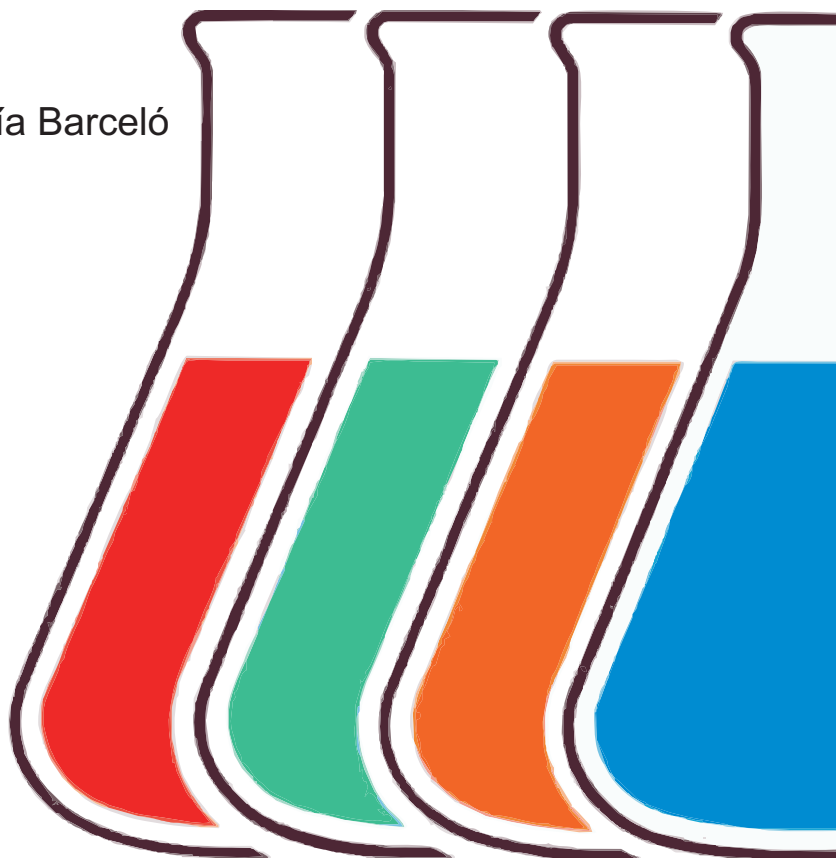


TECNICAS ANALITICAS PARA VINOS

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	

7. COMPUESTOS CARBONILICOS

ACETALDEHIDO	7.5
METODO COLORIMETRICO REBELEIN	7.6
METODO ENZIMATICO	7.7
METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS	7.9
ACETOINA Y DIACETILO	7.10
METODO MURDOCK	7.11
METODO GASCROMATOGRAFICO	
PARADIACETILO	7.12
METODO CROMATOGRAFICO PARA ACETOINA	7.14
HIDROXIMETILFURFURAL	7.15
METODO COLORIMETRICO	7.15
METODO PIRES MARTINS	7.16
METODO WINKLER	7.18

Acetaldehído

COMENTARIOS

El acetaldehído es un producto intermedio en el fenómeno de fermentación. Dada su facilidad de reacción, su combinación rápida con el dióxido de azufre y sus propiedades organolépticas, es muy interesante conocer su contenido, en distintos momentos de la etapa de conservación del vino.

Tanto el acetaldehído como la acetoína y diacetilo, están íntimamente ligados metabólicamente. Se forma por acción de las enzimas glicolíticas a partir del piruvato.

Su concentración en los vinos es muy variable, según haya sido la temperatura de fermentación, presencia de SO_2 , pH y carencia de pantotenato y tiamina.

Existen diversas metodías para la determinación del acetaldehído o etanal. Puede medirse directamente, mediante el empleo de técnicas gascromatográficas, también por iodometría, por reacciones coloreadas o análisis enzimático.

METODO COLORIMETRICO REBELEIN¹ _____

Principio del método

Por decoloración del vino, filtrado y tratamiento con solución de piperidina y nitroprusiato, para formar un producto coloreado, que es proporcional a la cantidad de combinación sulfito/etanal, también llamado complejo bisulfítico.

Reactivos

SOLUCION NITROPRUSIATO. En un matraz de 250 mL se disuelven 1 gramo de nitroprusiato sódico, completando a volumen con agua destilada. Esta solución debe prepararse diariamente.

SOLUCION PIPERIDINA. Se diluyen 2 mL de piperidina con 20 mL de agua destilada.

SOLUCION DIOXIDO DE AZUFRE al 5%. Para ello se satura agua con SO₂ a temperatura de 20 °C.

CARBONACTIVO.

Técnica operativa

1. En un erlenmeyer de 50 mL se vierten 25.00 mL del vino a analizar.
2. Se añaden 2 gramos de carbón activo y al cabo de 2 minutos se filtra.
3. En un erlenmeyer de 25 mL, que contiene 5 mL de la solución de nitroprusiato y 5 mL de la solución de piperidina, se vierten 2.00 mL del líquido filtrado en la operación 2). Se agita.
4. Se pasa el líquido de la operación 3) a una cubeta de 10 mm de paso de luz y se lee inmediatamente la absorbancia en la longitud de onda de 570 nm. La máxima absorbancia se alcanza a los 50 segundos.

1. H. Rebelein, *Dtsch. Lebensm. Rudnsch.*, 66, páginas 6-11, (1970).

Cálculos

Preparación de la solución patrón. En un matraz de 500 mL que contenga unos 400 mL de agua destilada, se vierte 1 gramo, aproximadamente, de acetaldehído recién destilado. Se añaden 30 mL de solución acuosa de SO₂ y se completa el volumen con agua. Se determina la concentración exacta de etanal, de acuerdo a la siguiente técnica:

En un erlenmeyer de 500 mL, se vierten 50.00 mL de la solución de acetaldehído, se añaden 15 mL de ácido clorhídrico, 10 mL de solución de engrudo de almidón y 100 mL de agua. Se valora con solución de iodo 0.05 M, para eliminar el exceso de solución de bisulfito. A continuación, se añaden 10 mL de solución de borato (preparada con 100 g de ácido bórico y 170 g de NaOH, por litro). Se valora el SO₂ que se ha liberado, con iodo 0.05 M. El etanal se calcula por la fórmula: $etanal = V/44$ en mg/L, en donde V es igual a los mililitros de solución de iodo 0.05 M gastados.

De esta solución patrón de acetaldehído, se preparan distintas diluciones, para efectuar la reacción coloreada correspondiente. De los datos de las absorbancias, trazar la gráfica. Esta reacción sigue la ley de Beer, desde 0 a 200 mg/L, lo que quiere decir que es una línea recta dentro de los valores anteriores.

METODO ENZIMATICO _____

Principio del método

En presencia de aldehído-dehidrogenasa (Al-DH), el etanal es oxidado cuantitativamente por la nicotinamida-adenín dinucleótido (NAD) a ácido acético. La cantidad de NADH que se forma en la reacción es esteoquímica con la cantidad de acetaldehído. La NADH es determinada por la absorbancia en los 340 nm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número 668613, para 3 x 10 análisis. Contiene 4 frascos con reactivos, alguno de los cuales se debe reconstituir con agua destilada. La conservación de estos reactivos, así como 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, que se recomienda 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. Se efectuará una dilución adecuada. Si el vino o muestra contiene una cantidad superior a 0.05 g/L, se efectúa una dilución de 10 veces. Si sobrepasa el 0.5 g/L se diluirá 100 veces.
3. Seguir paso a paso las indicaciones del folleto adjunto al test de análisis.

Cálculos

La concentración de aldehído en el vino se halla con la ayuda de la fórmula:

$$\text{Acetaldehído} = 0.11362 \times Aa$$

Se tendrán en cuenta las diluciones que se hayan realizado.

Observaciones

a) Los vinos blancos se llevan a pH entre 7 y 8, con adición de solución de NaOH M.

b) Los vinos tintos, según la dilución a efectuar, pueden necesitar ser decolorados, en tal caso se procede como se indica. Se mezclan 10 mL de vino y 0.2 g de carbón decolorante, poliamida, o polivinilpirrolidona. Agitar durante unos 30 segundos y filtrar rápidamente. Emplear el líquido filtrado, que en algunos casos puede quedar totalmente incoloro.

METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS²

Principio del método

El acetaldehído se separa fácilmente de los demás componentes del vino, mediante el empleo de cromatografía de gas. Las fases estacionarias empleadas pueden ser semipolares o polares. Los productos más corrientemente utilizados son: el succinato de dietienglicol (DEGS) y el Carbowax 20M.

Aparato y columna

El cromatógrafo debe estar provisto de detector de ionización de llama. La columna en acero inoxidable deberá tener una longitud entre 3 y 5 metros y 1/8 de pulgada de diámetro exterior. La fase estacionaria es de 20% de Carbowax 20M sobre polvo de teflón de 80/100 mallas.

Técnica operativa

1. Los parámetros de trabajo del cromatógrafo son los siguientes: Temperaturas del inyector y del detector 150 °C, la columna isoterma a 110 °C. Gas portador nitrógeno a 30 mL/min.
2. Se inyecta en la columna un volumen entre 2 y 5 microlitros.
3. Previamente se tendrá preparado un patrón de acetaldehído, para comparar las alturas o áreas de los picos del cromatograma. Se inyectará el mismo volumen de la solución patrón.

Observaciones

En el caso de utilizar la fase estacionaria DEGS, pueden determinarse simultáneamente el etanal y el acetal.

2. R.L. Morrison, *Am. J. Enol. Vitic.*, 13, páginas 159-168, (1962).

Acetoína y diacetilo

COMENTARIOS

Durante la fermentación, hay formación de acetoína, y sus cantidades varían entre amplios límites, de 2 a 80 mg/L. En los vinagres naturales, la concentración de acetoína es mayor que en los vinagres artificiales o de imitación. La cantidad de diacetilo en los vinos es mucho más baja y puede oscilar entre 0.2 y 4 mg/L.

Estos compuestos, por ser volátiles, se encuentran también en las holandas y brandies, y en general en todos los destilados del vino. Es muy importante este análisis en los brandies, pues son productos característicos.

Bajo condiciones aeróbicas, las levaduras pueden reducir la acetoína a 2,3-butanodiol. Ciertas levaduras y bacterias, a elevadas temperaturas de fermentación, forman mayor cantidad de acetoína y diacetilo.

METODO MURDOCK³

Principio del método

Se fundamenta en la reacción de Voges-Proskauer, del diacetilo y la acetoína, con el α -naftol y creatina. Se hace reaccionar el destilado del vino con dichos compuestos y se lee la absorbancia a los 5 minutos, para determinar el diacetilo. La acetoína reacciona más lentamente y debe tomarse la lectura al cabo de una hora.

Reactivos

SOLUCION α -NAFTOL, preparada por disolución de 5 gramos de α -naftol en 100 mL de isopropanol. Se añaden 0.5 g de carbón decolorante, se mezcla y agita durante 30 minutos. Luego se filtra. Se guarda en frasco de color topacio.

SOLUCION CREATINA-KOH. En un matraz de 100 mL, se disuelven 40 gramos de KOH en una pequeña cantidad de agua, se diluye a unos 90 mL y se añade 0.5 g de creatina, se disuelve y se completa a volumen con agua. Conservar en frasco de polietileno y al refrigerador.

SOLUCION STOCK DE DIACETILO. Se disuelve 1 gramo de diacetilo puro en 1 litro de agua destilada. De esta solución se efectúa una dilución de 1.00 mL a 100 mL.

SOLUCION STOCK DE ACETOINA. Disolver 1 gramo de acetoína pura en un litro de agua. Se efectúa luego una dilución de 20.00 mL a 100 mL.

Técnica operativa

1. Se utilizan cubetas de 10 mm de paso de luz, para emplear en el espectrofotómetro, con la longitud de onda de 530 nm.
2. En un microdestilador con arrastre de vapor, se colocan 5.00 mL de vino y se recogen poco menos de 50 mL en un matraz de este volumen. La punta del refrigerante deberá estar sumergida en una pequeña cantidad de agua destilada.
3. Terminada la destilación, se completa el volumen con agua.

³ D.I. Murdock, *Fodd Technol.*, 21, páginas 157-761, (1967) y J.F. Guymon y E.A. Crowell, *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, páginas 85-91, (1965).

4. De este destilado se emplean 10.00 mL, para efectuar el análisis, comenzando por la adición de la solución de hidróxido potásico-creatina.
5. Se compara la absorbancia, al cabo de 1 minuto, con la gráfica del diacetilo patrón.
6. Después de transcurrida una hora, se compara con la gráfica de acetoína.
7. Como la lectura de la absorbancia del diacetilo está incluida en la lectura efectuada al cabo de una hora, es necesario deducir dicho valor.

Cálculos

Se preparan una serie de patrones. Para ello, a diferentes matraces aforados de 100 mL, se les añade 0, 2.00, 5.00, 10.00, 20.00 y 50.00 mL de la solución de diacetilo. A otros matraces se efectúan iguales adiciones de la solución de acetoína. A partir de estas diluciones, así como también en el destilado del vino, se toman 10.00 mL a los que se añaden 2 mL de solución de creatina-KOH y 2 mL de solución de α -naftol. Se mezcla bien y se tapa. Al cabo de 1 minuto se lee la absorbancia a 530 nm y se repite esta lectura al cabo de una hora. Es necesario utilizar un ensayo en blanco, para comparar las absorbancias.

METODO GASCROMATOGRAFICO PARA DIACETILO⁴

Principio del método

Se utiliza la técnica del espacio de cabeza, para proceder luego al análisis gascromatográfico, en un detector de captura de electrones. Es necesario el empleo de este detector, ya que con el detector de ionización de llama, y debido a que la cantidad presente es relativa-

mente pequeña, el pico de acetoína o diacetilo viene solapado en el pico de etanol. Este problema se resuelve con el empleo del detector de captura, que no es sensible al etanol, pero sí a las cetonas. Se emplea en esta metódica la acetona como patrón interno.

Aparato y columna

Cromatógrafo de gas, provisto de detector de captura de electrones. La columna de 2 metros de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro exterior, en acero inoxidable. Relleno de Porapak Q de 80/100 mallas.

Técnica operativa

1. Los parámetros de trabajo del cromatógrafo son: Temperatura del inyector 175 °C, detector 150 °C y la de la columna 110 °C. El gas portador puede ser nitrógeno o mejor la mezcla de argón con 10% de metano a un flujo de 30 mL/min en la columna y 100 mL por minuto en el detector de captura.
2. En un vial de 60 mL de volumen, provisto de septum de goma perforable, se vierten 10 mL de vino y 1 mL de una mezcla de acetona en agua, en la relación de 1:9 en volumen, respectivamente.
3. Se sumerge completamente en un baño de agua a 25 °C, durante 30 minutos.
4. Transcurrido el tiempo, se toma el frasco por el septum, y se seca la goma sin sacar el frasco del agua. Con una jeringa para gases, se toman del interior del frasco, de 2 a 5 microlitros del espacio de cabeza.
5. Este volumen se inyecta en el cromatógrafo.
6. Bajo estas condiciones, los tiempos de retención de la acetona y del diacetilo, son 4.5 y 9.5 minutos respectivamente. El etanol tiene un tiempo de retención de 2.2 minutos.
7. Es necesario tener preparados unos patrones de diacetilo y acetoína, para someterlos a igual tratamiento que las muestras, y comparar la altura o área de los picos.

⁴ D.C. Rankine, J.C.M. Fornachon y D.A. Bridson, *Vitis*, 8, páginas 129-134, (1969).

METODO CROMATOGRAFICO PARA ACETOINA⁵

Principio del método

La acetoina se determina directamente por inyección del vino en el cromatógrafo, sin tratamiento previo alguno.

Aparato y columna

Cromatógrafo de gases, provisto de detector de ionización de llama. La columna de 2 metros de longitud y 1/4 de pulgada de diámetro exterior. Acero inoxidable. Fase estacionaria 3% de UCON oil 75H-90M, sobre Chromosorb GAW de 100/120 mallas.

Técnica operativa

1. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo, son: Bloque de inyección a 150 °C, detector a 180 °C y columna a 140 °C. Gas portador helio a 60 mL/min.
2. Se inyecta directamente en el cromatógrafo de 2 a 3 micro-litros del vino a analizar.
3. Como se ha indicado en el párrafo 7) del análisis anterior, se someterá la solución patrón de acetoina, como la muestra de vino.

5. C.S. Ough y M.A. Amerine, *Am. J. Enol. Vitic.*, 18, páginas 157-164, (1967).

Hidroximetilfurfural

COMENTARIOS

Por el calentamiento en medio ácido de los mostos o vinos dulces, la fructosa, sensible a la acción de la temperatura, genera hidroximetilfurfural. Los vinos que han sufrido un tratamiento térmico o que han sido edulcorados con mostos concentrados o desulfitados, pueden contener este producto. Los vinos del tipo Málaga, lo contienen en cantidad bastante apreciable.

Las concentraciones pueden variar entre amplios márgenes, tales como 25 a 135 miligramos por litro.

METODO COLORIMETRICO

Principio del método

Es una de las técnicas más aplicadas para analizar este producto y se basa en la reacción coloreada del hidroximetilfurfural con el reactivo de Fiehe⁶.

