrofotómetro con lámpara de tungsteno, se sitúa a 340 nm de longitud de onda.

3. Efectuar una dilución del vino de diez veces, si la concentración de ácido cítrico sobrepasa 0.4 g/L.
4. Seguir paso a paso las indicaciones del folleto adjunto al test de análisis.

Cálculos

El cálculo de la concentración de ácido cítrico, se determina por la diferencia de las absorbancias leídas, siguiendo las instrucciones dadas en el folleto.

Puede expresarse el ácido cítrico hallado como, anhidro o monohidrato, para ello las fórmulas a aplicar serán:

$$c = 0.460 \times Ac \text{ g/L anhidro}$$

$$c = 0.503 \times Ac \text{ g/L monohidrato}$$

siendo *Ac* la diferencia de absorbancias leídas.

Observaciones

a) Para determinar el ácido cítrico total, en el que se incluye el ácido salificado, se procede como sigue: En un matraz provisto de refrigerante de reflujo, se colocan 20.00 mL de vino y 6 mL de solución alcohólica de hidróxido potásico, aproximadamente 2 M, y se hierve durante 10 minutos. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se neutraliza con ácido sulfúrico 2 M. Cuantitativamente se pasa a un matraz de 50 mL y se enrasa con agua. De este líquido se toman 10.00 mL y se llevan a volumen de 100 mL con agua destilada. Esta dilución es la que se emplea en el análisis. En caso de que sea muy concentrada, se diluyen 5.00 mL a 100 mL. Los cálculos son los mismos, que en la determinación del ácido cítrico libre.

b) Esta metódica, como todas la enzimáticas, son muy específicas y por ello el gran interés de su aplicación en la determinación del ácido cítrico en el vino. La laboriosidad del método químico, hace problemático el resultado, dada la gran cantidad de manipulación necesaria para llevarlo a cabo.

Málico

COMENTARIOS

Por su concentración, es el segundo ácido de importancia en la uva. En el fruto verde, su presencia es elevada y disminuye a medida que avanza la maduración, principalmente durante los meses de julio y agosto. En la madurez, la cantidad presente puede ser de un 10 al 35%, mientras que cuando está verde, alcanza hasta un 65% de la acidez.

Peynaud⁷ considera que la desaparición del ácido málico durante la fermentación es debida a la separación de los dos átomos de hidrógeno y, posterior decarboxilación del ácido oxalacético a etanal, que actúa como acceptor de hidrógeno y se transforma en alcohol.

El ácido málico es de importancia en el vino, ya que es el más fácilmente atacable por microorganismos, en comparación con el tartárico o succínico. En los vinos que han sufrido la fermentación maloláctica, puede darse el caso de total ausencia de este ácido. Puede suceder también que, en vinos obtenidos de cosechas verdes, la concentración de ácido málico alcance los 6 gramos por litro.

7. E. Peynaud y A. Maurié, *Ann. Inst. natl. recherche agron.*, serE4, páginas 111-139, (1956).

METODO AMERICAN SOCIETY OF ENOLOGISTS⁸

Principio del método

Se utiliza la enzima L-málico dehidrogenasa, para catalizar la reacción entre el ácido málico y la NAD (nicotinamida adenina dinucleótido), formando ácido oxalacético y la forma reducida del dinucleótido (NADH). El ácido oxalacético se fija por la hidracina, en solución alcalina. La reacción se mide por el cambio en el coeficiente de extinción a 340 nm, debido a la reducción del NAD a NADH.

Reactivos

TAMPON DE pH 9.5. En un matraz aforado de 100 mL, se colocan 7.5 gramos de glicina, 5.2 gramos de sulfato de hidracina y 0.2 gramos de EDTA, un poco de agua para que queden en suspensión y luego se añaden 51 mL de hidróxido sódico 2 M, enrasando al volumen con agua destilada. Esta solución es estable durante una semana, si se mantiene a una temperatura inferior a 4 °C.

SOLUCION NAD, disolver 420 miligramos de NAD en 12 mL de agua destilada. Esta solución se conserva cuatro semanas a 5 °C.

SOLUCION DEHIDROGENASA MALICA, por disolución de 10 miligramos en 2 mL de agua. Esta suspensión es estable durante un año a 5 °C.

Técnica operativa

1. En un tubo de ensayo pequeño, se colocan 0.9 mL del tampón de pH 9.5. Se añade 1 mL de agua destilada y 1.00 mL del vino o mosto a analizar, con un contenido de ácido málico entre 10 y 40 microgramos. Para ello hay que diluir la muestra de 100 a 200 veces.
2. Se añaden a continuación, 0.1 mL de NAD (35 miligramos/mL) y se mezcla bien.

8. B. Gump, S. Saguandeekui y otros, *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 3, páginas 248-251, (1985).

3. En el espectrofotómetro se colocará una cubeta con paso de luz de 10 mm con la muestra anterior y se leerá la absorbancia a 340 nm. Este valor de absorbancia se asigna con la letra A1.
4. Se añaden seguidamente 4 microlitros de la solución de dehidrogenasa málica y se mezcla. Se coloca en la estufa a 37 °C, durante 30 minutos.
5. Transcurrido el tiempo indicado, se enfría a 25 °C durante 6 minutos y se lee la absorbancia de nuevo. Sea A2 el valor leído.
6. Se prepara una gráfica con soluciones patrón de ácido málico, a partir de una solución standard que contenga 40 gramos por litro.

Cálculos

La absorbancia causada por el ácido málico, se calcula según la fórmula siguiente: $A2-A1$. Este valor se lleva a la gráfica y de ella se deduce la concentración de ácido málico, que deberá ser multiplicada por el factor de dilución que haya tenido lugar.

METODO O. I. V. (Af 33) _____

Principio del método

El ácido málico, separado mediante el empleo de una columna cambiadora de aniones, se determina colorimétricamente en el eluido que también contiene ácidos tartárico y láctico. Por la acción del ácido sulfúrico concentrado y el ácido cromotrópico, se forma una coloración amarilla. La intensidad de este color depende en gran manera de la concentración del ácido sulfúrico, por ello es necesario regularla con mucha precisión. El ácido láctico y el ácido málico provocan, junto con el ácido tartárico, una reacción interferente que colorea de azul-violeta el ácido cromotrópico debido al metanal formado. El resultado de la medida deberá corregirse, previa determinación de las concentraciones del ácido tartárico y láctico.

Reactivos

SOLUCION ACIDO CROMOTROPICO al 5%. Es necesario prepararla en el momento del uso, disolviendo 500 miligramos de cromotopato sódico, en 10 mL de agua destilada.

ACIDO SULFURICO al 96%. Se parte del ácido del 98%, previa valoración y de éste se prepara exactamente, la solución del 96% de ácido sulfúrico.

SOLUCION DE SULFATO SODICO al 7.1% preparada con 71 gramos de sulfato sódico anhidro y agua destilada hasta el volumen de un litro.

SULFATO SODICO 0.5 M.

ACIDO ACETICO al 30%. ACIDO ACETICO al 0.5%.

RESINA ANIONICA FUERTE, 11/ MERCK.

Técnica operativa

1. Colocar la resina en una columna de vidrio. La resina debe estar en suspensión en ácido acético al 30%.
2. Se lava con ácido acético al 0.5% varias veces.
3. Después del lavado, se vierten en la columna 10.00 mL de vino, se abre el grifo de la columna y se deja fluir el líquido a una velocidad de 1-1.5 gotas por segundo.
4. Se lava la resina con agua.
5. Con la solución de sulfato sódico, se eluyen los ácidos fijados en la resina.
6. En un tubo con tapón esmerilado, de una capacidad aproximada de 50 a 60 mL, se coloca 1.00 mL del líquido eluido de la resina.
7. En un tubo igual, se prepara un ensayo en blanco, colocando en él, 1 mL de solución de sulfato sódico.
8. A cada uno de los tubos se añade 1 mL de ácido cromotrópico y 10 mL de ácido sulfúrico. Tapar y agitar, de forma que se obtenga una homogeneidad perfecta, pero sin que el líquido llegue a mojar el tapón.

9. Sumergir los tubos en un baño de agua, en enérgica ebullición, manteniendolos así durante 20 minutos exactos.
10. Enfriar los tubos a 20 °C. Después de 90 minutos exactos, desde el enfriamiento, medir la densidad óptica con respecto al ensayo en blanco. La longitud de onda de trabajo del espectrofotómetro, en 429 nm.

Cálculos

Leer en la gráfica de tarado, el valor del ácido málico en bruto y asignado como M. El valor real de ácido málico, se deduce por la siguiente fórmula:

$$M = \frac{(0.15 \times TL)}{1 - (0.02 \times T)}$$

en la que T igual a la concentración de ácido tartárico en la muestra y L igual al ácido láctico de la misma.

Para preparar la gráfica patrón, se disolverán 250 miligramos de ácido málico puro, racémico o levógiro, (los dos dan la misma reacción), en solución de sulfato sódico 7.1 %, llevando el volumen a 500 mL. Tomar 5.00, 10.00, 15.00, ... 35.00 mL de esta solución, verterla en matraces de 50 mL y completar a volumen con la solución de sulfato sódico. Las soluciones obtenidas, corresponden a un eluado de vino que contiene 0.5, 1.0, 1.5, ... 3.5 gramos de ácido málico por litro.

METODO ENZIMATICO _____

Principio del método

En presencia de l-malato dehidrogenasa, el ácido l-málico o sus sales, es oxidado por el NAD a oxalacetato. La reacción, catalizada por la enzima glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT), el oxalacetato se convierte en l-aspartato, en presencia de l-glutamato.

La cantidad de NADH formada, es esteoquímica con la concentración de l-malato. La NADH es la que provoca la absorbancia en la longitud de onda de 340 nm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número de catálogo 139068, para 25 determinaciones. Contiene 4 frascos con reactivos, alguno de los cuales se debe reconstituir con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como su reconstitución, se indica en el folleto que acompaña a cada test analítico.

Técnica operativa

1. Se preparan las cubetas de 10 mm de paso de luz, recomendándose que sean de plástico de un solo uso, con objeto de evitar contaminaciones. El espectrofotómetro, con lámpara de tungsteno, se sitúa a 340 nm de longitud de onda.
2. Si la concentración del ácido málico en el vino o mosto, no sobrepasa los 2 g/L, se diluye de la siguiente forma: 10.00 mL de vino en un matraz aforado de 100 mL y se completa el volumen con agua destilada. Si la concentración del ácido en la muestra es superior a los 2 g/L se efectúa una dilución de 1.00 mL a 100 mL.
3. Como lo importante es la determinación del ácido libre, se efectúa el análisis sobre la dilución.
4. Seguir paso a paso, las indicaciones del folleto adjunto al test analítico.

Cálculos

A partir del dato de la absorbancia, se calcula la concentración del ácido málico, de acuerdo a la fórmula:

$$c = 0.472 \times A_m \text{ en g/L}$$

deberá tenerse en cuenta el factor de dilución, efectuado al iniciar el análisis.

Observaciones

Para determinar el ácido málico total, en el que se incluyen sus sales, se procede de la siguiente forma: En un matraz provisto de

refrigerante de reflujo, se colocan 20.00 mL de vino y 6 mL de solución acuosa de hidróxido sódico 2 M, se hierve durante 30 minutos. Déjese enfriar a la temperatura ambiente y seguidamente se neutraliza con ácido sulfúrico 1 M, empleando papel indicador. Cuantitativamente se traspara a un matraz aforado de 50 mL y se completa al volumen con agua destilada. Esta solución es la que se empleará para el análisis, considerando siempre la dilución efectuada.

Láctico

COMENTARIOS

No existe este ácido en la uva, y es sólo un subproducto minoritario de la fermentación alcohólica, cuya concentración puede oscilar entre 0.02 y 0.8 gramos por litro. Cantidades mayores de ácido láctico, son consecuencia de la transformación del ácido málico por la fermentación maloláctica o, por una excesiva actividad bacteriana.

En el caso de la acción biológica anteriormente indicada, en un vino tinto pueden alcanzarse valores variables entre 3 y 6 gramos de ácido láctico por litro.

METODO AMERICAN SOCIETY OF ENOLOGISTS⁹

Principio del método

Es una reacción colorimétrica, que tiene lugar por oxidación del ácido láctico a etanal, por la presencia de p-hidroxifenilo. Este méto

9. G.J. Pilone y R.E. Kunkee, *Am. J. Enoi. Vitic.*, 21, páginas 12-18, (1970).

do es sensible para concentraciones de ácido láctico comprendidas entre 1 y 10 microgramos por mL (equivalentes a 1 y 10 mg por litro).

La presencia de los ácidos tartárico, málico, cítrico, acético, etanol, glucosa, fructosa y dióxido de azufre, no producen interferencia en el análisis.

Reactivos

SOLUCION DE SULFATO DE COBRE al 20%. Preparada por disolución en agua, de 20 gramos de sulfato cúprico cristalizado con cinco moléculas de agua, hasta 100 mL.

HIDROXIDO CALCICO EN POLVO.

SOLUCION DE SULFATO DE COBRE al 4%. En un matraz de 100 mL, se colocan 4 gramos de sulfato cúprico pentahidrato. Se lleva a volumen con agua destilada.

ACIDO SULFÚRICO CONCENTRADO.

SOLUCION DE p-HIDROXIFENILO al 1.5%, en solución de hidróxido sódico al 0.5%.

Técnica operativa

1. Se diluye el vino con agua, de forma que la concentración de ácido láctico en la muestra esté comprendida entre 10 y 100 microgramos/mL (10 a 100 miligramos por litro).
2. En un tubo de ensayo de 20 x 180 mm, se coloca 1.00 mL de la muestra diluida, 1 mL de solución de sulfato de cobre al 20% y 8 mL de agua destilada.
3. Mezclar. Añadir 1 gramo, aproximadamente, de hidróxido cálcico en polvo. Agitar vigorosamente y dejar en reposo durante 30 minutos.
4. Después de transcurrido el tiempo indicado, se centrifuga.
5. En otro tubo de ensayo igual, se coloca 1.00 mL del líquido claro centrifugado y 0.05 mL de sulfato de cobre al 4%. Con agitación del tubo, se añaden 6 mL de ácido sulfúrico concentrado.
6. Se coloca el tubo de ensayo en un baño de agua hirviente y se deja 7 minutos. Se enfría a temperatura inferior a 20 °C, en un baño de hielo y agua.

7. Al líquido frío, se añade, 0.1 mL de la solución de phidroxifenilo y se agita. Se coloca el tubo en estufa a 30 °C durante 15 minutos, después de este tiempo se agita, y de nuevo se coloca en la estufa 15 minutos más.

8. Se retira de la estufa y se sumerge en un baño de agua hirviente, durante 1.5 minutos, para disolver el precipitado. Luego se enfría el tubo al chorro del agua.

9. Cuando frío, se lleva al espectrofotómetro, para leer la densidad óptica a 560 nm en cubeta de 10 mm de paso de luz.

Cálculos

Para preparar la curva patrón, se emplearán soluciones de lactato de litio en agua, con concentraciones equivalentes a 0, 10, 20, 30, 50 y 70 miligramos de ácido láctico por litro.

METODO ENZIMATICO

Principio del método

El ácido láctico, en presencia de l-lactato-dehidrogenasa (l-LDH), es oxidado por la nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD) a piruvatos. La cantidad de NADH formada, es proporcional a la concentración de ácido l-láctico. Este aumento de la NADH se determina por su absorbancia a 340 nm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número de catálogo 139084, para 25 determinaciones. Contiene 4 frascos con reactivos, alguno de los cuales se debe reconstituir con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como su reconstitución, se indica en el folleto que acompaña a cada test analítico.

Técnica operativa

1. Se preparan las cubetas de 10 mm de paso de luz, recomendándose que sean de plástico de un sólo uso, con objeto de evitar contaminaciones. El espectrofotómetro, con lámpara de tungsteno, se sitúa a 340 nm de longitud de onda.
2. Si la concentración de ácido láctico en el vino o mosto no sobrepasa los 2 gramos por litro, se diluye de la siguiente forma: 10.00 mL de vino en un matraz aforado de 100 mL y se completa el volumen con agua destilada. Si la concentración del ácido en la muestra es superior a los 2 g/L, se efectúa una dilución de 1.00 mL a 100 mL.
3. Se efectúa el análisis de estas diluciones, siguiendo los detalles indicados en el folleto que acompaña los tests analíticos.

Cálculos

A partir del dato de la absorbancia, se calcula la concentración del ácido láctico, de acuerdo a la fórmula:

$$c = 0.320 \times A / \text{en g/L}$$

deberá tenerse en cuenta el factor de dilución, efectuado al iniciar el análisis.

Observaciones

Para la determinación del ácido láctico total, incluidas sus sales, se prepara un matraz con refrigerante de reflujo y se introducen 20.00 mL del vino y 2 mL de solución de hidróxido sódico 2 M. Se hierve durante 15 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y se neutraliza con ácido sulfúrico 1 M. Se pasa cuantitativamente a un matraz de 50 mL y se completa con agua destilada el volumen. Se utiliza esta muestra para el análisis, siempre considerando la dilución efectuada. Vinos con alto contenido de azúcar, se deberán hervir con agua en vez de la solución de hidróxido sódico, y el tiempo de ebullición el mismo.

Ascórbico

COMENTARIOS

Como sucede con el ácido cítrico, sólo se encuentran pequeñas cantidades de ácido ascórbico en el mosto (de 1 a 18 mg por 100 gramos de uvas). En los vinos, el nivel normal es de unos 2 miligramos por litro.

Las cantidades pueden ser muy superiores en muchos vinos, pero en tal caso, ha sido por adición como agente antioxidante. Es interesante hacer notar que, cantidades del orden de 25 a 50 mg/L, mantienen el potencial redox (o valor ITT), durante un período de 15 a 20 meses. Este producto no puede sustituir al dióxido de azufre, por no bloquear el etanal, como efectúa el sulfuroso.

METODO CEE. Ascórbico total _____

Principio del método

Análisis del ácido ascórbico total. Este ácido, se oxida por el iodo, a ácido dehidroascórbico, que se precipita por la 2,4-dinitrofenilhidracina en bis (2,4-dinitrofenilhidrazona). Después, separación por cromatografía en capa fina y solubilización en medio

acético. Este último compuesto se colorea en rojo y se determina espectrofotométricamente a 500 nm.

Reactivos

SOLUCION ACIDO METAFOSFORICO al 30% (p/v). Pesar en un mortero, 30 gramos de ácido metafosfórico. Lavar rápidamente con agua destilada, con agitación. Tirar el agua de lavado. Disolver el ácido lavado, en agua destilada, con ayuda de agitación. Pasar a un matraz de 100 mL y completar a volumen con agua destilada. Esta solución es aproximadamente del **30%** y su conservación máxima es de una semana, mantenida en el refrigerador.

SOLUCION ACIDO METAFOSFORICO al 3%. Esta solución se prepara extemporáneamente, a partir de la dilución de la solución del 30%.

SOLUCION ACIDO METAFOSFORICO al 1%. También se prepara en el momento del uso, a partir de la solución del 30%.

SUSPENSION DE POLIAMIDA. Se pesan 10 gramos de polvo de poliamida para cromatografía. Se mezclan con 60 mL de agua destilada y se dejan en reposo durante 2 horas. Esta cantidad es suficiente para 4 determinaciones.

TIOUREA.

SOLUCION 0.05 M DE IODO.

SOLUCION DE 2,4-DINITROFENILHIDRACINA al 6%, en una mezcla a partes iguales de ácido acético y ácido sulfúrico. La 2,4-fenilhidracina se pone en suspensión, en 50 mL de ácido acético cristalizante. La solubilización se obtiene por adición del mismo volumen de ácido sulfúrico concentrado.

ACETATO DE ETILO adicionado de 2% (v/v) de ácido acético cristalizante.

CLOROFORMO.

GEL DE SILICE G, para cromatografía. *ALMIDON*

SOLUBLE, en solución al 0.5%.

DISOLVENTE: Preparado con 50 partes (en volumen) de acetato de etilo, 60 partes de cloroformo, y 5 partes de ácido acético cristalizante. Antes del empleo, hay que dejarlo reposar un mínimo de 12 horas.

ACIDO ASCORBICO.

Técnica operativa

Oxidación a ácido dehidroascórbico

1. En un matraz de 100 mL, se colocan 50.00 mL de vino al que se añaden 15 mL de suspensión de poliamida y se enrasa con la solución de ácido metafosfórico al 3 %. Se deja en reposo durante 1 hora, agitando frecuentemente.
2. Filtrar sobre papel de filtro plegado. Colocar 20 mL del filtrado en un tubo de centrifuga, de unos 50 mL de capacidad con tapón esmerilado. Añadir 1 mL de solución 0.05 M de iodo. Se mezcla bien y después de 1 minuto, se reduce el exceso de iodo, por adición de unos 25 mg de tiourea.

Formación y extracción de la «bis» (2,4-dinitrofenilhidrazona) del ácido dicetogulónico

3. Colocar el tubo en un baño de agua a una temperatura comprendida entre 5 y 10 °C. Añadir 4 mL de solución de 2,4-dinitrofenilhidracina. Mezclar suavemente, evitando mojar el tapón. Dejar de inmediato el tubo, bien tapado, en un baño de agua a 20 °C, durante 16 horas (una noche).
4. Introducir 15 mL de acetato de etilo con acético, en el tubo. Tapar bien y agitar enérgicamente, durante 30 segundos. Inmediatamente centrifugar 5 minutos a 1000-2000 revoluciones por minuto.
5. Tomar con una pipeta, 10.00 mL del acetato de etilo centrifugado y colocarlo en un erlenmeyer pequeño, con tapón esmerilado.
6. Se introducen en el tubo, 5 mL de acetato de etilo con acético, agitar de nuevo durante 30 segundos y centrifugar otra vez a la misma velocidad. Se toman 5.00 mL del acetato de etilo de extracción y colocarlos en el erlenmeyer en donde se hallan los 10 mL anteriores. Mezclar bien.

Separación de la «bis» (2,4-dinitrofenilhidrazona) por cromatografía en capa fina

7. Sobre una placa Merck o equivalente de gel de sílice y a 2 cm del borde, colocar a lo largo de la línea de partida, 0.2 mL del acetato de etilo de extracción.
8. En la cuba de cromatografía, se coloca el disolvente hasta una altura de 1 cm. Una vez tapada la cubeta, dejar que la atmósfera interior se sature de los vapores.
9. Se coloca luego la placa cromatográfica en el interior y, una vez tapado, se deja ascender el disolvente hasta casi el borde superior de la placa. Esta separación cromatográfica debe realizarse dentro de las dos horas de efectuada la extracción.
10. Se seca la placa en medio bien ventilado, durante 1 hora. Se coloca la placa en posición vertical, sobre un papel satinado o parafinado, y con una espátula, se raspa la zona coloreada en rojo por la bis (2,4- difenilhidrazona), de tal manera, que se recoja todo el polvo cuantitativamente, por lo tanto deberán evitarse las corrientes de aire.
11. Colóquese el polvo recogido, en un pesa muestras de tapón esmerilado, que contendrá 4 mL de ácido acético cristalizante. Dejar en reposo durante 30 minutos, con agitación frecuente.
12. Se filtra directamente sobre la cubeta espectrofotométrica de 10 mm de paso de luz, con papel de filtro plegado, repasando el filtrado, hasta que el líquido esté perfectamente límpido.
13. Medir la absorbancia a 500 nm, empleando ácido acético como líquido de referencia.

Cálculos

Trazado de la curva de referencia. Preparar una disolución de ácido l-ascórbico al 1 %, empleando ácido metafosfórico al 1 %, como disolvente. De esta solución, se toman 5.00, 10.00 y 15.00 mL que se colocarán en sendos matraces de 100 mL, completando el volumen con ácido metafosfórico al 1 %, como diluyente.

Con 50.00 mL de cada una de las soluciones anteriores, que contienen 50, 100 y 150 mg de ácido ascórbico por litro, se efectúan las reacciones indicadas anteriormente, para trazar la gráfica correspondiente. Esta resulta ser una recta que pasa por el origen.

METODO CEE, rápido

Principio del método

La cantidad de ácido ascórbico activo, todavía reductor, puede ser determinada aproximadamente, por iodometría directa sobre el vino, en el cual, el dióxido de azufre ha sido bloqueado mediante la adición de etanal o propanal.

Reactivos

SOLUCION DE ETANAL al 6.9%. Obtenida por destilación de metaldehído o paraldehído, en presencia de ácido sulfúrico, valorada por el método del sulfito sódico. Se ajusta esta solución al 6.9%, de forma que 1 mL se combine con 10 miligramos de dióxido de azufre.

ACIDO SULFURICO 1/10 en volumen (180 g/L).

ENGRUDO DE ALMIDON a 5 g/L, al que se ha añadido 200 gramos de cloruro sódico por litro, para su conservación. Esta solución debe hervirse durante 10 minutos, para su preparación.

SOLUCION DE IODO 0.025 M.

Técnica operativa

1. En un erlenmeyer de 250 mL, se vierten 50.00 mL de vino y 5 mL de la solución de etanal. Tapar y dejar en reposo 30 minutos, previa agitación.
2. Añadir 3 mL de ácido sulfúrico al 1/10, valorando con solución de iodo, hasta viraje del engrudo de almidón.

3. Sea n el volumen de solución de iodo gastado en la valoración.

Cálculos

Un mililitro de la solución de iodo 0.025 M, oxida a 4.4 miligramos de ácido ascórbico. El cálculo de la concentración de ácido ascórbico, se halla por la fórmula: $88 \times n$, expresado en miligramos de ácido ascórbico por litro de muestra.

Observaciones

a) Ciertas sustancias del vino son también oxidadas por el iodo en medio ácido, pero el volumen gastado de iodo 0.025 M, para esta oxidación es del orden de unos 0.3 mL. Este método permite reconocer los vinos que han sido adicionados de ácido ascórbico en cantidad superior a los 20 mg/L y que no ha sido transformado en productos de oxidación.

b) Para los vinos tintos, es interesante iluminarlos adecuadamente, para la valoración, con una luz amarilla, obtenida por interposición frente a una lámpara blanca, de una solución de cromato potásico o bien una lámpara de vapor de sodio.

c) Es más fácil preparar la solución de aldehído, mediante el empleo del aldehído propílico. Para ello, basta pesar exactamente, 10 gramos de propanal y llevarlo al volumen de un litro, con agua destilada.

METODO ENZIMATICO _____

Principio del método

El ácido ascórbico y algunas sustancias reductoras, actúan sobre la sal de tetrazolio (MTT) en presencia del reductor PMS a pH 3.5, para obtener formazan. En el ensayo en blanco, sólo la fracción ascorbato, como parte de todas las materias reductoras, es eliminado por oxidación con la oxidasa del ácido ascórbico (AAO), en presencia

de oxígeno. El dehidroascorbato formado no reacciona con MTT/PMS. La absorbancia leída, es proporcional a la cantidad de ascorbato presente en la muestra. El parámetro de medición es el MTT/formazan formado, que se mide a 578 nm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número 409677, para 20 determinaciones. Contiene 3 frascos con reactivos, que se usarán tal como vienen en el test. La conservación de estos reactivos es de un año, si se mantienen a la temperatura de 4 °C.

Técnica operativa

1. Se preparan las cubetas de 10 mm de paso de luz, recomendándose que sean de plástico de un sólo uso, con objeto de evitar contaminaciones. El espectrofotómetro, con lámpara de tungsteno, se sitúa a 578 nm de longitud de onda.
2. Si la concentración de ácido ascórbico no sobrepasa los 200 mg/L, no es necesario efectuar dilución alguna, pero sí se seguirá lo indicado en 3). Si es mayor, la dilución deberá ser de 10 veces y efectuada en las siguientes condiciones: Tratar primeramente como en 3) y emplear como diluyente una solución de ácido m-fosfórico al 1.5% (p/v) ajustada previamente a pH 3.5-4.0 con KOH (5 mol/L).
3. El dióxido de azufre presente en el vino deberá ser tratado cómo sigue: Mezclar 10.00 mL de vino con una gota de formol (aproximadamente 5% p/v), mezclar y dejar reposar 5 minutos a la temperatura ambiente.
4. Seguir las instrucciones del folleto que se adjunta al test, para la realización del análisis.

Cálculos

El contenido de ácido ascórbico, se calculará de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$c = 0.2814 \times A_a \text{ en g/L}$$

Si la muestra ha sido diluida durante la preparación, será necesario multiplicar el resultado por el factor de dilución.

Observaciones

Después de la adición de la solución 3, contenida en el test, la reacción es sensible a la luz, por ello es necesario que las cubetas no estén expuestas a la luz diurna u otra luz intensa.

Succínico

COMENTARIOS

Este es un ácido producto de la fermentación, por ello aparece exclusivamente en el vino. Como regla general, el contenido normal en ácido succínico, es del orden de 1 % del alcohol presente en el vino. Así, un vino con un contenido alcohólico del 10%, la cantidad aproximada de ácido succínico es de 1 g/L.

Durante la fermentación, la cantidad formada de este ácido, dependerá del tipo de levadura y clase de mosto. Es un ácido muy resistente al ataque bacteriano.

METODO PEYNAUD-LAFON¹⁰ _____

Principio del método

Se procede a la extracción directa del vino con éter, y luego se procede a una oxidación de los ácidos extraídos. Una vez elimina-

10. E. Peynaud y otros, *Traité d Oenologia, vol 1, Analyse et Contrôle des Vins, (1977).*

dos los ácidos volátiles, el ácido succínico se valora potenciométricamente. Parte del ácido cetoglutárico, también viene valorado por este procedimiento.

Reactivos

ACIDO SULFÚRICO al tercio en volumen.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 0,05 M.

SOLUCION SATURADA DE PERMANGANATO

POTASICO.

SOLUCION DE HIDROXIDO DE BARIO, 0.05 M.

SOLUCION DE HIDROXIDO DE BARIO saturada.

SOLUCION SULFITO ACIDO DE SODIO, solución

saturada. ÉTER ETILICO.

Técnica operativa

1. Verter 20.00 mL de vino en un vaso de 100 mL y colocarlo en un baño de vapor, para reducir el volumen a unos 10 mL.
2. Enfriar y verter el contenido a un extractor líquido-líquido, lavando el vaso con 1 mL de ácido sulfúrico al 1/3 y 9 mL de agua destilada.
3. Añadir 10 mL de agua y extraer con éter, durante 5 horas. Este tiempo depende de la eficiencia del extractor y deberá ser establecido de antemano.
4. Evaporar el éter.
5. Añadir 1 mL de ácido sulfúrico al 1/3, 10 mL de solución de permanganato y dejar hervir durante 15 minutos.
6. Enfriar la solución y añadir unas gotas de solución saturada de sulfito, para eliminar el exceso de permanganato.
7. Para eliminar los ácidos volátiles, se destila con arrastre de vapor, hasta recoger 300-400 mL de destilado. Ahora la solución residual, sólo contiene ácido sulfúrico y succínico.
8. Con un medidor de pH se ajusta a pH 4.18, con adición, en primer lugar, de solución saturada de hidróxido de bario y luego con la solución de bario 0.05 M.