6. J. Fiehe, *Unters. Nahr. Genussm.*, 76, 161, (1908).

Reactivos

SOLUCION DE FIEHE. Se prepara disolviendo 0.1 g de resorcina en 10 mL de ácido clorhídrico concentrado. Esta solución se debe preparar diariamente.

ETER PURIFICADO. Se lava el éter etílico dos veces con agua

destilada, una vez con ácido sulfúrico al 10%, otra vez con agua, luego con una solución de NaOH al 10% y finalmente con agua destilada.

ACIDO CLORHIDRICO DILUIDO. Se toman 3 volúmenes de agua destilada y 7 volúmenes de ácido clorhídrico concentrado.

Técnica operativa

1. En un embudo de decantación de 125 mL, se mezclan 10 mL de la muestra de vino con 10 mL del éter purificado. Se agita bien.
2. Cuando se hallen separadas las dos capas líquidas, se desecha la capa de vino.
3. La capa etérea se pasa a una cápsula de porcelana y se evapora a sequedad a la temperatura ambiente.
4. Lavar, dejando resbalar por las paredes, con 5 mL de ácido clorhídrico diluido.
5. Se añaden 2 mL del reactivo de Fiehe.
6. La intensidad coloreada, es proporcional a la cantidad de hidroximetilfurfural presente en el vino. Puede llegar desde incoloro (ausencia) hasta rojo-ladrillo intenso.

METODO PIRES MARTINS⁷

Principio del método

El vino presenta, después de una eficaz defecación, una curva de absorción propia, que tiene valores sensiblemente iguales entre 245 y 250 nm y entre 280 y 285 nm.

⁷ G. Pires Martins, *FV/417*, (1972).

La presencia de hidroximetilfurfural en el vino modifica dicha curva de absorción. Las diferencias de esta absorción permiten determinar la concentración.

Aparato

Espectrofotómetro con posibilidad de medición en la zona del ultravioleta. Cubetas de cuarzo de 10 mm de paso de luz.

Reactivos

SOLUCION PATRON DE HIDROXIMETILFURFURAL, producto puro, en concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/L.

SOLUCION DE ACETATO BASICO DE PLOMO.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 7 M.

RESINA DE CAMBIO IONICO, Amberlite IR-120.

ACIDO SULFURICO al 20% v/v.

INDICADOR DE BROMOTIMOL al 0.4%.

Técnica operativa

1. En un matraz aforado de 50 mL, se vierten 2.5 mL de vino. Se neutraliza exactamente con la solución de NaOH, determinada separadamente, con el empleo de bromotimol como indicador.
2. Se añaden 0.3 mL de solución de acetato de plomo y se completa a volumen con agua destilada.
3. Se mezcla bien y al cabo de 15 minutos se filtra.
4. A 25 mL del filtrado, se añaden 250 mg de resina cambiadora de iones, en fase hidrógeno y una gota de solución de ácido sulfúrico. Se filtra.
5. Se prepara un ensayo en blanco, empleando para ello 25 mL de agua destilada.
6. Se mide la absorbancia en la zona de 280-285 nm, asignada como A 1 y en 245-250 nm, que la asignamos como A2. Se emplea como referencia el ensayo en blanco.

Cálculos

La gráfica se traza de acuerdo a las diferencias entre las absorbancias a 285 y 245 nm, en las soluciones con 25, 50, 75 y 100 mg/L.

La diferencia de las absorbancias A_1 y A_2 , es la que se lleva a la gráfica, para calcular la concentración de hidroximetilfurfural en el vino.

METODO WINKLER⁸

Principio del método

Es un método que se basa en la reacción coloreada que aparece, cuando se combina el hidroximetilfurfural con el ácido barbitúrico y la p-toluidina. Este método tiene como interferencia principal el sulfuroso presente en el vino. Puede evitarse este defecto, por eliminación del dióxido de azufre con iodo o por adición de exceso de aldehído etílico.

Aparato

Espectrofotómetro preparado para poder leer en los 550 nm de longitud de onda, con cubetas espectrofotométricas de 10 mm de paso de luz.

Reactivos

SOLUCION DE p-TOLUIDINA. En un matraz de 100 mL, se disuelven 10 g de p-toluidina en 40 mL de isopropanol, se añaden 50 mL de ácido acético glacial y se completa a volumen con isopropanol. Debe prepararse diariamente.

SOLUCION DE ACIDO BARBITURICO En un matraz de 100 mL, se colocan 500 mg de ácido barbitúrico y unos 90 mL de agua destilada. Se calienta hasta completa disolución. Se enfría y se completa con agua. Esta solución es estable durante una semana.

8. O. Winkler, *Z. Lebensm. Unt. Forsch.*, 102, páginas 161-172, (1955).

SOLUCION DE ACETALDEHIDO, al 1 % en agua.

SOLUCION STOCK DE HMF⁹, preparada con 1 gramo del producto puro, disuelto en 1 litro de agua.

Técnica operativa

1. Es necesario que el vino se halle perfectamente límpido, en caso contrario deberá filtrarse.
2. Si la cantidad de dióxido de azufre libre es inferior a 10 mg/L, se toman 2.00 mL del vino y se colocan en cada uno de dos tubos con tapón esmerilado.
3. A cada uno de los tubos se vierten 5 mL de solución de p-toluidina.
4. Al tubo que servirá de ensayo en blanco, se le añade 1 mL de agua destilada y al otro 1 mL de solución de ácido barbitúrico.
5. Se mezcla y se vierten en las cubetas de 10 mm de paso de luz, se mide la absorbancia a 550 nm. El máximo de absorbancia se alcanza a los 2 ó 3 minutos, después de la adición del ácido barbitúrico.
6. Si la concentración del SO_2 libre es superior a los 10 mg/L, se vierten en un matraz aforado de 25 mL, 15.00 mL del vino y 2 mL de solución de aldehído. Se mezcla y se completa a volumen con agua destilada.
7. Se utilizan 2.00 mL de esta solución y se procede como antes.

Cálculos

Se prepara una gráfica patrón, mediante el empleo de 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 y 4.00 mL de la solución de stock de HMF, en matraces de 100 mL. De estas soluciones se toman 2.00 mL de cada una y se someten al análisis, como se ha indicado anteriormente. De estos valores de absorbancias, se prepara la gráfica patrón.

Del valor de la absorbancia leído en el análisis de la muestra, se compara con la gráfica, para determinar la concentración de hidroximetilfurfural en el vino.

9. Hidroximetilfurfural.

8. COMPUESTOS FENOLICOS

FENOLES TOTALES	8.5
METODO SINGLETON	8.6
METODO ESPECTROFOTOMETRICO EN U.V.	8.8
METODO LOWENTHAL	8.9
INDICE DE PERMANGANATO	8.11
FLAVONOIDES	8.14
METODO KRAMLING	8.14
CATEQUINAS	8.16
METODO POMPEI Y PERI	8.16
METODO DE ARNOW	8.17
HIBRIDOS	8.20
METODO O.I.V. Ah 18	8.20
METODO SCHMIDT-HEBBEL	8.23
ANTOCIANINAS	8.25
METODO DIFERENCIA DE pH	8.25
METODO DECOLORACION POR BISULFITO	8.27
METODO COLORIMETRICO	8.28
TEST DE MADERIZACION	8.32

Fenoles totales

COMENTARIOS

El tema de los compuestos fenólicos en el vino, es asunto muy complejo. Ha sido, y es, objeto de un número muy elevado de trabajos efectuado por científicos de diversos países. Estos productos son importantes por muy diversas razones: son los causantes del color, bloquean gran parte del oxígeno, provocan el sabor astringente y son una fuente importante del fenómeno de oscurecimiento del vino.

El gran número de compuestos y la terminología compleja de los mismos, crean confusión en el trabajo analítico. Según Drawert y otros¹, han encontrado 58 diferentes compuestos fenólicos en vinos del tipo Tokay.

En la actualidad, la cantidad de fenoles totales en el vino, está muy por debajo del contenido que existía en años anteriores, debido a las técnicas de elaboración, que evitan el contacto prolongado con las partes de la uva que cedían estos compuestos (piel, raspón, pulpa y semillas).

La concentración aumenta por el tiempo de contacto con la piel y las semillas, la graduación alcohólica, temperatura de fermentación, agitación, intensidad del prensado, variedad de la uva, etc.

1. F. Drawert, V. Lessing y G. Leupold, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 5, 65-70. (1977).

SOLUCION STOCK DE FENOLES. Disolver en un matraz de 100 mL, 0.500 gramos de ácido gálico, en agua.

Los componentes que contribuyen al bouquet de los vinos tintos, son los flavonoides, antocianinas, flavonoles, catequinas y taninos antocianogénicos. No existe limitación legal de la concentración de fenoles en el vino.

METODO SINGLETON²

Principio del método

Este método se fundamenta en el empleo del reactivo de Folin-Ciocalteu, que es una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, que se reduce, al oxidar los fenoles, en una mezcla de óxido de tungsteno y molibdeno, de color azul. La coloración que se produce, presenta una absorción máxima alrededor de los 750 nm, y es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en la muestra de vino.

Reactivos

REACTIVO FOLIN-CIOCALTEU. Se encuentra en el comercio ya dispuesto. Se puede preparar de la siguiente forma: En un matraz de 2 litros, para destilación, se disuelven: 100 gramos de tungstato de sodio y 25 gramos de molibdato sódico, en unos 700 mL de agua destilada; se añaden 50 mL de ácido fosfórico al 85% y 100 mL de ácido clorhídrico concentrado; se coloca un refrigerante de reflujo y se hierve durante 10 horas; luego se añaden 150 gramos de sulfato de litio, algunas gotas de bromo y se lleva nuevamente a ebullición durante 15 minutos. Se enfría y se completa el volumen a 1 litro.

SOLUCION DE CARBONATO SODICO. Disolver 200 gramos carbonato sódico anhidro, en un litro de agua en ebullición. Dejar enfriar a la temperatura ambiente y sembrar con unos pocos cristales de carbonato sódico. Filtrar después de 24 horas.

Técnica operativa

1. Para vinos blancos, se toma 1.00 mL para el análisis. En el caso de vinos tintos se efectúa una dilución de 10.00 mL de muestra a 100 mL con agua. Se emplea 1.00 mL de esta dilución.
2. En un matraz de 100 mL se vierte 1.00 mL de la solución anterior.
3. Se añaden 60 mL de agua destilada y se agita.
4. A continuación se adicionan 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agita bien y se deja en reposo unos 2-3 minutos.
5. Se añaden 15 mL de solución de carbonato sódico, se completa a volumen con agua y se deja en reposo 2 horas a 20 °C.
6. Se determina la absorbancia a 765 nm, en cubetas de 10 mm de paso de luz.
7. Conviene preparar una curva de calibración, empleando la solución stock de ácido gálico. Para ello, en matraces de 100 mL se vierten: 0, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 y 10.00 mL de la solución stock de fenol y se completa el volumen con agua destilada. La concentración de fenol en estos matraces, expresada como equivalente en ácido gálico, es de 0, 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L.
8. Con estas soluciones patrón se opera como se indica en el paso 2) y sucesivos.

Cálculos

A partir de la gráfica preparada con las soluciones patrón se deduce la concentración de fenoles totales en la muestra de vino o mosto.

Observaciones

- a) La presencia de azúcares (fructosa) interfiere en esta determi-

² V.L. Singleton y J.A. Rossi Jr., *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, páginas 144-158, (1965).

nación, según E. Donko³, y por ello se recomienda dividir por el factor siguiente:

De 10 a 25 g/L azúcares	Factor divisor 1.03
De 25 a 100 g/L azúcares	Factor divisor 1.06
De 100 a 200 g/L azúcares	Factor divisor 1.10

b) También es importante anotar, que esta metódica se presta fácilmente a la automatización.

METODO ESPECTROFOTOMETRICO EN U.V.⁴ _____

Principio del método

Los polifenoles observados al espectrofotómetro y a una longitud de onda comprendida entre 200 y 350 nm, muestran una absorción inconfundible, con dos máximos típicos en 215 y 278 nm, con un mínimo alrededor de los 245 nm. La absorbancia en el segundo valor de longitud de onda es constante en cualquier tipo de vino y para cualquiera de las sustancias fenólicas. No influye tampoco el pH de las soluciones.

Reactivos

(+) CATEQUINA.

ALCOHOL ETILICO 96%.

Técnica operativa

1. Se prepara una solución acuosa de catequina, disolviendo en un matraz aforado de 100 mL, 100 mg de catequina en alcohol y completar el volumen con el mismo disolvente.
2. De la solución anterior se toman 10.00 mL y en un matraz aforado de 100 mL se diluyen con agua destilada de forma que cada mL corresponda a 0.1 mg de catequina.

3. E. Donko y E. Phinotis, *Szolesz Borazat*, 1, 357-366, (1975).

4. Lanfranco Paronetto, *Polifenoli e Tecnica enologica, Edagricole, Bologna*, (1979).

3. En cuatro matraces aforados de 100 mL, se sitúan 5.00, 10.00, 15.00 y 20.00 mL de la solución anterior y se completa a volumen con agua destilada. Las concentraciones corresponden a 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg de catequina por 100 mL.
4. Cada una de las soluciones anteriores se pasan por el espectrofotómetro, en cubeta de 10 mm de paso de luz, a la longitud de onda de 280 nm.
5. Con los valores obtenidos de cada una de las soluciones se prepara la curva patrón.
6. La muestra de vino tinto se diluye 100 veces, es decir se toma 1.00 mL de vino y en un matraz de 100 mL, se completa a volumen con agua destilada. Si el vino es blanco, la dilución será de 20 veces.
7. Se lee la densidad óptica de la muestra y se compara con la gráfica, para determinar la concentración de polifenoles totales.

Observaciones

a) Es una de las técnicas más simples, rápidas y fiables, para la determinación de los polifenoles totales.

b) Se puede también expresar el resultado, como «índice de fenoles», según la fórmula: $I.F. (met. U.V.) = A \times n$, siendo n la dilución de la muestra y A la absorbancia.

METODO LOWENTHAL⁵ _____

Principio del método

Los polifenoles reaccionan con la indigotina y se valora el exceso de la misma con solución de permanganato potásico. Es un método clásico, que todavía tiene vigencia.

5. Modificación de Carpené y Pi, resumido por J. Garcia Barceló, *Metodología de Análisis de Vinos y Derivados*, (1975).

Reactivos

ACIDO SULFURICO CONCENTRADO.

SOLUCION PERMANGANATO POTASICO. Se disuelven 0.558 gramos de permanganato potásico con agua destilada hasta el volumen de un litro.

SOLUCION DE SULFO-INDIGOTINA. En un matraz de un litro, se vierten 30 mL de ácido sulfúrico concentrado, se añaden 1.50 gramos de indigotina, dejándolo en reposo toda la noche. Se completa hasta volumen con agua destilada.

SOLUCION PATRON DE TANINO. Se prepara disolviendo 1 gramo de ácido gálico puro, en un litro de agua destilada.

Técnica operativa

1. En un vaso de unos dos litros de capacidad, se vierten unos 100 mL de agua, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y 10.00 mL de la solución de sulfoindigotina. Se añade un litro de agua, aproximadamente.
2. Se coloca el vaso bajo una bureta llena con la solución de permanganato y, sin cesar de agitar con una varilla, se deja caer gota a gota, hasta que el líquido tome un color amarillo, sin traza alguna de color verde.
3. Se anota la cantidad de permanganato gastado, y se conserva el líquido en el mismo vaso, cuyo color servirá de tipo para el dosado del tanino.
4. Se repite el paso número 1), pero con la adición de 10.00 mL de la solución patrón de tanino.
5. Déjese caer gota a gota el permanganato, agitando siempre, hasta alcanzar idéntico color que el obtenido en el paso 2).
6. Del número de mililitros gastados, se resta el volumen gastado en el paso 3). Divídase 10 por el número de mililitros de permanganato gastados, y el cociente expresará la equivalencia en tanino de 1 mL de la solución de permanganato potásico.
7. Se repite la operación 1), pero empleando 10.00 mL de la muestra de vino blanco en vez del patrón de tanino. Sígase

con el paso 2).

8. Del número de mililitros gastados de permanganato se deducen los que han sido necesarios para titular la sulfoindigotina (paso 3). La diferencia, multiplicada por la equivalencia hallada en el paso 6) y luego multiplicado por 100, expresa en miligramos por litro el tanino del vino.

Observaciones

- a) Es condición indispensable, efectuar la valoración con lentitud o sea por adición a gotas de la solución de permanganato.
- b) Para una misma cantidad de permanganato gastada, debe invertirse igual tiempo, tanto en la valoración de sulfoindigotina como en la determinación del tanino en la muestra.
- c) Conviene que la cantidad de permanganato gastada para descomponer el tanino del vino, sea aproximadamente la mitad de la necesaria para descomponer la sulfoindigotina. Si, por ejemplo, son precisos 10 mL de permanganato para decolorar 10 mL de indigotina, se operará con un volumen de vino, que exija aproximadamente 5 mL de permanganato.

INDICE DE PERMANGANATO⁶

Principio del método

Valoración con una solución de permanganato del poder reductor, en frío, de las sustancias polifenólicas del vino. Como todos los componentes fenólicos del vino, a igual concentración, no reducen la misma cantidad de permanganato, se trata de una valoración global que da un índice, al que se denomina «índice de permanganato».

Constituye una expresión del contenido en sustancias fenólicas que están en relación con los caracteres gustativos de: dureza, astringencia o aterciopelado, sin que la relación sea absoluta. Es una determina-

⁶ J. Ribéreau-Gayon y otros, *Traite d'Oenologie, vol. 1, Analyse et Contrôle des Vins*, DUNOD, Paris, (1972).

ción especial para vinos tintos; en blancos es poco apreciable y se presta a confusiones por el consumo de permanganato por otros componentes del vino, que en este caso tiene una influencia marcada.

Reactivos

SOLUCION DE PERMANGANATO POTASICO 0.01 N.

SOLUCION DE ACIDO TARTARICO. En un matraz de un litro se disuelven en unos 500 mL de agua destilada, 5 gramos de ácido tartárico reactivo análisis. Se añade 1.87 gramos de hidróxido sódico y una vez disuelto se completa el volumen con agua destilada.

INDICADOR DE INDIGO. La solución base se prepara con 3 gramos de carmín de índigo, disueltos en un litro de agua destilada. Se filtra y de esta solución se toman 50 mL y se colocan en un matraz de un litro, se añaden 50 mL de ácido sulfúrico al 1/3 (v/v) y agua destilada hasta completar el volumen.

Técnica operativa

1. En un erlenmeyer de 250 mL, se colocan 50 mL de la solución de índigo.
2. Se añaden 2.00 mL del vino objeto de análisis.
3. Inmediatamente se adiciona gota a gota, desde la bureta, la solución de permanganato, hasta desaparición completa de la coloración azulada y aparición de un color francamente amarillo.
4. Se toma nota del volumen, asignado como V.
5. Se repite otra valoración, siguiendo los pasos 1) y 2), pero utilizando 2 mL de la solución de tartárico en vez del vino.
6. Este volumen se asigna V'.

Cálculos

Si se tiene en cuenta, que para 2 mL de vino se han gastado: V- V' mililitros de solución de permanganato, para un litro de vino serán: $(V-V') \times 500$ mililitros de permanganato potásico 0.01 N.

Se acostumbra a referir el volumen de reactivo como permanganato potásico N, por ello la fórmula final a aplicar será:

8.12

$(V-V') \times 5$ en mL de KMnO_4 N.

Observaciones

- a) La valoración con permanganato del paso 3), debe hacerse de inmediato a la adición del vino.
- b) La solución de permanganato potásico 0.01 N es de muy difícil conservación y se recomienda prepararla en el momento del uso a partir de una solución 0.1 N.
- c) Es preferible emplear la cifra de miliequivalentes de permanganato, para indicar el índice.
- d) En vinos jóvenes, el cambio de color no es muy claro y por ello es recomendable emplear la mitad de volumen.

8.13

Flavonoides

COMENTARIOS

Forman parte del conjunto de polifenoles totales y puede tener algún interés el análisis de estos componentes. Las fracciones polifenólicas importantes, son tres: Fenoles simples, flavonoides y taninos.

METODO KRAMLING

Principio del método

La utilización del formaldehído como agente precipitante de los flavonoides en el vino, es la técnica que se describe. El método ha sido desarrollado por Kramling y Singleton'. El formaldehído reacciona con el 5,7-dihidroxi flavonoide, formando un derivado que precipita. Estas moléculas de condensación se eliminan por filtración y se analiza el filtrado por el método de Folin-Ciocalteu.

7. T.E. Kramling y V.L. Singleton, Am. J. Enol. Vitic. 20, 86-92, (1969).

Reactivos

ACIDO CLORHIDRICO al 1:4, en agua destilada.

SOLUCION DE FORMALDEHIDO al 0.8%, con agua destilada.

Técnica operativa

1. Es necesario disponer de un filtro de membrana de 0.45 micras.
2. Se colocan en un tubo de ensayo, 10.00 mL de vino filtrado.
3. Al tubo anterior se añade 5 mL de la solución de formaldehído.
4. Dejar en reposo durante 24 horas.
5. Se filtra por membrana y se efectúa el análisis por el método Folin.
6. A una muestra del vino filtrado también por membrana pero sin el tratamiento de formaldehído, se analiza por el método de Folin-Ciocalteu.
7. La diferencia entre estos dos análisis corresponde a los flavonoides.
8. Se expresará el resultado en miligramos de ácido gálico por litro de vino.

Catequinas

COMENTARIOS

Las catequinas son componentes que se hallan en la piel y pepitas de las uvas y son los componentes porcentuales mayores que se engloban en los polifenoles totales.

Según Rebelein⁸ el contenido promedio en vinos blancos es de 0.074 g/L y en tintos 2.150 g/L. Otros autores como Herrmann y Berger⁹ sugieren valores de 100-200 miligramos en los vinos blancos y 1000 mg/L en los tintos. Para convertir estas cifras en ácido gálico, deben multiplicarse por el factor 0.88.

METODO POMPEI Y PERI¹⁰

Principio del método

La determinación de la catequina, se basa en la reacción del anillo

8. H. Rebelein, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 61, 182-183 y 239-240, (1965).

9. K. Herrmann y W.G. Berger, *Weinberg Keller*, 19, 559-568, (1972).

10. M. Peri y J. Pompei, *Am. J. Enol. Vitic.*, 22, páginas 55-58, (1971).

floroglucínico con la vanillina, que produce un color rojo, relativamente estable, frente a la alta concentración de ácidos minerales fuertes.

Reactivos

ALCOHOL ETILICO 96%.

ALCOHOL ETILICO ABSOLUTO.

VANILLINA al 1 % en alcohol etílico de 96%.

(+) CATEQUINA.

ACIDO CLORHIDRICO 11.5 M.

Técnica operativa

1. Se dispondrá de un espectrofotómetro y sus accesorios.
2. En un matraz aforado de 25 mL, se colocan 1.00 mL del vino objeto de análisis, 10 mL de ácido clorhídrico, 5 mL de solución vanillina y se completa a volumen con alcohol etílico absoluto.
3. Espectrofotómetro en longitud de onda de 500 nm y cubeta de 10 mm de paso de luz.
4. Se deja en reposo un tiempo entre 10 y 30 minutos, en el transcurso del cual, se mide la absorbancia colorimétrica.
5. Se prepara un ensayo en blanco, empleando en lugar del vino, 1 mL de agua destilada.
6. Se prepara una gráfica con (+) catequina pura y alcohol etílico del 96% en concentraciones que alcanzarán un máximo de 3 miligramos de catequina, en el volumen de la solución a leer.

METODO DE ARNOW¹¹

Principio del método

Los orto-, di- y tri-fenoles forman compuestos unidos con meta

11. Lanfranco Paronetto, *Polifenoli e tecnica enologica, Edagricole*, Bologna, (1979).

les de transición u otros elementos como el boro y el molibdeno. No forman estos compuestos de unión, los mono-, meta- y para fenoles y así no interfieren en el análisis. Se forma un compuesto coloreado en amarillo con un máximo a 300 nm.

Reactivos

REACTIVO DE ARNOW. Se prepara por mezcla de 10 g de nitrito sódico y 10 g de molibdato sódico, disueltos en agua destilada hasta 100 mL.

ACIDO CLORHIDRICO 0.5 M.

HIDROXIDO SODICO 1 M.

(+)CATEQUINA.

Técnica operativa

1. Si el vino es tinto se diluye de 10 a 20 veces, según el tipo de vino. Los blancos no se diluyen.
2. En dos matraces aforados, asignados como A y B, de 50 mL, se vierten 2 mL de vino diluido, 5 mL de agua destilada y 5 mL de ácido clorhídrico 0.5 M.
3. En el matraz A, se añaden 5 mL del reactivo, y después de un minuto, 5 mL de hidróxido sódico 1 M.
4. Transcurridos 15 minutos, se completan a volumen los dos matraces.
5. El líquido del matraz A se coloca en cubeta de 10 mm de paso de luz y se lee la absorbancia a 500 nm, utilizando el líquido del matraz B como referencia,
6. La lectura de absorbancia se compara con la curva de patrones.
7. Las soluciones patrón se preparan a partir de una solución de (+)catequina obtenida con 100 mg del producto disueltos en agua y completando a volumen de 100 mL.
8. Se preparan diluciones de forma que contengan: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mg/mL.
9. Los volúmenes de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL de dichas soluciones se someten a igual tratamiento que la muestra de vino. De las absorbancias leídas se confecciona la gráfica.

Observaciones

La expresión de resultados de los ortodifenoles, es en miligramos de (+)catequina por litro.

Híbridos

COMENTARIOS

Las aplicaciones analíticas de la malvidina diglucósido, tienen por objeto conocer si un vino ha sido elaborado con uvas híbridas o de la variedad no *vinífera*.

El contenido del citado compuesto en los vinos procedentes de *V. vinífera*, no suele exceder de 5 miligramos por litro, según Hadorn¹², mientras que mezclas de vinos con sólo un 3% de vino procedente de híbrido, la cantidad es mayor a la indicada.

Existen varios métodos que utilizan la cromatografía de papel en capa fina.

METODO O.I.V. Ah 18

Determinación cualitativa

Principio del método

El compuesto diglucósido, bajo la acción controlada de un oxidante

12. H.Hadorn, K.Zürcher, y V.Ragnarson, *Mitt. Geb. Lebens-mittelunters Hyg.*, 58, 1-30, (1967).

adecuado, se transforma en una sustancia que examinada bajo luz ultravioleta, presenta una fluorescencia de color verde, en un medio amoniacal.

El dióxido de azufre libre del vino, debe fijarse con acetaldehído, en el caso de que la concentración de éste sea superior a 40 mg/L.

Reactivos

ACIDO CLORHIDRICO 1 M.

SOLUCION DE ACETALDEHIDO al 10% en alcohol al 50% (v/v).

SOLUCION DE NITRITO SODICO al 1 % (p/v).

ALCOHOL 96% con el 5% de hidróxido amónico concentrado.

Técnica operativa

Vinos tintos

1. Colocar en un tubo de ensayo, 1 mL del vino, 0.05 mL de ácido clorhídrico y 1 mL de nitrito sódico.
2. Agitar y dejar en reposo 2 minutos.
3. Adicionar 10 mL de alcohol con amoníaco.
4. Agitar y dejar en reposo 5 minutos.
5. Filtrar y someter el líquido filtrado a la radiación ultravioleta de 365 nm.
6. La presencia de fluorescencia verde, indica la presencia del diglucósido.

Observaciones

a) Si el vino a analizar es rosado, se emplean 5 mL de muestra y se adicionan 2 mL del alcohol, en vez de los 10 mL. Por lo demás la marcha analítica es la misma.

b) En el caso de vinos con concentraciones de dióxido de azufre libre, superiores a 40 mg/L, se procede al bloqueo del mismo con la solución de acetaldehído de la siguiente forma: a 10 mL de vino se añaden 1.5 mL de acetaldehído al 10% y se deja en reposo durante 20 minutos.

Determinación cuantitativa

Principio del método

Se basa igualmente en el anterior método, pero la fluorescencia se compara con una solución patrón de sulfato de quinina, cuya intensidad de fluorescencia ha sido estandarizada de una vez por todas, con el diglucósido malvósido puro.

Reactivos

Los del método anterior y,

SOLUCION DE SULFATO DE QUININA a 2 mg/L, se prepara una solución que contenga 10 mg de sulfato de quinina en 100 mL de ácido sulfúrico 0.05 M. Diluir 20 mL de esta solución a un litro con ácido sulfúrico 0.05 M.

Técnica operativa

1. Se dispondrá de un espectrofotómetro de fluorescencia con la onda de excitación en 365 nm y la fluorescencia emitida en 490 nm. Cubeta de 10 mm paso de luz.
2. En un tubo de ensayo se coloca 1.00 mL del vino tinto o rosado.
3. Se añaden 0.05 mL de ácido clorhídrico y 1 mL de nitrito sódico al 1 %.
4. Agitar y dejar en reposo 2 minutos.
5. Se añaden 10 mL de alcohol amoniacal.
6. Agitar y esperar 5 minutos.
7. Filtrar y colocar el líquido en una cubeta de paso de luz de 10 mm.
8. Si la muestra presenta una lectura superior a 35, debe diluirse la muestra de vino con uno que no contenga híbridos y tener en cuenta la dilución en el cálculo.
9. Vinos libres de malvidina, dan una lectura de 5 a 6. La lectura de 1 equivale a un contenido de malvidina diglucósido de 0.426 mg/L.

Cálculos

Para calcular la concentración de malvidina, se tendrá en cuenta la siguiente fórmula:

$$(A - 6) \times 0.426 \times F = \text{mg/L}$$

A equivale a la lectura de fluorescencia de la muestra y F al factor de dilución, si es que ésta ha tenido lugar.

Se estandariza el aparato para tener una lectura de 100, con la solución de sulfato de quinina.

METODO SCHMIDT-HEBBEL¹³

Principio del método

Utiliza las diferentes movilidades de la malvidina diglucósido con respecto a otros componentes, en un soporte de capa fina formada por gel de sílice. La malvidina se observa por fluorescencia.

Reactivos

PLACAS PARA CROMATOGRAFIA, formadas por Kieselgel G sobre soporte de plástico.

MEZCLA DE ARRASTRE. Alcohol isoamílico, n-hexano, ácido acético y agua en los siguientes volúmenes 3:1:3:3, respectivamente.

Técnica operativa

1. A un centímetro del borde de la placa, se deposita una pequeña cantidad de la muestra objeto de análisis, de forma que aparezca en una superficie pequeña.
2. Se coloca en una cubeta o vaso, una pequeña cantidad de solución reveladora, tal como se realiza en el análisis del ácido málico, por cromatografía de papel.

13. H. Schmidt-Hebbel, W. Wichelson, L. Masson y H. Stelser, *Lebenm. Unters. Forsch.*, 137. 169-171, (1968).

3. La placa con la mancha de la muestra de vino, se introduce en la cubeta y se tapa.
4. Se deja ascender el líquido hasta unos 3-5 centímetros de la parte superior.
5. Se retira la placa de la cubeta, se deja secar y se observa a la luz ultravioleta.
6. El R_f de la malvidina diglucósido es de 0.14-0.15.

Antocianinas

COMENTARIOS

El análisis de las antocianinas en el vino, mosto o extractos vegetales, puede determinarse por dos métodos, uno basado en la variación del color con la modificación del pH y otro sobre la reacción con el bisulfito de sodio.

Estos métodos han sido perfeccionados por Ribereau-Gayón y E. Stonestreet.¹⁴

El método por la variación del pH, descrito aquí, ha sido simplificado y modificado por G. Margheri.¹⁵

METODO DIFERENCIA DE pH _____

Principio del método

Este método se basa en la variación del color de las antocianinas del vino, al modificar el valor del pH. La absorbancia sufre cambios

14. P. Ribereau-Gayon y E. Stonestreet, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 419, 2649-2652, (1965).

15. G. Margheri y E. Falcieri, *Vini d'Italia*, 81, 511, (1972).

notables en los pigmentos no polimerizados, mientras prácticamente ninguna modificación, o en todo caso muy ligera, los pigmentos polimerizados. Igualmente, la adición de dióxido de azufre también causa cambios en los no polimerizados y no tiene influencia en los condensados.

En valores de pH neutro o superior, existe una formación de base anhidra, de color violeta.

Reactivos

ALCOHOL ETILICO ACIDO. A un litro de alcohol de 96% se añade 1 mL de ácido clorhídrico concentrado.

ACIDO CLORHIDRICO diluido al 2%.

SOLUCION TAMPON pH 3.5, preparada mezclando 303.5 mL de fosfato bisódico 0.2 M y 696.5 mL de ácido cítrico 0.1 M.

MALVINA clorhidrato (Fluka), peso molecular 691.

Técnica operativa

1. Se prepara el espectrofotómetro para la lectura en 525 nm de longitud de onda y las cubetas con paso de luz de 10 mm.
- 2 En un matraz aforado de 100 mL, disolver 100 mg de clorhidrato de malvina con el alcohol diluido.
3. Se prepara una serie de matraces de 50 mL a los que se añade: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 mL de la solución anterior de malvina. Igualmente otra serie de matraces con idénticas adiciones. Una de la serie de matraces se utiliza para la standarización y la otra para la referencia.
4. A los matraces se les añade la cantidad de alcohol al 15% necesario para que el volumen total sea de 1 mL (o sea el matraz con 0.05 mL se le añade 0.95 mL de alcohol diluido, al de 0.1 mL de adición de 0.90 mL alcohol, etc.)
5. A cada uno de los matraces se le adiciona, ahora, 1 mL de etanol ácido.
6. A la serie de matraces para la standarización se adicionan 10 mL de ácido clorhídrico 1 M.

7. A la serie de referencia, se añaden 10 mL del tampón de pH 3.5. Se agita y se pasan por el espectrofotómetro.
8. Con los datos de las absorbancias leídas, se confecciona la gráfica.
9. En dos matraces de 50 mL, se coloca 1.00 mL de vino diluido (5 a 10 veces, según la coloración sea más o menos intensa) y 1 mL de etanol ácido a cada matraz.
10. Al matraz de la muestra, se le añaden 10 mL de ácido clorhídrico 1 M y al de referencia 10 mL de tampón de pH 3.5.
11. Se lee la absorbancia y este valor se traslada a la gráfica obtenida anteriormente, para conocer la concentración de malvina en la muestra de vino.