9. Alcanzado el valor de pH 4.18, se procede a la valoración con hidróxido de bario 0.025 M, hasta llegar al valor de pH 7.50.

Cálculos

La cantidad de ácido succínico, se halla por aplicación de la siguiente fórmula:

$$\frac{V \times M \times 33.734}{V}$$

en donde:

V= volumen gastado de hidróxido de bario 0.025 M.

M= molaridad de la solución de hidróxido de bario.

v= volumen de la muestra.

METODO M. CASTINO¹¹

Principio del método

Separación mediante una resina aniónica, oxidación permangánica de las sustancias orgánicas extrañas, extracción con éter y determinación colorimétrica del complejo formado, con el cloruro férrico e hidroxilamina.

Reactivos

SOLUCION ACUOSA DE CARBONATO AMONICO, al 6% aproximadamente.

CARBONATO AMONIO 0.15M, preparada por dilución de la solución al 6%, de forma que neutralice exactamente a una solución de ácido sulfúrico 0.15 M.

PERMANGANATO POTASICO, solución saturada.

11. M. Castino, *Vini Ital.*, 11, páginas 509-521, (1969).

SOLUCION SULFATO FERROSO al 40 % (p/v).

ETER ETILICO, recientemente destilado sobre hidróxido sódico.

ETILENGLICOL.

ACIDO SULFÚRICO DILUIDO 1:1, (v/v) con agua destilada.

SOLUCION CLORHIDRATO HIDROXILAMINA al 10% (p/v).

SOLUCION HIDROXIDO SODICO, 4.5 M.

REACTIVO FERRICO, preparado con 20 gramos de cloruro férrico cristalizado con 6 moléculas de agua, disueltos en aproximadamente 500 mL de agua destilada. Se añaden 20 mL de ácido sulfúrico concentrado y se completa a volumen de un litro con agua.

Aparatos

Extractor líquido-líquido para disolventes más ligeros que el agua. Dos columnas de vidrio iguales, unidas entre ellas y colocadas una sobre la otra, de 65 mm de longitud y 8 mm de diámetro interior cada una. Una de las columnas se rellena con resina cambiadora catiónica fuerte, en ciclo ácido, Dowex 50W-X8 (o equivalente) de 50/100 mallas y la otra columna con resina aniónica fuerte, Dowex 1X8, de 100/200 mallas, en ciclo carbonato.

Técnica operativa

1. Se diluye la muestra de vino, tomando 2.00 mL y llevando a volumen de 20 mL con agua destilada. La muestra de vino o mosto debe estar perfectamente filtrada.
2. Se hace pasar esta dilución, por la columna catiónica, que es la que está situada en la parte superior, y seguidamente circula también por la resina aniónica. En la primera columna quedan retenidos los aminoácidos y los cationes, mientras que en la segunda quedan fijados los ácidos del vino.
3. Se separan las dos columnas, y se eluye el ácido succínico de la columna aniónica, con el empleo de 35 mL de carbonato amónico 0.15 M.
4. El eluado, recogido en un matraz de 100 mL, se lleva a ebullición durante unos minutos, tiempo necesario para descomponer la mayor parte del carbonato amónico.

5. Se acidifica con 2 mL de ácido sulfúrico 5 M y se añade gota a gota, la solución de permanganato potásico, hasta un abundante precipitado, persistente, de meta-hidróxido mangánico.
6. Se concentra la solución, por ebullición, hasta unos 7-8 mL. Después de frío se elimina el exceso de permanganato, con algunas gotas de solución de sulfato ferroso.
7. Se pasa cuantitativamente la solución al tubo del extractor, lavando el matraz con una pequeña cantidad de agua destilada.
8. Se pone en marcha el extractor y al cabo de unas 12 horas, puede suspenderse la extracción.
9. El extracto etéreo, se pasa en pequeñas porciones a un cristizador de 4 cm de diámetro, colocado sobre una placa ligeramente caliente, para ir eliminando el éter, lavando el balón del extractor, por tres veces, con unos 2 mL de éter cada vez.
10. Evaporado el disolvente, se coloca el cristizador en una estufa regulada de 70 °C, durante 30 minutos.
11. El residuo se disuelve con 2 mL de hidróxido sódico 0.25 M (el succinato sódico es más soluble que el ácido succínico).
12. La solución así obtenida es la que se emplea para la determinación colorimétrica. La cantidad de muestra, permite efectuar el análisis por duplicado.
13. En un tubo de ensayo, con tapón esmerilado, se introducen 0.5 mL de la solución, (que contendrá de 0.4 a 1.5 gramos de ácido succínico por litro), 1.5 mL de etilenglicol y 0.2 mL de ácido sulfúrico 1:1. Se mezcla bien y se sumerge el tubo en un baño de agua hirviendo, durante 20 minutos.
14. Cuando frío, se añade 0.5 mL de la solución de hidroxilamina y 2 mL de la solución de NaOH 4.5 M. Se agita durante 1 minuto y después se adicionan 10 mL del reactivo férrico y se agita enérgicamente. Se pone el tubo al chorro de agua fría.
15. Transcurridos 5 minutos, se hace la lectura en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 500 nm. Se efectúa una prueba en blanco, con todos los reactivos.

16. Las cubetas espectrofotométricas, tendrán un paso de luz de 20 mm. Si la concentración de ácido succínico es baja, podrá hacerse uso de cubetas de 40 a 50 mm de paso de luz.

Cálculos

Se prepara una gráfica, con el empleo de ácido succínico puro, reactivo para análisis, contrastando las lecturas de absorbancia de las muestras, con la curva obtenida con soluciones patrón.

Observaciones

La columna de resina catiónica, se regenera con 50 mL de ácido clorhídrico 2 M. La aniónica, con 50 mL de solución de carbonato amónico al 6%, lavadas después con agua destilada, hasta neutralidad del eluyente. Con el uso, la resina aniónica cambia de color, debido a las sustancias polifenólicas del vino, pero ello no modifica de ninguna forma, su propiedad de trabajo. Se recomienda sustituir las resinas, después de unas 30 determinaciones.

METODO ENZIMATICO _____

Principio del método

En presencia de succinil-CoA sintetasa (SCS), inosina-5'-trifosfato (ITP) y la coenzima A (coA), el ácido succínico se convierte a succinil-CoA, con formación simultánea de inosina-5'-difosfato (IDP). Este último se transforma a piruvato y es reducido por la NADH. La cantidad de NADH oxidada es estequiométrica con la cantidad de ácido succínico.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número de catálogo 176281, para 10 determinaciones, que contiene cuatro frascos con reactivos, algunos de los cuales deberán reconstituirse con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como su reconstitución, se indica en el folleto que acompaña a cada test.

2.48

Técnica operativa

1. Para el análisis, no es necesaria la dilución ni la decoloración de la muestra de vino.
2. Se preparan cubetas de plástico de 10 mm de paso de luz. El espectrofotómetro con lámpara de tungsteno, se sitúa a 340 nm de longitud de onda.
3. Seguir las instrucciones del análisis, en el folleto que se acompaña a cada test analítico.

Cálculos

Para hallar la concentración del ácido succínico en la muestra, de acuerdo a las instrucciones, deberá anotarse la diferencia de absorbancias y aplicarla a la siguiente fórmula:

$$\text{Acido succínico} = 0.613 \times A_s \text{ en g/L}$$

2.49

Acido glucónico

COMENTARIOS

Este ácido aparece, principalmente, cuando la uva ha sido atacada por *Botrytis*. Esto es debido a la enzima glucosa-oxidasa, que provoca la oxidación de la función aldehídica de la glucosa, con formación de ácido glucónico. Esta enzima, también puede ser aportada por el *Acetobacter*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Fusarium*.

Es muy importante disponer de un método analítico, aplicable a los mostos además de los vinos, pues de esta forma puede tenerse conocimiento de si la uva ha sido atacada por la *Botrytis*. Si éste análisis se efectúa en los vinos y, el resultado es positivo, indica que ha sido obtenido de uvas podridas.

METODO PEYNAUD Y CHARPENTIE¹² _____

Principio del método

Se basa en la producción de metanal, por oxidación periódica del ácido glucónico. Es necesario efectuar una defecación previa, para eli-

12. E. Peynaud y Y. Charpentié, *Ann. Falsif. Fraudes.*, 46, 14, (1953).

minar polifenoles, gomas y pectinas, tanto de los vinos como en los mostos. El ácido glucónico, se precipita en forma de sal cálcica. Hay que eliminar cualquier traza de azúcar, que sería una causa importante de error y, por ello, se procede a una segunda precipitación. Este segundo precipitado, es el que se oxida con el ácido periódico, efectuando luego, el análisis colorimétrico del metanal.

Reactivos

CARBON ACTIVO, de fuerte poder decolorante.

ACIDO CLORHIDRICO.

ALCOHOL ETILICO de 96% y 72%.

FENOLFTALEINA al 1%.

SOLLICION CLORURO CALICICO al 20%.

SOLUCION ALCALINA, preparada con: 100 mL de amoníaco concentrado, 40 gramos de hidróxido sódico y agua destilada hasta un litro.

SOLUCION AZUL DE BROMOTIMOL.

ACIDO SULFÚRICO CONCENTRADO. ACIDO

SULFÚRICO al 1/3.

ACIDO PERIODICO N/50.

SOLUCION DIOXIDO DE AZUFRE, a 1 gramo por litro.

REACTIVO CROMOTROPICO, preparado con: 50 gramos de ácido cromotrópico (ácido dihidro-1-3-naftalendisulfónico-3-6) y agua destilada suficiente para un litro. Este reactivo se conserva unos diez días en lugar oscuro y a una temperatura de 0 °C.

Técnica operativa

Defecación de la muestra

1. Se decolora un volumen de vino o mosto, con la cantidad necesaria de carbón activo de enérgico poder decolorante. De esta forma se separan las antocianinas, heterósidos, flavonas y taninos, que por la acción oxidante del ácido periódico-

dico, producirían pequeñas cantidades de metanal. El ácido glucónico no es absorbido, aunque se utilice un exceso de carbón activo.

2. Se toman 5.00 mL del vino decolorado y se colocan en un tubo de centrifuga de unos 50 mL de cabida. Se acidifica con 2 gotas de ácido clorhídrico, para liberar los ácidos. Se añaden 25 mL de alcohol de 96%. Se mezcla y se deja en nevera 24 horas. Las gomas y materias pécticas se precipitan durante este tiempo.
3. Se centrifuga y decanta el líquido a un pequeño erlenmeyer. Al residuo del tubo se añaden nuevamente 5 mL de alcohol de 96%, se pone en suspensión el residuo y de nuevo se centrifuga, reuniendo el alcohol que sobrenada con el primer líquido.

Precipitación doble del ácido glucónico

4. Se añade a la solución alcohólica anterior, que contiene el ácido glucónico de la muestra, algunas gotas de solución de fenoltaleína, 1 mL de solución de cloruro cálcico y solución alcalina, gota a gota, hasta viraje de la fenoltaleína. Se mezcla bien y se deja en la nevera.
5. El precipitado que se obtiene, se separa por centrifugación, y lavado por dos veces con 10 mL de alcohol del 72 %, cada vez. El residuo centrifugado, se trata con 5 mL de ácido clorhídrico 0.5 M, aproximadamente. El precipitado se disuelve completa y rápidamente.
6. De nuevo se vuelve a precipitar, por adición de 1 mL de solución de cloruro cálcico. Se añade solución alcalina, lentamente, hasta cambio de color de la fenoltaleína. Se añaden 25 mL de alcohol de 96%. La coloración rosa desaparece, pero el pH debe permanecer con el valor de 8.0 (se comprueba el toque con la solución de bromotimol, que debe permanecer azul). Se mezcla y se deja en reposo de nuevo en la nevera, durante 4 horas.
7. El precipitado formado durante el reposo se lava con 10 mL de alcohol de 72%.
8. Con un chorro de agua destilada se traslada, con la ayuda de un embudo, a un matraz de 50 mL.

Oxidación periódica del ácido glucónico

9. Antes de completar el volumen en el matraz anterior, se acidifica con 5 mL de ácido sulfúrico al 1/3 y se completa el volumen con agua destilada. Se agita bien.
10. Según el contenido de ácido glucónico en la muestra, la oxidación se lleva a cabo con 1 ó 2 mL del líquido del matraz, que representa un volumen de muestra de 0.1 ó 0.2 mL.
11. Se añade 1 mL de ácido periódico N/50, en tubos de ensayo provistos de tapón esmerilado o matraces aforados de 25 mL. Se deja que la oxidación actúe por unos 20 minutos a la temperatura ambiente. El rendimiento de metanal es cuantitativo, trabajando en las anteriores condiciones.

Dosado colorimétrico del metanal

12. Al matraz se introduce una solución sulfurosa de 1 g/L de dióxido de azufre, gota a gota, para reducir el exceso de ácido periódico y los iodatos formados en la reacción. Se libera el iodo y el líquido toma un color amarillo. Se van añadiendo las gotas de solución sulfurosa, hasta que una última gota decolore definitivamente el líquido. Se debe evitar un exceso de sulfuroso que modificaría posteriormente la coloración final.
13. Se añade ahora al tubo o matraz, 5 mL de reactivo cromotrópico y se completa con ácido sulfúrico concentrado, reactivo para análisis.
14. Después de la adición del reactivo, se calienta en baño maría hirviente, durante 30 minutos. Se formará una coloración violeta, cuya intensidad dependerá de la cantidad de metanal en la muestra. Es necesario efectuar cada vez un análisis en blanco, con agua destilada en vez de la muestra y un ensayo con ácido sulfúrico, sin ácido cromotrópico.
15. Transcurrido el tiempo anterior, se enfría y se completa a 25 mL con agua destilada, agitando bien.
16. El líquido se lleva a la cubeta de 10 mm de paso de luz del espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a la longitud de onda de 540 nm.

Cálculos

Se necesita preparar una curva patrón, empleando soluciones conocidas de ácido glucónico puro, con el que se procederá a la oxidación periódica directamente. La absorbancia obtenida, con la corrección debida a los ensayos en blanco, se compara en la gráfica y, de ella, se deduce la cantidad de ácido glucónico en la muestra.

METODO ENZIMATICO _____

Principio del método

En presencia de la enzima gluconato kinasa, el ácido glucónico y gluconatos son fosforilados por la adenosina-5'-trifosfato (ATP) a gluconato-6-fosfatasa. En la reacción se forma nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato, en forma reducida (NADP-H). La cantidad de este último compuesto es proporcional al gluconato o ácido glucónico presente en la muestra de vino o mosto. Se mide a la longitud de onda de 340 nm, con cubetas de paso de luz de 10 mm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número de catálogo 428191, para 25 determinaciones. Contiene 3 frascos con reactivos, uno de los cuales debe reconstituirse con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como su reconstitución, se indica en el folleto que acompaña a cada test.

Técnica operativa

1. Se preparan las cubetas de 10 mm de paso de luz, recomendándose que sean de plástico de un sólo uso, con objeto de evitar contaminaciones. El espectrofotómetro, con lámpara de tungsteno, se sitúa a 340 nm de longitud de onda.
2. En un matraz de 100 mL, se colocan 10.00 mL de vino y unos 25 mL de agua destilada.

3. Con una solución de hidróxido potásico 2 M, se lleva a pH 10-11. Se deja en reposo 10 minutos a la temperatura ambiente. Se comprueba si el pH es el mismo y en caso contrario, se corrige. Durante este tiempo, la glucono-5-lactona se transforma en ácido glucónico libre, que se valora.
4. Se ajusta la solución a pH 7.5-8.0 con ácido clorhídrico 1 M y se diluye con agua hasta el volumen de 100 mL. Con esta dilución pueden analizarse muestras con un contenido entre 0.6 y 6.0 gramos de ácido glucónico por litro.
5. Seguir las instrucciones que se indican en el folleto adjunto al test analítico.

Cálculos

La concentración de ácido glucónico se halla por la fórmula:

$$c = 0.9462 \times Ag \text{ en g/L}$$

Deberá considerarse la dilución que se haya realizado durante la preparación de la muestra, para tenerla en cuenta cuando se calcula la concentración.

Varios ácidos a la vez

COMENTARIOS

Una técnica para separar los ácidos no volátiles del vino o mosto es la cromatografía en papel o capa fina. Esta aplicación puede hacerse semicuantitativa, midiendo la intensidad y tamaño de la mancha. Con el uso meticuloso, pueden obtenerse cromatogramas para poder situar varios ácidos conjuntamente.

METODO KUNKEE¹³

Principio del método

Es una auténtica cromatografía de reparto. El papel o capa de gel de sílice es el que sirve de soporte. En el caso del papel, éste está formado por numerosas fibras de celulosa que contienen un porcentaje de humedad. Se puede considerar que las partes individuales de cada fibra, junto con su humedad, son células elementales. Tiene

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

lugar la separación de los componentes, por reparto entre la humedad y el disolvente que fluye. Se puede designar como fase estacionaria el papel de filtro, y fase móvil al disolvente.

En la cromatografía de papel, el movimiento del compuesto objeto de análisis viene determinado por la solubilidad relativa entre la fase móvil y la estacionaria. Si los componentes a analizar son solubles en el disolvente, emigrarán a la misma velocidad que éste, y si son totalmente insolubles, permanecerán en el lugar donde se colocó la muestra. En la velocidad de migración, hay otros factores que influyen en la misma, principalmente la adsorción.

La propiedad, por la que tanto la cromatografía en papel como en capa fina tiene su gran aplicación, es la siguiente: en un sistema dado, en igualdad de condiciones, la migración de un compuesto en relación con el frente de avance del disolvente es una propiedad característica y reproducible. El movimiento de un compuesto es un valor que se designa como R_f , que corresponde a la relación entre la distancia recorrida por el compuesto, y la recorrida por el disolvente.

Reactivos

FASE MOVIL.. Se prepara en un embudo de decantación, de 500 mL de capacidad, al cual se añaden: 100 mL de n-butanol, reactivo análisis, 100 mL de agua destilada, 10.7 mL de ácido fórmico y 15 mL de solución acuosa al 1 % de verde de bromocresol. Se agita enérgicamente y se deja en reposo, hasta que se separen perfectamente las dos fases líquidas, no miscibles. Se elimina la fase inferior, acuosa, y se utiliza la capa alcohólica superior, perfectamente límpida.

Técnica operativa

1. Se prepara una hoja de papel para cromatografía de 20 x 30 cm, Whatman número 1, o bien Schleicher and Schull Núm. 2043-B.
2. A 2.5 cm del borde de mayor longitud, se traza una línea con lápiz de grafito, que servirá de guía para depositar las muestras.
3. Con una micropipeta o jeringuilla, se colocan 10 microlitros de la muestra y ésta adición se repite cinco veces, con la precaución de que antes de cada adición se haya secado per-

fectamente la anterior. Si se efectúan varios análisis simultáneamente, la separación entre las manchas será de 3 cm.

4. En la cubeta cromatográfica, se coloca la solución de fase móvil, de forma que haya una altura de líquido entre 12 a 15 mm.
5. Se introduce el papel, en forma de cilindro, se tapa la cubeta y se deja que el disolvente ascienda por el papel, hasta casi llegar a unos 2-3 cm del borde superior. Según la temperatura ambiente, el tiempo empleado es de unas seis horas.
6. Se retira el papel de la cubeta cromatográfica y se seca en un ambiente bien ventilado y ausente de vapores ácidos. Se observarán en el papel diversas manchas amarillas, repartidas diferentemente a lo largo de cada muestra colocada en la línea de origen. Pueden identificarse según el *Rf*.

Observaciones

a) A continuación se indican algunos valores de *Rf* de distintos ácidos:

Acido tartárico	0.28
Acido cítrico	0.45
Acido málico	0.51
Tartrato ácido de etilo	0.59
Acido láctico	0.78
Acido succínico	0.78
Malato ácido de etilo	0.80
Frente del disolvente	0.87

b) Puede hacerse una comprobación, empleando soluciones patrón de los ácidos que interesen, mediante preparación de soluciones al 0.3%, a partir de los productos químicamente puros.

METODO DE CAPA FINA

Principio del método

Prácticamente es el mismo que en la metodología anterior, con la excepción de que el soporte se ha sustituido por una lámina de mate-

rial plástico, sobre la cual se ha depositado una capa fina de gel de sílice u otro soporte.

Reactivos

FASE MOVIL, se prepara utilizando la mezcla de 400 mL de n-butanol, 200 mL de ácido fórmico y 500 mL de agua destilada, se mezcla bien y se deja en reposo el tiempo suficiente para que se separen perfectamente las dos capas. Se emplea la capa alcohólica superior, cuando esté límpida.

Técnica operativa

1. Se coloca sobre la placa, colocada horizontalmente, un microlitro de la muestra.
2. Se efectúa la separación, colocándola en una cubeta adecuada para la medida de la placa, en la que se habrá colocado el disolvente en una altura de unos 15 mm.
3. El tiempo de separación es mucho más rápido que en el papel.
4. Se retira la placa y se procede a su secado en un ambiente exento de vapores ácidos.
5. A continuación se efectúa el revelado, pulverizando sobre la placa una disolución de acridina al 0.02% en alcohol al 50% con agua.
6. Las manchas de los distintos ácidos se observan con luz ultravioleta de longitud de onda de 254 nm.

Observaciones

a) Los *Rf* de los distintos ácidos se indican a continuación: Tartárico 0.13, cítrico 0.23, málico 0.35, láctico 0.76 y succínico 0.86.

b) Con esta técnica, se tiene la ventaja de que los dos ácidos: láctico y succínico, que en la metodología anterior eran coincidentes, con la utilización de placa con gel de sílice, existe suficiente separación para no confundirlos.

c) Puede también emplearse la fase móvil del método anterior.

3. ADITIVOS QUIMICOS

DIOXIDO DE AZUFRE	3.5
METODO USUAL DE LA C.E.E.	3.6
METODO CEE referencia	3.9
METODO SCHNEYDER Y VLCEK	3.12
METODO REBELEIN destilación	3.13
METODO HEIKE Y KREISEL	3.15
METODO ENZIMATICO	3.16
SORBICO Y SORBATOS	3.18
METODOS C.E.E.	3.19
CEE. Espectrofotometría ultravioleta	3.19
CEE. Análisis colorimétrico	3.21
CEE. Cromatografía en capa fina	3.23
METODO BERTRAND Y SARRE	3.25
METODO RAPIDO	3.26
SALICILICO	3.28
METODO BERTRAND Y SARRE	3.28
METODO DE LA A.O.A.C	3.30
TEST DE JORRINSEN	3.31
ACIDO BENZOICO	3.32
METODO JAULMES	3.32
METODO COLORIMETRICO	3.34
VARIOS ACIDOS	3.37
METODO GAS CROMATOGRAFICO	3.37
CLOROPICRINA	3.40
METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS	3.40
FERROCIANURO Y CIANURO	3.43
METODO DE LA CEE	3.43
METODOS USUALES CEE	3.45
METODO ADDEO, NOTA Y CHIANESE	3.49
METODO COLORIMETRICO	3.51
BETAINA	3.53
METODO CENCI Y CREMONINI	3.53
ANTIFERMENTOS	3.56
METODO BIOLOGICO GAROGLIO STELLA	3.56
ISOTIOCIANATO DE ALILO	3.58
METODO UNICO DE LA CEE	3.58
METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS	3.60

CUMARINA	3.63
METODO DYER Y MARTIN	3.63
EDULCORANTES SINTETICOS	3.66
METODO CROMATOGRAFICO EN CAPA FINA	3.66
β- ASARONA	3.70
METODO WOJTOWICZ	3.70
METODO A.O.A.C	3.72
ESTIRENO	3.74
METODO BRUN Y GIFFONE	3.74
METODO POR ABSORCION EN EL UV	3.76
METATARTARICO	3.78
METODO COLORIMETRICO	3.78
ACIDO OXALICO	3.80
METODO HENNING Y LAY	3.80
METODO ENZIMATICO	3.81

Dióxido de azufre

COMENTARIOS

Desde muy antiguo, se emplea el dióxido de azufre como antiséptico en los vinos. Su utilización se inició con la combustión del azufre. En la práctica, para poder efectuar una perfecta dosificación, se hace uso del metabisulfito potásico, dióxido de azufre comprimido en tubos o soluciones acuosas de sulfuroso.

La aplicación de este producto en enología, no es sólo por su acción antiséptica, sino también por su fuerte poder reductor. Algunas levaduras son muy sensibles al SO_2 , otras pueden resistirlo. Las bacterias del vino, no lo toleran y son eliminadas totalmente. En vinos tintos, la presencia de 80 mg de SO_2 , por litro, son suficientes para inhibir el crecimiento de las bacterias malolácticas.

Al añadir el dióxido de azufre al vino, aquel reacciona con el etanal, para formar un complejo de bisulfito. También reacciona con la función aldehídica de los azúcares, principalmente la glucosa, y con compuestos fenólicos, como los ácidos caféico y cumárico.

Los límites legales del dióxido de azufre, son distintos según los países y también según tipos de vino. España permite para vinos blancos y rosados, con menos de 5 g de azúcares/L, 210 mg/L de dióxido de azufre total. Vinos tintos y claretes con azúcar inferior a 5 g/L, 160 mg/L, de SO_2 . Vinos con más de 5 g azúcares por litro: blancos y rosados, 260 mg/L; tintos y claretes, 210 mg/L.

En el momento de embotellar, son suficientes de 20 a 30 mg de SO₂ por litro, en forma libre. Cuando se añade sulfuroso a un vino, con el tiempo, hay un progresivo aumento de la acidez fija, por esta razón, se recomienda el empleo de metabisulfito potásico, en vez del SO₂ procedente de tubos o de soluciones acuosas, para evitar tal defecto.

El cuidado con la muestra y la toma de la misma, es de extrema importancia para su análisis. El dióxido de azufre es una sustancia muy volátil que se elimina o transforma muy fácilmente a la temperatura ambiente, si la muestra está expuesta al aire. La recogida de la muestra debe hacerse, previa una buena mezcla en el recipiente que la contiene, y conservarla en un frasco perfectamente tapado hasta el momento del análisis. Pocos minutos de exposición al aire, de la muestra pipeteada, pueden causar importantes pérdidas de SO₂.

Ciertas sustancias del vino son también oxidadas por el iodo, en medio ácido, como tiene lugar en la determinación directa sobre el vino. El volumen de iodo 0.025 M (0.05 N), gastado para oxidar estas sustancias, es del orden de 0.3 mL para los vinos blancos, esta cifra es mayor en los tintos.

METODO USUAL DE LA CEE _____

Principio del método

Dióxido de azufre libre. Valoración iodométrica directa.

Dióxido de azufre combinado. Valoración iodométrica, después de la hidrólisis alcalina sobre el vino. Este valor, añadido al dióxido de azufre libre, indica el dióxido de azufre total de la muestra.

Reactivos

SOLUCION HIDROXIDO SODICO 4 M, (160 g / L)

ACIDO SULFURICO AL 1/10 en volumen.

ENGRUDO DE ALMIDON a 2.5g/L. En un mortero, se mezclan íntimamente, 2.5 gramos de almidón y 10 miligramos de ioduro mercúrico y una pequeña cantidad de agua, de manera que quede una pasta fluida. Introducirla en un litro de agua en plena ebullición y mantenerla durante 10 minutos. Cuando esté frío se filtra.

SOLUCION DE IODO 0.025 M (0.05 N).

EDTA

Técnica operativa

1. En un erlenmeyer de 500 mL, se colocan 50.00 mL de vino, 3 mL de ácido sulfúrico al 1/10, 5 mL de engrudo de almidón y 30 mg de EDTA.
2. Valorar inmediatamente, con la solución de iodo 0.025 M, hasta que la coloración azul persista durante 10 a 15 segundos. Sea n el número de mililitros de solución de iodo gastados.
3. Se añaden 8 mL de solución de hidróxido sódico 4 M, agitar una sola vez y dejar en reposo 5 minutos.
4. Verter con rapidez y agitando enérgicamente, 10 mL de ácido sulfúrico al 1 /10, que se tenían preparados en un pequeño vaso. Valorar inmediatamente con iodo 0.025 M. Sea n' el volumen de iodo empleado.
5. Añadir 20 mL de solución de hidróxido sódico 4 M, dejar reposar 5 minutos, previa agitación una sola vez. Diluir con 200 mL de agua destilada muy fría. Con agitación enérgica, verter con rapidez 30 mL de ácido sulfúrico 1/10, contenidos en un vaso.
6. Valorar con el iodo 0.025 M. Sea n'' el volumen gastado de iodo.

Cálculos

El valor de n''' , se halla según se indica en la observación a).

SO₂ libre = 32 ($n - n'''$) en mg/L.

SO₂ combinado = 32 ($n' + n''$) en mg/L.

SO₂ total = 32 ($n + n'' - n'''$) en mg/L.

Observaciones

a) Ya que ciertas sustancias son oxidadas con el yodo en medio ácido, es necesario, para efectuar un análisis más preciso, determinar la cantidad de yodo empleado en estos productos. Para ello, se combina el dióxido de azufre libre, con un exceso de etanal o propanal, antes de la valoración con yodo como se indica a continuación:

A 50 mL de vino, colocados en un erlenmeyer de unos 250 mL, añadir 5 mL de solución de etanal a 7 g/L ó 5 mL de solución de propanal a 10 g/L. Tapar y dejar en reposo 30 minutos, por lo menos. Añadir 3 mL de ácido sulfúrico al 1/10 y valorar con yodo 0.025 M, en cantidad necesaria para hacer virar el engrudo de almidón. Sea n''' el volumen de yodo empleado.