METODO DECOLORACION POR BISULFITO _____

Principio del método

Debido a que los antocianos se decoloran por acción de algunos productos (agua oxigenada, bisulfito sódico, hidroxilamina, etc.), se aprovecha esta propiedad para determinarlos por vía colorimétrica después de la adición de alguno de los componentes decolorantes indicados.

Este método, al bisulfito sódico, es relativamente fácil de realizar, aunque se obtienen resultados analíticos ligeramente superiores, con cuerda bastante con la metódica indicada anteriormente. Ribéreau-Gayon y Stonestreet, lo prefieren.

Reactivos

ALCOHOL ETILICO ACIDO, al 0.1 % de Hcl.

ACIDO CLORHIDRICO al 2%.

SOLUCION ACUOSA DE BISULFITO SODICO al 15 %.

SOLUCION MALVINA, como en el método anterior.

Técnica operativa

1. En un erlenmeyer de 100 mL se mezclan 1.00 mL de la muestra de vino, 1 mL del alcohol ácido y 20 mL de ácido clorhídrico al 2%,
2. Una vez bien agitado, se toman 10.00 mL y se colocan en un tubo de ensayo.
3. Se toman 10.00 mL del líquido del apartado 1) y se vierten en otro tubo de ensayo.
4. A un tubo se añaden 4 mL de solución de bisulfito sódico.
5. Al otro tubo se vierten 4 mL de agua destilada.
6. Después de 20 minutos se lee la absorbancia en cubeta de 10 mm de paso de luz y a 520 nm, de cada uno de los tubos, contra agua destilada.
7. Se prepara la gráfica, utilizando 1 mL de las soluciones patrón del método anterior de análisis.

METODO COLORIMETRICO¹⁶

Principio del método

Se basa en la transformación de las leucoantocianinas en cianidina, con variación del color hacia el rojo, en medio ácido y caliente.

Ya que esta reacción viene interferida por los azúcares presentes en el vino, se siguen métodos por separado para los vinos secos y para vinos dulces.

VINOS SECOS

Reactivos

SOLUCION ETANOL-CLORHIDRICO, obtenido por mezcla de 95 volúmenes de etanol de 96% y 5 volúmenes de ácido clorhídrico concentrado.

SOLUCION n-BUTANOL Y CLORHIDRICO, se mezcla 60 volúmenes de n-butanol y 40 volúmenes de ácido clorhídrico concentrado. A 100 mL de la mezcla anterior se añaden 30 mg de sulfato ferroso.

Técnica operativa

1. Se diluye el vino con la mezcla etanol clorhídrico, según la variedad, la dilución será entre 50 y 200 veces. El Cabernet y Merlot, se diluye 100 veces.
2. En un matraz de 100 mL con tapón esmerilado, se introducen 5.00 mL del vino diluido y 15 mL de la mezcla de butanol, clorhídrico y sulfato ferroso.
3. Se coloca el matraz, provisto de un refrigerante de reflujo, en un baño maría hirviente y se mantiene la ebullición durante 40 minutos.
4. Se enfría rápidamente al chorro del agua.
5. Como solución de referencia se emplea una solución igual a la obtenida en 2), pero mantenida a la temperatura ambiente.
6. En una cubeta de 10 mm de paso de luz, se lee la absorbancia en la longitud de onda de 550 nm.

Cálculos

La cantidad de leucoantocianinas se calcula por la fórmula:

$$C=A \times 208 \times F \text{ en mg/L}$$

en donde:

C es la concentración de leucoantocianinas.

A es la absorbancia con respecto al ensayo en frío.

F es el factor de dilución.

VINOS DULCES

Principio del método

Se efectúa la defecación con el reactivo sulfo-mercúrico, para eliminar los azúcares, que son los que interfieren en la lectura de la absorbancia.

16. Lanfranco Paronetto, *Polifenoli e Tecnica Enologica, Edagricole, Bologna, (1979).*

Reactivos

REACTIVO SULFO-MERCURICO. En un erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de agua destilada, se añaden 38 mL de ácido sulfúrico concentrado. Sin dejar enfriar la solución, se añaden 60 gramos de óxido de mercurio rojo. Esta adición debe hacerse con agitación y en pequeñas adiciones, en un plazo de tiempo de 4 horas. Se deja en reposo 24 horas y se filtra, obteniéndose una solución límpida e incolora.

SOLUCION ALCOHOL ETÍLICO al 50%, en agua v/v.

SOLUCION n-BUTANOL Y CLORHÍDRICO, se mezcla 60 volúmenes de n-butanol y 40 volúmenes de ácido clorhídrico concentrado. A 100 mL de la mezcla anterior se añaden 30 mg de sulfato ferroso.

Técnica operativa

1. En un matraz aforado de 100 mL, se vierten 10.00 mL de vino y se completa a volumen con alcohol diluido al 50%.
2. En dos tubos de centrifuga, se colocan 10.00 mL del vino diluido y se añaden 0.4 mL del reactivo sulfomercúrico, a cada tubo.
3. Se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos.
4. De cada tubo, se elimina el líquido sobrenadante y se añade 20 mL de solución hidroalcohólica, agitando con una varilla.
5. Se centrifuga de nuevo y se elimina el líquido, luego se añaden a cada tubo 20 mL de solución de butanol y ácido clorhídrico.
6. El líquido de uno de los tubos se coloca en un matraz provisto de un refrigerante de reflujo, ajustado con esmerilado.
7. Se coloca en baño maría hirviente durante cuarenta minutos. Se enfría bruscamente con el chorro del agua.
8. Se leen las absorbancias, en cubetas de 10 mm de paso de luz y a la longitud de onda de 550 nm, del líquido que se acaba de enfriar y el que ha estado a temperatura ambiente.

Cálculos

La cantidad de leucoantocianinas se halla por la fórmula:

$$C=A \times 104 \times F \text{ en mg/L}$$

en donde:

C es la concentración de leucoantocianinas.

A es la absorbancia con respecto al ensayo en frío.

F es el factor de dilución.

Test de maderización¹⁷

Observaciones

a) En la mayoría de los casos, es suficiente seguir el control de las absorbancias, durante unos 10-12 días.

b) Se aconseja efectuar sobre una misma muestra de vino, un borboteo de nitrógeno gas en vez del oxígeno, para poder hacer una comparación más exacta

Principio del método

Se somete el vino a una oxidación brusca y enérgica. A continuación se valora el efecto que ésta oxidación provoca en el oscurecimiento o sobre la tonalidad del color, en el vino tinto.

Técnica operativa

1. En un erlenmeyer de 250 mL, se vierten 100 mL de vino.
2. Se coloca en frigorífico a 4 °C y se satura con oxígeno, mediante borboteo del gas a través de una pipeta Pasteur, durante dos minutos.
3. Tapar el erlenmeyer y colocarlo en una estufa a 40 °C durante un tiempo.
4. Periódicamente, se lee la absorbancia, en cubeta de 10 mm de paso de luz, a 420 y 520 nm, si el vino es tinto, y solamente a 420 nm, si el vino es blanco.
5. Se traza una gráfica de las absorbancias a 420 nm en función del tiempo (días), si es vino blanco. Si el vino es tinto se traza la gráfica de la tonalidad del color (A_{420}/A_{520}) en función de los días.

17. Lanfranco Paronetto, *Polifenoli e Tecnica Enologica, Edagricole, Bologna (1979)*.

9. COMPUESTOS NITROGENADOS

NITROGENO TOTAL	9.5
METODO KJELDAHL	9.5
METODO COLORIMETRICO	9.8
METODO ELECTRODO ESPECIFICO	9.10
AMONIO	9.13
METODO O.I.V.	9.13
METODO ELECTRODO ESPECIFICO	9.15
METODO ENZIMATICO	9.16
AMONIO MAS AMINICO	9.17
METODO SORENSEN	9.17
PROTEINAS	9.19
METODO BAYLY Y BERG	9.19
METODO BIOLY SIEGRIST	9.21
NITRATOS	9.23
METODO O.I.V.	9.23
METODO ENZIMATICO	9.25
HISTAMINA	9.27
METODO LAFON-LAFOURCADE	9.27
UREA	9.30
METODO ENZIMATICO	9.30

Nitrógeno total

COMENTARIOS

Los compuestos nitrogenados, tales como: proteínas, aminas, aminoácidos, vitaminas, etc., se hallan en el mosto y en el vino, en cantidades bastantes apreciables. Algunos de estos productos son de vital importancia para el crecimiento de las levaduras.

Las proteínas, que se hallan presentes en las uvas, pueden también encontrarse en los vinos. Del complejo vitamínico que contiene el vino, las que se hallan en mayor cantidad, relacionadas en orden decreciente, son: ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina (vitamina B₆) y Tiamina (vitamina B1).

Es importante conocer el contenido de nitrógeno total en los mostos, ya que su cantidad, depende en gran parte de la buena marcha de la fermentación. Mostos con bajo contenido de nitrógeno, no suministran el elemento primordial, nitrógeno, para la levadura.

METODO KJELDAHL

Principio del método

Por la mineralización del nitrógeno orgánico, con ácido sulfúrico

y un catalizador para reducir el tiempo de digestión del ácido, se obtiene la sal amónica. Una vez terminada la mineralización, el amoníaco se destila sobre una solución de ácido bórico y se valora, empleando rojo de metilo como indicador.¹.

Reactivos

ACIDO SULFURICO-SALICILICO, preparado por disolución de 33 gramos de ácido salicílico reactivo, en un litro de ácido sulfúrico concentrado.

MEZCLA PARA EBULLICION, se prepara mezclando bien 1 g de sulfato de cobre pentahidrato, 2 g de sulfato ferroso eptahidrato y 20 g de sulfato sódico.

OXICLORURO DE SELENIO.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 12 M.

SOLUCION DE ACIDO BORICO al 4%.

ROJO DE METILO indicador, al 0.2% en alcohol de 60%.

ACIDO CLORHIDRICO 0.1 M.

Técnica operativa

1. En un matraz Kjeldahl de unos 800 mL, se colocan 50.00 mL de vino, o 25.00 mL si es mosto.
2. Se evapora hasta unos 10 mL.
3. Se añaden 40 mL de la solución de ácido sulfúrico y salicílico, 10 gramos de la mezcla para ebullición y 3 gotas de oxiclورو de selenio.
4. Mezclar bien todo lo anterior, y calentar sobre una pequeña llama.
5. En el caso de formación de espuma, se añaden unas gotas de silicona antiespuma.
- 6.. Continuar calentando hasta que la solución esté clara y después, 20 minutos más.

7. Una vez completada la digestión, se deja enfriar a temperatura ambiente.
8. Se añaden 300 mL de agua destilada, mezclar y añadir unas gotas de fenolftaleína.
9. Lentamente añadir 100 mL de solución de hidróxido sódico 12 M, hasta que aparezca una coloración rosa fuerte, indicando la alcalinidad.
10. Inmediatamente colocar el matraz en un conjunto destilador, donde a la salida del refrigerante hay un erlenmeyer de 500 mL que contiene 30 mL de solución de ácido bórico y unas gotas de rojo de metilo.
11. Destilar unos 150 mL.
12. Se retira el erlenmeyer, lavando la punta del refrigerante con agua destilada.
13. Se valora con ácido clorhídrico 0.1 M.
14. Es necesario efectuar un ensayo en blanco, con los mismos reactivos, empleando 50 mL de agua destilada en vez de la muestra.

Cálculos

Para hallar la concentración de nitrógeno, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{nitrógeno en mg/L} = \frac{(A - B) \times M \times 14 \times 1000}{v}$$

en donde:

- A* es el volumen de ácido clorhídrico gastado en la valoración de la muestra.
- B* es el volumen de clorhídrico gastado en el ensayo en blanco.
- M* es la molaridad del ácido clorhídrico.
- v* es el volumen de la muestra de vino.

Observaciones

a) Las metódicas para esta determinación, son prácticamente las mismas, cambiando en algún caso el catalizador.

¹. M.A. Amerine, *Laboratory Procedures for Enologists*, Assoc. Students Bookstore, Davis, California, (1970).

b) Los aparatos destiladores más idóneos, son los de arrastre de vapor, que al mismo tiempo son autolavables.

c) La operación que requiere más cuidado es la mineralización, por la lentitud y la espuma, que en muchas ocasiones hace que el tratamiento sea más largo.

METODO COLORIMETRICO² _____

Principio del método

La determinación del nitrógeno en el vino por el método colorimétrico propuesto, no requiere equipamiento particular. Puede efectuarse dentro de las condiciones normales en la industria. Se fundamenta en la reacción coloreada entre el amoníaco proveniente de la muestra mineralizada, el hipoclorito sódico y el salicilato sódico, en presencia de nitroprusiato como catalizador, y en medio básico. Se forma el colorante verde de indofenol. La especificidad y la sensibilidad dependen de las condiciones de trabajo, concentración y pureza de los reactivos y del orden en que son añadidos. Hay que seguir la operativa al pie de la letra. Es un micrométodo.

Reactivos

ACIDO SULFURICO concentrado.

ACIDO PERCLORICO al 57 %.

SELENIO METAL.

HIDROXIDO SODICO 0.2 M.

SOLUCION HIDROXIDO SODICO al 20%.

TIMOLFTALEINA, solución al 0.1 % alcohólica.

SALICILATO SODICO, al 4%.

NITROPRUSIATO SODICO, al 0.5 %.

HIPOCLORITO SODICO, solución con concentración en Cl activo de 0.1 %.

SULFATO AMONICO, solución de 2.36 g/L.

Técnica operativa

1. Se evapora a sequedad 0.25 mL de vino o mosto.
2. Se añaden 1.0 mL de ácido sulfúrico concentrado y se calienta a ebullición y se añade con precaución 0.02 mL de ácido perclórico, en dosis sucesivas cada uno o dos minutos, hasta el volumen de 0.2 mL.
3. Se sigue calentando hasta la total decoloración del líquido. Para activar la mineralización, se pueden añadir algunos gránulos de selenio (más recomendable), en sustitución del ácido perclórico.
4. Conjuntamente deben prepararse tres ensayos paralelos de la misma muestra.
5. Se trasvasa cuantitativamente a matraces aforados de 50 mL, lavando con agua destilada.
6. El primer ensayo se neutraliza, en presencia de fenolftaleína, con NaOH 20%. A los otros dos ensayos se añade el mismo volumen de NaOH que se ha gastado en la neutralización.
7. Después de la neutralización se añade 1 mL de hipoclorito y 2 mL de la mezcla (1/1) de salicilato y nitroprusiato, a cada ensayo.
8. Se completa a volumen con agua destilada. Se agita y se deja en reposo 30 minutos.
9. Determinar la absorbancia a la longitud de onda de 670 nm. Se utiliza el agua destilada como referencia.
10. La lectura se compara con la gráfica preparada de antemano, teniendo en cuenta la dilución efectuada.

Observaciones

Es una técnica con exactitud muy apreciable, aunque debe operarse con cuidado, dados los pequeños volúmenes que han de manejarse.

2. S.T. Ogorodnik, FV/454, (1970).

METODO ELECTRODO ESPECIFICO³

Principio del método

El nitrógeno total Kjeldahl puede ser determinado con el electrodo de amonio, después del tradicional procedimiento de digestión. No se necesita destilación ni valoración. Debe escogerse la cantidad de muestra, según la concentración de nitrógeno que contenga:

N supuesto mg/L	mL muestra
10-20	100
20-50	50
50-500	25

Reactivos

SOLUCION SULFATO MERCÚRICO. Disolver 8 g de óxido mercúrico (rojo) en 50 mL de una mezcla de ácido sulfúrico y agua 1 + 4 y completar a volumen de 100 mL.

REACTIVO DE DIGESTION. Disolver 267 g de sulfato potásico en 1 300 mL de agua destilada y 400 mL de ácido sulfúrico concentrado. Añadir 50 mL de solución de sulfato mercúrico y completar a volumen de 2 000 mL.

HIDROXIDO SODICO 10 M.

MEZCLA DE HIDROXIDO SODICO, IODURO SODICO Y EDTA. Disolver 400 g de hidróxido sódico, 300 g de yoduro sódico y 2 g de EDTA, en 700 mL. Cuando disuelto completar a volumen hasta 1 litro.

SOLUCION PATRON stock. 1.00 mL = 1.00 miligramo de nitrógeno amoniacal (Standard alto).

SOLUCION PATRON NITROGENO. 1.00 mL = 0.01 miligramos de nitrógeno amoniacal (Standard bajo).

Técnica operativa

1. Se preparan cinco matraces Kjeldahl de 800 mL de cabida a los que se ha hecho una marca a los 500 mL.

2. En un matraz se vierte el volumen de muestra, de acuerdo a la cantidad de nitrógeno que contenga.
3. Se preparan tres standards y ensayo en blanco que se tratarán igualmente como la muestra.
4. Los volúmenes del paso 2) son:

blanco:	500 mL agua destilada
0.1 mg:	10 mL «standard bajo»
1.0 mg:	100 mL «standard bajo»
10.0 mg:	10 mL «standard alto»
5. Diluir todas las muestras y standards a 500 mL en el matraz Kjeldahl.
6. Añadir 100 mL de la mezcla de digestión a cada uno de los matraces.
7. Calentar fuertemente los matraces, hasta desprendimiento de humo blanco de SO₃, y la solución se vuelve incolora o amarillo pálido.
8. Calentar durante 30 minutos más.
9. Enfriar y añadir, con suma precaución, agua destilada hasta la marca de 500 mL.
10. Enfriar y tomar 100 mL de cada matraz, pasar el líquido a un erlenmeyer de 250 mL y añadir lentamente 15 mL de hidróxido sódico 10 M.
11. Mezclar bien y dejar enfriar.
12. Se prepara el electrodo, siguiendo las instrucciones.
13. Calibrar el medidor utilizando los standards, introduciendo el electrodo y, mientras se agita, añadir 4 mL de la mezcla NaOH, NaI y EDTA. Tomar la lectura.
14. Efectuar la misma operación anterior, con la muestra.
15. Lavar los electrodos entre las mediciones.

Cálculos

Con las lecturas de milivoltios leídas, se prepara la gráfica y sobre ella se lee la de la muestra. El cálculo se halla:

3. Orion Research, *Guide to Food and Beverage*, página 19-21, (1984).

$$\frac{(A - B) \times 100}{C} = \text{mg/L de nitrógeno total Kjeldahl}$$

en donde:

A = mg NH₃-N de la muestra, leídos en la gráfica.

B = mg NH₃-N del ensayo en blanco, leídos en la gráfica.

C = volumen en mL de la muestra.

Observaciones

a) Si se ha efectuado alguna dilución de la muestra antes de la mineralización, se deberá tener en cuenta para el cálculo.

b) La conservación del electrodo, se efectuará según el detalle de las instrucciones del mismo.

Amonio

COMENTARIOS

Las determinaciones del amonio se efectúan, bien por electrodos específicos o por retención al paso por resinas catiónicas débiles. También puede determinarse conjuntamente con el nitrógeno amínico, por una técnica muy sencilla, o por método enzimático.

METODO O.I.V.⁴ _____

Principio del método

Se basa en la retención del amonio en una resina catiónica débil, Amberlite IRC-50, destilación del amoníaco y posterior valoración con

⁴. *Recueil des Methodes Internationales d'Analyse des Vins*, 5^o edición, O.I.V., París, 1978.

ácido clorhídrico 0.1 M. Este proceso de destilación es idéntico a la metódica anterior

Reactivos

TAMPON DE pH 7.00.

RESINA CAMBIO IONICO AMBERLITE IRC-50.

ACIDO CLORHIDRICO 1 M.

SOLUCION HIDROXIDO SODICO al 30%.

SOLUCION DE ACIDO BORICO al 4%.

INDICADOR ROJO DE METILO.

ACIDO CLORHIDRICO 0.1 M.

Técnica operativa

1. En una columna cromatográfica, se colocan 25 g de la resina fónica, de 80/100 mallas.
2. Se lava siguiendo el orden siguiente: con hidróxido sódico 2 M y ácido clorhídrico de la misma molaridad.
3. Se lava con agua hasta que el eluado no contenga iones cloruro (controlado con nitrato de plata).
1. Pasar 50 mL del tampón de pH 7.00, a través de la resina.
2. Lavar con agua destilada hasta ausencia de iones fosfato.
6. 50.00 mL de la muestra de vino o mosto, se colocan en un vaso de 250 mL.
7. Se neutralizan hasta pH 7.0, controlado con un medidor de pH.
8. La mezcla anterior neutralizada se pasa a través de la resina a la velocidad de una gota cada dos segundos.
9. Se lava la resina con 50 mL de agua destilada.
10. Todos los líquidos eluados, contienen aminoácidos, amidas y proteínas.
11. El amonio ha quedado retenido en la resina y a continuación se arrastra con 50.00 mL de ácido clorhídrico 0.1 M, recogiendo el eluado.

12. Seguidamente se lava con 50 mL de agua destilada, recogida en el mismo vaso del eluado anterior.
13. Al vaso de recogida se añaden 200 mL de agua y el conjunto se lleva a un destilador igual al del método anterior.
14. Se siguen exactamente las mismas operaciones, a partir de la operación número 10) de la metódica precedente.

Cálculos

La fórmula a aplicar es:

$$\text{amonio en mg/L} = \frac{V \times M \times 17 \times 1000}{v}$$

en donde: V es igual al volumen de ácido clorhídrico 0.1 M.

M es la molaridad del ácido clorhídrico.

v es el volumen de muestra.

Condensando la fórmula, de acuerdo al volumen de muestra empleado, queda la siguiente: amonio mg/L = $34 \times V$

METODO ELECTRODO ESPECIFICO⁵

Principio del método

Esta metódica se puede realizar, bien por calibración de standards o por la técnica de adición. La mayor precisión se logra por el sistema de adición, mientras que la calibración por patrones se adapta más a un gran número de muestras.

Reactivos

PATRON DE NITROGENO. Puede prepararse por dilución de cloruro amónico 0.1 M o bien con un standard de un gramo de N por litro.

HIDROXIDO SODICO 10 M.

5. D.J. McWilliam y C.S. Ough, *Am. J. Enol. Vitic.*, 25, 2, página 67, (1974).

Técnica operativa

Análisis por curva de calibración

1. Tanto la muestra como los patrones, se ajustan a pH algo superior a 11, por adición de NaOH 10 M.
2. Se leen los valores de milivoltios o concentración, según el aparato empleado y se traza una curva de calibrado.
3. Sobre la gráfica obtenida se halla la concentración.

Análisis por adiciones conocidas

1. Se prepara un patrón de forma que el volumen que se va adicionar, represente aproximadamente el doble de la concentración de la muestra.
2. A la muestra se añade hidróxido sódico 10 M para aumentar el pH por sobre el valor de 11.
3. Se determina la concentración, por lectura en el aparato y a continuación se adiciona un volumen de patrón, volviendo a efectuar la lectura.
4. El aumento hallado será el de la adición de patrón, y a partir de este dato se halla la concentración.

METODO ENZIMATICO _____

Metodología y reactivos igual al análisis de la urea, en este capítulo.

Cálculos

Para hallar la concentración de amonio, se utiliza la diferencia de absorbancias leídas, siguiendo las instrucciones que acompañan al test analítico.

La cantidad de amonio será:

$$c = 0.0843 \times Aa \text{ en g/L}$$

el resultado deberá multiplicarse por el factor de dilución que se haya realizado.

Amonio más amínico

METODO SORENSEN⁶ _____

Principio del método

El nitrógeno amónico y α -amino, reacciona con dos moléculas de formaldehído, eliminando dos hidrógenos de la molécula nitrogenada, con producción de un ácido más fuerte.

Reactivos

FORMALDEHIDO al 40% neutralizado.

HIDROXIDO SODICO 0.7 M.

Técnica operativa

1. En un vaso de precipitados de 250 mL se vierten 100 ml de vino, medidos con una pipeta.
2. Se sumergen los electrodos de un medidor de pH.
3. Con la solución de hidróxido sódico, se neutraliza el vino o mosto, hasta pH = 7.0.
4. Se añaden al vaso 40 mL de formol neutralizado. El pH del vino desciende un cierto valor.

6. P. L. Sorensen, *Biochem. Z.*, 7, 45-101, (1908). Metodica clásica y muy sencilla. Es bastante aproximada.

5. De nuevo, desde una bureta, se añade hidróxido sódico 0.1 M hasta alcanzar de nuevo el valor de pH = 7.0.

6. Al volumen anterior se asigna como V .

Cálculos

La fórmula para el cálculo del nitrógeno amoniacal y amínico es la siguiente:

$$\text{Nitrógeno} = \frac{V \times M \times 14 \times 1000 \text{ en mg/L}}{v}$$

en donde:

V es el volumen de hidróxido sódico gastado en la valoración,

M es la molaridad del hidróxido sódico,

v es el volumen de muestra empleado.

Observaciones

a) La neutralización del vino debe hacerse con precisión.

b) Normalmente el nitrógeno amoniacal, no se halla presente en los vinos, por haber sido consumido por la levadura durante el proceso de fermentación. Prácticamente el nitrógeno que se mide con este método es el amínico.

c) Es muy importante neutralizar bien el formaldehído. Este producto, una vez neutralizado, puede utilizarse en posteriores analíticas.

Proteínas

COMENTARIOS

Las proteínas pueden ser analizadas por distintos procedimientos de precipitación, bien con el empleo del ácido tricloroacético o por el ácido fosfomolibdico.

Una vez precipitadas las proteínas, las reacciones colorimétricas como el biuret o reactivo de Folin-Ciocalteu son las más sensibles. También puede determinarse el nitrógeno total de las proteínas por el método Kjeldahl y multiplicar el resultado por el factor 6.25.

METODO BAYLY Y BERG⁷

Principio del método

El fundamento es la precipitación de las proteínas por el ácido fosfomolibdico y el test del biuret.

7. F.C. Bayly y H.W. Berg, *Am. J. Enol. Vitic.*, 18, 18-32, (1967).

mL del mismo vino, pero sin añadir la solución de sulfato cúprico, y el volumen de hidróxido sódico será de 10.25 mL.

Reactivos

ACIDO FOSFOMOLIBDICO, preparado en un matraz de 1000 mL, al que se colocan 5 g de ácido fosfomolibdico, 15 mL de ácido sulfúrico concentrado, 5 g de sulfato sódico y 0.25 g de glucosa, diluyendo al volumen de 1000 mL, con agua destilada.

ETANOL 96%.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO al 3%.

SOLUCION DE SULFATO DE COBRE al 20 %.

SOLUCION STANDARD DE PROTEINAS, preparada con 0.3 gramos de albúmina de huevo pura, en agua destilada y completando a un volumen de un litro.

Técnica operativa

1. Mezclar 20.00 mL de vino con 20.00 mL de ácido fosfomolibdico y se deja en reposo durante unas 20 horas.
2. Se centrifuga a 5 000 rpm durante 15 minutos.
3. Decantar el líquido sobrenadante y redissolver el residuo con alcohol de 96%.
4. Mezclar y centrifugar durante 10 minutos.
5. Decantar y añadir 0.5 mL de la solución de hidróxido sódico, 0.25 mL de la solución de sulfato cúprico y de nuevo 9.5 mL de hidróxido sódico.
6. Agitar vigorosamente durante un minuto y dejar en reposo durante 2 horas.
7. Centrifugar durante 10 minutos y filtrar con papel.
8. Se determina la absorbancia a 530 nm, en cubeta de 10 mm de paso de luz.
9. En matraces aforados de 100 mL, se colocan 10.00, 20.00, 30.00, 40.00, 50.00, 70.00, 90.00 y 100.00 mL de la solución standard de proteína y se completa a volumen con agua.
10. Con estos patrones se traza la gráfica correspondiente.
11. Si el precipitado de proteína procedente de la muestra de vino es oscuro, se prepara un ensayo en blanco, con 20.00

Observaciones

La concentración de proteínas de las soluciones standard, equivalen a: 30, 60, 90, 120, 150, 210, 270 y 300 mg/L, respectivamente.

METODO BIOL Y SIEGRIST⁸

Principio del método

Por la acción de un exceso de tanino y el calor, las proteínas del vino precipitan. El método se basa en utilizar estos dos factores coagulantes, en una reacción rápida, para la precipitación de las proteínas. La adición del ácido ascórbico, es para evitar enturbiamientos férricos, utilizando su acción reductora.

Reactivos

ACIDO ASCORBICO.

SOLUCION DE ACIDO GALICO. Preparada con 5 g disueltos en 100 mL de una solución hidroalcohólica de 10%. La solución debe estar perfectamente límpida.

Técnica operativa

1. En dos tubos de ensayo de 20 x 200 mm, se vierten 20.00 mL de vino perfectamente limpio.
2. A cada tubo se añaden 200 mg de ácido ascórbico
3. A uno solo de los tubos, se añade 1 mL de la solución de ácido gálico.
4. Se mantiene durante 10 minutos en un baño de agua a la temperatura de 80 °C. Se enfría al chorro del agua.

8. J. García Barceló, *Metodología de Análisis de Vinos y Derivados (1976)*.

5. Se coloca el líquido en una cubeta de paso de luz de 10 mm y se lee la absorbancia a 650 nm.
6. La misma operación se efectúa con el ensayo en blanco.
7. Puede prepararse una gráfica, mediante el empleo de una solución de clara de huevo seca, como patrón y partir de ella en distintas diluciones, para trazar una gráfica.

Nitratos

COMENTARIOS

La metódica analítica de nitratos en vinos, había sido difícil de aplicar, hasta la aparición del método desarrollado por Rebelein⁹. Posteriores modificaciones han hecho el método más idóneo.

METODO O.I.V.¹⁰

Principio del método

Los nitratos son reducidos a nitritos, por la acción del cadmio esponjoso, formado dentro del mismo líquido a analizar. El nitrito originado se determina colorimétricamente.

Reactivos

CINC en polvo.

9. H. Rebelein, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 63, 223-239, (1967).

10. C. Junge, *O.I.V. Hoja verde* 396, (1972).

SOLUCION DE ACETATO DE CADMIO, preparada disolviendo 5 g de acetato de cadmio en 1 mL de ácido acético glacial y completar luego el volumen a 100 mL con agua destilada.

ACIDO ACETICO al 20%, 50 mL del ácido concentrado a 250 mL con agua.

SOLUCION DE CLORURO AMONICO al 28%. Disolver 70 g de cloruro amónico y agua destilada hasta 250 mL.

SOLUCION HIDROXIDO SODICO al 40%, disolver 100 g de hidróxido sódico en agua hasta 250 mL.

REACTIVO DE GREISS I. A 1.5 g de ácido sulfanílico, se añaden 50 mL de ácido acético glacial, cuando esté disuelto completar con agua destilada a 250 mL.

REACTIVO DE GREISS II. A 75 mg de alfa-naftilamina se añaden 50 mL de ácido acético glacial, completando a volumen de 250 mL con agua. Este reactivo debe prepararse al momento del uso.

SOLUCION PATRON DE NITRATO. En un matraz de 100 mL se introducen 374 miligramos de nitrato potásico y se disuelven con un vino que no contenga nitratos, completándose a volumen con el mismo vino.

Técnica operativa

1. En un matraz aforado de 50 mL, se colocan 5.00 mL de la muestra de vino, 5 mL de la solución de cloruro amónico y 2.5 mL de hidróxido sódico al 40%.
2. Mediante el empleo de un embudo seco, se introducen en el matraz 0.5 g de cinc en polvo, agitar bien.
3. Inmediatamente se añade 1 mL de la solución de acetato de cadmio, procurando verter este líquido al centro del líquido sin tocar las paredes del matraz.
4. Sin agitar, dejar en reposo durante 5 minutos (esto es para evitar que el precipitado de cadmio se aglomere, debido a su gran volumen).
5. Completar a volumen con agua destilada, agitar bien y filtrar sobre filtro de papel.

6. A 10.00 mL del filtrado, se añade 1 mL de una mezcla a partes iguales del reactivo Greiss I y II.
7. Tomar de nuevo 10.00 mL del filtrado y añadir 10 mL de ácido acético al 20%.
8. Se deja en reposo 15 minutos y se efectúa la lectura de la coloración rosa, con el espectrofotómetro a 530 nm en cubeta de 10 mm de paso de luz, empleando como líquido de referencia el obtenido en la operación 7).
9. En un matraz de 250 mL, se vierten 15 mL de la solución patrón de nitrato y se completa a volumen con el mismo vino que se preparó la solución patrón.
10. A matraces de 100 mL, se añaden 20.00, 40.00 y 60.00 mL de la solución anterior obtenida en 9) y completando a volumen con el mismo vino, exento de nitratos.
11. La cantidad de nitrato (expresado como N_2O_5) presente en los matraces es de 6, 12 y 18 mg/L.

Cálculos

El valor en nitrato se halla por contraste con la gráfica obtenida a partir de las soluciones patrón, teniendo en cuenta la eventual dilución de la muestra.

METODO ENZIMATICO

Principio del método

El nitrato se reduce por la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) a nitrito, en presencia de la enzima nitrato reductasa (NR). La cantidad de NADPH oxidada durante la reacción equivale a la cantidad de nitrato. La disminución de NADPH se mide por su absorbancia a los 340 nm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim, número 905658. Contiene 6 frascos con reactivos que se usarán, algunos con previa reconstitución con agua. 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, en material para un solo uso. Espectrofotómetro con lámpara de tungsteno, preparado para leer a la longitud de onda de 340 nm.
2. Si el vino contiene una cantidad de nitrato menor que 0.3 g/L, no es necesario diluir la muestra. Si la cantidad es mayor, pero no sobrepasa los 3 g/L, se diluirá 10 veces.
3. Si es necesario se neutralizará el vino. Cuando deba realizarse el análisis en vino tinto, se añadirán a 20 mL de vino, 1 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y agitar durante 5 minutos. Filtrar y utilizar el filtrado para el análisis.
4. 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 nitratos se calcula por:

$$c = 0.310 \times An \text{ en gramos por litro}$$

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

Histamina

COMENTARIOS

La histamina, junto con la tiramina, son dos aminas biógenas que se encuentran en pequeñas cantidades en la mayoría de los vinos. Particularmente en los vinos tintos, se halla en mayor proporción. La primera provoca una disminución de la tensión sanguínea, mientras que la segunda tiene un efecto contrario. De todas formas, dado su bajo contenido en los vinos, no tienen efectos perjudiciales.