El volumen n''' es pequeño, del orden de 0.2 a 0.3 mL de yodo 0.025 M. Si el vino ha sido adicionado de ácido ascórbico, n''' es mucho más elevado y se puede medir, aunque aproximadamente, la cantidad de este producto. Debe tenerse en cuenta que 1 mL de yodo 0.025 M equivale a 4.4 miligramos de ácido ascórbico. Con la medición de n''' , se puede evaluar si un vino ha sido adicionado de ácido ascórbico en cantidad superior a 20 mg/L.

b) Para el análisis en los vinos tintos, con bajo contenido de sulfuroso, es interesante emplear la solución de yodo más diluida, por ejemplo una de 0.01 M. En este caso, hay que reemplazar el factor 32 por 12.8, en las fórmulas anteriores.

c) En el análisis de los vinos tintos, es ventajoso iluminar el vino por la parte inferior, con una luz amarilla procedente de una lámpara de vapor de sodio. Colocar en una cámara oscura y observar la transparencia del vino, ya que cuando ha virado el engrudo de almidón, aparece opaco. La forma de comprobar el punto final de la valoración, es el empleo de un electrodo de platino y un medidor de pH, en la posición de milivoltios, y efectuar la lectura del cambio de redox. También, y más perfecto es la utilización de un titulador electrónico.

d) Cuando la cantidad obtenida en el análisis, se acerca o sobrepasa el límite legal, es necesario determinar el dióxido de azufre por el método de referencia.

e) Si el interés particular se centra en el contenido del dióxido de azufre libre, se ha convenido determinarlo en una muestra mantenida tapada durante cuatro días a la temperatura de 20 °C, antes del análisis. Este será efectuado a la misma temperatura.

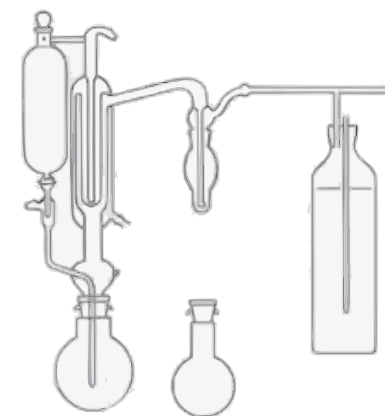
METODO CEE referencia _____

Principio del método

El dióxido de azufre es arrastrado por una corriente de aire o de nitrógeno, fijado y oxidado, por borboteo, sobre una solución diluida y neutra de peróxido de hidrógeno. El ácido sulfúrico formado, se neutraliza con una solución valorada de hidróxido sódico. El dióxido de azufre libre se extrae del vino, por arrastre en frío (10 °C). El sulfuroso total se extrae igualmente, pero a la temperatura de 100 °C aproximadamente.

Aparato

El aparato debe estar formado de acuerdo al esquema que se adjunta, en particular en lo que se refiere al refrigerante. El tubo de desprendimiento de gas en el borboteador, debe estar terminado con



un vidrio poroso, con objeto de que se formen un gran número de pequeñas burbujas, para lograr un contacto íntimo entre la fase gaseosa y la líquida.

La velocidad del paso de gas o aire, debe estar regulado a 40 litros por hora. El frasco de la derecha, está destinado a limitar la depresión de la trompa de agua a unos 20-30 cm.

Reactivos

ACIDO FOSFORICO al 85%.

SOLUCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO a 9.1 g de H_2O_2 por litro (3 volúmenes).

SOLUCION DE INDICADOR preparado en un matraz aforado de 100 mL con 100 mg de rojo de metilo, 50 mg de azul de metileno y alcohol al 50% hasta completar el volumen.

HIDROXIDO SODICO 0.01 M.

Técnica operativa

Análisis del dióxido de azufre libre

1. El vino debe estar en un frasco lleno y tapado, a la temperatura de 20 °C, durante cuatro días antes del análisis.
2. En el matraz A de 250 mL del aparato de arrastre, se colocan 50.00 mL de la muestra y 15 mL de ácido fosfórico.
3. Se coloca el matraz en el conjunto del aparato.
4. En el borboteador B, se colocan 2 ó 3 mL de la solución de peróxido de hidrógeno, dos gotas del indicador y neutralizar la solución del agua oxigenada con hidróxido sódico 0.01 M.
5. Se adapta el borboteador al aparato.
6. Hacer pasar el aire o nitrógeno, durante 15 minutos.
7. Retirar el borboteador del aparato y valorar el ácido formado, con el hidróxido sódico 0.01 M. Sea n el número de mililitros gastados.

Cálculos

Para hallar el contenido de dióxido de azufre libre, se aplica la fórmula: $6.4 \times n$ miligramos por litro.

Técnica operativa

Análisis del dióxido de azufre total.

1. En el caso de que la concentración de SO_2 en la muestra sea igual o menor de 50 mg/L, se toman 50.00 mL de la muestra y 15 mL de ácido fosfórico.
2. Si la concentración de la muestra es superiora 50 mg/L, en el matraz A de 100 mL se colocan 20.00 mL de la muestra y 5 mL de ácido fosfórico.
3. Colocar en el borboteador B, 2 ó 3 mL de peróxido de hidrógeno, se neutraliza como se ha indicado anteriormente.
4. Llevar a ebullición el vino contenido en el matraz A, por la acción de una llama de unos 4 cm de altura que toque en el fondo del matraz. Se recomienda colocar un disco metálico con un orificio de 30 mm, para evitar la pirogenación de las materias extractivas del vino, en las paredes del matraz.
5. Mantener la ebullición y el paso del gas, durante 15 minutos. En este tiempo todo el dióxido de azufre ha sido extraído y oxidado.
6. Valorar el ácido formado en el borboteador B, con hidróxido sódico 0.01 M. Sea n el volumen gastado de reactivo.

Cálculos

En el caso de que se haya empleado un volumen de muestra de 50.00 mL, la fórmula es la siguiente: $6.4 \times n$. Si la toma de muestra ha sido de 20 mL, se aplicará el factor 16 en vez de 6.4.

METODO SCHNEYDER Y VLCEK¹ _____

Principio del método

Exclusivamente para el dióxido de azufre libre. Es una metódica muy similar al método de Ripper, pero emplea solución de iodato potásico para la valoración, en vez del yodo, por su mayor estabilidad. Se añade al vino un exceso de ioduro potásico y entonces se valora con iodato. Tan pronto como exista un exceso de yodo, el engrudo de almidón presente lo pone de manifiesto, por su cambio de color. Comparativamente con el método de Ripper, se le considera mejor.

Reactivos

SOLUCION ALMIDON-ioduro POTASICO, preparada por disolución de 10 gramos de ioduro potásico y 2.5 gramos de almidón soluble, con agua destilada hasta un litro.

SOLUCION DE IODATO POTASICO. Disolver 0.11135 gramos de iodato potásico en 200 mL de ácido sulfúrico 1 M y llévese a volumen de un litro con agua destilada. Es una solución 0.0005203 M.

Técnica operativa

1. En un erlenmeyer de 250 mL, se colocan unos 50 mL de agua destilada, 10.00 mL de la muestra de vino o mosto a analizar y 2 mL de la solución de almidón-ioduro y se valora con la solución de iodato, hasta persistencia azul del almidón.

Cálculos

El contenido en miligramos de sulfuroso libre, por litro de vino, es igual al volumen de iodato gastado, multiplicado por 10 (1 mL= 10 mg/L).

1. J. Schneider y G. Vicek. *Versuchsanst Wein-Obstbau (Klosterneuburg)*, 27 páginas 87-88, (1977).

Si se emplea otra molaridad del iodato potásico, se puede hallar el contenido de sulfuroso libre, de acuerdo a la siguiente fórmula:

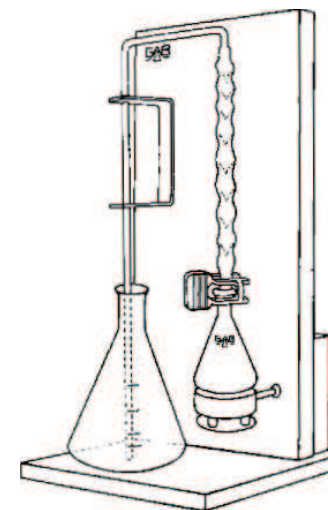
$$\frac{V \times N \times 32 \times 1000}{V'}$$

en donde: v' = volumen de la muestra empleada para el análisis.
 N = normalidad de iodato potásico. Debe tenerse en cuenta la equivalencia de la molaridad y normalidad (1 M = 6 N).
 V = volumen de la solución de iodato gastada.

METODO REBELEIN destilación² _____

Principio del método

Se fundamenta en la destilación del dióxido de azufre total contenido en la muestra, recogiendo el destilado en una solución de ioda-



2. H. Rebelein, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 2, páginas 112-121, (1973).

to potásico. La destilación del SO₂ total se desarrolla más rápidamente en ácido sulfúrico, que en ácido fosfórico. Con la ayuda de un destilador con fraccionamiento, es posible destilar cuantitativamente el dióxido de azufre total, en un tiempo de 3 a 4 minutos.

Una modificación del aparato, introducida por GAB, permite disponer en una sola unidad, el destilador y la placa calefactora proyectada para este fin.

Reactivos

SOLUCION DE IODATO POTASICO, 111.4 mg en agua hasta un litro.

ME TANOL.

INDICADOR DE ALMIDON, al 1 %.

ACIDO SULFÚRICO al 20%.

SOLUCION TIOSULFATO SODICO, 1.5512 g disueltos en un litro de agua.

Técnica operativa

1. El aparato destilador GAB, deberá estar dispuesto para el trabajo, no es necesaria agua de refrigeración. Previamente la placa calefactora se tendrá conectada, con objeto de que alcance la temperatura de trabajo (unos 20 minutos).
2. En un erlenmeyer de 250 mL se vierten 50.00 mL de la solución de iodato.
3. En el erlenmeyer de 100 mL, se colocan 2 mL de metanol, un poco de piedra pómez, 10.00 mL de la muestra de vino, procurando que la punta de la pipeta se halle apoyada en la pared del erlenmeyer (para que la muestra resbale por la misma) y 10 mL de ácido sulfúrico.
4. Se monta en el destilador y se coloca el erlenmeyer sobre el calefactor, con el tubo de salida sumergido en el erlenmeyer que contiene la solución de iodato.
5. Iniciada la ebullición, se cuenta un tiempo de cinco minutos.
6. Transcurrido el tiempo, se levanta el destilador y se enjuaga con agua destilada la punta del mismo.

7. Se enfría rápidamente el erlenmeyer al chorro de agua.
8. Cuando frío, se añaden 10 mL de solución de indicador de almidón y 10 mL de solución de ácido sulfúrico.
9. Se valora con la solución de tiosulfato, hasta desaparición del color azul-violáceo.
10. El contenido se lee directamente de la bureta que ha sido graduada en mg de dióxido de azufre por litro.

Observaciones

a) Es absolutamente necesario seguir el orden de adición de los reactivos, tal como se indican en la técnica operativa.

b) Como en toda valoración, es recomendable la adición del líquido de la bureta con cierta lentitud al acercarse al punto de equivalencia, con el fin de detener la misma en el momento exacto.

METODO HEIKE Y KREISEL³

Principio del método

Es un método para determinar el sulfuroso total. Comparativamente es tan exacto como el método oficial alemán, con la ventaja de permitir el automatismo en su aplicación. Se basa en la combinación *del SO₂ con cloruro mercurico, para formar un compuesto, que reacciona con la pararosanilina, en medio ácido y formaldehído, para dar un producto coloreado, cuya medición puede realizarse a 570 nm con el espectrofotómetro.*

Reactivos

SOLUCION TETRACLOROMERCURATO SODICO. Se prepara disolviendo 27.2 gramos de cloruro mercurico y 11.7 gramos de cloruro sódico, en agua destilada, completando el volumen a un litro.

3. E. Heike y A. Kreisel, *Z Anal. Chem.*, 285, páginas 39-42, (1977).

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 0.1 M.

SOLUCION FORMALDEHIDO, preparada con 5 mL de formal del 40%, diluido a un litro de agua destilada.

SOLUCION DE PARARROSANILINA, por disolución de 100 mg de pararrosanilina, disueltos en 40 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se lleva a volumen de 250 mL con agua destilada y se deja en reposo durante una noche.

Técnica operativa

1. En un matraz de 100 mL, se añaden 5.00 mL de la muestra de vino, 1 mL de solución de tetracloromercurato, 10 mL de hidróxido sódico 0.1 M y se completa a volumen con agua destilada.
2. Se toman 5.00 mL de esta disolución y se pasan a un matraz de 50 mL, al que se añaden 5 mL de solución de formaldehído y 5 mL de solución de pararrosanilina, se completa a volumen con agua destilada y se deja 8 minutos en baño de agua a 20 °C.
3. Se mide la absorbancia, en una cubeta espectrofotométrica de 10 mm de paso de luz, a 570 nm de longitud de onda, en comparación con un ensayo en blanco, con todos los reactivos menos el vino. El color de la muestra es estable durante 30 minutos.

Cálculos

Se prepara una curva de calibración, frente a la que se comparan las lecturas de las absorbancias de las muestras.

METODO ENZIMATICO

Principio del método

El sulfito (ácido sulfuroso) se oxida a sulfato en presencia de oxígeno, a través de sulfito-oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado en esta reacción se reduce en presencia de la nicotinamid-adenin-

dinucleótido (NADH) por la enzima NADH-peroxidasa. La cantidad de NADH consumida, en esta reacción, es equivalente a la cantidad de sulfito libre o también al sulfito combinado con el aldehído.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número 725854, para 40 determinaciones. Contiene 5 frascos con reactivos, que se usarán, algunos previa reconstitución con agua destilada. La conservación y forma de reconstituir, se indica en el folleto que acompaña a cada test analítico.

Técnica operativa

1. Se preparan las cubetas de 10 mm de paso de luz, de plástico para un solo uso. El espectrofotómetro con lámpara de tungsteno, se prepara para leer a la longitud de onda de 340 nm.
2. Si la cantidad de dióxido de azufre no sobrepasa los 300 miligramos/L, no es necesario efectuar dilución alguna de la muestra de vino.
3. El análisis se efectúa siguiendo las instrucciones detalladas en el folleto explicativo, que acompaña a cada test.

Cálculos

Una vez hallada la diferencia de absorbancias, la concentración de dióxido de azufre se calcula por:

$$SO_2 = 0.3213 \times A_s \text{ en gramos por litro}$$

deberá tenerse en cuenta el factor de dilución, en el caso que haya sido hecha.

Observaciones

En el caso de analizar vinos tintos, es necesario efectuar el siguiente tratamiento: Se colocan en un matraz aforado de 50 mL, 25.00 mL de vino y se neutralizan a pH 7.5-7.8 con hidróxido sódico 2 M y se completa a volumen con agua destilada (factor de dilución = 2). Mantenerlo durante 10 minutos a la temperatura ambiente. Utilícese 0.1 mL para el análisis.

Sórbico y sorbatos

COMENTARIOS

Este ácido ha sido aceptado como aditivo al vino, para inhibir el crecimiento de las levaduras. El ácido sórbico no tiene acción contra las bacterias, antes bien, a las dosis normales de empleo, favorece apreciablemente, el desarrollo de las bacterias acéticas. Debe ser empleado en cantidad suficiente, para actuar como antifermonto, ya que si no es así, es totalmente inútil su adición. No es eficaz como antifermonto, en los mostos o zumos de uva. Su utilidad principal, se destina a vinos embotellados, empleado en concentraciones de 150 a 200 mg/L, ya que existe una acción sinérgica con el alcohol del vino, más acentuada en los vinos con bajo pH. En la práctica se hace uso de la sal potásica, ya que el ácido es muy poco soluble en agua.

El ácido sórbico, como tal, no tiene olor, sin embargo, sí aparece lentamente un olor cuando hay una acción bacteriana y, en este caso, es un olor desagradable. Favorece el fenómeno de oxidación, conocido por «maderizado» del vino. Para evitarlo, siempre debe emplearse conjuntamente con dióxido de azufre y ácido ascórbico.

La cantidad máxima permisible, para su aplicación al vino, difiere según los países. En España y la CEE, la concentración máxima admitida es de 200 miligramos de ácido sórbico por litro de vino.

3.18

METODOS CEE

Principio del método

El ácido sórbico (constante de volatilidad = 0.59), arrastrado por el vapor de agua, se determina en el destilado. La eliminación de las sustancias que puedan enmascarar el análisis, se efectúa por evaporación a sequedad del destilado, ligeramente alcalinizado por el agua de cal. Tanto es aplicable para la espectrofotometría de absorción en el ultravioleta, como para la colorimetría después de la oxidación a aldehído malónico, que se condensa con el ácido tiobarbitúrico, para dar una coloración rosa. Valores inferiores a 20 mg/L, deben confirmarse con la cromatografía en capa fina, cuya sensibilidad es de 5 mg/L.

Obtención del destilado. Se prepara el destilado como se ha indicado para la determinación de la acidez volátil, recogiendo 320-330 mL, a partir de 20.00 mililitros de muestra de vino, adicionado de 1 a 2 gramos de ácido tartárico, con el objeto de efectuar la extracción total del ácido sórbico.

CEE. Espectrofotometría ultravioleta

Reactivos

AGUA DE CAL, aproximadamente 0.02 M.

SOLUCION DE SULFATO DE COBRE, preparada por disolución de 50 miligramos de sulfato de cobre pentahidrato, reactivo análisis, 0.1 mL de ácido sulfúrico concentrado puro, y agua destilada hasta completar un litro.

SOLUCION DE ACIDO SORBICO a 20 mg/L, preparada disolviendo en un matraz de un litro, 20 miligramos de ácido sórbico puro, con unos 900 mL de agua caliente, agitar. Enfriar y completar a volumen con agua destilada. También puede prepararse por disolución de 26.8 miligramos de sorbato potásico, en un litro de agua fría.

3.19

Técnica operativa

1. En una cápsula de 55 mm de diámetro, colocar 5.00 mL del destilado, añadir 1 mL de agua de cal límpida y una gota de solución de sulfato de cobre.
2. Evaporar a sequedad en baño maría hirviente. Tomar el residuo con agua destilada y llevarlo a un matraz de 20 mL y completar a volumen con agua.
3. Medir la absorbancia, con cubetas de cuarzo, de paso de luz de 10 mm, a 256 nm, comparativamente con un ensayo en blanco, Este se prepara con 1 mL de agua de cal, una gota de solución de sulfato de cobre y agua hasta 20 mL.
4. Las lecturas se comparan frente a una gráfica obtenida por soluciones patrón, de concentraciones: 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 miligramos de ácido-sórbico por litro. La absorbancia se mide en comparación con agua destilada. Estas soluciones se obtienen, por dilución adecuada de la solución base de 20 mg/L.

Cálculos

Sea e , la cantidad en miligramos/litro de ácido sórbico que contiene la solución colocada en la cubeta, por comparación espectrofotométrica con la gráfica. Si V mL es el volumen (próximo a 330 mL) del destilado obtenido a partir de 20.00 mL de la muestra de vino, el contenido será:

$$0.2 \times e \times V$$

miligramos de ácido sórbico por litro. En el supuesto de que se recojan exactamente 330 mL de destilado, la fórmula para el cálculo es $66 \times e$ miligramos por litro.

Si la concentración en ácido sórbico es igual o inferior a 20 mg/L, es necesario proceder a una cromatografía en capa fina de la muestra. Si la presencia viene confirmada, proceder de la siguiente forma:

Tomar 50.00 mL del destilado. Colocar éste volumen en una cápsula con 3 mL de agua de cal límpida y 5 gotas de solución de sulfato de cobre. Evaporar a sequedad en baño maría. Tomar el residuo con agua destilada y llevarlo a volumen de 20.00 mL. Agitar y continuar el análisis, como se ha indicado anteriormente, sobre 5.00 mL

del destilado concentrado. Sean e los miligramos de sórbico que contiene la solución del destilado, concentrado 2.5 veces, que se han colocado en la cubeta. Si V es el volumen (casi 330 mL del destilado obtenido, a partir de 20.00 mL de muestra, la concentración en el vino será: $0.02 \times e \times V$ miligramos de ácido sórbico por litro.

CEE. Análisis colorimétrico _____

Reactivos

AGUA DE CAL 0.02 M aproximadamente.

ACIDO SULFÚRICO 0.5 M.

SOLUCION DICROMATO POTASICO 0.05 M.

ACIDO TIOBARBITURICO solución al 0.2% (p/v). Se disuelven, en un matraz de 100 mL, 200 mg de ácido tiobarbitúrico con agua, a temperatura de 60-80 °C. Cuando frío enrasar con agua destilada a volumen. La solución debe estar perfectamente límpida. En caso contrario filtrarla. Debe prepararse extemporáneamente.

SOLUCION DE ACIDO SORBICO a 20 mg/L. En un matraz aforado de un litro, con 900 mL de agua destilada caliente, se vierten 20 miligramos de ácido sórbico puro. Agitar hasta disolver perfectamente. Se deja enfriar y se lleva a volumen con agua. Puede también prepararse con 26.8 mg de sorbato potásico.

Técnica operativa

1. Colocar en una cápsula, 5.00 mL del destilado, añadir después 1 mL de agua de cal límpida. Evaporar a baño maría hirviente.
2. Tomar el residuo con agua destilada y llevarlo a volumen de 10 mL, con las aguas de lavado de la cápsula. Agitar.

3. En un tubo de ensayo, colocar: 1 mL de este último líquido obtenido, 1 mL de agua destilada, 1 mL de solución de ácido sulfúrico 0.5 M y 0.2 mL de solución 0.05 M de dicromato potásico.
4. Colocar este tubo en un baño maría hirviente, durante 5 minutos exactamente. Enfriar bruscamente el tubo en un baño de agua con hielo, añadir seguidamente 2 mL de solución de ácido tiobarbitúrico al 0.2%.
5. Llevar de nuevo al baño maría durante 10 minutos exactos. Enfriar en agua con *hielo*. Aparecerá una coloración rosa, cuya absorbancia debe medirse dentro de los 10 minutos siguientes a la salida del baño maría y con el líquido *completamente* frío.
6. El tiempo de calentamiento y el empleo del agua con hielo, debe observarse escrupulosamente, ya que, en caso contrario, la intensidad de la coloración se modifica. También a la temperatura ordinaria, la coloración va evolucionando continuamente. Medir la absorbancia de la solución a 532 nm, en comparación a un testigo preparado con 2 mL de agua destilada, adicionada de las mismas cantidades de los reactivos indicados anteriormente.
7. Se compara la absorbancia, con la gráfica preparada con soluciones de ácido sórbico puro, de las siguientes concentraciones: 0.5, 1.0, 2.5 y 5 miligramos de ácido sórbico por litro, preparadas a partir de la solución de ácido sórbico de 20 mg/L. Un mililitro de estas diluciones, se trata exactamente igual como el líquido destilado.

Cálculos

Sean e los miligramos de ácido sórbico por litro que contiene la solución situada en la cubeta espectrofotométrica. Si V es el volumen (cerca de 330 mL) del destilado obtenido a partir de 20.00 mL de vino, éste contendrá: $0.1 \times e \times V$ miligramos de ácido sórbico por litro. Si se han recogido exactamente 330 mL de destilado, el cálculo será: $33xe$ miligramos de ácido sórbico.

En el caso de que la concentración de ácido sórbico sea igual o inferior a 20 mg/L, se comprobará, por cromatografía en capa fina, la presencia de ácido sórbico. Si es así, se toman 50.00 mL del desti-

lado y se colocan en una cápsula, a la que se añaden 3 mL de agua de cal límpida y se evapora a sequedad a baño maría hirviente. Se toma el residuo con agua y se completa el volumen a 20 mL.

En un tubo se introducen: 1 mL del destilado concentrado 2.5 veces, 1 mL de agua destilada, 1 mL de ácido sulfúrico 0.5 M y 0.2 mL de solución de dicromato potásico 0.05 M. Se continúa el análisis como antes se ha indicado.

CEE. Cromatografía en capa fina _____

Principio del método

El ácido sórbico se extrae con éter, del vino previamente acidificado. Luego tiene lugar una separación cromatográfica, en capa fina, con polvo de poliamida. Se pone de manifiesto la presencia del ácido mediante radiación ultravioleta.

Reactivos

ETER ETILICO. METANOL.

ALCOHOL ETILICO 96%.

SOLUCION DE ACIDO SULFURICO al 20 % (v/v).

SULFATO SODICO ANHIDRO.

POLVO DE POLIAMIDA CROMATOGRAFICO, Merck.

INDICADOR FLUORESCENTE F 254, Merck.

DISOLVENTE. Preparado con 20 partes de pentano, 20 partes de exano y 3 partes de ácido acético.

SOLUCION PATRON, 0.1 gramos de ácido sórbico en 100 mL de alcohol de 96%.

Aparatos

Dispositivos para colocar las placas cromatográficas.

Placas de vidrio de 20 x 20 cm

Preparación de las placas: Mezclar íntimamente en seco, 12 g de polvo de poliamida con 0.3 g del indicador fluorescente, añadir agitando continuamente, 60 mL de metanol. Colocar sobre las placas de forma muy uniforme, con un espesor de 0.3 mm. Secar a temperatura ambiente.

Preferible a la preparación indicada anteriormente, se recomienda el empleo de cromatoplasmas de plástico de la firma Merck, de 20 x 20 cm, que incorporan la poliamida y el indicador, estando ya dispuestas para la colocación de las muestras.

Técnica operativa

1. Se colocan en un tubo de decantación de unos 200 mL, 50 mL de la muestra de vino.
2. Se acidifica con ácido sulfúrico al 20%, y se extrae por tres veces con éter, empleando cada vez 20 mL.
3. Reunir las soluciones etéreas en otro embudo de decantación y lavar con unos 10 mL de agua destilada.
4. Secar el extracto etéreo con sulfato sódico anhidro.
5. Evaporar el éter a sequedad, a baja temperatura. Si la evaporación se efectúa en baño maría, conviene ayudar con una corriente de aire hasta casi un residuo de unos 3 mL, y terminar luego, la evaporación en frío.
6. El residuo se disuelve con 1 mL de etanol.
7. Se colocan en las placas, de 3 a 5 microlitros de esta solución.
8. Las placas se colocan en la cubeta cromatográfica, saturada de vapores del disolvente, tapar y dejar ascender el disolvente hasta una altura de 15 cm. Aproximadamente se necesitan unas dos horas, dependiente de la temperatura ambiente.
9. Se retira la placa y se deja secar. De inmediato se observa a la radiación ultravioleta, en la longitud de onda de 254 nm.

10. El ácido sórbico presenta una mancha oscura sobre fondo verde-amarillo, fluorescente. Esta técnica permite la detección de 5 miligramos de ácido sórbico por litro de muestra.

METODO BERTRAND Y SARRE⁴

Principio del método

Es una técnica gas cromatográfica, que presenta la ventaja de la rapidez, automatización e incluso, la inyección directa del vino. Se efectúa una determinación cuantitativa, en comparación con un patrón interno.

Aparatos

Es necesario disponer de un cromatógrafo de gases con detector F. I. D., conjuntamente con registrador integrador. Las columnas serán de acero inoxidable, de 4 metros de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro. El relleno se prepara con succinato de dietilenglicol (DEGS) 5% más 1 % de ácido fosfórico, sobre Gaschrom Q de 80-100 mallas. También puede sustituirse este relleno por otro con la siguiente fase estacionaria: 1 % adipato de dietilenglicol más 1 % de ácido fosfórico sobre el mismo soporte. Purgar la columna a 200 °C, durante una noche.

Técnica operativa

1. Se empleará un patrón interno, con objeto de obtener mayor precisión en las determinaciones. Este patrón interno es el ácido undecanoico, cuyo tiempo de retención es vecino al del ácido sórbico. Se prepara dicho patrón con 1 gramo, disuelto en un litro de alcohol de 96%.
2. En un tubo de ensayo de un volumen aproximado de 40 mL, se colocan 20.00 mL de vino, 2 mL de la solución de patrón interno y 1 mL de ácido sulfúrico al tercio. Se agita.

4. A. Bertrand y C. Sarre, *Connaiss. Vigne Vin*, 9, páginas 267-272, (1975).

3. Se añaden 10 mL de éter etílico. La extracción se efectúa por agitación del tubo, durante 5 minutos. Se deja en reposo para que se separen las dos fases líquidas.
4. De la fase superior, etérea, se toman 2 microlitros para inyectar en el cromatógrafo.
5. Los parámetros de trabajo del cromatógrafo, son los siguientes: temperatura de la columna, isotérmica, 175 °C; inyector y detector, 200 °C, flujo de nitrógeno 30 mL por minuto.
6. Para poder efectuar el análisis cuantitativo, es necesario preparar un patrón de referencia. Para ello se emplea un vino totalmente exento de ácido sórbico, al que se añaden 100 miligramos de ácido sórbico puro (134 mg de sorbato potásico), a un litro.
7. Este patrón se trata como se ha indicado anteriormente para la muestra de vino y, el área del pico, será la que servirá de comparación con las muestras analizadas.

Cálculos

Vienen dados por el integrador, una vez efectuado el análisis cromatográfico. El tiempo total empleado en el análisis, es de unos 20 minutos

METODO RAPIDO⁵

Principio del método

Análisis espectrofotométrico en el ultravioleta.

Reactivos

ACIDO FOSFORICO concentrado.

ISOOCTANO.

5. R. Viader Guixà, *Viader Análisis, 08770 Sant Sadurní d'Anoia (Barcelona)*.

Técnica operativa

1. En un tubo de ensayo se colocan 0.100 mL de vino y 0.050 mL de ácido fosfórico concentrado. Agitar bien.
2. Se añaden 4 mL de isooctano y se agita bien durante un minuto.
3. Dejar en reposo durante 10 minutos, para que se separen las capas.
4. La capa de isooctano es la que se coloca en la cubeta de cuarzo de 10 mm de paso de luz, y leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 254 nm.
5. Efectuar un análisis en blanco y con dos patrones de 10 mg/L de ácido sórbico.

Observaciones

Si el vino supera los 100 mg/L, es necesario diluirlo a la mitad con agua destilada, antes de efectuar el análisis.

Salicílico

METODO BERTRAND Y SARRE⁶

Principio del método

Las condiciones de extracción son las mismas que las del ácido sórbico. Estos ácidos son extraídos por el éter etílico, después de la acidificación del vino. El extracto etéreo, es el que se emplea en la cromatografía.

Reactivos

SOLUCION PATRON INTERNO, preparada con 500 miligramos de ácido oléico puro, disueltos en una mezcla hidroalcohólica al 60%, hasta el volumen de un litro.

ACIDO SULFURICO al 1/3 en volumen, con agua. *ETER*

ETILICO.

Aparato y columna

El cromatógrafo, equipado con detector de ionización de llama. Columna con tubo de acero inoxidable de 1/8 de pulgada y 1 metro de longitud. La fase estacionaria se compone de una mezcla de succi-

6. A. Bertrand y C. Sarre, *Cannaiss. Vigne Vin*, 11, páginas 345-350, (1977).

nato de dietilenglicol (DEGS) y ácido fosfórico, en la proporción de 5% y 1 % respectivamente, sobre soporte de Gaschrom Q de 80/100 mallas.