Sin embargo, sí es interesante tener conocimiento de su concentración, ya que algunas legislaciones limitan la cantidad presente en el vino.

METODO LAFON-LAFOURCADE¹¹

Principio del método

Se emplea la cromatografía en capa fina, después de pasar las muestras por resinas de cambio iónico, y determinación espectro

11. S. Lafon-Lafourcade, *Connais, Vigne Vin*, 9, 103-115 (1975), y *Ref. Fr. Oenol.*, 15, 33-38, (1976).

fluorimétrica. El método ha sido modificado por C. Tejedor y A. Mariné¹².

Reactivos

RESINA AMBERLITE CG50, preparada de forma usual, ácida, básica y lavada con alcohol.

TAMPON DE FOSFATO a pH 7.5.

ACIDO CLORHIDRICO 2 M.

o-FTALALDEHIDO al 0.5%, 0.5 g disueltos en metanol. En el análisis se le asigna como OPT.

SOLUCION PATRON DE HISTAMINA. Un miligramo por litro.

Técnica operativa

1. Colocar la resina en un tubo de 15 mm de diámetro, la resina debe ocupar una longitud de 100 mm. Se emplea la solución tampón de pH 7.5 para acondicionarla en el tubo. Igualmente se realiza este trabajo para preparar otra columna.
2. Con el empleo de un medidor de pH, se neutralizan a pH 7.0, 2.00 mL de vino con la mínima cantidad de hidróxido sódico. Puede también neutralizarse mayor cantidad de vino, pero se colocarán en la columna una cantidad equivalente a 2.00 mL de vino.
3. A las dos columnas añadir 1 mL de tampón pH 7.5 y 2.00 mL de vino neutralizado.
4. A una columna se añaden 2 mL de patrón de histamina.
5. Se deja fluir el líquido a razón de 2 gotas por minuto.
6. Se lava con 30 mL del tampón de fosfato.
7. A continuación se eluye la histamina de las dos columnas con 16 mL de ácido clorhídrico 2 M, a la misma velocidad que la indicada en 5).
8. Con el empleo de hidróxido sódico, se modifica el pH de los líquidos eluados de cada columna, a 12.45 exactamente, con la ayuda de un medidor.

9. Ajustar el volumen a 20.00 mL.

10. Se toman 6.00 mL de las soluciones anteriores y se adiciona 0.3 mL de la solución OPT.

11. Después de 30 minutos se corrige el pH a 7.0, con ácido clorhídrico.

12. Se completa el volumen a 10 mL con agua.

13. Realizar un ensayo en blanco, utilizando 0.3 mL de OPT, ajustado a pH 7.0 y completado a volumen de 10 mL.

14. Las tres muestras deben estar a pH 7.0 y tener todas el mismo volumen de 10.00 mL.

15. Leer las muestras en el fluorímetro, con la longitud de onda de excitación de 360 nm y la emisión a 450 nm.

16. Se sitúa el espectrofotómetro a 100, con el eluido de histamina.

Cálculos

La siguiente fórmula se aplica para conocer la concentración de histamina en la muestra:

$$\text{histamina mg/L} = \frac{A - B}{100 - A}$$

en donde: A = valor fluorimétrico de la muestra

B = id del blanco

100-A = id de la histamina añadida

Observaciones

a) El rango analítico de esta metodología es de 0 a 4 mg/L. Por encima de los valores indicados, debe diluirse la muestra antes de la adición del OPT.

b) Según Tejedor y Mariné, el contenido de histamina en los vinos blancos oscila entre 0.3 y 5.5 mg/L. En los vinos tintos, la cantidad hallada está comprendida entre 3.0 y 10.0 mg/L.

12. C. Tejedor y A. Mariné, *Rev. Agro. Technol. Aliment.*, 261-269, (1982).

Urea

2. Generalmente es necesaria una dilución de 10 veces, colocando en un matraz aforado de 100 mL 10.00 mL de la muestra de vino y completar a volumen con agua destilada.
3. Seguir paso a paso las indicaciones del folleto adjunto al test analítico.

Cálculos

El cálculo de la concentración de urea se determina por la lectura de las absorbancias, siguiendo las instrucciones detalladas en el folleto.

La cantidad de urea será:

$$c = 0.1497 \times Au \text{ en g/L}$$

el resultado deberá multiplicarse por el factor de dilución que se haya efectuado, en este caso por 10.

METODO ENZIMATICO _____

La urea se hidroliza a amonio y dióxido de carbono, en presencia de la enzima ureasa. En presencia de glutamato dehidrogenasa (GIDH) y NADH, el amonio reacciona con 2-oxoglutarato a 1-glutamato. La cantidad de NADH oxidada es esteoquímica con la cantidad de amonio y con la mitad de la cantidad de urea. Se mide la absorbancia a 340 nm.

Reactivos

Test-combinación de la firma Boehringer Mannheim número 542 946, para unas 50 determinaciones. Contiene 10 frascos con reactivo, alguno de los cuales se debe reconstituir con agua destilada. La conservación de estos reactivos y su reconstitución, se indican en el folleto que acompaña a cada test analítico.

Técnica operativa

1. Prepararlas cubetas de 10 mm de paso de luz, se recomienda las 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.

10. ESTERES

ESTERES VOLATILES TOTALES	10.5
METODO COLORIMETRICO A.O.A.C., Núm. 972.07	10.6
METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS	10.8
ANTRANILATO DE METILO	10.9
METODO GASCROMATOGRAFICO	10.9
METODO FLUORIMETRICO	10.10

Esteres volátiles totales

COMENTARIOS

El nombre de esteres corresponde a la combinación química entre alcoholes y ácidos. El acetato de etilo, que se obtiene por combinación del ácido acético y el alcohol etílico, se presenta en los vinos no alterados en cantidades muy pequeñas, mientras que en los vinos picados, está presente en mayor cantidad. Las infecciones por *Acetobacter* y algunas levaduras salvajes, provocan gran cantidad de acetato de etilo, por lo tanto niveles elevados de este producto, van en detrimento de la calidad.

Los esteres de los ácidos volátiles, son más volátiles que sus ácidos y se caracterizan por su olor, en algunos casos muy agradable. El aroma y bouquet del vino responde, en gran parte, a los esteres volátiles.

La variedad de esteres presentes en el vino, es muy elevada, dependiendo de la procedencia y variedad de la uva. Para citar algunos de ellos, basta con reseñar los esteres etílicos de los ácidos propiónico, isobutírico e isovalérico. Uno de los esteres muy característico, es el antranilato de metilo, que por su aroma muy intenso, condiciona a veces, el tipo de vino.

Las fermentaciones a baja temperatura, así como las buenas prácticas de fermentación (bajos niveles de sulfuroso, levaduras puras, etc.), influyen extraordinariamente en la formación y retención de los

esteres. Unos trabajos de Daudt y Ough¹, confirman que a temperaturas de 12-15 °C se obtiene el óptimo de formación de esterres y su retención en el vino.

La tecnología actual de análisis por cromatografía de gas, en espacio de cabeza, permite tener conocimiento de estos componentes tan importantes que caracterizan a un tipo de vino.

METODO COLORIMETRICO A.O.A.C., Num. 972.07²

Principio del método

Los esterres reaccionan cuantitativamente con la hidroxilamina, en solución alcalina, para formar ácido hidroxámico que, después de la acidificación, forma un complejo coloreado con los iones hierro. La concentración de esterres es proporcional a la absorbancia que tiene lugar en los 525 nm.

Reactivos

ACIDO CLORHIDRICO 4 M. Diluir 333 mL del ácido concentrado a un litro, con agua destilada.

SOLUCION DE CLORURO FERRICO 0.37 M. Disolver 50 gramos de cloruro férrico 6 hidrato, en aproximadamente 400 mL de agua, contenido en un matraz de 500 mL. Añadir 12.5 mL de ácido clorhídrico 4 M y llevar a volumen con agua destilada.

SOLUCION DE CLORHIDRATO DE HIDROXILAMINA 2 M Se colocan en un matraz de 500 mL, 69.6 gramos de clorhidrato de hidroxilamina, se disuelven con agua, y completando el volumen. Conservar en el refrigerador.

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO 3.5 M. Se disuelven 70 gramos de hidróxido sódico, en unos 400 mL de agua, colocada en un matraz aforado de 500 mL. Cuando frío se completa a volumen con agua.

Técnica operativa

1. Debe utilizarse el destilado del vino o mosto, efectuado sin ningún tratamiento del vino.
2. Se colocan en un tubo de 15 mL, 3.00 mL del destilado del vino.
3. Adicionar 2 mL de la solución de clorhidrato de hidroxilamina y también 2 mL de la solución de hidróxido sódico. Tapar con tapón de neopreno o silicona.
4. Agitar y dejar en reposo durante 10 minutos.
5. Transcurrido el tiempo se añaden 2 mL de solución de ácido clorhídrico 4 M y 2 mL de la solución de cloruro férrico.
6. Agitar bien y leer la absorbancia en cubeta de 10 mm de paso de luz, en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 525 nm.
7. Se prepara una solución patrón de stock de acetato de etilo a la concentración de 1 gramo por litro. Se empleará reactivo análisis de la máxima pureza.
8. De la solución anterior se preparan diluciones de forma que tengan concentraciones de: 0, 25, 50, 75 y 100 mg/L.
9. Con las soluciones anteriores se opera como se ha indicado para la muestra del destilado del vino. Con los datos de las absorbancias, se prepara la gráfica correspondiente.

Cálculos

Con la gráfica obtenida con las soluciones patrón, se contrasta el valor de la absorbancia leída por la muestra, y se deduce la concentración de esterres en la muestra, expresados como acetato de etilo por litro de vino.

1. C.E. Daudt y C.S. Ough., *Am. J. Enol. Vitic.*, 24, páginas 130-135, (1973).

2. Official Methods of Analysis, 15 edición (1990).

METODO POR CROMATOGRAFIA DE GAS³ _____

Principio del método

La técnica gascromatográfica, se presta extraordinariamente a la determinación de esteres volátiles. Varios son los tipos de fases estacionarias que se pueden utilizar con buen éxito. Es recomendable el empleo de columnas capilares para lograr los mejores resultados. Se utilizará el detector de ionización de llama.

Técnica operativa

1. Se prepara el cromatógrafo con los siguientes parámetros: Temperatura del horno 100 °C, bloque detector e inyector 150 °C, gas portador nitrógeno a 20 mL/min. Se recomienda el helio para obtener una mayor resolución.
2. Deberá disponerse de una mezcla de los esteres que se desee, que nos servirá como patrón.
3. El patrón interno que se utiliza es el metit-4-pentanol-2.
4. Se prepara el patrón interno con 1 gramo disuelto en una solución de agua y alcohol al 10%.
5. A 50 mL del vino a analizar se añaden 5 mL de la solución anterior.
6. De la mezcla de vino y patrón interno, se inyectan de 2 a 5 microlitros en el cromatógrafo.

Observaciones

- a) Pueden utilizarse fases estacionarias como Carbowax 600, 1540, 4000, 20M, Porapak Q, en diferentes tamaños de mallas.
- b) Uno de los problemas que acostumbra aparecer en este método analítico, es la presencia elevada del etanol, que enmascara mucho el cromatograma. Es muy recomendable, el empleo de la extracción con disolventes que sean poco solubles en el etanol, mediante el empleo del Freon⁵. El líquido de extracción se concencomo es el caso de los Freones.

3. M. Onishi y otros, *Am. J. Enol. Vitic.*, 29, páginas 54-59, (1978).

Antranilato de metilo

COMENTARIOS

Este producto se encuentra como componente odorífero de algunas uvas. Holley y otros, confirman que el antranilato de metilo es el predominante en la variedad de uvas Concord. En general, pequeñas cantidades de éste producto, se halla en los vinos.

METODO GASCROMATOGRAFICO⁴ _____

Principio del método

El antranilato de metilo puede ser extraído del mosto o del vino, mediante el empleo del Freon⁵. El líquido de extracción se concen-

4. R.R. Nelson y otros, *J. Assac. Off Anal. Checo.*, 59, páginas 1387-1389, (1976).

5. Freon es una marca registrada de disolvente fluocarbonado.

tra y se inyecta el volumen previsto, en el cromatógrafo.

Los límites de detección se sitúan en 0.1 mg/L.

Técnica operativa

1. En un extractor líquido-líquido para disolvente más pesado que el agua, se efectúa la extracción
2. El producto de extracción obtenido, se concentra dejando evaporar el disolvente.
3. Se inyecta en el cromatógrafo un volumen de 2 a 5 microlitros, situando un patrón interno en la muestra.
4. Se procede como en cualquier metódica gas cromatográfica o siguiendo los pasos del análisis anterior para los esteres.

METODO FLUORIMETRICO⁶ _____

Principio del método

Es un procedimiento fluorimétrico desarrollado para la determinación del antranilato de metilo en el vino. Este método se basa en el arrastre de vapor del vino y las propiedades fluorescentes del antranilato de metilo. La interferencia del etanol se evita empleando patrones que contengan la misma cantidad de etanol que las muestras de vino. La recuperación del producto es de 99 % y el error standard del método es de 0.044%.

La concentración de antranilato de metilo en las uvas americanas, puede alcanzar hasta los 10 ppm. Normalmente en el zumo se hallan entre 1 y 5 mg/L.

Reactivos

SOLUCION TAMPON DE pH 7.0.

Técnica operativa

1. En un aparato de destilación por arrastre de vapor, se colocan 10.00 mL de la muestra de vino y se destilan recogiendo en un matraz aforado de 50 mL, que contiene 10 mL de solución tampón de pH 7.0.
2. La muestra obtenida tiene una dilución de cinco veces, y por tanto también el alcohol que contiene el vino.
3. Para compensar el efecto del etanol en la fluorescencia del antranilato de metilo, el contenido de alcohol del patrón debe tener la misma concentración que el de la muestra.
4. La solución patrón de stock de 10 mg/L se prepara con 0.0124 g de clorhidrato de antranilato de metilo (punto fusión de 181 °C), disueltos en agua hasta un litro.
5. La solución de trabajo de 1 mg/L, se prepara a partir de 10.00 mL de la solución stock y completada hasta 100 mL con agua.
6. Los patrones de composición similar al destilado tamponado, se preparan diluyendo en matraces aforados de 50 mL, cantidades de 0 a 25 de la solución patrón del párrafo 5), 10 mL de la solución tampón y completar a volumen con agua destilada.
7. El fluorímetro se ajusta a cero con una solución preparada con 40 mL de agua destilada y 10 mL de la solución de pH 7.0.

Observaciones

Analizando vinos que varían poco en su contenido alcohólico no es necesario ajustar exactamente el contenido de alcohol del patrón con el destilado. Por ejemplo vinos que contienen menos de 0.4 mg/L de antranilato de metilo, el contenido de alcohol puede variar de 11 % a 13% (2.2 a 2.6% en el destilado) y la variación en los valores finales obtenidos, de antranilato de metilo, puede ser de ± 0.015 mg/L.

6. J.C Moyer y L.R. Mattick, *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 3, páginas 134-135, (1976).

11. GASES

OXIGENO	11.5
METODO ELECTROMETRICO	11.7
DIOXIDO DE CARBONO	11.8
METODO DE LA CEE referencia	11.9
METODO C.E.E. usual	11.12
METODO HENNIG Y LAY	11.14
METODO RAPIDO vinos tranquilos	11.17

Oxígeno

COMENTARIOS

La presencia de este gas en los vinos es asunto que conviene controlar, pues puede muy bien suceder que, si el contenido es elevado, provoque problemas de estabilidad o cambio de color. En la vida de un vino es ventajoso limitar o prevenir el contacto con el oxígeno. Particularmente en los vinos blancos, es muy importante que la cantidad de oxígeno se mantenga al mínimo durante el envejecimiento.

La necesidad de controlar la presencia del oxígeno en los vinos es importante por lo anteriormente citado. En la elaboración y embotellado del vino, puede haber contacto con el aire y ello provocar problemas. En la actualidad se elabora con gran cuidado, pero a pesar de ello conviene controlar este gas en el vino. Durante el tratamiento de frío es posible que se alcance una cantidad de 12 mg de oxígeno por litro de vino¹.

La afinidad por el oxígeno de la polifenol oxidasa en el mosto está comprobada, y puede ser eliminada por una pequeña cantidad de dióxido de azufre (unos 50 mg/L) en el mosto, cuyo efecto puede durar unas 7 horas. La absorción del oxígeno por el mosto de uva es una función de la variedad de uva².

1. G. Prass y J. Vingo, *Food Technol. Austl.*, 28, 475-477, (1976).

2. B.B. White y C.S. Ough, *Am. J. Enol. Vitic.*, 224, 148-152, (1973).

Es interesante la tabla siguiente³, referente a la concentración de oxígeno en mezclas hidroalcohólicas y vino a 20 °C y 760 mm de presión atmosférica:

Etanol (vol %)	Oxígeno (mg/L)
0	9.2
5	8.5
10	8.3
11.2 (vino)	8.25
15	8.2
20	8.1
20.5 (vino)	7.8

La tabla que sigue se refiere a la concentración de oxígeno en mg/L a 760 mm de presión atmosférica en mezclas hidroalcohólicas y diferentes temperaturas, según Rankine⁴.