Técnica operativa

1. En un tubo de ensayo, con tapón esmerilado, se introducen 20.00 mL de vino objeto de análisis, 2.00 mL de patrón interno y 1 mL de ácido sulfúrico diluido. Se mezcla bien.
2. Se añaden 10 mL de éter. Se agita durante 5 minutos.
3. La fase etérea se separa y se evapora hasta reducción del volumen a 0.5 mL. De este líquido se toma 1 microlitro, para inyectar en el cromatógrafo.
4. La temperatura de la columna debe estar a 170 °C, en programación isotérmica.
5. El inyector y detector deben estar a 300 °C.

6. El gas portador, nitrógeno con un flujo de 44 mL por minuto.

Cálculos

La concentración (C) en la muestra problema, viene dada por la siguiente fórmula:

$$C = 60 \times \frac{SI \times sh}{si \times SH}$$

donde *SI* = superficie del pico del patrón interno en el análisis de referencia.

si = superficie del pico del patrón interno en la muestra del vino.

sh = superficie del pico de ácido salicílico en la muestra de vino.

SH = superficie del pico de ácido salicílico en el análisis de referencia.

Las superficies de los picos vienen calculadas por el integrador del registrador.

METODO DE LA A. O. A. C.⁷ _____

Principio del método

Se fundamenta en la reacción coloreada, que tiene lugar entre el ácido salicílico y el cloruro férrico. La coloración es sensible y muy visible por el intenso color rojo-violeta.

Reactivos

ACIDO CLORHIDRICO al 1/3 v/v, con agua destilada.

ETER ETILICO.

ETER DE PETROLEO.

SOLUCION DE CLORURO FERRICO al 0.5%,
neutralizada.

Técnica operativa

1. Se toman 200 mL de vino y se alcalinizan al tornasol, con solución de hidróxido sódico al 10%.
2. En un baño maría de agua hirviente, se evaporan a un tercio de su volumen inicial. Se diluye de nuevo a su volumen original con agua destilada y se filtra si es necesario.
3. Se colocan en un embudo de decantación, 50 mL de la solución anterior, se añaden 5 mL de ácido clorhídrico diluido, 50 mL de éter etílico y se mezcla bien.
4. La capa acuosa se decanta, se lava con dos porciones de 5 mL cada una de agua destilada y se evapora a sequedad. Este residuo se destina a la prueba colorimétrica.
5. Si interfieren materias colorantes u otras sustancias, se purifica de la forma siguiente: Se disuelve el residuo obtenido en el número 4), con 25 mL de éter etílico, se pasa a un embudo de decantación y se añaden 25 mL de agua destilada, que previamente se habrá hecho alcalina, con algunas gotas de hidróxido amónico diluido (1 + 9 de agua). Se deja en reposo. Se decanta el agua, se filtra sobre papel húmedo y se evapora a sequedad.

7. A.O.A.C., 14 edición, número 20.110, (1984).

6. Al residuo seco, se le añade una gota de solución de cloruro férrico. Un color violeta, indica la presencia de ácido salicílico.

TEST DE JORRINSEN⁸ _____

Reactivos

SOLUCION NITRITO POTASICO al 10%, se colocan 10 gramos de nitrito potásico, en un matraz de 100 mL y se completa con agua destilada hasta el volumen.

ACIDO ACETICO, disuelto con igual volumen de agua destilada.

SOLUCION DE SULFATO DE COBRE al 1 %, se pesa 1 gramo de sulfato cúprico pentahidrato, reactivo para análisis y se coloca en un matraz de 100 mL, se disuelve con agua destilada y se completa a volumen.

Técnica operativa

1. Al residuo seco obtenido en el análisis anterior (AOAC, operación 6), se le añade un poco de agua destilada caliente y se deja enfriar.
2. Se toman 10 mL de la solución anterior, pasándolos a un tubo de ensayo.
3. Se adicionan 4-5 gotas de la solución de nitrito, 4-5 gotas de la solución de ácido acético y 1 gota de solución de sulfato de cobre.
4. Mezclar bien y se hierve durante 30 segundos, se deja en reposo 2 minutos.
5. En presencia de ácido salicílico, aparece un intenso color rojo.

8. A.O.A.C., 14 edición, número 20.112, (1984).

Acido benzoico

COMENTARIOS

Raramente se emplea este ácido como antiséptico, se utiliza casi siempre la sal sódica, pues el ácido es muy difícilmente soluble en agua. Fue empleado en el vino, hace años, y actualmente se halla prohibido su uso en enología. Algunos mostos se mantenían estériles con la adición de benzoato sódico, en dosis de un gramo por litro. Cantidades superiores, alteran las condiciones organolépticas.

METODO JAULMES⁹

Principio del método

Se miden las absorbancias en la región del ultravioleta y a partir de ellas se deduce la concentración en ácido benzoico.

9. P. Jaulmes y otros, *Ann. Falsif. Fraudes*, 54, 326, página 84, (1961)

Reactivos

ETER ETILICO.

SOLUCION DE ACIDO SULFURICO al 1/3 v/v en agua.

HIDROXIDO SODICO 1 M.

SOLUCION DICROMATO POTASICO, disolviendo 34 gramos de este reactivo en agua destilada hasta un litro.

Técnica operativa

1. En un embudo de decantación, se colocan 20 mL de vino y 25 mL de éter etílico, se agita.
2. La capa etérea se separa colocándola en un vaso.
3. De nuevo se añade al mismo vino, 25 mL de éter y se vuelve a efectuar la extracción de la misma forma anterior.
4. Se reúnen los extractos etéreos y se tratan rápidamente con 5 mL de solución de hidróxido sódico, por dos veces y al final con 5 mL de agua destilada.
5. Estas soluciones acuosas alcalinas, se evaporan a baño maría para eliminar el éter.
6. Se pasa la solución, una vez fría y cuantitativamente, a un matraz de 100 mL con tapón, se añaden 20 mL de ácido sulfúrico diluido y 20 mL de solución de dicromato. Se tapa, agita y deja en reposo durante una hora como mínimo.
7. En el caso de que la coloración amarilla, provocada por la adición del dicromato, desapareciera, convendrá una nueva adición de este producto.
8. Se añaden por dos veces, 20 mL de éter y se reúnen los líquidos etéreos. Se lavan con agua destilada y se decantan.
9. Cuantitativamente y con la ayuda de éter, se pasan a través de un filtro a un matraz de 50 mL, se lava el filtro con un poco de éter y se completa a volumen.
10. La solución etérea, se coloca en el espectrofotómetro en cubeta de 20 mm de paso de luz y provista de tapa, comparando las absorbancias con éter puro.
11. La medición se efectúa a 267 nm (A), 272 nm (B) y 276 nm (C).

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO-ALCOHOL, añadir a 5 g de hidróxido sódico, 50 mL de agua destilada, después de fría la solución, se añade alcohol etílico 96% hasta completar el volumen de 100 mL.

Cálculos

Se calcula la concentración de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$d = B - \frac{A + C}{2}$$

este valor se compara con la gráfica patrón, preparada con soluciones que contienen 10, 15, 20, 25, 30 y 40 miligramos de ácido benzoico por litro y bajo las mismas condiciones. Con esta técnica se pueden determinar hasta 4 mg/L.

METODO COLORIMETRICO¹⁰

Principio del método

Extracción por el éter, del ácido benzoico presente en el vino. Tratamiento del extracto por la mezcla nitro-sulfúrica y formación del ácido 3,5-dinitrobenzoico, que es extraído con éter y después recogido por la mezcla acetona-alcohol. La adición de hidróxido sódico, da origen a una coloración violeta. Esta reacción es sensible, específica y cuantitativa, medible con espectrofotómetro a la longitud de onda de 570 nm.

Reactivos

ETER ETILICO.

MEZCLA ACETONA - ALCOHOL, volúmenes a partes iguales, alcohol absoluto y acetona.

MEZCLA NITROSULFURICA, añadir a 10 g de nitrato potásico, 100 mL de ácido sulfúrico 96%.

Técnica operativa

Técnica para vinos secos o dulces (< 100 g/L)

1. En un embudo de decantación, se colocan 10.00 mL de vino, al que se añaden 2 mL de ácido sulfúrico al 25% y 25 mL de éter, dos veces seguidas. Agitar.
2. Decantar y filtrar el éter, por papel de filtro seco, colocar en un matraz aforado de 50 mL y enrasar.
3. Poner 20.00 mL de la solución etérea en erlenmeyer de 50 mL. Evaporar aspirando los vapores mediante el vacío, permaneciendo el erlenmeyer sumergido en baño de agua fría.
4. Añadir al residuo, 5 mL de la mezcla nitrosulfúrica, cuidando de empapar bien todo el residuo.
5. Llevar después al baño maría hirviente durante 35 minutos, agitando de cuando en cuando.
6. Enfriar en agua fría, añadir 5 mL de agua destilada, seguir enfriando y verter el contenido en una ampolla de decantación de 250 mL. Enjuagar el erlenmeyer con 5 mL de agua y volver a verter el contenido en la ampolla y añadir 30 mL de éter.
7. Agitar cinco minutos.
8. Eliminar la fase acuosa, después de cuidadosa decantación, y lavar el éter con 5 mL de agua.
9. Decantar con cuidado. Un lavado más prolongado originaría pérdidas de dinitrobenzoico en la fase acuosa, por lo que es preferible decantar bien, que volver a lavar.
10. Filtrar el éter por filtro revestido con sulfato sódico anhidro, lavar el filtro enseguida con 10 mL de éter.
11. Evaporar el filtrado en una pequeña cápsula a 35 °C, arrastrar con tres adiciones de 5 mL de acetona-alcohol, cada vez (previamente enfriado en la nevera). Recoger todos estos lí-

10. B.O.E., de 26 de julio de 1977.

quidos en un tubo de ensayo de tapón esmerilado y aforado a 20°C.

12. En un tubo de ensayo de tapón esmerilado y con trazo de aforo de 15 mL, poner de 0.5 a 5.0 mL de la anterior mezcla. Este volumen debe variar con la riqueza supuesta para obtener la reacción coloreada con el ácido dinitrobenzoico originado por 0.1 a 0.5 mg de ácido benzoico.
13. El método es válido entre 0.03 y 1 mg, si se utiliza aparato capaz de medir absorbancias superiores a 1.5.
14. Diluir el volumen de líquido puesto en el tubo, con la mezcla acetona-alcohol fría, hasta 14.7 mL y añadir después 0.3 mL de sosa al 5%, agitar y sumergir en hielo fundente.
15. La determinación, en cubeta de 10 mm de paso de luz a la longitud de onda de 570-580 nm. Después de 30 minutos y antes de 60 minutos a partir del momento de la mezcla.
16. Utilizar como solución compensadora para comparación una mezcla de 14.5 mL de acetona-alcohol con 0.3 mL de sosa al 5%.
17. Para obtener la curva patrón, preparar una solución valorada de 50 mg de ácido benzoico puro en 100 mL de éter.
18. Diluir esta solución a 1/10 con éter y tratar 10 mL de esta solución de 50 mg/L, como se ha indicado antes para la muestra.
19. La densidad óptica varía linealmente con la cantidad de ácido benzoico.

Cálculos

Llevar la absorbancia obtenida a la curva patrón y expresar el correspondiente contenido de ácido benzoico en mg/L.

3.36

Varios ácidos

COMENTARIOS

Se presenta una técnica por cromatografía de gas, que simultáneamente pueden identificarse los siguientes ácidos a la vez: MONOCLORACETICO, BENZOICO, SALICILICO, p-HIDROXI y p-CLOROBENZOICOS. Técnica muy interesante para el análisis de antifementos en vinos, por la simultaneidad en determinar estos compuestos antisépticos.

METODO GAS CROMATOGRAFICO¹¹

Principio del método

Extracción de los ácidos, mediante el empleo del éter etílico, previa la acidificación de la muestra de vino. El extracto etéreo, después de deshidratado, es utilizado para el análisis.

¹¹ D. Revuelta, G. Revuelta y F. Armisen, An. Quim., 71, páginas 179-182, (1975).

3.37

Reactivos

ETER ETILICO.

SULFATO SODICO ANHIDRO.

ACIDO SULFURICO, en solución acuosa al 10% en volumen.

ACIDO CLORHIDRICO concentrado.

METANOL.

CLOROFORMO.

Aparato y columnas

Cromatógrafo de gas, con detector de ionización de llama. Columna en tubo de acero inoxidable de 1/8 de pulgada y 1 metro de longitud. La fase estacionaria, es silicona SE-30 al 1 %, sobre Chromosorb W-AW, de 80-100 mallas.

Temperatura isoterma del horno a 155 °C. Gas portador, nitrógeno, con un flujo de 40 mL por minuto.

Técnica operativa

1. En un embudo de decantación de 500 mL, se vierten 10 mL de vino, 100 mL de éter etílico y 20 mL de ácido sulfúrico diluido. Se agita durante 5 minutos y se deja después, en reposo, para que se separen las dos fases líquidas.
2. Se elimina la capa acuosa, y la fase etérea se deseca con sulfato sódico anhidro.
3. Se inyectan en el cromatógrafo, 2 microlitros de la solución anterior, para efectuar las determinaciones del ácido monocloracético y el ester etílico del ácido p-hidroxibenzoico.
4. El resto del extracto etéreo, se evapora hasta sequedad. Al residuo seco se le añaden 10 mL de metanol y 0.5 mL de ácido clorhídrico.
5. Se coloca la mezcla en un matraz para reflujo y se mantienen durante 4 horas a suave ebullición (unos 60 °C). Se deja enfriar.
6. Al líquido anterior, colocado en un embudo de decantación, se extraen los esteres metílicos, con cloroformo.

5. De la capa clorofórmica, se toman 2 microlitros y se inyectan en el cromatógrafo, para determinar los ácidos: salicílico, benzoico, p-clorobenzoico y p-hidroxibenzoico.

6. Para la identificación, se prepara una solución con los ácidos citados, para poder determinar los tiempos de retención de cada uno de ellos y poderlos identificar en el cromatograma de la muestra objeto del análisis.

Observaciones

Podría efectuarse un análisis cuantitativo, pero en este caso deberá operarse con volúmenes medidos, durante las extracciones. Fundamentalmente este análisis es cualitativo, pero a la vista de la superficie de los picos, puede darnos una idea de cual es el componente más destacable, para luego aplicar una metodología específica para el análisis.

Cloropicrina

COMENTARIOS

La cloropicrina (tricloronitrometano), se emplea en la desinfección de suelo, cereales y como desinfectante en envases de gran volumen. Por su efecto antiséptico, ha sido utilizada, fraudulentamente, en vinos de baja calidad. La cloropicrina añadida al vino, se degrada con el tiempo en los siguientes compuestos: mono y dicloronitrometano. Pequeñas cantidades de estos degradados, así como el producto original, son fácilmente detectables por cromatografía de gas, con la ayuda del detector de captura electrónica.

METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS¹² _____

Principio del método

Extracción del tricloronitrometano y sus compuestos de degradación di y monocloronitrometano, con ciclohexano, en el vino. Determinación por cromatografía de gas, con detector específico de cap

12. INCAVI, *Diari Oficial Generalitat de Catalunya*, n° 277, página 2.675, (1982).

tura de electrones. La presencia de los picos de los dos metabolitos, en los vinos analizados, indican la adición de cloropicrina.

Aparatos y columnas

Cromatógrafo de gases, equipado con detector de captura de electrones con Ni₆₃ o bien H₃. Integrador, para registrar y valorar los tiempos de retención y superficie de los picos. Columna en acero inoxidable, de 2 metros de longitud y 118 de pulgada de diámetro exterior. Relleno con DEGS al 10%, sobre un soporte de Chromosorb W-AW-HMDS, de 80/100 mallas.

Reactivos

CICLOHEXANO.

SULFATO SODICO ANHIDRO.

CLOROPICRINA PURA, Fluka Ref. 91320.

Técnica operativa

1. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo, son las siguientes: gas portador, nitrógeno a 35 mL por minuto. Temperaturas del inyector y detector 200 °C en cada uno. Temperatura de la columna 80 °C.
2. En un embudo de decantación de 250 mL, se extraen 50 mL de vino, con 50 mL de ciclohexano. Se deja en reposo para que se separen las dos fases líquidas. Pueden emplearse volúmenes menores, pero siempre manteniendo la relación 1/1 entre el vino y el disolvente.
3. La fase orgánica, se deseca con sulfato sódico anhidro y se inyecta en el cromatógrafo un volumen comprendido entre 1 y 5 microlitros, de acuerdo a la sensibilidad del aparato.
4. Para la preparación de la solución de referencia, se emplea un vino que no contenga ningún producto interferente. La mejor comprobación, es efectuar una extracción e inyectar en el cromatógrafo. No debe aparecer ningún pico, aparte el del disolvente.
5. El ciclohexano también es indispensable comprobarlo, de la misma forma que en el procedimiento anterior, para asegurarse que no contenga algún pico coincidente con los que se van a determinar.

6. Con el vino comprobado, se prepara un patrón con 4 ppm de cloropicrina pura.
7. El patrón, recién preparado y analizado, presenta solamente el pico del tricloronitrometano. Con el tiempo, unos seis meses, se hidroliza la cloropicrina en sus metabolitos. Al cabo de este tiempo podrán fijarse los tiempos de retención de los compuestos de degradación.

Observaciones

a) Para evitar posible contaminación de las muestras, por causa de deficiencia en la limpieza del embudo de decantación, se aconseja operar de la siguiente forma:

Emplear tubos de ensayo de vidrio, nuevos para cada análisis. El tubo de ensayo puede ser de dimensiones 16 x 160 mm. Se colocan en el mismo partes iguales de vino y ciclohexano, se agita enérgicamente durante 2 minutos y luego se centrifugan, para separar las dos fases. Parte de la fase orgánica se vierte a otro tubo que contiene una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro, en polvo, se agita y se toma 1 microlitro para inyectar en el cromatógrafo.

b) Se recomienda sustituir el nitrógeno, como gas portador, por la mezcla de argón con 10% de metano, ya que este gas es más idóneo para el detector de captura electrónica.

Ferrocianuro y cianuro

COMENTARIOS

En los vinos naturales, se hallan cantidades muy insignificantes, del orden del microgramo, de cianuro. Niveles más altos de este componente, proceden, con toda seguridad, del tratamiento excesivo de los vinos con exacianoferrato (II) potásico, para la eliminación del hierro, cobre y/o proteínas. Modernamente se hace casi innecesario este tratamiento, debido al perfeccionamiento en las tecnologías empleadas en las bodegas. De todas formas, en agricultura, se emplean fungicidas coloreados fuertemente con azul de Prusia y pueden, accidentalmente, contaminar los vinos.

Se necesitan técnicas sensibles y rápidas, para detectar el cianuro en los vinos.

METODO DE LA CEE _____

Principio del método

Control de los vinos tratados por el exacianoferrato (II) potásico. Verificación de la ausencia de precipitado de exacianoferrato (II) fé

rico, en suspensión o formando un depósito. Comprobación de la ausencia de exacianoferrato (II) férrico por adición de una sal férrica, al vino acidulado. Comprobación de la presencia de hierro, precipitándolo por una mezcla de exacianoferrato (II) y exacianoferrato (III) alcalinos, añadidos al vino acidulado.

Reactivos

ACIDO CLORHIDRICO al 50% en volumen, exento de hierro. Se obtiene fácilmente la ausencia de hierro, mezclando el ácido con una cantidad igual de agua destilada. Esta mezcla se destila y el líquido obtenido está exento de hierro.

SOLUCION DE SULFATO FERRICO-AMONICO al 15% en agua destilada.

SOLUCION DE EXACIANO FERRATO (II) POTASICO al 10%.

SOLUCION DE EXACIANO FERRATO (III) POTASICO al 10%.

Técnica operativa

Investigación de trazas de exacianoferrato (II) férrico en suspensión

1. Antes de tomar la muestra del vino, se procederá a una agitación del envase que lo contiene, para mezclar el sedimento que pudiera existir.
2. Se toman 20 mL del vino y se colocan en un tubo de centrifuga, cónico, de 30 mL de capacidad. Se centrifuga durante 15 minutos a 3500 rpm.
3. Al observar el fondo del tubo en donde se halla la muestra, debe hallarse exento de partículas azules.

Investigación de trazas de iones ferrocianógenos en solución

1. En un tubo cónico de centrifuga de 30 mL, se vierten 20 mL de vino límpido, 1 mL de ácido clorhídrico al 50% y una gota de solución de sulfato férrico-amónico. Se agita y se deja en reposo, como mínimo, 24 horas.
2. Centrifugar durante 15 minutos a 3500 rpm.
3. El fondo del tubo debe estar exento de partículas azules de exacianoferrato (II) férrico.

Comprobación de la presencia de iones hierro en el vino

1. En un tubo de ensayo, se colocan 20 mL de vino, 1 mL de ácido clorhídrico al 50%, 1 gota de solución de exacianoferrato (II) potásico y una gota de solución de exacianoferrato (III) potásico. Agitar.
2. Una coloración o un precipitado de color azul, debe aparecer antes de 30 minutos.
3. Filtrar el líquido sobre el papel de filtro sin pliegues y lavando el filtro 2 veces con 5 mL de agua destilada, no se debe observar ningún color azul sobre el filtro.

Observaciones

Se pueden reemplazar y, con ventaja, la centrifugación por la filtración sobre papel de filtro exento de hierro, o mejor todavía, en un filtro de membrana de 0.45 micras de porosidad.

METODOS USUALES CEE _____

Principio del método

Dosado argentimétrico del ácido cianhídrico total, liberado por hidrólisis ácida y posterior destilación. Determinación del ácido cianhídrico libre, destilado al vacío y arrastre por una corriente de aire a la temperatura ambiente. Los derivados cianurados se expresarán en miligramos de ácido cianhídrico por litro y determinados con una sensibilidad de 0.1 mg.

Análisis del cianhídrico total

Aparato

Un matraz de fondo esférico de unos 500 mL, se coloca, con el cuello inclinado, sobre una placa de hierro de 20 x 20 cm, con un orificio central de 50 mm de diámetro. El balón se une a un refrige-

rante de West de 350 mm de longitud. La extremidad inferior de este refrigerante, en posición vertical, termina en un tubo de vidrio afinado, que conduce el destilado al fondo de un matraz receptor de 50 mL. Este matraz se halla sumergido en una mezcla de hielo y agua.

Reactivos

ACIDO SULFURICO DILUIDO. Mezclar 200 mL de ácido concentrado en una cantidad de agua, suficiente para obtener un volumen de un litro.

CLORURO CÚPRICO cristalizado.

SOLUCION DE ROJO FENOL. Se pesan 0.05 gramos de rojo fenol y se disuelven en 1.4 mL de una solución 0.1 M de hidróxido sódico. Se completa a volumen de un litro con agua destilada.

SOLUCION DE IODURO POTASICO. Disolver 250 gramos de ioduro potásico, reactivo análisis, en agua destilada hasta obtener un litro.

SOLUCION 0.001 M DE NITRATO DE PLATA. Se toman 10 mL de solución de nitrato de plata 0.1 M y se diluyen con agua hasta un litro, previa adición de 0.5 mL de ácido nítrico concentrado.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 1 M, puro y exento de hierro.

Técnica operativa

1. En el matraz de fondo esférico del aparato, se introducen 100.00 mL de vino filtrado (o sin filtrar, si se desea determinar también el ácido cianhídrico contenido en el eventual enturbiamiento azul), añadir 0.005 gramos, aproximadamente, de cloruro cúprico y 10 mL de ácido sulfúrico diluido.
2. En el matraz receptor, se vierten 5 mL de solución 1 M de hidróxido sódico, exenta de hierro.
3. Se destila hasta obtener 50 mL.
4. El destilado se vierte en un vaso de 400 mL situado en un baño maría hirviente. Este baño maría debe estar calentado eléctricamente, ya que si se emplea gas para calentar, éste

puede contener cianhídrico. Tampoco se debe fumar cuando se efectúa este análisis, pues el humo del tabaco también contiene cianhídrico. Para acelerar la evaporación, se puede dirigir una corriente de aire frío, sobre la superficie.

5. Se reduce el volumen por evaporación hasta unos 5-7 mL, lo que tiene lugar en unos 30 minutos (no se debe reducir el volumen a menos de 5 mL).
6. La solución, una vez fría, se filtra sobre un pequeño filtro, recogiendo el filtrado en un tubo de 20 x 180 mm. Se lava bien el filtro y el vaso, con algunos mililitros de agua.
7. El tubo de vidrio se coloca sobre un fondo negro y se ilumina lateralmente, con luz blanca. El líquido debe estar perfectamente límpido.
8. Añadir dos gotas de solución de rojo fenol, para apreciar mejor la turbidez. Algunas personas observan mejor la aparición del enturbiamiento, en una solución rosa que en una incolora.
9. Luego se añade una gota de solución de ioduro potásico. Valorar con la solución de nitrato de plata, hasta aparición de un ligero enturbiamiento estable. Sea n el volumen de solución necesaria para obtener este resultado.
10. Por otro lado, se prepara un tubo parecido al anterior, con 5 mL de solución 1 M de hidróxido sódico, dos gotas de solución de rojo fenol, una gota de solución de ioduro potásico y una cantidad de agua destilada suficiente para obtener un volumen idéntico a la del ensayo con vino.
11. Añadir solución de nitrato de plata 0.001 M, en cantidad suficiente para obtener el mismo enturbiamiento. Sea n' el volumen gastado.

Cálculos

Téngase en cuenta que un mililitro de solución de nitrato de plata 0.001 M, se corresponde a 54 microgramos de ácido cianhídrico. La cantidad de ácido cianhídrico total, contenida en el vino y expresada en miligramos por litro, se halla por la fórmula:

$$C = 0.54 (n - n')$$

Solamente se tendrá en cuenta una cifra decimal, después de la coma.

Se considerarán significativos, los ensayos cuya diferencia antes indicada, sea superior a 0.5 mL.

Cuando la diferencia es superior a 10 mL, investigar y determinar el ácido cianhídrico libre, por la metódica que se indica en el siguiente análisis.

Si la diferencia $n - n'$ es superior a 10 mL, comenzar de nuevo el análisis y emplear una solución de nitrato de plata 0.01 M.

Análisis del cianhídrico libre

Aparato

El aparato está formado por dos matraces de un litro, *A* y *B*, provistos de un tubo recto de 30 mm de diámetro y de 300 mm de longitud, con unión esmerilada que permita la separación. Uno de los matraces *A*, está provisto de un grifo que puede unirse a una bomba de vacío o también adaptar un pequeño embudo a través de un racor de plástico. El tubo recto, reposa sobre un mecanismo, que permite girar sobre su eje a una velocidad moderada.

Técnica operativa

1. En el matraz *B*, se introducen 5 mL de solución de hidróxido sódico. En el matraz *A*, 5 mL de agua destilada. Dejar girar los dos matraces y efectuar el vacío. Mientras, se calienta ligeramente para vaporizar un poco de agua, con objeto de eliminar el aire de su interior.
2. Se cierra el grifo y se elimina la unión con la bomba de vacío. Se coloca el matraz *B* en agua fría y luego en agua con hielo.
3. Se introducen, con precaución, 100 mL de vino en el matraz *A*, evitando todo lo posible la entrada de aire.
4. Colocar ahora el matraz *A* en un recipiente con agua tibia. El vino entra en ebullición. Se activa la destilación haciendo girar el matraz alrededor de su eje.

5. Después de haber destilado los dos tercios del matraz *A* (lo que se efectúa en unos 20 minutos), invertir el aparato colocando el matraz *B* en agua tibia y el *A* en agua con hielo. Redestilar en sentido inverso un tercio del contenido de *B*.

6. El matraz *A* contiene el alcohol, aldehídos, esterés y los iones ferrocianógenos combinados con el residuo del vino.

7. Se efectúa ahora la determinación del ácido cianhídrico libre, en el contenido del matraz *B*, tal como se ha indicado en el método anterior.

METODO ADDEO, NOTA Y CHIANESE¹³

Principio del método

El procedimiento se basa en la transformación del ión CN en $BrCN$, por tratamiento de la muestra, con agua de bromo. Después de eliminado el bromo en exceso, las soluciones de vino se extraen con cloroformo y los extractos son analizados por cromatografía de gas. Cantidades tan pequeñas como un microgramo por litro, pueden detectarse selectivamente en el detector de captura electrónica. La sensibilidad y precisión del método, puede compararse con la metódica colorimétrica.

Aparato y columnas

Cromatógrafo de gas provisto con detector de captura de electrones, utilizando Ni_{63} . Columna de vidrio de un metro de longitud y 3 mm de diámetro interior. Esta columna se llena con Porapak Q. Gas portador nitrógeno, a un flujo de 50 mL/min. Las temperaturas del inyector y del detector, son respectivamente 120 y 150 °C. La columna se mantiene a la temperatura de 112 °C.

13. F. Addeo, G. Nota y L. Chianese, *Am. J. Enol. Vitic.*, 29, págs 7-10, (1978).

Reactivos

SOLUCION DE ACIDO FOSFORICO al 20 % en peso.

AGUA SATURADA DE BROMO.

SOLUCION DE FENOL al 5% p/v.

CLOROFORMO.

Técnica operativa

1. Se vierten 10.00 mL de vino, en un tubo de centrifuga con tapón esmerilado, de unos 30 mL y se añaden 5 mL ácido fosfórico y 2 mL de agua saturada de bromo. Agitar.
2. Transcurridos cinco minutos, se añaden 4 mL de fenol al 5% y se agita manualmente. A continuación se añade 1 mL de cloroformo, se agita durante 1 minuto y luego se centrifuga durante cinco minutos a 1500 rpm.
3. De la capa orgánica de cloroformo, se toman 5 microlitros que se inyectan en el cromatógrafo.

Cálculos

Para la determinación cuantitativa del ión cianógeno, se prepara una solución de referencia de ácido cianhídrico. La relación entre la concentración y la altura del pico, es lineal entre valores de 25 a 100 microgramos de cianhídrico por litro de vino.

Observaciones

a) Con objeto de no sobrecargar el detector con el disolvente, se prevee en el aparato una válvula de dos vías a la salida de la columna. Después de haber registrado el pico de *BrCN*, se desvía el gas de salida al aire.

b) El pico del *BrCN* se separa perfectamente del cloroformo empleado como disolvente, que sale un minuto después.

METODO COLORIMETRICO¹⁴

Principio del método

Utiliza el reactivo Aquaquant de Merck, que forma una reacción coloreada violeta en presencia de cianuros, con la piridina y el ácido N,N'-dimetilbarbitúrico, No es necesario tratamiento alguno de la muestra de vino.

Reactivos

AQUAQUAQNT MERCK cianuros, ref. 14417. Este test contiene tres reactivos: CN-1, CN-2 y CN-3. Debe comprobarse antes del análisis, pues tiene caducidad.