Alcohol (% vol)	Temperatura °C						
	0	5	10	15	20	25	30
0	14.6	12.8	11.3	10.15	9.2	8.4	7.7
10	12.6	11.3	10.1	9.2	8.3	7.7	7.2
20	11.7	10.6	9.6	8.9	8.1	7.5	7.1

Los métodos químicos para la determinación del oxígeno se basaban en la capacidad oxidante del vino, después de la eliminación del oxígeno por borboteo de nitrógeno, y se comparaba con la cantidad de sulfito sódico que se requería para reducir la muestra de vino no tratado con nitrógeno. En los vinos tintos interfería el color del indicador, carmín de índigo, y por ello sólo se aplicaba a vinos blancos.

Modernamente se utiliza el electrodo de membrana, debido a Clarke, para la medida del oxígeno disuelto.

3. J.V. Mejane y otros, *Ind. Aliment. Agric.*, 90, 719-727, (1973).

4. B.C. Rankine, *Austl. Grapegrower Winemaker*, 11, 18-19, (1974).

METODO ELECTROMETRICO⁵

Principio del método

Se lee la corriente eléctrica, mediante aparato adecuado, que circula a través de los dos polos del electrodo. Este está constituido por un cátodo de platino u oro, recubierto con una membrana permeable de plástico. Un ánodo de plata está también en el interior del electrodo. Al sistema se aplica un potencial de 0.5 V. El oxígeno pasa a través de la membrana y se reduce. Se mide la corriente que circula.

Técnica operativa

1. Recoger la muestra de vino o mosto, con la mínima aireación posible.
2. Calibrar el electrodo, con aire, para la lectura de 100%, procurando sea la calibración a la misma temperatura que la muestra.
3. Cuidadosamente, transferir la muestra al receptáculo de medición, llenándolo totalmente.
4. Poner en marcha el agitador y esperar a que se alcance un equilibrio y leer el porcentaje de saturación.
5. Se multiplica el valor leído, por la saturación del vino a la misma temperatura que se hace la medición. Esta cifra se halla en la tabla VI.

Observaciones

En el mercado se hallan medidores de oxígeno, que aplican esta técnica del electrodo de Clarke. Las instrucciones de manejo que acompañan a cada aparato, indican la operatoria de cada análisis y su cálculo para hallar la concentración de oxígeno disuelto.

5. M.A. Amerine y C.S. Ough, *John Wiley & Sons* (1980).

Dióxido de carbono

COMENTARIOS

El dióxido de carbono es el gas que existe en mayor proporción en el vino, ya que durante la fermentación se producen grandes volúmenes de este gas que pasa a la atmósfera. El remanente de carbónico en el vino depende de varios factores, pero principalmente del contenido en alcohol y la temperatura del almacenamiento.

También en la fermentación maloláctica, se produce una cantidad apreciable de CO₂. Los niveles de carbónico en los vinos tranquilos dependen mucho de la forma de elaboración de los mismos.

Las técnicas analíticas simples corresponden a efectuar el desprendimiento del gas, en medio ácido, y recogerlo en soluciones alcalinas y determinarlo por acidimetría. Técnicas instrumentales, tales como la cromatografía de gas o la espectrofotometría de infrarrojo, son también utilizadas.

METODO DE LA CEE referencia

Vinos tranquilos hasta 0.5 x 10⁵ Pa.⁶

Principio del método

Al volumen de vino a analizar, se añade, a una temperatura de 0 °C aproximadamente, solución de hidróxido sódico para llevar la muestra a pH entre 10 y 11. Se valora con una solución ácida, en presencia de la enzima anhidrasa carbónica.

El contenido de carbónico, se deduce del volumen de ácido gastado para pasar de pH 8.6 (forma carbonato ácido) a pH 4.0 (forma ácido carbónico). También se efectúa una valoración sobre el mismo vino, previamente desgasificado, lo que permite tener en cuenta la cantidad de hidróxido sódico gastado en la acidez propia del vino.

Reactivos

HIDROXIDO SODICO 0.1 M.

ACIDO SULFURICO 0.05 M.

SOLUCION DE ANHIDRASA CARBONICA a 1 g/L.

Técnica operativa

1. Se deberá disponer de un medidor de pH y un agitador magnético.
2. Enfriar la muestra de vino a una temperatura aproximada de 0 °C, así como también la pipeta de 10 mL que servirá para tomar la muestra.
3. En un vaso de 100 mL se colocan 25 mL de solución de hidróxido sódico 0.1 M.
4. Se adicionan 2 gotas de la solución de enzima y 10.00 mL del vino frío, medido con la pipeta también fría.
5. Se coloca el vaso sobre el agitador magnético, se sumerge el electrodo del medidor y el imán agitador.
6. Se comienza una agitación moderada y se deja que alcance la temperatura ambiente.

⁶. 1 bar = 10⁵ Pascal (Pa).

7. Se vierte lentamente la solución de ácido sulfúrico 0.05 M, hasta alcanzar el pH 8.6.
8. La bureta se vuelve a llenar con ácido, enrasando al cero. Se adiciona de nuevo ácido sulfúrico 0.05 M al vaso, con lentitud, hasta alcanzar el pH 4.0. Este volumen se le asigna como n .
9. A continuación se procede a la eliminación del CO₂ en un volumen de unos 50 mL del vino, por agitación, bajo vacío, y calentando ligeramente (unos 25 °C).
10. Repetir el análisis sobre 10.00 mL del vino desgasificado como se ha indicado anteriormente en el paso 3).
11. El volumen gastado del reactivo se asigna como n' .

Cálculos

Debe tenerse en cuenta que 1 mL de ácido sulfúrico 0.05 M equivale a 4.4 mg de CO₂.

La cantidad de dióxido de carbono en gramos por litro se obtiene de la siguiente fórmula:

$$0.44 (n - n')$$

se expresa con dos decimales.

Observaciones

En el caso de que los vinos a analizar contengan una cantidad de CO₂ inferior a 1 g/L, no es necesaria la adición de la enzima, para catalizar la hidratación del CO₂.

Vinos espumosos en general

Principio del método

La muestra del vino a analizar, se enfría al punto próximo de congelación. Después de retirar un volumen para la decarbonatación, se alcaliniza para fijar la totalidad del CO₂, bajo forma de carbonato sódico. Se valora con ácido en presencia de la anhídrida carbónica.

Se considera, como en el caso anterior, el volumen de solución ácida gastado para reducir el pH de 8.6 a 4.0. Se efectúa un análisis

en las mismas condiciones, sobre la muestra de vino desgasificada, para corregir el volumen de ácido gastado en la neutralización de los ácidos del vino.

Reactivos

SOLUCION DE HIDROXIDO SODICO al 50%.

ACIDO SULFURICO 0.05 M.

SOLUCION DE ENZIMA CARBONICA al 1 g/L.

AGUA DESTILADA HERVIDA.

Técnica operativa

1. Marcar sobre la botella el nivel del líquido en su interior, antes de enfriar.
2. Someter al frío la botella, de forma que se alcance justo al comienzo de la congelación.
3. Deberá tenerse cuidado antes de destapar, que los cristales de hielo, estén totalmente disueltos, ayudándose de una agitación.
4. Rápidamente destapar la botella y retirar con cuidado, mediante una probeta un volumen de 50 mL, que servirá después de análisis testigo.
5. El volumen exacto, separado anteriormente, será determinado cuando se halle a la temperatura ambiente, asignándolo como v .
6. Inmediatamente añadir 20 mL de la solución de hidróxido sódico, para una botella de 750 mL. Se agita.
7. Dejar que el vino alcance la temperatura ambiente.
8. En un vaso de 100 mL, se vierten 30 mL de agua destilada hervida, 2 gotas de la solución de enzima y 10.00 mL del vino alcalinizado.
9. Se coloca el vaso sobre un agitador magnético, se sumerge el electrodo y se somete a una agitación moderada.
10. Se vierte de la bureta el ácido sulfúrico 0.05 M hasta pH 8.6.
11. De nuevo se llena la bureta, se enrasa a cero y se continúa la valoración hasta alcanzar el pH 4.0. El volumen gastado

se asigna como n .

12. Se procede a la desgasificación de los 50 mL del vino que se habían separado al comienzo, como se ha indicado en el análisis anterior.
13. En un vaso de 100 mL, se vierten 30 mL de agua destilada hervida, unas 2-3 gotas de la solución de hidróxido sódico y 10.00 mL del vino desgasificado. (La adición del hidróxido sódico tiene por finalidad llevar a pH 10-11, la solución).
14. Se valora como en el análisis anterior, asignando el volumen gastado como n' .

Cálculos

También, como anteriormente, la equivalencia del ácido sulfúrico 0.05 M es la misma.

Se vacía la botella que contenía el vino objeto de análisis y se mide el volumen inicial del vino, llenando con agua hasta la señal marcada en el exterior de la botella. Es interesante que esta medición sea lo más exacta posible. Este volumen es V mL.

La cantidad de dióxido de carbono en gramos por litro, se calcula por:

$$0.44 (n - n') \times \frac{V - v + 20}{V - v}$$

el resultado se expresa con dos decimales.

METODO C.E.E. usual

Principio del método

Es un método manométrico. Se mide la presión del dióxido de carbono directamente en la botella, por medio de un manómetro. Se mide la presión, después de la estabilización térmica y agitación de la botella.

11.12

Aparato

El aparato que permite medir la presión del interior de las botellas, se denomina afrómetro. Se presenta de diferentes formas, según el tipo de tapón que tenga que perforar.

Particularidades

Los afrómetros pueden ser: mecánicos sistema Bourdon y digitales, con captador piezoeléctrico. En el primer caso el tubo interior del manómetro será de acero inoxidable.

Están graduados en pascals (Pa). Para los vinos espumosos es más interesante la graduación en kilopascals (kPa).

Verificación

Los afrómetros deben contrastarse periódicamente, por lo menos una vez al año. La verificación debe realizarla un laboratorio que disponga de manómetros patrón.

Técnica operativa

1. El tiempo de estabilización de la temperatura de las botellas debe ser, como mínimo, de 24 horas.
2. Perforar el tapón o cápsula, procurando evitar cualquier pérdida de gas.
3. Cuando esté ajustado el afrómetro, agitar fuertemente la botella y leer la presión, cuando la lectura sea constante.

Cálculos

La presión a 20 °C, se expresa en pascals (Pa) o kilopascals (kPa). Cuando la temperatura de medida es diferente de 20 °C, hay que efectuar una corrección, multiplicando la presión medida por un factor que se indica en la tabla VII.

A partir de la presión medida a 20 °C, se puede calcular la presión absoluta, añadiendo al valor hallado, el de la presión atmosférica, expresada en pascals.

La cantidad de dióxido de carbono que contiene un vino, se halla por las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} \text{Litros de CO}_2/\text{ litro} &= 0.987 \times 10^{-5} P_{\text{abs}_{20}} (0.86 - 0.01A) (1 - 0.00144S) \\ \text{Gramos de CO}_2/\text{ litro} &= 1.951 \times 10^{-5} P_{\text{abs}_{20}} (0.86 - 0.01A) (1 - 0.00144S) \end{aligned}$$

11.13

en donde: A es igual al grado alcohólico del vino a 20 °C.
 S es el contenido en azúcares del vino, en g/L.

Observaciones

a) Si el afrómetro está graduado en presión absoluta y en atmósferas, la presión medida se multiplicará por el factor que se indica en la tabla ($P_{a_{20}}/P_{a_i}$).

b) Si el afrómetro está graduado en sobre presión (comienzo del afrómetro en 0 y expresado en atmósferas), será necesario añadir 1 a la medida, antes de hacer la corrección.

c) Las expresiones de la tabla, son utilizables para valores de alcohol comprendidos entre 10 y 14% (v/v) y las concentraciones de azúcares comprendidas entre 0 y 100 g/L. Dado que los vinos no tienen una composición constante, los datos obtenidos presentan un error de 2 a 3%.

METODO HENNIG Y LAY⁷

Principio del método

Se basa en el bloqueo del CO_2 con solución alcalina, para poder muestrear el vino y posterior desprendimiento del dióxido de carbono en medio ácido. El gas se difunde en soluciones alcalinas valoradas y determinación posterior, por acidimetría.

Reactivos

SOLUCION ALCALINA, preparada con hidróxido sódico al 50% en agua destilada.

AGUA OXIGENADA, al 10% (uso farmacéutico).

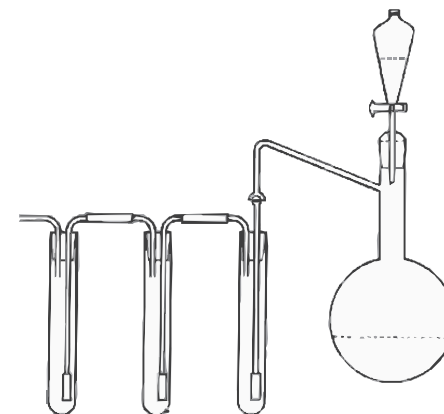
SOLUCION DE CLORURO DE BARIO. Se disuelven 60-65 gramos de cloruro de bario cristalizado, en agua destilada hasta

un litro. Si el líquido tiene reacción ácida, se neutraliza con NaOH 0.5 M, hasta viraje de la fenolftaleína.

ACIDO CLORHIDRICO 0.5 M.

INDICADOR DE FENOLFTALEINA.

ACIDO FOSFORICO, 85%.



Técnica operativa

1. Se deja la botella que contiene el vino o espumoso, sin destapar, en un refrigerador a la temperatura de 0 °C, hasta que el líquido alcance dicha temperatura.
2. Rápidamente se destapa la botella y, con precaución para no perder carbónico, se retiran 50 mL a una probeta graduada e inmediatamente se adicionan a la botella 50 mL de solución de hidróxido sódico, medido dicho volumen con una pipeta.
3. Se tapa la botella, agitando, para conseguir una mezcla homogénea de la solución alcalina añadida.
4. Se deja en reposo, hasta que alcance la ambiente.
5. Todo el contenido de la botella, se vacía en una probeta gra-

⁷ K. Hennig y A. Lay, Weinberg Keller, 9, páginas 202-205, (1962).

duada de un litro, para medir el volumen total.

6. Supuesto que el volumen total medido sea de 710 mL, el volumen de espumoso es la diferencia deducidos los 50 mL de álcali.
7. Con una pipeta se toman 50.00 mL (equivalentes a 46.5 mide muestra) y se vierten en un matraz de 250 mL.
8. A continuación se añaden 2 mL de agua oxigenada, para la eliminación del sulfuroso y, piedra pómez para facilitar el desprendimiento del CO₂.
9. Se monta el matraz de destilación en el aparato descrito en la figura. Los dos primeros borboteadores, contienen cada uno 25 mL de hidróxido sódico 0.5 M y el tercero 10 mL de hidróxido sódico y 10 mL de la solución de cloruro de bario.
10. En el embudo del matraz, se vierten 15 mL de ácido fosfórico y se deja caer lentamente la totalidad, cerrando luego el grifo y poniendo en marcha la trompa de agua para efectuar la succión.
11. Cuando se haya añadido todo el ácido, se calienta lentamente y luego más fuerte, destilando durante media hora.
12. El contenido de los borboteadores, se reúnen en un vaso de precipitados de unos 250 mL, lavándolos con agua destilada, hervida previamente.
13. Se añade al vaso, 50 mL de solución de cloruro de bario y se valora con solución de ácido clorhídrico 0.5 M, empleando indicador de fenolftaleina. Este volumen se asigna como V'.
14. Se toman 60.00 mL de la solución de hidróxido sódico 0.5 M y se añaden 50 mL de solución de cloruro de bario, valorando con ácido clorhídrico 0.5 M, empleando el mismo indicador anterior, y el volumen es anotado y designado como V.

Cálculos

La fórmula para el cálculo del contenido de carbónico, es la siguiente:

$$\text{Co}_2 \text{ en g/L} = \frac{11 \times (V - V')}{a}$$

el denominador a es la cantidad de muestra según se deduce del paso número 6).

Observaciones

a) Debe disponerse de trompa de agua para hacer el vacío; no se recomienda el empleo de bomba mecánica.

b) Es absolutamente necesario cerrar el grifo del embudo después de añadir las últimas gotas de ácido fosfórico, pues en caso contrario entraría aire y los resultados serían dados por exceso.

c) La solución de hidróxido sódico 0.5 M, debe valorarse siempre antes de efectuar el análisis. Se toman 60.00 mL de la solución y se añaden 50 mL de la solución de cloruro de bario, procediéndose a la neutralización con ácido clorhídrico de la misma molaridad. El volumen de este último, es el asignado por V.