ACIDO FOSFORICO concentrado.

Técnica operativa

1. En un pequeño matraz de destilación, se colocan 10.00 mL de vino.
2. Se adicionan 5 mL de agua destilada y 0.5 mL de ácido fosfórico concentrado.
3. Se destila a fuego muy lento (sin llegar a la ebullición), haciendo borbotear el gas desprendido en un tubo de ensayo que contenga una cucharadita del reactivo CN-1 disuelto en 10 mL de agua
4. Destilar durante 4 minutos.
5. Se retira el tubo de ensayo y se añade una cucharadita de reactivo CN-2 y se agita hasta disolución completa.
6. A continuación se añaden 10 gotas del reactivo CN-3 y se agita.
7. Se deja en reposo durante 10 minutos y se lee la absorbancia en cubeta de 10 mm de paso de luz a la longitud de onda de 585 nm, ajustado frente al agua.
8. Paralelamente se destila un patrón de 0.10 mg de cianuro, o un vino exento del producto a determinar, al que se ha añadido 0.1 mL de cianuro.

14. R. Viader Guixà, *Semana Vitivinícola*, número 1923, Junio, (1983).

Observaciones

a) Si no se observa la más mínima coloración violeta en la muestra, se le considera negativo y ya no es necesaria la lectura en el espectrofotómetro.

b) Es conveniente efectuar la comprobación del reactivo, dado que con el tiempo pierde su actividad.

Betaína

COMENTARIOS

Este componente se halla en el azúcar obtenido de la remolacha. Detectando la betaína en el vino, puede predecirse la adición de sacarosa al mosto, en el momento de la fermentación. En las uvas puede hallarse betaína y se ha podido comprobar la presencia en niveles de 0 a 5 mg/L de mosto.

METODO CENCI Y CREMONINI¹⁵ _____

Principio del método

Separación de la betaína con resinas de cambio iónico y separación por cromatografía en capa fina.

Reactivos

RESINA CATIONICA DOWEX-50 W

CROMATOPLACAS MERCK DE SILICAGEL H.

15. P. Cerzci y B. Cremonini, *Riv. Vit. En. (Conegliano)*, 5, página 195, (1973).

ETANOL, para cromatografía.

n-BUTANOL.

SOLUCION DE BROMOFENOL al 0.05%, en agua destilada, adicionada de amoniaco al 5% en v/v.

SOLUCION DE EOSINA AZULADA MERCK, al 0.05% en agua destilada.

ACIDO CLORHIDRICO 0.1 M.

Técnica operativa

1. Se decoloran 1000 mL de vino, con carbón activo. Con ácido clorhídrico se lleva a pH 3.0. Esta operación debe controlarse con un medidor de pH.
2. En una columna de vidrio, se colocan 100 mL de resina iónica, llevada a la forma ácida mediante el paso de ácido clorhídrico 2 M y lavada hasta eliminación de la acidez residual.
3. Se pasa el vino decolorado, por esta resina.
4. Lavar la columna con dos porciones de 300 mL de agua destilada y eluir la betaína con 1000 mL de hidróxido amónico al 2% y lavar con 300 mL de agua. Reunir el eluado y el agua, y concentrar por ebullición hasta unos 100 mL.
5. Cromatografiar sobre la placa.
6. Para el revelado se emplea: a) el azul de bromofenol amoniacal o bien, b) con la eosina azulada. Según esta última técnica, pulverizar la placa con la eosina, hasta obtener un color rosa uniforme.
7. Secar en corriente de aire caliente o en estufa a 125-130 °C durante unos veinte minutos.
8. La placa una vez seca, se observa a la luz ultravioleta de 366 nm o mejor todavía a 254 nm.
9. La betaína aparece como una mancha de color amarillo-crema, intensamente fluorescente.

Observaciones

a) La resina puede ser regenerada, tratándola con ácido clorhídrico 1 M.

b) La sensibilidad del método, permite poner de manifiesto la adición de azúcar tal, que pueda aumentar el grado alcohólico en un uno por ciento.

Antifermentos

METODO BIOLOGICO GAROGLIO STELLA¹⁶ _____

Principio del método

Extraer el antifermento del vino, y partir del producto extractado, para comprobar una refermentación. Es una técnica rápida y fiable.

Reactivos

ETER ETILICO.

SACA ROSA.

TIAMINA (vitamina B₁) cristalizada.

LEVADURA DE CERVEZA.

Técnica operativa

1. En un embudo de decantación de 250 mL, se extraen 100 mL de vino con 50 mL de éter, repitiendo igual extracción por segunda vez.
2. Se reúnen los extractos y se evaporan a sequedad sobre un baño maría.

3. Se toma el residuo con un sustrato preparado con. solución de sacarosa al 1 % adicionada de vitamina B₁, extracto de levadura y una siembra de levadura de cerveza.
4. Se coloca en una estufa a 28-30 °C, para que tenga lugar la fermentación.

Observaciones

Los autores comentan, que el vino no es un medio adecuado para el análisis biológico, por una serie de circunstancias, entre las que cabe destacar las siguientes:

- a) En países en que está autorizado el empleo de resinas de cambio iónico, el vino tratado por este sistema, puede quedar esterilizado.
- b) En el vino ya existen productos que son antisépticos de por sí: alcoholes, ácidos, taninos, colorantes, esterres y otros más.
- c) En una mezcla de antisépticos, se refuerza el poder inhibitor de una sustancia; si se elimina el antiséptico natural y el antiséptico fraudulento, no se beneficia de la acción sinérgica y queda sin poderse hallar.
- d) Es imposible obtener un sustrato «vino» o «mosto» patrón. La sensibilidad del método biológico clásico (Tarantola), es variable según la muestra analizada.
- e) El pH del medio de cultivo preparado, antes de la adición del extracto, es de 5.5 a 6. Cuando se adiciona el residuo del vino, el pH se sitúa en 4.0 aproximadamente. Aunque la concentración de sacarosa es baja, es muy eficaz para reconocer la presencia del antifermento.
- f) La levadura de cerveza, se prefiere a otras levaduras, por la facilidad de pesar. Se obtienen magníficos resultados.
- g) Por todas estas circunstancias, se ha pensado en la necesidad de separar el antifermento del vino o del mosto, mediante la extracción y, añadirlo a un sustrato standard, para comprobar la fermentabilidad del mismo.

16. P.G. Garoglio y C. Stella, Enc. Vitivinícola Mondiale, 7, página 36 (1973).

Isotiocianato de alilo

COMENTARIOS

Este antifermendo ha sido utilizado en años atrás. Su nombre vulgar es el de «esencia de mostaza» y su empleo se destinó a evitar el «picado» del vino. En la actualidad está totalmente prohibido su uso.

METODO UNICO DE LA CEE _____

Principio del método

El isotiocianato de alilo, eventualmente presente en el vino, y recuperado por destilación, se identifica por una técnica de cromatografía de gases.

Reactivos

ETANOL.

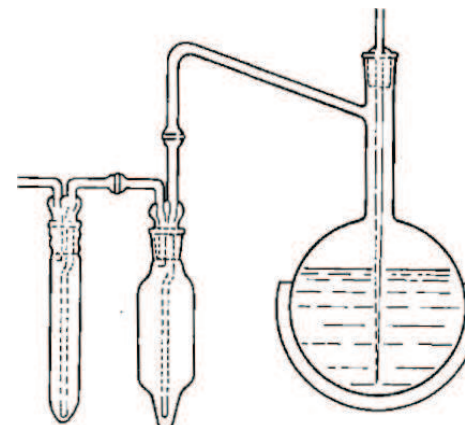
SOLUCION PATRON, preparada con 15 miligramos de isotiocianato puro, en un litro de alcohol.

MEZCLA REFRIGERANTE, formada por alcohol y nieve carbónica (temperatura -60 °C).

3.58

Aparatos

Aparato de destilación por corriente de nitrógeno, según la figura adjunta.



Calefactor termostático, flujómetro y cromatógrafo de gas con detector de espectrofotometría de llama, con filtro selectivo de 394 nm.

Columna de acero inoxidable, de 3 m de longitud y de 3 mm de diámetro interior. Relleno: Carbowax 20 M al 10%, sobre Chromosorb WHP de 80/100 mallas.

Técnica operativa

1. Colocar 2 litros de vino en el matraz de destilación. Introducir algunos mililitros de alcohol en los dos tubos de recuperación, hasta completa inmersión de la parte porosa, para la dispersión gaseosa.
2. Enfriar exteriormente los dos tubos, con la mezcla refrigerante.
3. Unir el matraz a los tubos receptores y comenzar la introducción de una corriente de gas nitrógeno, de aproximadamente 3 litros por hora.

3.59

4. Calentar el vino a 80 °C, regulando la calefacción de forma adecuada para que se mantenga constante la temperatura. Recuperar un total de destilado de 45 a 50 mL.
5. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo son: inyector a 200 °C, columna a 130 °C, gas portador, helio a 20 mL/min.
6. Inyectar una cantidad de solución patrón, de forma que el pico del isotiocianato de alilo, pueda ser fácilmente identificado en el cromatograma.
7. De igual forma inyectar una parte alícuota del destilado y comprobar el tiempo de retención y la altura del pico obtenido con el patrón.
8. En las condiciones indicadas de trabajo, no hay interferencia de otros compuestos que puedan hallarse en el vino.

METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS¹⁷ _____

Principio del método

Extracción del isotiocianato de alilo, con ciclohexano, en el vino. Determinación por cromatografía de gas, con detector específico de captura de electrones. La presencia de dos picos, próximos a los degradados de la cloropicrina, es característico de este compuesto.

Aparato y columnas

Cromatógrafo de gases, equipado con detector de captura de electrones, con Ni₆₃ o H₃. Integrador, para registrar los tiempos de retención, así como la superficie de los picos. Columna en acero inoxidable, de 2 m de longitud y 118 de pulgada de diámetro exterior. Relleno con DEGS al 10%, sobre Chromosorb W-AW-HMDS, de 80/100 mallas.

17. INCAVI, *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya*, n.º, 277, página 2.6715, (1982).

Reactivos

CICLOEXANO.

SULFATO SODICO ANHIDRO.

ISOTIOCIANATO DE ALILO.

Técnica operativa

1. Condiciones de trabajo del cromatógrafo: Gas portador nitrógeno a 36 mL/min. Temperaturas del inyector y del detector, 200 °C en cada uno. Temperatura de la columna 80 °C.
2. En un embudo de decantación de 250 mL, se extraen 50 mL de vino, con 50 mL de ciclohexano.
3. La fase orgánica se deseca con sulfato sódico anhidro.
4. Se inyecta en el cromatógrafo un volumen comprendido entre 1 y 5 microlitros, de acuerdo a la sensibilidad del aparato.
5. Solución de referencia. Se utiliza un vino que no contenga ningún producto interferente. La mejor comprobación, es efectuar una extracción e inyectar en el cromatógrafo; no debe aparecer pico alguno, aparte el del disolvente.
6. El disolvente también se comprobará, de la misma forma que en 5), para verificar que no contenga algún pico coincidente con los que se van a determinar.
7. Se prepara un vino patrón, con 4 ppm de isotiocianato de alilo puro.

Observaciones

a) Para evitar posible contaminación de las muestras, por efecto de deficiencia en la limpieza del embudo de decantación, se aconseja operar de la siguiente forma:

Emplear tubos de ensayo nuevos para cada análisis. El tubo de ensayo puede ser de dimensiones 16 x 160 mm. Se colocan en el mismo partes iguales de vino y ciclohexano, se agita enérgicamente durante 2 minutos y luego se centrifuga, para separar las dos fases. Parte de la fase orgánica, se vierte a otro tubo de iguales dimensiones, que contiene sulfato sódico anhidro, se agita, y se toma el volumen para inyectar al cromatógrafo.

b) Se recomienda, sustituir el nitrógeno, como gas portador, por la mezcla de argón con 10% de metano, ya que este gas es más idóneo, para el detector de captura de electrones.

Cumarina

COMENTARIOS

Este compuesto ha sido empleado en pocas ocasiones, como aromatizante en algunos tipos de vino. Dado que existe una legislación limitando los niveles máximos de este producto, es por ello el interés de disponer de metodías analíticas adecuadas.

METODO DYER Y MARTIN¹⁸

Principio del método

Se aprovecha la solubilidad de la cumarina¹⁹, en cloroformo. La solución clorofórmica, es la que se emplea para el análisis cromatográfico.

Aparato y columna

Se emplea un cromatógrafo con detector de ionización de llama y registrador-integrador acoplado al mismo. La columna de vidrio de

18. R.H. Dar y G.E. Martin, J. Assoc. Off Anal. Chem., 59, páginas 780-782, (1976).

19. Nombre químico 1,2-benzopirona.

2 mm de diámetro interior y 1.8 metros de longitud, se halla llena de una fase estacionaria, compuesta por el 10% de SP-1000 (Carbowax 20M-TPA), sobre Chromosorb W-AW de 100/120 mallas.

Reactivos

SOLUCION PATRON DE CUMARINA. Se colocan en un matraz aforado de 200 mL, 100 miligramos de cumarina²⁰ y se disuelven con etanol, completando después el volumen.

CLOROFORMO

Técnica operativa

1. En dos embudos de decantación de 250 mL, se vierten 100 mL de vino en cada uno de ellos.
2. A uno de los embudos, se adiciona 1 mL de la solución patrón de cumarina y 1 mL de etanol, al otro embudo.
3. Se dispone así de una muestra con adición del componente a analizar y otra sin ella.
4. Se mezcla bien y a continuación se añaden 20 mL de cloroformo y se agita vigorosamente durante 2 minutos. Se deja en reposo para que las dos capas se separen.
5. Se toman 10-12 mL de la capa clorofórmica y se vierten en un tubo de centrifuga. Se somete a centrifugación para obtener una solución límpida.
6. Se inyectan 5 microlitros en el cromatógrafo.
7. Se repite la inyección por tres veces y se toma el promedio de los tres análisis.
8. Los parámetros de trabajo del cromatógrafo, son: Horno isotérmico a 180 °C, inyector y detector a 200 °C. Gas portador, helio a un flujo de 30 mL por minuto. El tiempo de retención de la cumarina, en las condiciones indicadas de trabajo, es de unos 15 minutos.

20. De la firma Eastman Kodak núm. 9 o similar.

Cálculos

La concentración de cumarina, se calcula con el empleo de la siguiente fórmula

$$\text{cumarina} = 5 \times \frac{U}{S - U} \text{ en mg/L}$$

en donde,

U = altura del pico de la muestra sin adición de cumarina.

S = altura del pico de la muestra con adición de cumarina.

Los valores de U y S , que se emplean en la fórmula, son cifras promedio de las tres inyecciones.

Observaciones

Si se emplea el integrador, en lugar de la altura, se anotarán las áreas integradas de los picos correspondientes.

Edulcorantes sintéticos

COMENTARIOS

Dentro de la gama de los edulcorantes artificiales, los más utilizados son: el ciclamato, la sacarina y la dulcina. En el vino, y las bebidas derivadas del mismo, no está permitida la adición de cualquier tipo de edulcorante artificial. La presencia de cualquiera de los citados, es una adición fraudulenta, y por tanto, interesa disponer de técnicas analíticas que puedan poner de manifiesto la presencia de los mismos.

METODO CROMATOGRAFICO EN CAPA FINA²¹

Principio del método

Los edulcorantes se separan mediante el empleo del cambiador iónico líquido y posterior cromatografía en capa fina. La identificación se efectúa por pulverización con 2,7-diclorofluoresceína.

Para investigar la dulcina en presencia de vanillina y esteroides del

21. Comm. Anal. Vini, FV/316, (1969)

ácido p-hidroxibenzoico, se pulveriza con una solución de 4-dimetilaminobenzaldehído. La dulcina, forma un compuesto de color anaranjado; la vanillina y los esteroides del ácido p-hidroxibenzoico no dan ninguna reacción coloreada.

Reactivos

ÉTER DE PETROLEO, zona ebullición entre 40 y 60 °C.

CAMBIADOR DE IONES LIQUIDO. Amberlite La-2 u otro semejante.

ACETONA.

XILOL.

n-PROPANOL.

METANOL.

ACIDO ACETICO GLACIAL.

SOLUCION ACUOSA ACIDO ACETICO (1+4)

ACIDO NITRICO, 1 M.

ACIDO SULFURICO al 10 %.

ACIDO FORMICO.

SOLUCION ACUOSA AMONIACO (1 + 3).

SOLUCION DE 2,7-DICLOROFLUORESCINA al 0.2 % p/v en etanol.

SOLUCION DE 4-DIMETILAMINO BENZALDEHIDO, 1 gramo en un matraz de 100 mL con 50 mL de etanol, 10 mL de ácido nítrico al 25% y enrasar a volumen con etanol.

SOLUCIONES PATRON: Dulcina 0.1% en metanol; Sacarina 0.1 % en mezcla de metanol/agua 1/1; Ciclamato 1 % en ídem; vanillina 1 % en ídem; ester del ácido p-hidroxibenzoico 1 % en metanol.

TRATAMIENTO DEL CAMBIADOR DE IONES. Agitar enérgicamente, 5 mL del cambiador líquido, con 95 mL de éter de petróleo y 20 mL de ácido acético diluido. Se emplea la fase líquida superior.

MEZCLA LIQUIDA: Xilol 45 mL, n-propanol 6 mL, ácido acético 7 mL y ácido fórmico 2 mL.

Aparatos y material

Recipiente para poder efectuar la cromatografía en capa fina. Cromatofolios Merck, de celulosa y poliamida. Jeringa Hamilton de 10 microlitros. Lámpara ultravioleta de 254 mm o bien 360 nm. Dispositivo de pulverización.

Técnica operativa

1. Acidificar 50 mL de vino con 10 mL de ácido sulfúrico diluido, y extraer por dos veces cada una, con 25 mL del cambiador líquido.
2. Se reúnen las fracciones, se lavan tres veces, cada vez con 50 mL de agua destilada.
3. Se reúnen las fracciones amoniacaes y se evaporan a sequedad, a 50 °C sobre baño maria o en evaporador rotativo.
4. El residuo se toma con 5 mL de acetona y dos gotas de ácido nítrico 1 M. Se filtra y de nuevo se evapora a sequedad sobre baño de agua a 70 °C. Es importante evitar un exceso de calentamiento.
5. El residuo se toma con 1 mL de metanol. De este líquido, se colocan de 5 a 10 microlitros, en la placa cromatográfica, así como también 2 microlitros de solución patrón.
6. Se cromatografía hasta una altura de 15 cm, operación que requiere prácticamente una hora.
7. Se seca la placa al aire y se pulveriza con la solución de 2,7-diclorofluoresceína. La presencia de sacarina y ciclamato, se observa de inmediato a la luz del día, bajo forma de manchas claras, sobre un fondo de color salmón.
8. A la luz ultravioleta, se observan las dos anteriores y la dulcina, como manchas de color azul sobre fondo amarillo. A partir de la base, se observan primero el ciclamato, luego la sacarina y finalmente la dulcina.
9. La vanillina y los esteres del ácido p-hidroxibenzoico, presentan el mismo *R_f*, que la dulcina. Para identificar la dulcina en presencia de estos dos, se pulveriza la placa con la solución de 4-dimetilaminobenzaldehído. A la luz del día, la dulcina aparece de color anaranjado, mientras que la vanillina y esteres del p-hidroxibenzoico, no dan mancha alguna.

Observaciones

Pueden ser detectadas cantidades del orden de: 50 mg/L para el ciclamato, 10 mg/L para la sacarina e igual cantidad para la dulcina.

β -Asarona

COMENTARIOS

La β -asarona²² es un agente aromático utilizado como tal, en algunos vinos y sobre todo en vermut. En este último caso se empleaban en sustitución del aceite de cálamo. Las dosis alcanzaban, desde los 5 a 30 miligramos por litro. Según los resultados de estudios toxicológicos efectuados, la FDA estadounidense, ha prohibido su empleo, en cualquiera de sus formas.

METODO WOJTOWICK²³

Principio del método

La β -asarona es arrastrada por vapor de agua, en la muestra de vino y posteriormente sometido a extracción del destilado, con exano. Se efectúa una determinación fluorimétrica.

22. cis-2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenceno.

23. E.J. Wojtowics, *J. Agric. Food. Chem.*, 24 Páginas 526-528, (1976).

Reactivos

SOLUCION SATURADA DE CLORURO SODICO.

EXANO.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 1 M.

ACIDO CLORHIDRICO 1 M.

Técnica operativa

1. En un matraz de 500 mL, se vierten 100 mL de vino o 50 mL de vermut.
2. Se añaden 40 mL de agua destilada y 10 mL de solución saturada de cloruro sódico.
3. Se destila y se recogen 100 mL del destilado, pasándolos después a un embudo de decantación de 250 mL y se extraen con 50 mL de exano, durante 4 minutos.
4. Se separa la capa del disolvente y se lava primero con 20 mL de solución de hidróxido sódico, y se decanta la capa acuosa.
5. A continuación se añaden 20 mL de ácido clorhídrico y después de decantada la capa de ácido, se añaden 20 mL de agua destilada.
6. De esta solución de exano, se toma la cantidad suficiente para medir en una cubeta fluorimétrica de 10 mm de paso de luz.
7. Se determina la emisión a 350 nm, con excitación de 310 nm.
8. Deberá prepararse una curva patrón con soluciones de referencia de β -asarona, entre 0 y 20 mg por litro.

Cálculos

Se comparan las lecturas de la muestra problema, con la curva standard. La sensibilidad alcanza 0.1 a 0.2 mg/mL de muestra.

METODO A.O.A.C.²⁴

Principio del método

Se separa por destilación la β -asarona, y el destilado se extrae con exano y se inyecta en el cromatógrafo. Se compara con una solución de referencia, preparada con β -asarona pura.

Aparato y columna

Se prepara el cromatógrafo con detector de ionización de llama. La columna en acero inoxidable de 1/8 de pulgada de diámetro exterior o bien de vidrio con 2 mm de diámetro interior por 1.8 m de longitud. La fase estacionaria formada por 10% de SP-1000²⁵ sobre Chromosorb W-HP de 80/100 mallas. Gas portador helio a 40 mL por minuto. Los tiempos de retención del palmitato de etilo y la β -asarona, son aproximadamente 5 y 6 minutos, respectivamente.

Reactivos

ALCOHOL ETILICO solución acuosa al 20%

SOLUCION PATRON INTERNO, preparada con 0.1 g de palmitato de etilo, disuelto en 100 mL de exano.

SOLUCION DE REFERENCIA, preparada por disolución de β -asarona en alcohol a razón de 1 mg/mL.

SOLUCION SATURADA DE CLORURO SODICO, filtrada.

Técnica operativa

1. En un matraz de destilación, se vierten 100 mL de vino y 50 mL de agua destilada. Destilar hasta haber recogido un volumen de 100 mL.
2. Este volumen se pasa a un embudo de decantación, al que se añaden 100 mL de solución saturada de cloruro sódico. Se mezcla bien.
3. A continuación se añaden 10 mL de exano, agitando vigorosamente durante 2 minutos. Se deja en reposo para que se separen las dos capas.

²⁴. AOAC, 15 edición, número 977.09, (1990).

4. Se separa la fase acuosa, dejando cuantitativamente el exano en el embudo.
5. Este volumen se vierte en tubo de centrifuga. Se debe recuperar prácticamente el volumen de 10 mL, ± 0.5 mL.
6. Se inyectan en el cromatógrafo, 5 microlitros.
7. Con esta primera inyección, se comprueba si aparecen los picos de β -asarona y palmitato de etilo. Si no se aprecia pico del primer compuesto, puede considerarse que no se alcanza la concentración de 0.5 mg/L, ya que este es el límite analítico que puede medirse en las condiciones de trabajo indicadas.
8. Si el pico observado tiene el mismo tiempo de retención, que el palmitato, empléese la altura del pico, para determinar la concentración de β -asarona.
9. En el caso de que éste producto esté presente dentro de los límites de la curva patrón y no existe palmitato de etilo, se añaden 200 microlitros de la solución de patrón interno, mezclar bien y cromatografiar de nuevo.
10. Se utiliza la relación de alturas de picos para determinarla β -asarona, de acuerdo a la curva de la solución de referencia. Si el pico de la β -asarona sale del límite de la escala, se diluye la mezcla con exano, de forma que la concentración oscile entre 1 y 5 mg por litro.

Cálculos

Se preparan las soluciones de referencia que contengan 1, 2, 3, 4 y 5 miligramos de β -asarona por litro. A cinco matraces aforados de 100 mL, que contengan aproximadamente 90 mL de alcohol diluido, se les añaden: 100, 200, 300, 400 y 500 microlitros de la solución de referencia de β -asarona, se mezclan y se completan a volumen, con alcohol diluido.

Cada una de estas soluciones patrón, se someten a destilación y extracción, como la muestra problema. Al exano contenido en el tubo de centrifuga, se añaden 200 microlitros de la solución de patrón interno de palmitato de etilo, se mezcla bien y se inyectan 5 microlitros en el cromatógrafo. La relación de picos de cada cromatograma de las soluciones de referencia, son las que se emplearán para comparar con el problema.

Estireno

COMENTARIOS

La determinación de estireno en los vinos, es muy importante, ya que este producto forma parte del material de construcción de los depósitos de fibra de vidrio, tan empleados en la actualidad en las bodegas. Este compuesto, es muy soluble en el vino.

METODO BRUN Y GIFFONE²⁶

Principio del método

Se basa en una técnica de extracción del vino, por cierto sencilla, con adición de un patrón interno e inyección en el cromatógrafo de gas. El disolvente de extracción es el exano y, como patrón interno, se emplea el ciclohexano. Esta metódica permite detectar 10 microgramos de estireno por litro de vino.

²⁶S. Brun, M. Giffone y H. Matiras, *Trav. Soc. Pharm. (Montpellier)*, 37, páginas 207-216, (1977).

Aparato y columna

El cromatógrafo debe disponer de detector de ionización de llama. La columna, en acero inoxidable de 1/8 de pulgada y 7.5 metros de longitud. La fase estacionaria, es: Carbowax 1540 al 10% sobre Chromosorb W-AW de 60/80 mallas. Esta columna debe acondicionarse a 150 °C, durante 6 horas como mínimo.

Reactivos

PATRON INTERNO, preparado con 35 mg de ciclohexano, reactivo análisis, disueltos en exano, hasta un volumen de 100 mL.

SOLUCION DE REFERENCIA, para comparación. Se disuelven 30 mg del monómero estireno y 35 mg de ciclohexano, en 5 mL de exano.

ACIDO ACETICO.

Técnica operativa

1. Los parámetros de trabajo, son: Horno isotérmico a 130 °C, detector a 150 °C, inyector a 180 °C. Gas portador, nitrógeno a 60 mL por minuto.
2. En un embudo de decantación de 250 mL, se vierten 200 mL de vino y 20 mL de exano. Se agita durante 3 a 4 minutos.
3. A continuación se añade 1 mL de ácido acético, agítase suavemente y déjese en reposo para separar las dos capas líquidas.
4. De la capa superior, se toman 2 mL y se mezclan con 2 mL de la solución de patrón interno. Se mezcla bien y se toman 5 microlitros, para la inyección en el cromatógrafo.
5. Para comparación, se inyecta 1 microlitro de la solución de referencia.

Cálculos

Para la determinación cuantitativa, se hace uso de la fórmula que se indica a continuación:

$$\text{Estireno X} = \frac{A \times H_2 \times h_1 \times q}{B \times H_1 \times h_2 \times F} \text{ microgramos por litro}$$

en que las letras representan lo siguiente:

X = Concentración de estireno en la muestra.

A = Concentración de la solución de referencia en µg.

B = Conc. de cicloexano en solución referencia (µg /L).

H₂ = Altura pico de cicloexano en solución referencia.

H₁ = Altura pico de estireno en solución referencia.

h₁ = Altura pico de estireno en la muestra.

h₂ = Altura pico de cicloexano en la muestra.

q = Concentración de cicloexano en la muestra.

F = Relación de volúmenes de inyección entre la muestra referencia.

Abreviadamente la fórmula, se reduce a la siguiente:

$$\text{Estireno} = 6 \times \frac{H_2 \times h_1}{H_1 \times h_2} \text{ en microgramos/L}$$

METODO POR ABSORCION EN EL UV²⁷ _____

Principio del método

Por extracción del vino con exano, puede identificarse y también cuantificarse el estireno, por absorción en el ultravioleta.

Reactivos

EXANO.

Técnica operativa

1. Se tratan, en un embudo de decantación, 100 mL de vino con 10 mL de exano puro. Se agita, con relativa energía, durante unos 4 minutos. Se dejan en reposo para que se separen las dos capas líquidas.

²⁷. P.G. Garoglio, *Enci. Vitivin. Mondiale*, 7, página 67, (1973).

2. La fase orgánica superior, casi siempre permanece emulsionada. Para obtener una perfecta separación, la fase orgánica separada, se lleva a un tubo de centrifuga y durante 5 minutos se somete a 3000 rpm.
3. Un volumen de la capa perfectamente límpida, se coloca en el espectrofotómetro.
4. Se efectúa una exploración del espectro comprendido entre 320 y 200 nm. El estireno presenta un máximo de absorbancia, que se sitúa en los 248 nm.
5. Medir la absorbancia a aquella longitud de onda y también a 275 nm (longitud de onda a la cual el estireno tiene la mínima absorción).

Cálculos

Simplemente se calcula la diferencia entre la absorbancia a 248 nm y la correspondiente a 275 nm.

Se traza una curva de tarado, empleando un vino exento de estireno, al que se le añaden: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 miligramos de estireno por litro. Para trazar la gráfica, se somete cada una de las soluciones patrón, al análisis como se ha indicado, llevando la diferencia de absorbancias en función de la concentración de estireno

Metatartárico

de vanadato en 150 mL de hidróxido sódico 1 M, se pasa la solución a un matraz aforado de 500 mL y se añaden 200 mL de la solución de acetato sódico, completando a volumen con agua.

HIDROXIDO SODICO 1 M.

ACIDO SULFURICO 0.25 M.

ALCOHOLETILICO 96 %.

Técnica operativa

1. Centrifugar la muestra antes del análisis, para que se halle completamente límpida.
2. En un tubo de centrifuga, se colocan 20 mL del vino centrifugado, al que se añaden 5 mL de la solución de acetato de cadmio.
3. Se mezcla y se deja en reposo durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifuga durante 5 minutos.
4. Se decanta con precaución el líquido límpido. La presencia de un precipitado en el fondo del tubo, ya indica la presencia del ácido metatártarico.
5. Para confirmarlo, se lava el residuo con 10 mL de agua destilada, procurando dejar suelto el precipitado.
6. Se añade 0.2 mL de la solución de acetato de cadmio, se centrifuga nuevamente y se decanta el líquido.
7. En el tubo se introduce 1 mL de hidróxido sódico y se coloca en un baño maría hirviente durante 5 minutos.
8. Después de frío se añade 1 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de vanadato amónico.
9. La presencia de ácido metatartárico, se pone en evidencia por el color rojo que aparece.
10. Es interesante efectuar una prueba en blanco con todos los reactivos, cuyo color final será amarillo.

METODO COLORIMETRICO²⁸

COMENTARIOS

El ácido metatartárico se emplea para la estabilización de los vinos, con objeto de evitar la precipitación del bitartrato potásico.

Principio del método

El ácido metatartárico en ambiente débilmente ácido, reacciona con el acetato de cadmio dando un precipitado insoluble en agua, que calentado con hidróxido sódico se descompone formando ácido tartárico. Este último reacciona con una solución de monovanadato amónico, produciendo una coloración roja.

Reactivos

ACETATO DE CADMIO 2-hidrato al 5%, disolviendo 5 g del producto en un matraz de 100 mL con 1 mL de ácido acético concentrado y completando a volumen con agua destilada.

SOLUCION ACETATO SODICO al 27%.

SOLUCION VANADATO AMONICO al 2%. Se disuelven 10 g

28. Deuts. Lebensm.-Rundschau, 6, página 167, (1969).

ACIDO CLORHIDRICO 2 M.

ACIDO CLORHIDRICO 0.1 M, saturado con oxalato de torio.

Acido oxálico

Técnica operativa

1. Se evaporan en un vaso o cápsula, 50.00 mL de vino límpido (centrifugado o filtrado) hasta unos 10 mL.
2. Añadir 10 mL de ácido clorhídrico 2 M, para obtener una solución 1 M de clorhídrico.
3. Se añaden 2.5 mL de la solución de nitrato de torio, agitando, sin frotar las paredes. Se deja en reposo 24 horas.
4. El precipitado formado de sal de torio del ácido oxálico, se filtra a través de un filtro sin cenizas. Dejar que se seque el filtro.
5. Colocar el filtro en una cápsula de platino y se incinera a la temperatura de 500-550 °C.
6. Se enfría en un desecador y se pesa el óxido de torio. Sea *P* el peso hallado.

COMENTARIOS

El ácido oxálico no está presente en el vino, aunque algunas veces se puede encontrar incidentalmente, como consecuencia del tratamiento no legalizado, para la eliminación del exceso de calcio en el vino.

Cálculos

Para calcular la cantidad de ácido oxálico, se emplea la siguiente fórmula:

$$P \times 0.9549 \times 20 \text{ en g/L}$$

METODO HENNING Y LAY²⁹

Principio del método

Consiste en la precipitación del ácido oxálico como sal de torio, que después de calcinación se determina como óxido de torio.

Reactivos

SOLUCION DE NITRATO DE TORIO, se disuelven 6 g del producto pentahidrato, colocado en un matraz de 100 mL, con ácido clorhídrico 1 M y se completa a volumen con el mismo ácido.

29. K. Henning y A. Lay, *Weinberg und Keller*, 12, página 425, (1965).

METODO ENZIMATICO

Principio del método

El ácido oxálico se descompone en ácido fórmico y CO₂ a pH 5.0, en presencia de la oxalato descarboxilasa. El formiato formado es cuantitativamente oxidado a bicarbonato por la NAD. La cantidad de NADH formada es esteoquímicamente igual a la cantidad de ácido oxálico.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número 755699, para 10 determinaciones, que contiene 8 frascos con reactivos, que deberán reconstituirse algunos con agua destilada. La conservación, así como su reconstitución, se indica en el folleto que acompaña a cada test.

Técnica operativa

1. Si la cantidad de ácido oxálico presente en el vino es mayor que 0.2 g/L, deberá efectuarse una dilución de 10 veces.
2. Se preparan las cubetas de plástico, como en todo análisis enzimático. El espectrofotómetro estará situado en la longitud de onda de 340 nm, con la lámpara de tungsteno.
3. Seguir paso a paso las indicaciones del folleto adjunto al test.

Cálculos

Para hallar la concentración de ácido oxálico, se aplica la siguiente fórmula:

$$c = 0.3959 \times A_o \text{ en g por litro}$$

en donde A_o representa la diferencia de absorbancias leídas en el análisis.

4. ALCOHOLES

ETANOL (grado alcohólico)	4.5
METODO USUAL DE LA CEE (Areometría)	4.5
METODO REBELEIN (químico)	4.8
METODO ENZIMATICO	4.10
METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS	4.12
METODO EBULLIOMETRICO	4.13
METANOL	4.14
METODO COLORIMETRICO DE REBELEIN	4.14
METODO GAS CROMATOGRAFICO	4.17
ALCOHOLES SUPERIORES	4.18
METODO QUIMICO DE GUYMON	4.18
METODO GAS CROMATOGRAFICO	4.21
GLICEROL	4.23
METODO GAS CROMATOGRAFICO	4.24
METODO ENZIMATICO	4.25
METODO O. I. V. Ae21	4.26
2,3-BUTANODIOL	4.30
METODO QUIMICO	4.30
METODO GAS CROMATOGRAFICO	4.32
SORBITOL	4.33
METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS	4.33
METODO ENZIMATICO	4.35
MANITOL	4.37
METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS	4.37
METODO GAYON Y DUBOURG	4.38

Etanol (grado alcohólico)

COMENTARIOS

El alcohol es el producto principal de la fermentación del mosto de uva. Además del etanol, son varios los alcoholes y polialcoholes que están presentes en un vino. Algunos de los alcoholes superiores, son los que dan la característica a los vinos. El etanol es el alcohol mayoritario, y a éste producto van dirigidas las técnicas analíticas, para determinar su concentración.

Para efectuar el análisis de alcohol, deben ser tomadas ciertas precauciones al preparar la muestra, para evitar la pérdida por evaporación, dilución o contaminación. Muchas son las metodicas para determinar la concentración de este producto: métodos basados en el punto de ebullición; destilación seguida por oxidación química; peso específico del destilado; índice de refracción u otras propiedades del destilado; técnicas enzimáticas, cromatografía de gas, reflexión en el infrarrojo y otras.

METODO USUAL DE LA CEE (Areometría) _____

Aparatos

Destilador.- Formado por un matraz de 1000 mL, de ajuste esmerilado, con una columna rectificadora de 20 cm de longitud, o en su defecto una bola Kjeldahl. Para evitar toda pirogenación de las ma-

terias extractivas, este matraz se calienta con mechero de gas, a través de una plancha metálica de 20 x 20 cm, con un orificio en el centro de 8 cm de diámetro. El vapor se condensa en un refrigerante de West (no serpentín), colocado verticalmente. El destilado se recoge en un matraz, a través de un tubo terminado en punta. Este matraz receptor, debe estar sumergido en agua con hielo.

Puede emplearse otro modelo de destilador, incluso el de arrastre de vapor, lo que permite acelerar la operación, a condición de que el aparato y la técnica, cumplan las condiciones indicadas para el método de referencia que son las que a continuación se detallan:

Un volumen de 200 mL de una mezcla alcohólica de 10% en volumen, destilado cinco veces consecutivas, debe dar como resultado 9,9% después de la última destilación, lo que quiere decir que no se puede producir una pérdida superior al 0.02% en el curso de una destilación.

Alcohómetro: Debe responder a las prescripciones del Consejo 76/765/CEE, de 27 de julio de 1976, relativa a los alcohómetros y areómetros para alcohol. Estos aparatos deben estar contrastados por el Estado.

Se empleará un termómetro graduado en grados y décimas con escala de 0 a 30 °C, verificado adecuadamente. La probeta estará constituida por un tubo de vidrio cilíndrico de 36 mm de diámetro y 320 mm de altura, mantenida vertical sobre una placa nivelable. El diámetro interior de la probeta, debe ser 6 mm superior, como mínimo, al diámetro del alcohómetro.

Reactivos

LECHADA DE CAL, preparada con 120 gramos de CaO por litro.

Técnica operativa

Destilación

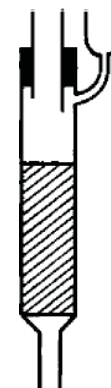
1. A los vinos jóvenes o espumosos, se les debe eliminar, todo lo posible, el gas carbónico que contengan, mediante agitación de 260 mL de la muestra en frasco de 500 mL, previamente siliconado interiormente.
2. Al interior del matraz se vierten 250 mL de vino, medidos en un matraz, cuyo diámetro interior del cuello sea de 12 mm, se enjuaga cuatro veces con 5 mL de agua, cada vez.

4.6

3. Se añaden 10 mL de lechada de cal. La materia colorante del vino, virará debido a la alcalinidad. En el caso de vinos acetificados (picados), muy ácidos, etc., se añade lechada de cal, hasta que dé franca reacción a la fenolftaleína, observada por toques exteriores.
4. Se añaden trozos de piedra pómez y una gota de solución acuosa diluida de silicona antiespuma al 1 %, con objeto de evitar la posible formación de espuma.
5. Recoger el destilado en el mismo matraz que se ha medido el vino, en el que se han vertido 10 mL de agua destilada.
6. Se deben destilar, como mínimo, 200 mL.
7. Se completa el volumen a la misma temperatura inicial, con una aproximación de 5 °C, con agua destilada.

Observaciones

a) Se puede evitar la alcalinización del vino, colocando a la salida del refrigerante, un tubo de prolongación que contenga en su interior 10 gramos de resina cambiadora de iones de base fuerte, bajo forma de hidróxido. La resina debe ser de 50/100 mallas.



b) Esta resina retiene el ácido acético, dióxido de azufre libre y combinado y el dióxido de carbono, que han sido conjuntamente destilados con el alcohol. Diez gramos de esta resina, son eficaces para 30 destilaciones de vinos normales.

c) La regeneración se efectúa con hidróxido sódico en agua al 5% y posterior lavado con agua destilada por 6 veces consecutivas.

4.7

Medida de la densidad del destilado

1. El destilado se coloca en la probeta, se agita, y se mantiene perfectamente vertical.
2. Se introduce el termómetro y el alcoholómetro. La lectura del termómetro, se efectúa un minuto después de haber agitado el conjunto, para lograr la igualdad de temperatura de la probeta, termómetro, alcoholómetro y destilado.
3. Se retira el termómetro y se lee el grado alcohólico, después de un minuto de reposo.
4. Deberán efectuarse, como mínimo, tres lecturas. Si la temperatura del destilado no es la de 20 °C, se efectuará una corrección, con el empleo de la tabla II.
5. Es necesario que la temperatura del líquido, tenga poca diferencia con la temperatura ambiente, como máximo 5 °C. En caso contrario y para mayor exactitud, se recomienda utilizar una habitación termostatzada a 20 °C.

METODO REBELEIN (químico)¹ _____

Principio del método

Es un método por oxidación química del alcohol destilado. Es una técnica de microdestilación, con equipo muy simple. El tiempo total del análisis es de 5 a 6 minutos, con un error medio de 0.05 %. Esta técnica ha sido ampliamente comprobada y verificada su validez. La firma GAB, tiene comercializado este método con destilador y placa calefactora, diseñado especialmente.

Reactivos

SOLUCION CROMATO POTASICO, preparada con 67.445 g de cromato potásico y agua hasta completar un litro.

ACIDO NITRICO diluido, 770 mL del ácido concentrado y agua hasta un litro.

SOLUCION IODURO POTASICO, preparada con 300 gramos del reactivo puro, 100 mL de NaOH 1 M y 500 mL de agua

destilada, cuando disuelto se completa el volumen a un litro.

SOLUCION DE TIOSULFATO, disolver 86.194 gramos de tiosulfato sódico en 100 mL de NaOH 1 M y 500 mL de agua

destilada, cuando disuelto se completa el volumen a un litro.

INDICADOR DE ALMIDON, preparado con 10 gramos de almidón soluble, disueltos en 500 mL de agua que contenga 20 gramos de ioduro potásico y 10 mL de hidróxido sódico 1 M.

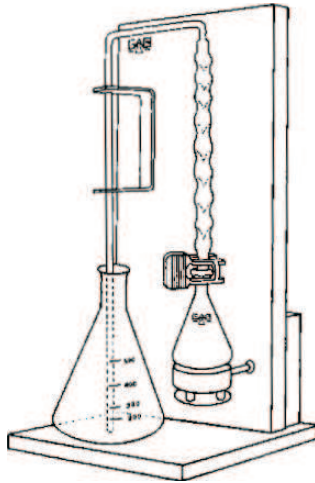
Técnica operativa

1. El aparato destilador GAB, deberá estar dispuesto para el trabajo; no es necesaria agua de refrigeración. Previamente la placa calefactora se tendrá conectada, con objeto de que alcance la temperatura de trabajo (unos 20 minutos).
2. Al erlenmeyer receptor, de 500 mL, se vierten 10.00 mL de la solución de cromato y 25 mL de ácido nítrico diluido. Esta cantidad es suficiente para oxidar 1 mL de solución de etanol, del 14%. Si la concentración es mayor que la citada, deberá diluirse el vino al efectuar el análisis.
3. En el recipiente destilador, de 100 mL, se colocan 12 mL de agua destilada, 1.00 mL de la muestra de vino y piedra pómez en polvo. Si es necesario se añade sílica antiespuma.
4. La salida del tubo del destilador, debe sumergirse en el líquido del erlenmeyer de 500 mL.
5. Se hierve durante 3 minutos (la destilación debe ser completa).
6. Se retira el erlenmeyer en donde se ha recogido el destilado.
7. Se añaden unos 300 mL de agua destilada, luego 10 mL de solución de ioduro y 10 mL del indicador de almidón.
8. Se valora con la solución de tiosulfato, hasta color azul celeste permanente.

Cálculos

Con el método comercializado y modificado por GAB, no es necesario ningún cálculo, ya que el contenido de alcohol viene indicado en la bureta directamente.

¹. H. Rebelein, *Chem. Mikrobiol Technol. Lebensma.*, 2, páginas 112-121, (1973).



METODO ENZIMATICO

Principio del método

El etanol es oxidado por la nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD), en presencia de la enzima alcohol dehidrogenasa (ADH) a acetaldehído. El equivalente de esta reacción se halla en el lado del etanol y NAD. A pH alcalino y bloqueando el acetaldehído formado, puede desplazarse el equilibrio. El acetaldehído es oxidado en presencia de aldehído deshidrogenasa (Al-DH) cuantitativamente a ácido acético.

La cantidad de NADH formada en las dos reacciones, equivale a la mitad de la cantidad de etanol. NADH es un valor medible y se puede determinar a 340 mm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número 176290, para unas 30 determinaciones. Contiene 2 frascos con reactivos, alguno de los cuales se deben reconstituir con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como su reconstitución, se indican en el folleto que acompaña a cada test analítico.

4.10

Técnica operativa

1. La muestra de vino se diluye 1000 veces. Para ello se toman 10.00 mL de vino y se colocan en un matraz aforado de 100 mL, completando el volumen con agua destilada. De ésta dilución se toman 1.00 mL y en otro matraz de 100 mL se diluye de nuevo. Con esta última solución se efectúa el análisis.
2. Se preparan las cubetas de plástico de 10 mm de paso de luz.
3. El espectrofotómetro, con lámpara de tungsteno, se situará en la longitud de onda de 340 mm.
4. Seguir paso a paso las indicaciones del folleto adjunto al test analítico.

Cálculos

La cantidad de alcohol, se halla según la fórmula:

$$\text{Etanol} = 110.428 \times A_e$$

el valor hallado representa el peso de etanol, en gramos, por 100 mL de vino. Para expresar el contenido de alcohol en volumen, la fórmula se transforma en la siguiente:

$$\text{Etanol} = 139.200 \times A_e$$

La dilución que se ha indicado, permite el análisis de vinos hasta una graduación del 15 % de alcohol. Si el contenido alcohólico es mayor, convendrá efectuar otra dilución diez veces mayor, y multiplicar el resultado por esta última dilución.

METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS²

Principio del método

La determinación cromatográfica del etanol en los vinos, es una técnica muy avanzada. Se emplea como patrón interno, la acetona, y se han hallado resultados halagadores. Se logra una precisión del 0.05%, en el análisis de un vino.

2. B. Stackler y E.N. Christensen, *Am. J. Enol. Vitic.*, 25, 4, páginas, 202-207 (1974).

4.11

La técnica ofrece varias ventajas sobre otros métodos, como son: excelente precisión, metódica que puede ser automatizada y resultados extraordinariamente rápidos. En grandes bodegas, en las que se analizan muchas muestras diariamente, las ventajas anteriores son de extrema importancia.

Aparato y columna

Cromatógrafo con detector de llama de hidrógeno. La columna en acero inoxidable, de 2 m de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro exterior con un relleno de Carbowax 600 al 3% sobre Chromosorb T de 40/60 mallas.

Técnica operativa

1. Se prepara el cromatógrafo, con los siguientes parámetros: programa isoterma a 80 °C, temperatura del inyector 120 °C, temperatura del detector 125 °C. Gas portador helio a 110 mL por minuto.
2. Con el empleo de un diluidor automático, se toman 0.1 mL de vino y 25 mL de diluyente, que será una mezcla de agua y acetona como patrón interno.
3. La cantidad de muestra inyectada, será de 0.5 microlitro. Se hará uso de un integrador para efectuar las determinaciones cuantitativamente.

Cálculos

Es necesario efectuar unas inyecciones, con patrones de etanol puro, para poder comparar las áreas de los picos hallados en la muestra de vino.

METODO EBULLIOMETRICO

Principio del método

La disminución del punto de ebullición de las mezclas de agua y alcohol, han sido utilizadas para la determinación de la concentración del alcohol en el vino. Una historia de los métodos para deter-

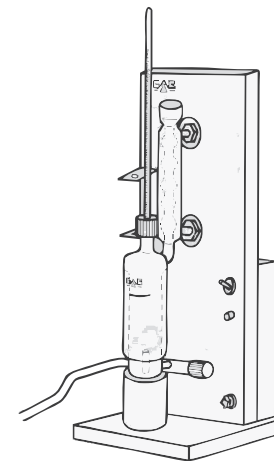
minar el alcohol, utilizados en el siglo XIII, pueden hallarse en el trabajo de Marco y Leoci³. El ebuliómetro Malligand data de 1875 y fue modificado por Salleron en el año 1881.

Observaciones

a) Es una metódica aproximada, ya que a pesar de que las reglas calculadoras tengan sus correcciones, está previsto para mezclas hidroalcohólicas. En general, los vinos blancos, son los que más coinciden en los resultados. Vinos tintos y dulces, se apartan más de la realidad.

b) El ebuliómetro, ha venido funcionando con mechero de alcohol, como elemento calefactor. Están contruidos en material metálico, y por tanto, no es visible el interior de la caldera. Es muy importante que se mantenga sin incrustaciones el interior, con objeto de *lograr una perfecta y suave ebullición del líquido*.

c) La firma GAB ha creado un ebuliómetro, construido totalmente en vidrio, que incorpora un refrigerante para evitar las pérdidas de vapor por un exceso de ebullición. Además, la calefacción eléctrica ha sustituido al clásico mechero de alcohol. También incorpora un dispositivo electrónico, que regula automáticamente la potencia calorífica, con lo que se logra una ebullición muy regular.



3. O. de Marco y B. Leoci, *Riv. Vitic. Enol.*, 28, página 145-161, (1975).

Metanol

COMENTARIOS

El metanol es un producto que se forma directamente en la fermentación, aunque se halla presente en pequeñas cantidades en los vinos. La actividad de la pectinasa, es quien provoca la formación de metanol, por desmetilación del ester metílico de la α -1,4- δ galacturonopiranos. La levadura raramente causa demetilación durante la fermentación.

La dosis oral letal de este producto, es de 340 mg/Kg de peso, en la persona. Este alcohol se metaboliza por el hígado, de igual forma que el etanol. Existen límites de este producto en varias bebidas alcohólicas, incluidas el vino.

METODO COLORIMETRICO DE REBELEIN⁴ _____

Principio del método

El metanol se separa del vino o licores, por destilación, conjunta-

4. H. Rebelein, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 61, páginas 211-212, (1965).

mente con el etanol. El destilado se oxida a formaldehído, que reacciona colorimétrica mente, con la rosanilina o bien con el ácido cromotrópico. El método descrito utiliza la oxidación con permanganato potásico y la reacción coloreada, con el ácido cromotrópico.

Reactivos

SOLUCION PERMANGANATO POTASICO ACIDO FOSFORICO. Disolver 200 gramos de ácido ortofosfórico en agua hasta un litro. Se toman 10 mL de ésta solución y se valora con NaOH 1 M. Se calcula la concentración de ácido fosfórico en los 990 mL restantes, y se ajusta a solución 1 M, por adición de agua o fosfórico. Se disuelven en agua 52.67 gramos de permanganato potásico y se completa a un litro con agua. En un matraz de 250 mL, se vierten 60 mL de la solución de permanganato, 100 mL del fosfórico 1 M y se completa a volumen con agua destilada.

SOLUCION ACIDO OXALICO-SULFURICO, preparada por mezcla de 15.75 gramos de ácido oxálico dihidratado con 100 mL de agua, se añaden 25 gramos de ácido sulfúrico concentrado y se diluye hasta el volumen de 250 mL con agua destilada.

SOLUCION ACIDO CROMOTROPICO. Se disuelven 300 mg del ácido en 20 mL de agua destilada. Si se dispone de su sal, será necesario obtener el ácido libre, disolviendo 10 g de la sal en 25 mL de agua, se añaden 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y 50 mL de metanol. Se calienta justo a ebullición y se filtra. Enfriar y añadir 100 mL, o más, de isopropanol, para precipitar el ácido cromotrópico.

SOLUCION NITRATO DE PLATA 1 M.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO al 30%.

Técnica operativa

1. Se destila el vino, obteniendo un volumen de destilado igual al volumen original. Se determina la concentración de etanol ($V = \% \text{ en volumen}$), para calcular el volumen del mismo que se ha de emplear en la determinación del metanol, según la fórmula $250/V$.

2. Medir la cantidad de destilado antes calculado con una bureta, colocando el líquido en un erlenmeyer, a continuación se añade agua hasta que el volumen total sea de 48 mL.
3. Se añade 1 mL de solución de nitrato de plata y 0.5 mL de hidróxido sódico. Se coloca un refrigerante de reflujo y se hierve durante 30 minutos.
4. Se lava el interior del refrigerante, con varias porciones de agua, empleando un volumen total de 10 mL.
5. Se destila a un matraz de 50 mL. Cuando se ha terminado la destilación se completa el volumen del matraz con agua destilada. La concentración de etanol en este destilado debe ser exactamente de 5%.
6. En un tubo de 10 mL con tapón, se colocan 2 mL de destilado y 5 mL de permanganato. Se tapa y agita. Se deja reposar 15 minutos.
7. Se añaden 2 mL de la solución de oxálico y se deja desprender el carbónico.
8. A los 15 minutos la solución debe ser incolora y límpida. Si se observa alguna partícula de dióxido de manganeso, se tapa y agita suavemente. Para una determinación precisa, es importante mantener una alta concentración de dióxido de carbono.
9. Inmediatamente, en un tubo de 25 mL con tapón, que contenga 1 mL del ácido cromotrópico, se añade 1 mL de la solución anterior y 10 ml de ácido sulfúrico concentrado, se mezcla y se tapa.
10. Se coloca en un baño de agua a 60 °C, durante 20 minutos, pasar luego a un baño de 20 °C y se deja enfriar.
11. Se emplea cubeta de paso de luz de 10 mm y el espectrofotómetro en la longitud de onda de 570 nm, empleando aire como referencia.

Cálculos

Es necesario preparar soluciones patrón de metanol. Estas soluciones se tratan como ha quedado indicado anteriormente, pero sólo a partir del número 6). La gráfica resultante sirve para determinar cuantitativamente el metanol en el vino.

METODO GAS CROMATOGRAFICO⁵

Principio del método

La determinación del metanol por esta metódica, es fácil, exacta y rápida. El destilado obtenido cuantitativamente del vino, es el que se inyecta en el cromatógrafo.

Aparato y columna

El cromatógrafo, equipado con detector de llama de hidrógeno. La columna en acero inoxidable de 2 m de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro exterior, relleno de Porapak QS (polímero de etilvinilbenceno sililado) de 80/100 mallas.

Se calienta la columna durante 24 horas a 210 °C para acondicionarla.

Técnica operativa

1. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo, serán las siguientes: Isoterma a 115 °C. Gas portador nitrógeno a 40 mL/min. Inyector a 210 °C y detector a 220 °C.
2. Se inyecta 1 microlitro del destilado.
3. Se prepara una solución patrón, pesando un gramo de metanol, para disolverlo con un litro de agua.
4. De esta solución concentrada, se preparan diluciones que contengan 50, 100, 250 y 500 miligramos de metanol por litro.

Cálculos

Del registro obtenido de los patrones y muestras, puede calcularse el metanol, por comparación de las alturas de los picos o bien por las áreas halladas en el integrador.

5. C.Y. Lee, T.E. Acrey y R.M. Butts, *Anal. Chem.*, 47, páginas 747-748, (1975).

Alcoholes superiores

COMENTARIOS

Durante la fermentación, además del etanol, se forman alcoholes de mayor número de átomos de carbono. De acuerdo al mecanismo indicado por Eherlich, se forman los alcoholes superiores por oxidación de un ceto-ácido, descarboxilación y finalmente reducción del aldehído al correspondiente alcohol. Los más importantes alcoholes superiores son: el n-propanol, isobutanol, isoamílico.

Si se aumenta la aireación durante la fermentación, puede provocar un aumento de los alcoholes superiores.

METODO QUIMICO DE GUYMON⁶

Principio del método

Los alcoholes superiores reaccionan con el p-dimetilaminobenzaldehído, aldehído salicílico y vanillina, en presencia de ácido sulfúrico

6. J.F. Guymon, *Anal. Proced. Brandy, Universidad California, Davis, (1959).*

co concentrado, para formar compuestos coloreados. El ácido sulfúrico deshidrata los alcoholes a hidrocarburos no saturados, que reaccionan con los aldehídos aromáticos. Es necesario eliminar interferencias, mediante el tratamiento del destilado con nitrato de plata.

Reactivos

SOLUCION PATRON CONCENTRADA. Se prepara con el alcohol isoamílico puro (zona destilación entre 131 °C y 132 °C) y alcohol isobutílico (zona destilación entre 107.5 °C y 108 °C). Es preferible efectuar la destilación, recogiendo las fracciones indicadas. Se mezclan cuatro volúmenes de alcohol isoamílico y un volumen de isobutílico. Pesar exactamente 1 gramo de la anterior mezcla disolviéndolo con agua hasta un litro. Esta es la solución de stock.

SULFATO DE PLATA.

CINC en gránulos.

SOLUCION DE ACIDO SULFURICO, preparada por mezcla de volúmenes iguales de agua y ácido sulfúrico concentrado.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 6 M.

SOLUCION DE p-DIMETILAMINO BENZALDEHIDO, preparada pesando 0.5 gramos de p-dimetilaminobenzaldehído disueltos en un litro de ácido sulfúrico concentrado. Esta solución debe prepararse diariamente. Manténgase la disolución en hielo.

Técnica operativa

1. Puede emplearse para el análisis el destilado obtenido para la determinación del alcohol. En un matraz de 250 mL se vierten 25.00 mL del destilado.
2. Se añaden 0.25 g de sulfato de plata, 0.5 mL de solución de sulfúrico y una pequeña cantidad de porcelana porosa o piedra pómez.
3. Se coloca un refrigerante de reflujo y se hierve durante 15 minutos. Sin detener la ebullición y transcurrido el tiempo indicado, se vierten, por el refrigerante, 5 mL de solución de hidróxido sódico y unos pocos gránulos de cinc.
4. Se mantiene la ebullición durante 30 minutos.

5. Dejar enfriar, se separa el refrigerante de reflujo y se sustituye por uno para destilación, colocando en la punta del mismo un matraz de 50 mL.
6. Se destila y se recogen 48 mL, completando después hasta el volumen con agua destilada.
7. Cuidadosamente, se mide 1.00 mL del destilado y se vierte en un tubo de ensayo de 25 x 200 mm colocado en un baño de hielo.
8. A continuación se vierten 20 mL de la solución fría de p-dimetilaminobenzaldehído. Durante esta mezcla entre reactivo y destilado, es necesario agitar, con objeto de evitar cualquier sobrecalentamiento.
9. Prepárense una serie de tubos, en los que se efectuará las mismas adiciones, pero empleando las soluciones patrón. Estas se preparan en matraces de 100 mL a los que se añaden: 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 35 mL de la solución de stock.
10. Después, a cada uno de los matraces, se añaden 7 mL de alcohol del 95%, previamente purificado, por reflujo sobre sulfato de plata y posterior destilación, recogiendo la fracción comprendida entre el 10 y el 75%.
11. Las soluciones patrón se completan a volumen con agua destilada. Todos los tubos deben contener un líquido con transparencia y color como el agua destilada.
12. Los tubos se tapan con papel de aluminio y se pasan a un baño de agua hirviendo, calentándose durante 20 minutos exactos.
13. Se enfrían a continuación en agua de hielo. Después de transcurridos de 5 a 10 minutos, se dejan en gradilla para que adquieran la temperatura ambiente.
14. Se determina la absorbancia a la longitud de onda de 525 nm en comparación con un ensayo en blanco en el que sólo se halle el reactivo y agua destilada.

Cálculos

Se prepara la gráfica patrón, a partir de las lecturas de absorbancia y los miligramos de aceite de fúsel o alcoholes superiores de cada

una de las soluciones patrón. La fórmula indicada a continuación define la cantidad:

$$\text{Aceite de fúsel} = \frac{C \times 50}{V} \text{ en mg por litro de vino}$$

en donde C es la concentración deducida de la gráfica, expresada en mg/L y V el volumen del destilado de vino, en mL.

METODO GAS CROMATOGRAFICO⁷

Principio del método

Es una técnica modificada por Ough⁸ en la que utiliza unas fases estacionarias distintas, con objeto de lograr una mayor resolución y rapidez.

Reactivos

SOLUCION PATRON DE ALCOHOL AMILICO, preparado por dilución de 5 g de alcohol amílico, Eastman No. 18, que contiene un 76.2% de alcohol isoamílico y un 23.8% de amílico activo, en 500 mL de alcohol etílico al 50%.

SOLUCION PATRON DE ALCOHOL ISOBUTILICO, se disuelve 1 g de alcohol isobutílico en 500 mL de alcohol etílico al 50%.

SOLUCION PATRON DE ALCOHOL PROPILICO, preparado por disolución de 1 gramo de alcohol 1-propílico en 500 mL de etanol al 50%.

SOLUCION DE PATRON INTERNO, por disolución de 1 mL

7. J. H. Kahn, F. M. Trent y otros, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 51, páginas 1330-1333, (1968).

8. M. A. Amerine y C. S. Ough, *Methods for Analysis of Musts and Wines*, página 108, (1980).

de 3-pentanol a 100 mL con alcohol etílico de 96%, se añade 1 mL de esta solución a cada uno de los patrones preparados para el análisis.

Técnica operativa

1. De las soluciones patrón se preparan diluciones de forma que su concentración sea próxima al contenido de la muestra, mezclándole también el correspondiente patrón interno.
2. Se preparará una columna de acero inoxidable de 1/8 de pulgada de diámetro y 1.8 metros de longitud. La fase estacionaria se prepara con Gas Chrome R, 100/120 mallas mezclado con 2% de 1,2,6-hexanotriol y 2% de glicerol.
3. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo, equipado con F.I.D. son: Temperatura del horno 65 °C, Detector e inyector 200 °C, gas portador, nitrógeno a un flujo de 30 mL/min.
4. Destilar cuantitativamente el vino y a 10.00 mL de éste destilado se añade 0.1 mL del patrón interno.
5. Inyectar en el cromatógrafo, 2 microlitros.
6. El mismo volumen se inyectará de los patrones, para poder comparar la altura de los picos del cromatograma.

4.22

Glicerol

COMENTARIOS

El glicerol es, después del agua y del alcohol, el constituyente del vino que aparece en mayor abundancia. Debido a su sabor dulce, igual al de la glucosa, contribuye al sabor suave de los vinos. El glicerol se forma al comienzo de la fermentación alcohólica, de tal manera que los primeros 50 gramos de azúcar fermentados producen la mitad de la glicerina presente en el vino. Su formación depende de la cantidad inicial de azúcar, de la naturaleza de las levaduras y también, fundamentalmente, de las condiciones de fermentación, tales como la temperatura, acidez, pH, aireación, azufrado, etc.

Los vinos tintos, generalmente, tienen mayor contenido de glicerol que los vinos blancos. Ello es debido a que los vinos tintos fermentan a mayor temperatura y su valor de pH es más alto.

El glicerol puede ser determinado por distintos métodos, pero hasta hace poco todos presentaban un tiempo de realización bastante elevado. Los métodos antiguos se basan en separar, purificar y pesar el glicerol. En la actualidad, existen métodos rápidos, como son la cromatografía en fase gaseosa, técnica muy simple, y el análisis enzimático, muy exacto y rápido.

4.23

METODO GAS CROMATOGRAFICO⁹ _____

Principio del método

Con columna adecuada, el glicerol puede ser cromatografiado cualitativa y cuantitativamente. Esencialmente el método empleado es el de Feil y Marinelli, utilizando columna de Porapak. Se efectúa inyección directa del vino, mezclado con patrón interno.

Aparato y columna

Se emplea un cromatógrafo con detector de ionización de llama de hidrógeno o similar. La columna en acero inoxidable de 2 metros de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro exterior, rellena de Porapak Q de 80/100 mallas.

Reactivos

PATRON INTERNO DE n-EXANOL. Preparado con 250 mL de etanol al 30% y 4 mL de n-exanol, redestilado.

GLICEROL.

Técnica operativa

1. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo son: Temperatura del inyector 250 °C, temperatura del detector 285 °C y la columna isotérmica a 245 °C. Gas portador nitrógeno a 30 mL/min.
2. Se mezcla 1 mL de vino o solución patrón de glicerol con 0.2 mL del patrón interno. De esta mezcla se inyectan en el cromatógrafo 3 microlitros para el análisis.
3. El pico de glicerol se identifica por su tiempo de retención y se confirma por el aumento del área de su pico, con la inyección de un patrón conocido.
4. Como patrón interno se utiliza el n-exanol, ya que en el vino es un producto raramente presente.

5. En las condiciones expuestas anteriormente, los tiempos de retención de distintos picos son los siguientes:

Etanol	3.65
2,3-butanediol	4.45
Lactato de etilo	5.35
n-exanol	6.95
Glycerol	9.50

Cálculos

Se prepara la curva patrón, a partir de diluciones de glicerol en agua destilada. Las concentraciones para el trazado de la gráfica pueden ser: 0.1 a 0.8 g/L.

Pueden emplearse las áreas de los picos, o bien la altura de los mismos, para el cálculo cuantitativo.

METODO ENZIMATICO _____

Principio del método

El glicerol es fosforilizado por la gliceroquinasa, en presencia de adenosina-5-trifosfato a glicerol-3-fosfato. Mediante la piruvatoquinasa, se transforma en piruvato adenosina-5-difosfato. El piruvato es hidrogenado por nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). La cantidad de éste último es equivalente al glicerol presente en la reacción. Se mide en la región del espectro ultravioleta de 340 nm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número 148270, para unas 30 determinaciones. Contiene tres frascos con reactivos, algunos de los cuales deberán reconstituirse con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como su reconstitución, se indican en el folleto que acompaña a cada test analítico.

9. M.F. Feil y L. Merinelli, *Am. Soc. Srew. Chem. Proc.*, páginas 29-34. (1969).

Técnica operativa

1. Para vinos que no superen la cantidad de 5 gramos de glicerol por litro, se diluyen 10 veces con agua destilada.
2. En el caso de que la cantidad de glicerol supere los 5 g/L, la dilución debe ser de 100 veces.
3. La longitud de onda del espectrofotómetro se situará en los 340 nm.
4. Seguir paso a paso las indicaciones del folleto adjunto al test de análisis.

Cálculos

La concentración de glicerol en el vino se halla por la siguiente fórmula:

$$\text{Glicerol} = 4.41 \times A_g$$

si se ha efectuado la dilución de 10 veces. En el caso de que se haya diluido 100 veces, se deberá multiplicar el resultado anterior por 10.

Observaciones

Los vinos tintos pueden analizarse sin decoloración previa.

METODO O. I. V. Ae21

Principio del método

El glicerol se oxida con ácido periódico y el formaldehído formado se hace reaccionar con la floroglucina, dando una coloración que se mide con el espectrofotómetro a 480 nm. A la muestra se la somete a tratamiento, para eliminar sustancias interferentes, mediante clarificación y purificación.

Aparato

Espectrofotómetro previsto para trabajar con cubetas de paso de luz de 10 mm y a la longitud de onda de 480 nm.

Reactivos

SOLUCION DE ACIDO PERIODICO 0.05 M. En un matraz de 1 litro, se colocan 11.5 gramos de periodato potásico (peso molecular 230); si se emplea el $K_2H_3IO_6$ (peso molecular 304), se pesarán 15.2 gramos, 800 mL de agua destilada y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. En un baño de agua, se calienta con suavidad, hasta completa disolución, se enfría y enrasa a volumen con agua. Esta solución se mantiene bien durante dos semanas.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 7 M. SOLUCION DE ACIDO SULFURICO 0.5 M. HIDROXIDO DE BARIO, sin pulverizar. **ACETONA.**

SOLUCION DE FLOROGLUCINA al 0.2%, debe prepararse diariamente.

SOLUCION DE GLICEROL standard, preparada por dilución de 20 mL de glicerol destilado, en agua hasta 100 mL. Se determina la concentración de glicerol mediante un refractómetro. Se diluye una parte alícuota, de forma de obtener una solución con una concentración de 0.1 g/L.

Técnica operativa

Separación del glicerol y 2,3-butanodiol de las sustancias interferentes

1. En un erlenmeyer de 100 mL con tapón de goma, se colocan 5 gramos de hidróxido de bario, 5 g de arena lavada y 10.00 mL de vino. Si el vino es dulce (más de 120 g/L), emplear 5.00 mL.
2. Se agita vigorosamente durante 30 segundos. Dejar reposar, agitando de vez en cuando.
3. Añadir 50 mL de acetona, agitar fuertemente durante 30 segundos.
4. Se coloca el erlenmeyer en un baño de agua a 45 °C, agitando fuerte cada minuto aproximadamente, durante un total de 5 minutos.

5. Filtrar sobre vidrio poroso número 4 la solución todavía caliente, con la ayuda de succión.
6. Lavar el residuo con 40 mL de agua y finalmente con 5 mL de solución de hidróxido sódico. Después, por tres veces con acetona, agitando el residuo en cada adición. Es interesante que el residuo quede lo más seco posible.
7. Los líquidos de filtrado y lavados se pasan a un matraz de destilación fraccionada y destilar hasta que el termómetro marque 100 °C, en este momento se destilan 20 mL más.
8. Al residuo de la destilación, todavía caliente, se le añaden 5 mL de ácido sulfúrico 0.5 M. Se enfría y cuantitativamente se pasa el residuo a un matraz aforado de 50 mL, llevando a volumen con agua destilada.
9. Este residuo se emplea para determinar el glicerol y también el 2,3-butanodiol.

Determinación del glicerol

10. En un matraz de 100 mL se colocan 5.00 mL del destilado anterior y se diluye con agua hasta el enrase.
11. De esta dilución se toman 20.00 mL y se colocan en un matraz, con tapón esmerilado, de 60 mL al que se añaden 10 mL de solución de ácido periódico. Se agita y se deja en reposo durante 5 minutos.
12. Rápidamente se vierten, dejando resbalar el líquido por la pared del matraz, 10 mL de solución de hidróxido sódico, agitar y añadir seguidamente 10 mL de solución de floroglucina. Agitar.
13. Colocar en la cubeta del espectrofotómetro y efectuar la lectura de absorbancia del color violeta a 480 nm.
14. La coloración que se obtiene cambia con suma rapidez, por ello la lectura debe efectuarse antes de los 50 segundos.
15. El ensayo en blanco, se efectúa con 20 mL de agua destilada y el reactivo correspondiente.

4.28

Cálculos

Preparar soluciones a partir de la solución standard de glicerol, por dilución con agua hasta 200 mL, empleando 25, 50, 75, 100, 125, 150 y 175 mL. Se toman de cada una de estas soluciones 20.00 mL y se efectúa la determinación, comenzando por la operación número 11).

A partir de la gráfica obtenida, se determina la cantidad de glicerol en el vino, conocida la absorbancia a 480 nm.

4.29

2,3-butanodiol

COMENTARIOS

Durante la fermentación, pueden formarse tres isómeros de este compuesto. La fermentación vínica genera, principalmente, las formas meso y levo. Estos compuestos son formados por reducción de la acetoína, procedente del ácido pirúvico.

Si las condiciones de fermentación son aeróbicas, sólo se forma acetoína y no 2,3-butanodiol. La determinación de este producto es similar al análisis del glicerol.

METODO QUIMICO¹⁰

Principio del método

Se basa en la oxidación del 2,3-butanodiol a acetaldehído y valoración de este último compuesto, bien directamente o por formación de un producto coloreado con la piperidina y nitroprusiato, y

10. H. Rebelein, *Z Lebensm. Unters. Forsch.*, 105, páginas 296-311, (1957).

subsiguiente medida espectrofotométrica. Para el análisis se emplea el filtrado obtenido para el análisis del glicerol.

Reactivos

SOLUCION ACETATO SODICO, al 27%.

SOLUCION ACIDO PERIODICO 0.05 M.

SOLUCION NITROPRUSIATO SODICO, al 2%.

SOLUCION ACUOSA DE 2,3-BUTANODIOL, preparada con 2 gramos del producto puro para análisis en un litro de agua.

SOLUCION ACUOSA DE PIPERIDINA, al 10%.

Técnica operativa

1. Tómense 5.00 mL del filtrado preparado para el análisis del glicerol y 5 mL de la solución acuosa de acetato, en un matraz de 60 mL, se añaden 10 mL del ácido periódico, se agita y se deja en reposo durante 2 minutos.
2. Se añaden, vertiendo por las paredes del matraz, 5 mL de la solución de nitroprusiato y a continuación 10 mL de piperidina.
3. Una vez mezclado, el líquido se pasa a una cubeta espectrofotométrica de 10 mm de paso de luz, determinándose la absorbancia a 570 nm.
4. La máxima intensidad coloreada tiene lugar a los 30-40 segundos, disminuyendo de inmediato.
5. Se compara con un ensayo en blanco, empleando 5 mL de agua destilada y efectuando los mismos tratamientos.

Cálculos

La solución standard de 2,3-butanodiol, se diluye 1 a 10 con agua destilada, y de esta dilución se preparan matraces de 100 mL con 0, 10.00, 20.00, 30.00, 40.00, 50.00, 60.00 y 70.00 mL. Se toman 5.00 mL de cada una de estas soluciones y se procede analíticamente igual, como se ha indicado anteriormente.

Se deberá tener en consideración, para los vinos dulces, la corrección debida a la presencia del azúcar, de acuerdo a la tabla III.

METODO GAS CROMATOGRAFICO¹¹ _____

Principio del método

Con el empleo de la cromatografía de gas, es posible la determinación de los dos isómeros del 2,3-butanodiol, con inyección directa del vino. El método se debe a Guymon y Crowell.

Aparato y columna

El cromatógrafo debe estar equipado con detector de ionización de llama. Se emplea columna de 2 m de longitud y 1/4 de pulgada de diámetro exterior, en acero inoxidable. La fase estacionaria es: 10% de aceite HUCON75-H-90M sobre Chromosorb W de 60/80 mallas.

Técnica operativa

1. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo son: Temperaturas del inyector y detector 200 °C, columna a 125 °C, isotérmico y gas portador, helio a un flujo de 60 mL/min.
2. Se inyecta en el cromatógrafo 2 µL de muestra.
3. De los dos isómeros, el primero en salir es el leve.
4. En el caso del análisis de vinos dulces, pueden aparecer picos fantasmas y deriva de la línea de base. Para subsanar estos defectos, se recomienda aumentar la temperatura del horno a 180 °C, durante unos pocos minutos y volver a enfriar, antes de un nuevo análisis.

Cálculos

Deberá inyectarse una solución patrón de 2,3-butanodiol, en igualdad de condiciones de trabajo, para efectuar comparaciones de las áreas o alturas de los picos correspondientes.

11. J.F. Guyman y E. A. Crowell, *Am. J. Enol. Vitic.*, 23, páginas 200-209, (1967).

Sorbitol

COMENTARIOS

En los vinos normales, existen pequeñas cantidades de sorbitol que no llegan a sobrepasar los 50 mg/L. La fermentación por levaduras no altera la presencia del sorbitol original en el mosto.

Puede servir el análisis para comprobar algún fraude, por mezcla de vino con sidra u otro líquido fermentado, procedente de frutas.

METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS¹² _____

Principio del método

Previa separación de azúcares y alcohol, los polialcoholes son acetilados. Estos compuestos acetilados se cromatografían en una columna de fluorosilicona y detectados en ionización de llama.

12. A. Bertrand y R. Pissard, *Am. falsif Expert. Chim.*, 69, páginas 571-579, (1976).

El método descrito sirve para la determinación simultánea de varios polialcoholes, como: sorbitol, glicerol, eritritol, arabitol, xilitol, manitol y mesoinositol.

Reactivos

RESINA DE CAMBIO IONICO AMBERLITE IRA 400 (80/100 mallas).

SOLUCION HIDROXIDO SODICO 1 M.

ACIDO CLORHIDRICO 1 M.

PATRON INTERNO, PERSEITOL (polialcohol de 7 átomos de carbono, 4 gramos por litro).

TETRACLORURO DE CARBONO. ANHIDRIDO ACETICO.

PIRIDINA.

Aparato y columna

Cromatógrafo de gas, provisto de detector de ionización de llama. Se prepara una columna de 3 m de longitud en acero inoxidable de 1/8 de pulgada de diámetro exterior. Se rellena con una mezcla de 7% de QF-1, sobre Gaschrom Q de 80/100 mallas.

Técnica operativa

1. Los parámetros de trabajo del cromatógrafo son: Temperaturas del inyector y detector 270 °C, el horno isotérmico a 210 °C. Gas portador, nitrógeno, a 30 mL/min.
2. En primer lugar, se prepara la resina IRA 400, por lavado con hidróxido sódico, luego con ácido clorhídrico 1 M y posterior lavado con agua, hasta ausencia de iones cloruro, comprobado con nitrato de plata.
3. Finalmente se eluye con hidróxido sódico y se lava con agua, hasta reacción negativa a la fenolftaleína.
4. Se toman 10 mL de la resina y se colocan en una columna de vidrio de 10 x 200 mm.
5. Se mezclan 2.00 mL del patrón interno, con 20.00 mL de la muestra de vino.

6. De la mezcla se toman 5.00 mL y se pasan a la columna de vidrio donde se halla la resina.
7. A continuación se lava con 100 mL de agua. Se recoge todo el eluado, que contiene todos los polialcoholes. Los ácidos y azúcares son retenidos por la resina.
8. Puede regenerarse la resina, con 100 mL de hidróxido sódico, comprobándose la neutralidad tal como se ha indicado anteriormente. La resina, después de cuatro ciclos, debe regenerarse con ácido y base, como se ha descrito en el número 2).
9. El eluado se concentra al vacío, a la temperatura de 60 °C. Cuando está casi seco, se añaden de 5 a 10 mL de tetracloruro de carbono, para destilar azeotrópicamente el agua residual.
10. Al residuo se añaden 2 mL de anhídrido acético y 0.4 mL de piridina. Se calienta a reflujo a 100 °C, durante una hora.
11. Después de fría, se inyectan en el cromatógrafo 5 microlitros. El sorbitol sale después de 18-20 minutos y el patrón interno a los 35 minutos.

Cálculos

Se prepara una curva patrón con las alturas de los picos del cromatograma. La solución stock se prepara por disolución de 1 gramo de sorbitol puro, en un litro de agua destilada.

A matraces de 100 mL, se añaden: 0, 5.00, 10.00, 15.00 y 20.00 mL del stock y, una vez completados a volumen, se tendrán concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 mg/L. Se toman 20.00 mL de estas soluciones y se procede como en el vino.

METODO ENZIMATICO

Principio del método

El d-sorbitol se oxida en presencia de la enzima sorbitol-dehidrogenasa (SDH) a través de la nicotinamida-adenina-dinucleótido

(NAD) a d-fructosa formándose NADH. Se mide la absorbancia a 492 nm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número 670057, para 3 x 10 determinaciones, que contiene cuatro frascos con reactivos, que deberán reconstituirse algunos con agua destilada. La conservación, así como su reconstitución, se indica en el folleto que acompaña a cada test analítico.

Técnica operativa

1. Si la concentración de d-sorbitol en el vino no sobrepasa la cantidad de 0.1 g/L, no es necesaria la dilución. En el caso de que la cantidad no alcance a 1 g/L, la dilución será de 10 veces; si el nivel va de 1 a 10 g/L, se diluirá 100 veces.
2. El vino a analizar debe estar perfectamente límpido, obtenido por una buena filtración.
3. Preparar las cubetas de plástico de 10 mm de paso de luz y el espectrofotómetro con lámpara de tungsteno a la longitud de onda de 492 nm.
4. Seguir con detalle las instrucciones de análisis que se indican en el folleto adjunto al test.

Cálculos

La concentración de sorbitol en la muestra de vino se halla por la siguiente fórmula:

$$\text{d-sorbitol} = 0.2792 \times A_s \text{ en g/L}$$

en donde A_s representa la absorbancia de la muestra de vino.

Manitol

COMENTARIOS

En los vinos, la presencia de manitol en niveles superiores a los 40 mg/L es signo de alteración. Se forma por acción bacteriana sobre la fructosa. Casi siempre tiene lugar en fermentaciones que han superado los 35 °C de temperatura.

Las fermentaciones llamadas «maníticas» provienen del *Bacterium mannitopoeum*. Las vendimias atacadas de *Botrytis cinerea* aumentan el contenido de polialcoholes, aparte del glicerol.

METODOS POR CROMATOGRAFIA DE GAS _____

Principio del método

Se emplean las mismas metodicas especificadas para el análisis del sorbitol.

METODO GAYON Y DUBOURG¹³ _____

Cualitativo

Para un análisis cualitativo, es suficiente hacer evaporar en frío unos 2 ó 3 mL de vino, preferiblemente decolorado, con la cantidad mínima posible de carbón activo, en un vidrio de reloj. Si hay manitol, al cabo de 24 horas se habrán formado unas agujas cristalinas muy finas, en disposición radial. Se distinguen perfectamente de los cristales de tartrato de cal y del bitartrato potásico. Este sistema es sensible para una concentración de manitol superior a 1 gramo por litro.

Si el vino es dulce, es necesario hacer fermentar los azúcares con anterioridad al análisis.

Cuantitativo

Reactivos

SOLUCION HIDROALCOHOLICA al 85%.

Técnica operativa

1. Se toman 50 mL del vino y se concentran a baño maría, hasta consistencia siruposa.
2. Se deja cristalizar durante 2 ó 3 días en un lugar fresco.
3. El residuo se mezcla con 2 gramos de arena silícea, lavada y calcinada.
4. Después se pasa a un mortero y se mezcla íntimamente con 100 mL de la solución de alcohol. Se filtra y se deja en reposo unas 3 horas.
5. Se coloca en un matraz el filtro y su contenido, y en caliente se trata con 100 mL del alcohol diluido al 85%, durante una hora.
6. Una vez frío, se procede a su destilación hasta obtener las 4/5 partes, se añade un poco de carbón decolorante al líquido y se filtra.

7. El carbón contenido en el filtro se lava con 50 mL de alcohol diluido y caliente.
8. Los líquidos recogidos son evaporados a sequedad a la temperatura de 60 °C.
9. Después de la evaporación total, el residuo está formado por manitol puro, y por lo tanto se procede a pesarlo y de este resultado se deduce la concentración de manitol en la muestra.

13. J. Ribéreau-Gayon y otros, *Traité d'Oenologie, vol 1, Analyse et Contrôle des Vins*, Dunod, Paris (1972).

5. AZUCARES

REDUCTORES	5.5
METODO USUAL DE LACEE	5.6
METODO REBELEIN	5.10
MÉTODO GAB	5.12
GLUCOSA Y FRUCTOSA	5.13
METODO ENZIMATICO	5.13
SACAROSA	5.15
METODO DE REFERENCIA DE LACEE	5.15
METODO CUALITATIVO USUAL DE LACEE	5.18
METODO GAB	5.20
METODO ENZIMATICO	5.21

Reductores

COMENTARIOS

Los azúcares predominantes en el zumo de la uva son la glucosa y la fructosa; el primero de ellos con función química aldehídica y el segundo cetónica. Los dos tienen acción química reductora sobre la solución cuproalcalina.

En los granos de uva se almacenan los azúcares durante la maduración. Si la fermentación ha sido total, los vinos resultantes prácticamente no contienen materias azucaradas.

Para efectuar un análisis, en casi todas las metodicas químicas debe realizarse una defecación previa a la técnica analítica propiamente dicha. Para mayor exactitud, se recomienda el análisis que no necesite de la defecación, por la pérdida apreciable de materias reductoras que comporta el tratamiento, aún perfectamente realizado, cosa bastante difícil de llevar a cabo.

MÉTODO USUAL DE LA CEE

Principio del método

El vino se somete en primer lugar a la defecación, que puede efectuarse con acetato neutro de plomo o bien con hexacianoferrato (II) de cinc.

Después de la defecación se hace reaccionar el mosto o el vino defecados, sobre una cantidad determinada de reactivo cuproalcalino, y los iones de cobre sobrantes son valorados por iodometría.

El líquido en el cual se va a efectuar el dosado de azúcares debe tener una concentración de estos compuestos comprendida entre 0.5 y 5 g/L. Si el vino es seco, evitar la dilución durante la defecación. Si los vinos son dulces, se diluyen de manera que la concentración de azúcares esté en los límites indicados anteriormente.

Defecación con acetato de plomo

Reactivos

SOLUCION DE ACETATO DE PLOMO (aproximadamente saturada). Se prepara con 250 gramos de acetato de plomo y agua destilada muy caliente, para un volumen total de 500 mL. Agitar hasta total disolución.

CARBONATO CALCICO, en polvo.

Técnica operativa

Vinos secos

1. En un matraz de 100 mL, se vierten 50.00 mL de vino, se añaden $n-0.5$ mL de solución molar de hidróxido sódico, siendo n el volumen de solución 0.1 M gastado en la acidez total de 50 mL de vino.
2. Con agitación se añaden 2.5 mL de solución saturada de acetato de plomo y 0.5 gramos de carbonato cálcico; se agita varias veces y luego se deja 15 minutos en reposo.
3. Se completa el volumen con agua destilada y se filtra.
4. Un mL del filtrado equivale a 0.50 mL de vino.

Mostos, mistelas y vinos dulces

1. En un matraz de 100 mL se coloca un volumen de mosto o vino, definido por lo siguiente:

Mostos y mistelas. Diluir al 10% el líquido a analizar, emplear 10.00 mL de esta dilución.

Vinos dulces, alcohólicos o no, cuya densidad se halle comprendida entre 1.005 y 1.038. Diluir al 20% y tomar 20.00 mL del líquido diluido.

Vinos semisecos, con densidades comprendidas entre 0.997 y 1.006, emplear 20.00 mL del vino no diluido.

2. Añadir 0.5 gramos de carbonato cálcico, unos 60 mL de agua destilada y 0.5, 1 ó 2 mL de solución saturada de acetato de plomo. Se agita y se deja en reposo 15 minutos, agitando de cuando en cuando y finalmente se completa a volumen con agua, y filtrar.
3. En el primer caso, 1 mL del filtrado equivale a 0.01 mL del mosto o mistela. En el segundo caso, 1 mL de filtrado corresponde a 0,04 mL de vino dulce y, por último, 1 mL equivale a 0.20 mL de vino semisecho.

Defecación con hexacianoferrato (II) de cinc

Este procedimiento de defecación sólo se aplica a los vinos blancos, vinos dulces claros y mostos.

Reactivos

SOLUCION I de hexacianoferrato (II) potásico, preparada con 150 gramos de hexacianoferrato (II) potásico y agua hasta un litro.

SOLUCION II de sulfato de cinc, obtenida por disolución de 300 gramos de sulfato de cinc y completando a volumen de un litro con agua destilada,

Técnica operativa

1. En un matraz de 100 mL, se coloca un volumen de vino, de acuerdo a lo siguiente:

Mostos y mistelas. Diluir al 10% y emplear 10.00 mL de ésta dilución.

Vinos dulces, alcohólicos o no, cuya densidad esté comprendida entre 1.005 y 1.038. Se diluye al 20% y se emplean 20.00 mL.

Vinos semisecos, con densidad entre 0.997 y 1.006. Emplear 20.00 mL del vino no diluido.

Vinos secos, se toman 50.00 mL del vino sin diluir.

2. Se le añaden 5 mL de solución I y 5 mL de solución II. Agitar y llevar a volumen con agua destilada. Esperar 10 minutos y filtrar.
3. Las equivalencias con la muestra original son las siguientes: Primer caso, 1 mL de filtrado corresponde a 0,01 mL de mosto o mistela. Segundo caso, 1 mL de filtrado equivale a 0.04 mL del vino dulce. Tercer caso, 1 mL de filtrado igual a 0.20 mL de vino semisecco. Por último, 1 mL igual a 0.50 mL de vino seco.

Análisis propiamente dicho

Reactivos

SOLUCION CUPROALCALINA, preparada con 25 gramos de sulfato cúprico pentahidratado, 50 g de ácido cítrico y 368 g de carbonato sódico cristalizado. Se disuelve el sulfato de cobre en 100 mL de agua, el ácido cítrico en 300 mL de agua y el carbonato sódico en unos 350 mL de agua destilada caliente. Se mezclan las soluciones de cítrico y carbonato. De inmediato se añade la solución de sulfato de cobre y se completa hasta el litro.

SOLUCION DE IODURO POTASICO al 30%, preparada con 30 gramos de ioduro potásico, reactivo análisis, y agua suficiente para 100 mL.

ACIDO SULFURICO al 25%, vertiendo 25 g del ácido concentrado sobre unos 80 mL de agua destilada. Dejar enfriar y completar a volumen de 100 mL.

SOLUCION DE ENGRUDO DE ALMIDON, preparada con 5 g/L de almidón y conservada por la adición de 200 gramos de cloruro sódico.

TIOSULFATO SODICO 0.05 M

Técnica operativa

1. En un erlenmeyer de 250 mL, se colocan 25.00 mL de solución cuproalcalina, 15 mL de agua y 10.00 mL del líquido defecado objeto del análisis. Este volumen de líquido no debe contener más de 60 miligramos de azúcares reductores.
2. Añadir algunos granos de piedra pómez y llevar a ebullición en 2 minutos.
3. Colocar un refrigerante de reflujo al erlenmeyer y mantener la ebullición durante 10 minutos exactamente.
4. Enfriar de inmediato con un chorro de agua fría.
5. Cuando frío, se añaden 10 mL de solución de ioduro, 25 mL de ácido sulfúrico diluido y 2 mL de engrudo de almidón.
6. Se valora con la solución de tiosulfato sódico 0.05 M. Sea n el número de mililitros gastados.
7. Comprobar un ensayo en blanco, sustituyendo los 25 mL del líquido azucarado por agua destilada y valorar. Sea n' el volumen de tiosulfato empleado.

Cálculos

La cantidad de azúcares, expresado en azúcar invertido, contenido en la toma del ensayo, se halla por la diferencia de volumen hallados entre el ensayo en blanco y la muestra. Se expresará la concentración en gramos de azúcar por litro, teniendo en cuenta las diluciones efectuadas durante la defecación y el volumen de muestra. En la tabla IV, se hallan las equivalencias entre volumen gastado y azúcares.

METODO REBELEIN¹

Principio del método

Se fundamenta también en la reducción del reactivo cuproalcalino. No es necesaria defecación alguna, lo que representa una mayor exactitud en la determinación, por cuanto no hay pérdidas de materias reductoras, que siempre tienen lugar en el proceso de defecación. Se puede comparar, en exactitud, con los métodos mucho más largos de ejecución, ya que en ésta metódica sólo se tarda unos 5 minutos en efectuar una determinación. Un adicional calentamiento puede causar variaciones en los resultados, por ello es necesario respetar los tiempos indicados de ebullición.

Reactivos

SOLUCION DE SULFATO DE COBRE pentahidrato, preparada con 41.92 gramos de sulfato cúprico, reactivo análisis, 10 mL de ácido sulfúrico 0.5 M y agua destilada hasta un litro.

SOLUCION ALCALINA. Se pesan 250 g de tartrato sódico potásico y se disuelven en 400 mL de agua, 80 g de hidróxido sódico en 400 mL de agua. Se mezclan las dos soluciones en un matraz de un litro y se completa a volumen cuando esté frío.

SOLUCION IODURO POTASICO. En un matraz de un litro se colocan 300 g de ioduro potásico y unos 500 mL de agua. Se disuelve y se añaden 100 mL de solución de hidróxido sódico 1 M. Se mezcla bien y se completa a volumen con agua.

SOLUCION ACIDO SULFÚRICO al 16%, preparada con 175 mL del ácido concentrado sobre agua y completar a volumen de un litro.

SOLUCION ALMIDON. Se deslíen 8 g de almidón en agua y se vierten a 500 mL de agua en ebullición y se mantendrá ésta durante 2 minutos. Se enfría. En 400 mL de agua se disuelven 20 g de ioduro potásico y 10 mL de hidróxido sódico 1 M. Se mezclan las dos soluciones y se completa al volumen de un litro.

SOLUCION DE TIOSULFATO, preparada con 13.777 g de tiosulfato sódico puro, en un matraz de un litro, al que se añaden 50 mL de solución de hidróxido sódico 1 M y completando a volumen con agua destilada.

Técnica Operativa

1. En un erlenmeyer de 250 mL, se vierten 10.00 mL de solución cúprica, 5 mL de solución alcalina y 2.00 mL de la muestra de vino (no debe contener más de 28 g de azúcar por litro).
2. Se hace hervir durante un minuto y medio exactamente, enfriando rápidamente al chorro de agua fría.
3. Cuando está fría, se añaden 10 mL de solución de ioduro, 10 mL de ácido sulfúrico y 10 mL de solución de almidón.
4. Se valora con solución de tiosulfato sódico, hasta un color ligeramente amarillo.
5. En este momento se añaden 10 mL de almidón y se completa la valoración hasta una coloración crema claro.
6. La concentración de azúcar, en g/L, se lee directamente de la bureta de valoración.
7. Si el vino ha sido diluido, se deberá multiplicar por el factor de dilución.

Cálculos

No son necesarios, ya que la concentración viene indicada en la misma bureta.

Observaciones

La bureta es de 30 mL de volumen total, graduada de tal manera que en la parte superior se halla la cifra 30 g/L y en el extremo inferior el 0.

¹. H. Rebelein, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 2 páginas 112-121, (1973).

METODO GAB²

Principio del método

Es una modificación del método Rebelein, que permite determinar, tanto las materias reductoras, como los azúcares que necesitan de una inversión previa para ser analizados. El tiempo de análisis es también el mismo y los reactivos vienen ligeramente modificados.

Método muy satisfactorio para el análisis de los vinos de tiraje, para la elaboración de cava y vinos espumosos en general, por su exactitud y rapidez.

Reactivos

PACK ANALISIS AZUCARES GAB, Ref. 1002000, para unos 50 análisis. Contiene 6 frascos con los reactivos preparados para el uso, así como una pequeña cantidad de piedra pómez. Cada pack contiene el folleto explicativo de los pasos a realizar para el análisis.

Técnica operativa

1. Preparar la placa calefactora proyectada para éste análisis (se recomienda siempre utilizar la suministrada por GAB).
2. Utilizar la bureta destinada a este análisis, graduada directamente en g/L (Ref. GAB número 3019033).
3. Seguir, paso a paso, las indicaciones del folleto adjunto al pack analítico.

Cálculos

No son necesarios, ya que la cantidad de azúcares viene indicada en la misma bureta. Sólo deberá tenerse en consideración la dilución que se haya realizado en la muestra de vino.

2. P.E. GAB, 08734 MOJA (Barcelona).

Glucosa y fructosa

COMENTARIOS

Estos son los azúcares fundamentales en la maduración de la uva, y por tanto presentes en el mosto antes de fermentar. Puede ser interesante conocer la concentración de estos azúcares e incluso la relación existente entre ellos. La metódica que se ha creído más idónea para el análisis es la que se resume seguidamente.

METODO ENZIMATICO

Principio del método

La d-glucosa y la d-fructosa son fosforiladas por la enzima hexokinasa (HK) y adenosin-5'-trifosfato (ATP) a glucosa-6-fosfato (G-6-P) y fructosa-6-fosfato (F-6-P) con la formación simultánea de adenosin-5'-difosfato (ADP). La cantidad de NADPH obtenido en la reacción con la glucosa y la fructosa es proporcional a dichos azúcares y las absorbancias sirven para cuantificarlos.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número de catálogo 139106, para unas 50 determinaciones. Contiene 10 frascos con reactivos, algunos de los cuales deberán ser reconstituídos con agua destilada. La conservación y duración de estos reactivos, así como su reconstitución, se indican en el folleto que acompaña a cada test analítico.

Técnica operativa

1. Se preparan las cubetas de 10 mm de paso de luz. El espectrofotómetro, con lámpara de tungsteno, se sitúa en 340 nm de longitud de onda.
2. Si la concentración en la muestra no supera un gramo por litro, no se efectuará dilución. Hasta 10 g/L diluir 10 veces. De 10 a 100 g/L la dilución será de 100 veces y si la cantidad es mayor la dilución debe ser de 1000 veces.
3. La muestra debe estar perfectamente filtrada.
4. Los vinos o mostos tintos no necesitan decoloración alguna.
5. Para la realización del análisis, se deben seguir las instrucciones que se adjuntan a cada test analítico.

Cálculos

Las concentraciones de glucosa y fructosa, se calculan por las siguientes fórmulas, a partir de las absorbancias leídas:

$$\begin{aligned} \text{glucosa} &= 0.8636 \times A_g \text{ en g/L} \\ \text{fructosa} &= 0.8694 \times A_f \text{ en g/L} \end{aligned}$$

será necesario tener en cuenta la dilución efectuada en la muestra, para anotar su concentración.

Sacarosa

COMENTARIOS

Este azúcar aparece en la uva, en cantidad muy reducida, ya que sólo existe en un nivel que varía, según J. Ribéreau-Gayon³, entre 1 y 3 g/L y aún se hidroliza a azúcares reductores.

METODO DE REFERENCIA DE LA CEE _____

Para la investigación cualitativa

Principio del método

Se emplea la cromatografía en capa fina. La sacarosa se identifica en los mostos y vinos, empleando la capa fina de gel de sílice G, que contiene acetato sódico. El revelador (ácido tiobarbitúrico y tricloroacético) se incorpora al disolvente (acetato de etilo, isopropanol y agua).

3. J. Ribéreau-Gayon, *Traité d'Oenologia, Dunod, 2.2., París (1973)*.

La sacarosa, por calentamiento en medio ácido forma hidroximetilfurfural, que reacciona con el ácido tiobarbitúrico, con formación de una coloración amarillo-anaranjado.

Aparatos y material

Se dispondrá del material necesario para efectuar una cromatografía en capa fina, principalmente cubeta y pulverizador.

Reactivos

CROMATOPLACAS MERCK de gel de sílice o similares.

DISOLVENTE Se prepara con 65 mL de acetato de etilo, 30 mL de isopropanol y 5 mL de agua destilada.

REVELADOR. En el momento del empleo, se añaden a 100 mL del disolvente: 0.3 g de ácido tiobarbitúrico y 5 g de ácido tricloracético, en cristales.

SOLUCION PATRON DE SACAROSA, al 0.05 g en 100 mL.

SOLUCION 'A' DE SACAROSA, preparada al 0.5% en agua destilada.

SOLUCION 'B' DE GLUCOSA Y FRUCTOSA, al 5% de cada azúcar.

SOLUCIONES PATRON. Se preparan empleando 1 mL de la solución 'A' y 1, 2, 3, 4 y 5 mL de solución «B» en sendos tubos con enrase a 10 mL. Se completa el volumen con agua. De esta forma se obtienen una serie de soluciones patrón de sacarosa, con diferentes concentraciones de azúcares reductores.

Técnica operativa

1. Si el vino es tinto o fuertemente coloreado, deberá tratarse con carbón decolorante, antes de depositarlo en la placa cromatográfica.
2. En una línea de partida, que se halla a 2.5 cm del borde de la placa, se colocan los líquidos a analizar, separados unos de otros 3 cm y también a 3 cm del borde lateral.
3. Según la concentración de azúcares, se colocan de 1 a 5 microlitros de muestra. Cada mancha no debe contener más de 0.25 mg de azúcares.

4. Se colocan igualmente 5 microlitros de la solución patrón de sacarosa.
5. Para que las manchas queden del menor tamaño posible, se depositan por etapas, previo el secado entre ellas.
6. Se coloca la cromatoplaça en la cubeta cromatográfica y se deja ascender el disolvente unos 16 cm, a partir de la línea de origen.
7. Se retira la placa y se seca, con la ayuda de una corriente de aire.
8. Luego se coloca en una estufa a 105 °C, durante 15 minutos.
9. En presencia de sacarosa, aparece una mancha de color amarillo, en el *R_f* idéntico al de la solución patrón de sacarosa. Los *R_f* de la glucosa y fructosa son superiores al de la sacarosa.

Para la determinación cuantitativa después de la inversión

Principio del método

Sobre el líquido obtenido por la defecación del vino, es donde puede determinarse la sacarosa. Se efectúa por comparación de los poderes reductores de antes y después de la hidrólisis con ácido clorhídrico. Este líquido se prepara como se ha indicado en el análisis de los azúcares reductores. El método de análisis del poder reductor es el mismo que el empleado en la determinación de reductores.

Técnica operativa

1. Colocar en dos matraces de igual volumen, designados como *A* y *B*, la misma cantidad, en cada uno de ellos, del líquido obtenido en la defecación.
2. A cada uno de los recipientes *A* y *B* se añaden 0.3 mL de ácido clorhídrico concentrado por cada 10 mL de la muestra.
3. En el recipiente *A* se añade de inmediato 0.3 mL de NaOH 12 M, por cada 10 mL del líquido azucarado defecado, y se procede al análisis de los azúcares reductores tal como se ha indicado anteriormente.

4. El recipiente *B*, que contiene el líquido azucarado acidificado, se coloca en un baño maría hirviente, durante 2 minutos. Se deja enfriar el recipiente durante 15 minutos.
5. A continuación se añade el mismo volumen de NaOH 12 M, como en el matraz *A* y se procede a su análisis.
6. La diferencia entre las cantidades de los azúcares reductores hallados multiplicada por el factor 0.95 da la concentración de sacarosa.
7. Se expresará en gramos de sacarosa por litro de vino, después de haber tenido en cuenta las diluciones efectuadas en la defecación y en el volumen de la muestra sometida a análisis.

METODO CUALITATIVO USUAL DE LA CEE _____

Principio del método

Es un método colorimétrico. El vino se somete a la defecación con acetato de plomo, óxido de magnesio y permanganato potásico a pH 8-9. Sobre el defecado caliente a 100 °C, se añade la difenilamina en medio clorhídrico y acético. El producto de condensación, en presencia de la sacarosa, se extrae con cloroformo, el cual adquiere una coloración azul.

Reactivos

ACETATO DE PLOMO NEUTRO, cristalizado.

OXIDO DE MAGNESIO pesado, en polvo.

SOLUCION DE PERMANGANATO POTASICO al 0.2 %.

SOLUCION SATURADA DE SULFATO SODICO.

CLOROFORMO.

REACTIVO DE DIFENILAMINA. A 10 mL de difenilamina al 10% en etanol absoluto, se añaden 20 mL de ácido acético glacial y 70 mL de ácido clorhídrico concentrado. Es necesario comprobar la pureza del reactivo. Para ello se toman 2 mL de difenilamina y 2 mL de agua destilada, se colocan en un tubo y se lleva a baño maría, durante 5 minutos. Se enfría la solución bruscamente por inmersión en agua fría y se extrae con 1 mL de cloroformo. La fase orgánica, no debe presentar coloración azul.

Técnica operativa

1. Disolver unos 200 mg de óxido de magnesio y 200 mg de acetato de plomo, en 10 mL de agua destilada.
- 2 Se lleva al baño maría a unos 95 °C, durante 3 a 5 minutos.
- 3 Se añaden 2 mL de vino o mosto, que debe estar perfectamente límpido y una concentración en azúcares totales inferior al 1 %, se diluye la muestra, si es necesario, para mantener la concentración indicada.
- 4 Debe procurarse que la cantidad de acetato de plomo sea la suficiente, pero sin exceso, ya que disminuiría la sensibilidad de la reacción.
- 5 Al líquido claro, que sobrenada, se añaden unas gotas de solución concentrada de acetato de plomo, hasta que no se observe precipitación alguna. Se agita y se mantiene en el baño maría, hasta que el líquido superior esté limpio.
- 6 Se añade solución de sulfato sódico para eliminar el exceso de plomo.
7. Se añaden 0.5 mL de solución de permanganato potásico y se mantiene en el baño maría durante 10 minutos. Enfriar bruscamente y filtrar. Puede suceder que aparezca una coloración amarilla, ello no perjudica la reacción.
8. En un tubo de ensayo, colocar 2 mL del filtrado y 2 mL del reactivo de difenilamina. Se mantiene en el baño maría hirviente durante 5 minutos exactamente.
9. Enfriar por inmersión en agua fría, añadir 1 mL de cloroformo y extraer la coloración por agitación.

Observaciones

Los vinos blancos secos, no adicionados de sacarosa, pueden dar una coloración azul-gris muy ligera. En presencia de sacarosa, la coloración es netamente azul. Los vinos con azúcar residual, mostos y mostos concentrados, dan una coloración amarilla, que en el caso de presencia de sacarosa, la coloración es netamente verde.

METODO GAB⁴

Principio del método

Con el empleo del pack de azúcares *Ref. 1002000* se puede hallar la sacarosa por diferencia, entre los azúcares previa inversión y los reductores directos. Es método muy sencillo y fácil de realizar.

Técnica operativa

1. Se determinan los azúcares previa inversión, siguiendo las instrucciones que acompañan al pack de análisis, Se anota este valor.
2. Los reductores se hallan directamente sin pasar por la ebullición previa de los 2 minutos. El valor obtenido en este análisis se anota.
3. La sacarosa se halla por diferencia entre el primer análisis y el segundo, multiplicando el resultado por el factor 0.95, para obtener los gramos de sacarosa por litro de la muestra.

Observaciones

Debe tenerse en cuenta que la sacarosa presente en el vino disminuye con el tiempo, por la hidrólisis que tiene lugar en el medio ácido del vino. Es muy posible que efectuando análisis en espacios de tiempo un poco largos, se observe una disminución apreciable de la sacarosa.

4. P.E. GAB, 08734 MOJA (Barcelona).

METODO ENZIMATICO

Principio del método

Se determina la glucosa antes y después de la hidrólisis enzimática de la sacarosa. Antes de la inversión la glucosa se determina por fosforilización con ATP, empleando como catalizador la enzima exocinasa. La glucosa-fosfato (G6P) que se forma, es oxidada específicamente por la NADP a NADPH. La cantidad de este último compuesto es equivalente a la cantidad de glucosa.

La sacarosa se hidroliza por medio de la enzima β fructosidasa (invertasas) a glucosa y fructosa. La determinación de la glucosa después de la inversión (glucosa total), se efectúa como se ha indicado anteriormente.

Por la diferencia de las concentraciones de glucosa antes y después de la inversión enzimática, se calcula el contenido de sacarosa.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número de catálogo 139041, para unas 40 determinaciones de sacarosa o glucosa. Contiene 3 frascos con reactivos algunos de los cuales se deben reconstituir con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como su reconstitución, se indican en el folleto que acompaña a cada test de análisis.

Técnica operativa

1. Se preparan las cubetas de 10 mm de paso de luz, que se recomiendan sean de plástico para un solo uso, con objeto de evitar contaminaciones. El espectrofotómetro con lámpara de tungsteno se sitúa a 340 nm de longitud de onda.
2. En los vinos cuya suma de glucosa y sacarosa esté comprendida entre 0.8 y 8.0 g/L, se diluirán 10 veces. Si la concentración es superior a la indicada e inferior a 80 g/L, la dilución debe ser de 100 y si es mayor se diluirán 1000 veces.
3. Seguir paso a paso las indicaciones del folleto adjunto al test de análisis.

Cálculos

La diferencia de la glucosa total (muestra de sacarosa) y la glucosa, dará la absorbancia (As) correspondiente a la sacarosa.

La concentración de sacarosa se calcula por la siguiente fórmula, si el vino ha sido diluido 10 veces:

$$\text{Sacarosa} = 16.41 \times A_s$$

Observaciones

Los vinos tintos también pueden analizarse por esta metódica, sin necesidad de tratamiento previo alguno.

6. CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS

CARACTERISTICAS CROMATICAS	6.5
METODO A.O.A.C. núm. 976.11	6.6
METODO O.I.V. referencia	6.6
METODO RAPIDO O.I.V	6.7
METODO OUGH, BERG Y CHICHESTER	6.9
COLOR DE LOS VINOS tintos y rosados	6.10

Características cromáticas

COMENTARIOS

La característica cromática de un vino, se basa en dos factores importantes, como son: *luminosidad y tonalidad*.

Luminosidad, es el factor cuantitativo que define la intensidad del color, puede definirse también como transmitancia, ya que ésta varía inversamente proporcional a la intensidad. Un vino puede ser pálido o subido.

Tonalidad o cromancia, es el factor de cualidad del color y corresponde a la longitud de onda dominante (rojo, amarillo, verde, etc.) que caracteriza la tonalidad.

El color de los vinos es muy variable, debido a su origen, forma de elaboración y envejecimiento. La medición de las características cromáticas, debe realizarse con la ayuda de aparatos que puedan evaluar cualquier zona del espectro visible. El ojo humano no puede distinguir, por separado, los colores que configuran la tonalidad de un vino, pero sí su mezcla.

METODO A.O.A.C. núm. 976.11¹ _____

Principio del método

Para análisis de control rutinarios en vinos blancos, puede emplearse un colorímetro sencillo, que incorpore filtros entre 420 y 530 nm de longitud de onda.

Medición de la absorbancia en la longitud de onda de 430 nm. Como patrón comparativo se emplea una solución de cromato potásico.

Reactivos

SOLUCION DE CROMATO POTASICO, 0.0002059 M. Preparada por disolución de 0.040 gramos de cromato potásico, reactivo puro para análisis, en hidróxido potásico 0.05 M y completar a un litro con la misma solución de KOH.

Técnica operativa

1. Preparar el espectrofotómetro para trabajar con cubetas de 25 mm de paso de luz. Situar a 430 nm la longitud de onda.
2. Ajustar el aparato a 100% de transmitancia, con agua destilada.
3. Situar luego una cubeta con la solución de cromato y tomar lectura.
4. La muestra de vino se mide a continuación.
5. Las diferencias de transmitancia, nos darán la intensidad de color de la muestra.

METODO O.I.V. referencia _____

Principio del método

Método espectrofotométrico que permite el cálculo de los valores triestimulares y los coeficientes tricromáticos necesarios para es

1. Official Methods of Analysis, 15 edición, número 976.11, (1990).

pecificación del color, de acuerdo a los términos de la Commission Internationale de l'Eclairage.

Aparatos

Espectrofotómetro que permita las medidas entre 300 y 700 nm. Cubetas de vidrio, aparejadas, de paso óptico *b*, igual a 1, 2, 5 y 10 mm.

Técnica operativa

1. Si el vino es turbio, centrifugarlo o bien filtrar con filtro de membrana.
2. Los vinos jóvenes o espumosos, deben ser eliminados de la mayor parte posible del dióxido de carbono, por agitación bajo vacío.
3. El paso de luz de las cubetas, debe ser escogido de forma tal, que la absorbancia medida esté comprendida entre 0.3 y 0.7.
4. Efectuar las medidas espectrofotométricas, utilizando como líquido de referencia el agua destilada colocada en una cubeta del mismo paso óptico, para regular el cero en la escala de absorbancias a las longitudes de onda: 445, 495, 550 y 625.
5. Anotar las absorbancias obtenidas por el vino en las cuatro longitudes de onda indicadas, expresadas con tres decimales.

Cálculos

Es necesario transformar las absorbancias leídas, en transmitancias. Todos los datos necesarios para el cálculo, se pueden hallar en el apartado de cálculos del método *COLOR DE LOS VINOS* que se halla al final de este capítulo.

METODO RAPIDO O.I.V. _____

Principio del método

Se fundamenta en la lectura de las absorbancias, a las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm. Aplicable a vinos tintos y rosados.

Técnica operativa

1. El vino se somete a centrifugación o filtración por membrana, para lograr una perfecta limpidez. No se diluye nunca el vino, ya que la dilución modifica el equilibrio de la materia colorante del vino.
2. Se empleará una cubeta de paso de luz adecuada, para poder efectuar la lectura. Este paso de luz puede ser de 1, 2, 5 y 10mm.
3. Ajustar a cero de absorbancia con agua destilada, en cubeta con paso de luz igual a la que se va a utilizar con el vino, empleando la longitud de onda de 420 nm.
4. Leer la absorbancia del vino a 420 nm.
5. Proceder como en 3), pero a 520 nm. .
6. Tomar lectura de la absorbancia del vino a 520 nm.
7. Proceder como en 3), pero con la longitud de onda de 620 nm.
8. Leer la absorbancia de la muestra del vino a los 620 nm.

Cálculos

Deben referirse las lecturas a 10 mm de paso de luz, por lo tanto deberán multiplicarse los resultados obtenidos de las absorbancias por 10, 5 y 2, si se han empleado cubetas de 1, 2 ó 5 mm, respectivamente.

Expresión de los resultados

La *luminosidad*, por definición, es la suma de las tres absorbancias a 420, 520 y 620 nm, referidas a 10 mm de paso de luz:

$$\text{luminosidad} = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

expresada con tres decimales.

La *tonalidad*, se la considera como el cociente entre las absorbancias a 420 y 520 nm, también expresada con tres decimales.

METODO OUGH, BERG Y CHICHESTER²

Principio del método

Como en todas las metodías, se basa en la lectura de las absorbancias a 420 y 520 nm.

Técnica operativa

1. Filtrar el vino tinto a través de una membrana de 0.45 micras.
2. Determinar el pH del vino con exactitud.
3. Tomar 10.00 mL del vino y colocarlo en un matraz de 100 mL.
4. Añadir al matraz, agua destilada, cuyo pH ha sido ajustado por adición de una mezcla de ácido cítrico y tampón de fosfato, al mismo pH del vino.
5. Se ajusta el espectrofotómetro con agua destilada situada en una cubeta de 10 mm de paso de luz.
6. A continuación se coloca el vino y se mide la absorbancia a 420 nm.
7. Se procede, a continuación, como en 5) y 6) pero en 520 nm.

Cálculos

Se calcula la luminosidad por la suma de las absorbancias y la tonalidad por el cociente de las absorbancias a 420 y 520 nm.

Si el espectrofotómetro permite la colocación de cubetas de 1 mm de paso de luz, no es necesaria la dilución.

Observación del autor

El empleo de cubetas de 1 mm de paso de luz, comporta facilidad para el trabajo, por cuanto no es necesaria la dilución. El problema aparece en la limpieza de la cubeta después del análisis, aparte del coste elevado de dicha cubeta. Se hace imprescindible el empleo de un baño ultrasónico y buen detergente, para su perfecta limpieza.

² C.S. Ough, H.W. Berg y C.O. Chichester, Am. J. Enol. Vitic., 13, páginas 32-39, (1962) y J. Food Sci., 29, páginas 661-667, (1964).

COLOR DE LOS VINOS³

Principio del método

Es un método espectrofotométrico que permite el cálculo de los valores triestimulares y de los coeficientes tricromáticos necesarios para la especificación de color, con los términos de la «Comisión Internationale de l'Eclairage» (C.I.E.).

Aparatos

Se necesitará un espectrofotómetro que permita medidas de transmitancia o absorbancia en la gama de las longitudes de onda del espectro visible. Los valores de una misma transmitancia, medida varias veces, no debe presentar diferencias superiores a 0.005. Cuando la escala del aparato está graduada en valores de transmitancia multiplicada por 100, es decir, expresados en porcentaje (T%), esta diferencia no debe sobrepasar 0.5.

Cubetas de cuarzo o de vidrio de índice de refracción 1.5 como máximo, que tengan las paredes paralelas que den a los líquidos un espesor uniforme b expresado en centímetros. El espesor b debe ser conocido con una precisión de $\pm 0.002 b$. Conviene disponer de cuatro pares de cubetas cuyos espesores b sean iguales a 0.1, 0.2, 0.5 y 1 cm.

El espesor del par de cubetas que hay que utilizar, está en razón inversa a la intensidad del color del vino. Se elige de manera que la absorbancia A esté comprendida preferentemente entre 0.3 y 0.7 (transmitancia comprendida entre 0.5 y 0.2).

Técnica operativa

1. Si el vino no está limpio, se centrifuga o filtra a través de membrana. Si es espumoso o de aguja, se elimina el gas por agitación a vacío.
2. Se miden directamente en el espectrofotómetro las transmitancias del vino a las siguientes longitudes de onda: 625, 550, 495 y 445.
3. Según la intensidad colorante del vino, se elegirá la cubeta de espesor más conveniente.

³. B.O.E., 11 de octubre de 1981.

4. Se utiliza el agua destilada como líquido de referencia, en una cubeta del mismo espesor.

Cálculos

Calcular las coordenadas (x , y) del punto representativo del color del vino en el diagrama tricromático de la C.I.E.

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad y = \frac{Y}{X + Y + Z}$$

$$\begin{aligned} X &= 0.42T_{625} + 0.35T_{550} + 0.21T_{445} \\ Y &= 0.20T_{625} + 0.63T_{550} + 0.17T_{445} \\ Z &= 0.24T_{495} + 0.94T_{445} \end{aligned}$$

Los valores triestimulares X , Y y Z expresan las proporciones de colores rojos, verdes y azules que dan por mezcla el color del vino.

Cuando el espesor b de la cubeta sea inferior a 1 cm, referir la transmitancia a 1 cm en la siguiente forma: $T = T'^{1/b}$ y si la transmitancia viene expresada en porcentaje:

$$T = \frac{T'^{1/b}}{100^{(1/b)-1}}$$

T =transmitancia referida a 1 cm de espesor de cubeta.
 T' =transmitancia obtenida para b cm de espesor de cubeta.
 b =espesor en cm de la cubeta utilizada.

Como los espectrofotómetros están generalmente graduados tanto en transmitancia T como en absorbancia A , se puede también calcular la transmitancia en 1 cm de espesor del vino a partir de la absorbancia observada en el espesor b , si la medida se ha hecho en cubeta de espesor inferior a 1 cm, teniendo en cuenta que:

$$A = \log 1/T$$

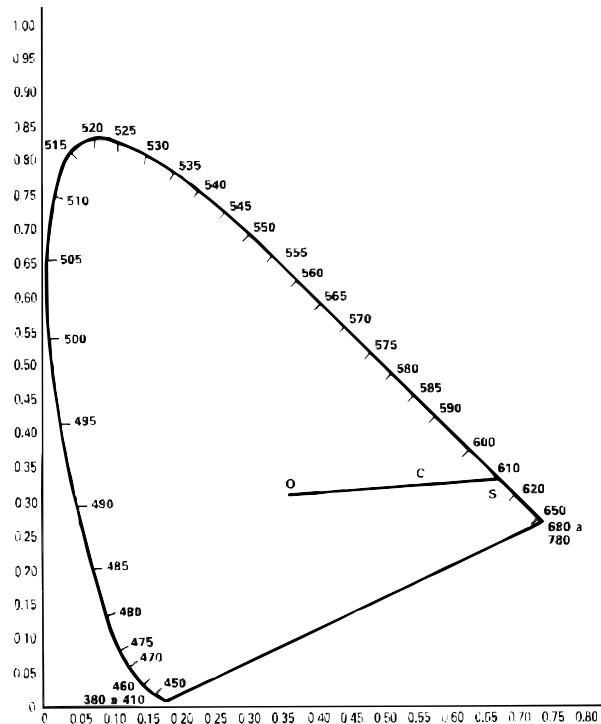
Con este fin se calculan las absorbancias A en un cm de espesor multiplicando respectivamente por 2, 5 y 10 las absorbancias leídas en un espesor b de 0.5, 0.2 y 0.1 cm. Se obtienen después los valores correspondientes de transmitancia bien por aplicación de la relación anterior, bien refiriéndose a la tabla calculada a partir de esa misma relación. Ver tabla V.

Expresión de resultados

Luminosidad relativa. Es el valor de Y , expresado en porcentaje (siendo el negro $y=0$ y el incoloro $y=100$).

Cromaticidad. Para expresar la cromaticidad (longitud de onda dominante y pureza) se recurre al diagrama de cromaticidad, que representa el «locus» de todos los colores del espectro, considerando que a 400 nm, corresponde el azul, a 520 nm corresponde el verde y a 700 nm el rojo. El punto O corresponde a la fuente luminosa utilizada, que, en este caso, es el iluminante standard Q, que representa la luz de un día medianamente claro y cuyas coordenadas son:

$$X_0=0.3101 \text{ y } Y_0=0.3163.$$



Longitud de onda dominante. Conocidas las coordenadas x e y de [color], se une el punto de esas coordenadas C al punto O. En el punto en que esta recta corta el «Spectrum Locus», se encuentra la longitud de onda dominante, que corresponde al matiz de este color. Así en el caso de vinos de tono teja, la longitud de onda dominante se sitúa entre 585 y 598 nm aproximadamente. Para los vinos de un color tinto franco, se sitúa entre 599 y 650 nm, mientras que para los vinos de tono rojo púrpura, está caracterizada por la longitud de onda dominante del color complementario. Se obtiene el valor de esta longitud de onda, prolongando la recta en la dirección de C hacia O para que ella corte el «Spectrum Locus» como hemos visto antes.

Este color complementario en el caso de vinos de tono rojo púrpura se sitúa en el verde. Se anota el valor de esta longitud de onda seguida de c (complementario), por ejemplo 495 c .

Pureza. La pureza se calcula, determinando la distancia relativa del punto C que representa el color del vino examinado y del punto S que corresponde al «Spectrum Locus» al punto O, que representa al iluminante.

Se expresa la pureza en porcentaje por la relación:

$$100 \times \frac{\text{Distancia del punto C al punto O}}{\text{Distancia del punto O al punto S}}$$

Observaciones

a) El color de un vino, queda completamente definido por la luminosidad relativa Y en porcentaje y las coordenadas tricromáticas x e y .

b) Se pueden prever las características cromáticas de una mezcla de varios vinos cuando se conocen las características cromáticas de los mismos. Los valores triestimulares X , Y , Z de la mezcla se obtienen por la suma de esos valores, multiplicando por su proporción para cada constituyente.