METODO RAPIDO vinos tranquilos⁸ _____

Principio del método

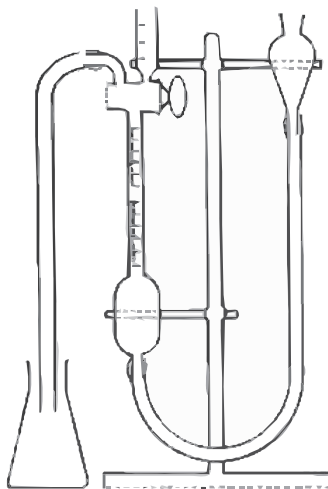
El dióxido de carbono se determina mediante gasometría a presión y temperatura normal. Se vierte una cantidad medida de vino a través del embudo, al tubo de desgasado. El vacío se efectúa por una depresión de mercurio, contenido en el tubo. La lectura del gas se hace directamente en el tubo que está graduado directamente en gramos de CO₂ por litro. El análisis es simple, muy rápido y de una buena precisión.

Aparato

La determinación se verifica en un aparato de vidrio basado en el de Van Slyke, para la determinación del dióxido de carbono en la sangre. Este aparato ha sido modificado para poder medir con gran pre-

8. J.F. Schopper, FV/444 (1973).

cisión⁹. Es optativo, también, un barómetro para poder medir la presión del laboratorio, preferible uno de columna de mercurio, por si se desea mayor precisión.



Técnica operativa

Preparación del aparato

1. El conjunto de vidrio tiene que estar perfectamente limpio y utilizar grasa de silicona en los grifos para mantener bien el vacío.
2. Llenar el aparato de mercurio, evitando cualquier formación de burbujas.
3. Colocar un tubo en el grifo de dos vías, con objeto de recuperar el mercurio. La cantidad total de mercurio necesario es de unos 2 Kg.
4. Es conveniente situar todo el conjunto del aparato sobre una bandeja de plástico, por si sucediera alguna rotura o caída del mercurio, para poderlo recuperar.

9. La firma GAB tiene a disposición tal aparato.

Medida de la cantidad de CO₂

1. La botella con la muestra de vino (con un contenido de CO₂ inferior a 3 g/L), se enfría durante una noche a 0 °C.
2. Destapar lentamente la botella y verter unos mL de vino en el embudo, con el grifo cerrado. El vino no debe desprender burbujas de gas.
3. Con el grifo abierto hacia la salida al exterior y sosteniendo el depósito de mercurio, moverlo de forma que aquel llegue justo al centro del grifo.
4. Girar el grifo hacia donde se halla el vino; aspirar lentamente bajando el depósito de mercurio, hasta recoger aproximadamente 1 mL, se cierra el grifo de forma que pueda eliminarse el vino hacia el exterior. (Esto es un lavado del aparato).
5. De nuevo se aspira 1.00, 2.00 ó 4.00 mL de vino, colocados en el embudo. Se cierra bien el grifo.
6. Se hace descender el depósito de mercurio lo máximo posible. Se crea así un vacío, que hace desprender el CO₂ contenido en el vino. El descenso del mercurio debe alcanzar la ampolla de la parte baja del aparato.
7. Repetir esta operación otra vez.
8. Se equilibran los niveles del mercurio en el interior del tubo y el del depósito. Mantener el depósito fijo.
9. Se mide el volumen de gas que se halla sobre el nivel del vino en el tubo de medida.
10. La lectura en el tubo graduado, indica directamente la concentración en dióxido de carbono.
11. Una vez tomada esta lectura, se limpia el aparato, girando el grifo hacia la salida exterior y subiendo el depósito de mercurio hasta eliminar el vino. El mercurio que pueda salir al exterior, se recupera previo lavado con agua.

Cálculos

La cantidad de muestra de vino colocada en el embudo, será de 1 mL si el CO₂ es mayor que 400 mg/L, 2 mL, si el valor está entre 200 y 400 mg/L y 4 mL si es menor que 200 mg/L.

Los resultados leídos en el tubo, se multiplicarán por 2 en el primer caso y por 1 en el segundo. Si se han empleado 4 mL de muestra, el resultado se divide por 2.

Observaciones

a) Se recomienda efectuar dos veces el análisis con dos muestras del mismo vino.

b) La operación de extracción del gas, mediante el vacío, debe durar 3 minutos antes de leer el volumen final, con el fin de lograr un suficiente equilibrio de la temperatura.

c) El mercurio debe lavarse periódicamente con agua y filtrado a través de un papel de filtro plegado, que tenga unos pequeños orificios.

d) El error máximo hallado por este método, es menor de ± 0.10 g/L.

e) El tubo de medida está graduado en mililitros. 1 mL = 1000 mg de dióxido de carbono por litro.

12. METALES

POTASIO	12.5
METODO O.I.V. Aac8	12.6
ANALISIS VOLUMETRICO Aac8	12.7
FOTOMETRIA DE LLAMA	12.8
ABSORCION ATOMICA	12.10
ELECTRODO ESPECIFICO a)	12.11
ELECTRODO ESPECIFICO b)	12.13
TEST DE BOULTON	12.15
SODIO	12.18
FOTOMETRIA DE LLAMA	12.18
ABSORCION ATOMICA	12.19
CALCIO	12.20
METODOS COLORIMETRICOS	12.20
METODO O.I.V	12.22
METODO VOLUMETRICO	12.24
ABSORCION ATOMICA	12.25
MAGNESIO	12.26
HIERRO	12.27
METODO DEL TIOCIANATO	12.28
METODO FERRE MICHEL	12.29
METODO C.E.E. usual	12.31
METODO ABSORCION ATOMICA	12.33
COBRE	12.35
METODOS COLORIMETRICOS	12.36
METODO DE ABSORCION ATOMICA C.E.E.	12.39
PLATA	12.42
METODO ABSORCION ATOMICA C.E.E.	12.42
OTROS METALES	12.44

Potasio

COMENTARIOS

La cantidad de potasio en el mosto, depende de multitud de variables, como pueden ser: la variedad de uva, suelo, condiciones climáticas, época de recogida y otras más. En cuanto al vino, la mayor o menor concentración de potasio depende, de la temperatura de fermentación y conservación, tiempo, pH, grado alcohólico, agentes filtrantes, etc.

Durante la conservación y envejecimiento, disminuye la cantidad de potasio, por precipitación bajo forma de tartrato ácido de potasio. El conocimiento exacto de la cantidad de potasio en un vino, es de primordial importancia para el bodeguero, con objeto de predecir la estabilidad del mismo, después del embotellado.

Las técnicas analíticas aplicadas, son varias, unas hacen uso de instrumentación y otras son meramente reacciones químicas.

METODO O.I.V. Aac8

Principio del método

Precipitación mediante el tetrafenilborato, lavado y pesado del precipitado. Eventualmente puede ser complementado por un análisis volumétrico, disolviendo el precipitado. La precisión del método es de ± 0.02 g de potasio por litro.

Reactivos

SOLUCION DE TETRAFENILBORATO SODICO. Disolver 3 g del reactivo en la cantidad de agua necesaria para obtener un volumen de 100 mL, añadir algunos centigramos de alúmina neutra y filtrar. Esta solución no se conserva mucho tiempo.

SOLUCION DE VERDE DE BROMOCRESOL, saturada en agua.

ACIDO SULFURICO al 10% en volumen.

HIDROXIDO SODICO 1 M, exenta de potasio.

Técnica operativa

1. En una cápsula de platino o sílice, se evaporan 25.00 mL de vino.
2. Incinerar el residuo a una temperatura de unos 525 °C, no es indispensable que las cenizas resultantes sean del todo blancas.
3. Se toman las cenizas con aproximadamente 20 mL de agua acidificada con 0.5 mL de ácido sulfúrico al 10%.
4. Trasvasar, cuantitativamente a un matraz de 25 mL y enrasar con agua destilada, agitar y filtrar.
5. A 10.00 mL del filtrado, se añade una gota de la solución de verde de bromocresol y una cantidad de hidróxido sódico, exenta de potasio, hasta alcanzar un pH entre 4 y 5 (color verde del indicador).
6. Se coloca en un baño maría a 50 °C y se añaden, agitando continuamente, 5 mL del reactivo de tetrafenilborato. Esta cantidad es suficiente para vinos que contengan un máximo de 1 gramo de potasio por litro. Si el vino tiene una con-

centración mayor, deberá aumentarse el volumen de reactivo.

7. Después de frío, se filtra sobre filtro de vidrio poroso G4.
8. Lavar cápsula y filtro con agua destilada que contenga 2 mL de la solución de tetrafenilborato en 100 mL.
9. Secar en la estufa a 110 °C y pesar. Al peso hallado se asigna como *P*.

Cálculos

La cantidad de potasio contenido en el vino es;

$P \times 279.7$ en miliequivalentes de potasio/L.

$P \times 10.91$ en gramos de potasio/L.

$P \times 52.64$ en g de tartrato ácido de potasio/L.

Observaciones

Conjuntamente con el método anterior, existe una técnica comparativa volumétrica, que se realiza como complemento de esta metodica. Los detalles de su realización se comentan en los siguientes párrafos.

ANALISIS VOLUMETRICO Aac8

Reactivos

NITRATO DE PLATA 0.05 M.

ALUMBRE DE HIERRO AMONICAL al 15%.

ACIDO NITRICO concentrado.

SOLUCION DE TIOCIANATO POTASICO 0.05 M.

Técnica operativa

1. Lavar por tres veces con acetona, el residuo del filtro de la operación anterior, una vez pesado, recogiendo los líquidos en un vaso.
2. Se añaden 20.00 mL de nitrato de plata, 5 mL de alumbre de hierro amoniacal y 1 mL de ácido nítrico.
3. Se valora con tiocianato potásico el exceso de nitrato de plata. El volumen gastado se asigna como *N*.

Cálculos

El cálculo del potasio, se halla según la siguiente fórmula:

5 (20-*N*) en miliequivalentes de potasio/L.

0.195 (20-*N*) en gramos de potasio/L.

0.941 (20-*N*) en g de tartrato ácido de potasio/L.

FOTOMETRIA DE LLAMA¹

Principio del método

Esta es una de las metódicas más usuales, dado que la instrumentación, el fotómetro de llama, es relativamente económico. Con este aparato pueden analizarse, además del potasio, el calcio, sodio y magnesio, empleando los filtros ópticos necesarios. Es un método comparativo frente a soluciones patrón, por tanto, deberá extremarse el cuidado en la preparación de dichas soluciones.

Reactivos

SOLUCION PATRON de 100 mg de K/L. Se prepara disolviendo en un matraz aforado de 1000 mL, 481.3 miligramos de tartrato ácido de potasio, reactivo análisis con 500 mL

1. Método de O.I.V. Aac8.

de agua destilada. Aparte, en 400 mL de agua, se disuelven los siguientes productos:

Alcohol absoluto	10 mL
Acido cítrico	700 mg
Sacarosa	300 mg
Glicerol	1000 mg
Fosfato monosódico	20 mg
Cloruro cálcico seco	10 mg
Cloruro magnésico seco	10 mg

Este volumen se añade al matraz y se completa el volumen a un litro.

SOLUCION DE DILUCION. En un matraz de 1000 mL se disuelven los siguientes productos:

Alcohol 96%	10 mL
Acido cítrico	700 mg
Sacarosa	300 mg
Glicerol	1000 mg
Fosfato monosódico	20 mg
Cloruro cálcico seco	10 mg
Cloruro magnésico seco	10 mg
Acido tartárico	383 mg

completando a volumen con agua destilada.

Técnica operativa

1. Deberá standarizarse el instrumento, empleando la solución patrón con diferentes diluciones.
2. El vino deberá tenerse diluido unas 10 veces, mediante la solución de dilución.
3. Se someterá a diferentes diluciones, tanto el vino como la solución patrón, hasta lograr lecturas comparativas en el fotómetro de llama.

Observaciones

Es una técnica sencilla, pero conviene tener bien calibrado el fotómetro, para poder realizar el trabajo con rapidez. Se seguirán las instrucciones que acompañan el aparato.

ABSORCION ATOMICA²

Principio del método

La metódica de absorción atómica, se fundamenta en el hecho de que en una nube de átomos formada por la introducción en una llama de poder calorífico elevado, al ser atravesada por una radiación específica, parte de esta radiación será absorbida por los átomos del metal.

Al introducir continuamente en una llama potente, una solución de la muestra, la energía de la llama provoca una evaporación y una disociación de las moléculas, dejando los átomos en estado fundamental.

En el caso concreto del potasio, la radiación de la lámpara debe ser de 382.3 nm.

Técnica operativa

1. Se dispondrá del equipo de absorción atómica y la lámpara específica de este elemento.
2. El mechero se alimentará con los gases: aire y acetileno.
3. Las condiciones de trabajo de la lámpara, serán las indicadas en las instrucciones del equipo.
4. A niveles altos de potasio, se efectuará una dilución de 1:100 a 1:250.
5. Se recomienda¹ añadir 10 mL de ácido clorhídrico concentrado, a un matraz de 100 mL, 5.00 mL del vino y agua destilada hasta completar el volumen.
6. De la solución anterior, se efectúan diluciones de 1:20 a 1:50 y se someten al análisis.
7. La concentración de potasio en la muestra, deberá contrastarse con una solución patrón.

2. G.L. Hill y A. Caputi Jr., *Am. J. Enol. Vitic.*, 20, páginas 227-236, (1969).

3. R.G. Olmedo, P. Puertas y otros, *An. Bromatol.* 29, páginas 281-304, (1977).

ELECTRODO ESPECIFICO a)⁴

Principio del método

Desde hace algunos años, que aparecieron los electrodos de ión selectivo, se han ido perfeccionando las técnicas analíticas en esta aplicación. En la actualidad existen electrodos selectivos para aniones y también cationes. Es una de las técnicas más simples y rápidas que existen, al propio tiempo que no precisa de una instrumentación costosa. Tal vez la única dificultad existente, es la corta duración de algunos de los electrodos.

Concretamente en el caso del potasio, su electrodo es muy duradero. Es necesario disponer de un medidor de pH, que en el rango de milivoltios, pueda apreciar perfectamente 1 mV. Puede también realizarse el análisis, con una pequeña cantidad de muestra.

Reactivos

SOLUCION DE SULFATO DE ALUMINIO 0.9 M, preparada con 60 g de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$, disueltos en 80 mL de agua destilada muy caliente, y enrasar a volumen de 100 mL cuando fría.

SOLUCION PATRON DE POTASIO a 10 g/L. Disolver 9.55 g de cloruro potásico puro y seco y enrasar con agua hasta 500 mL.

SOLUCION ELECTROLITICA para electrodo de referencia. Se pipetea 2 mL de la solución de sulfato de aluminio y se diluye a 100 mL con agua destilada.

Técnica operativa

Preparación de los electrodos

1. Se prepara el electrodo de potasio, llenándolo con la solución que se suministra con el electrodo, procurando que no existan burbujas, ni en la membrana ni en el cuerpo del electrodo.

4. Orlon Research, *Series Methods Manual*, (1983).

2. Enroscar la membrana y dejar sumergido el electrodo en 50 mL de la solución patrón de potasio de 2 g/L durante unas dos horas antes de su utilización.

Electrodo de referencia

3. Rellenar la cámara externa del puente salino, marcada con un punto azul, con la solución electrolítica anteriormente preparada.
4. Lavar bien los electrodos con agua destilada.
5. Colocar en un vaso 100 mL de agua destilada, añadir 2 mL de solución de sulfato de aluminio y 1.00 mL de solución patrón de potasio de 10 g/L.
6. Sumergir los electrodos en la solución y agitar, mediante el agitador magnético, a una velocidad suave.
7. Leer en el medidor la lectura de milivoltios, una vez estabilizada, y la anotamos como mV' .
8. A continuación se añaden 10.00 mL de la solución patrón de potasio de 10 g/L.
9. Se leen los milivoltios, después de estabilizado y la asignamos como mV'' .
10. La pendiente del electrodo será $S=mV''-mV'$.
11. Tomar 10.00 mL de vino y diluir hasta 100 mL con agua destilada.
12. Añadir 2 mL de solución de sulfato de aluminio.
13. Lavar los electrodos con abundante cantidad de agua destilada.
14. Sumergir los electrodos en la muestra de vino y leer el potencial, después de estabilizado, asignado como mV''' .
15. Añadir 10.00 mL de solución patrón de potasio de 10 g/L.
16. Leer el potencial, como en anteriores ocasiones, y asignarlo como mV'''' .
17. La diferencia entre este potencial y el leído en el paso 14), es el incremento de potasio.

Observaciones

- a) La estabilización de la lectura no es inmediata, normalmente se logra al cabo de un minuto.
- b) El electrodo de potasio, debe dejarse sumergido en una solución de potasio de 2 g/L, mientras no se utiliza.
- c) Antes de cada determinación, lavar bien los electrodos con abundante agua destilada.
- d) El método proporciona resultados concordantes y repetitivos con una dispersión máxima del 1.8%.
- e) El cálculo de la pendiente, debe realizarse diariamente.

ELECTRODO ESPECIFICO b)⁵ _____

Principio del método

El contenido de potasio de un vino, se determina mediante potenciometría directa, empleando un electrodo selectivo de ión potasio.

Aparato

MicropH Crison modelo 2002.

Electrodo selectivo de potasio.

Electrodo de referencia Ag/AgCl, doble unión líquida y diafragma esmerilado.

Agitador magnético microSTIRRER 2038.

Reactivos

SOLUCION PATRON DE POTASIO 0.01 M. Pesar 1.011 g de nitrato potásico y disolverlo con agua destilada y completar a volumen.

5. CRISON INSTRUMENTS, S.A., *Aplicación Crison SE-6, mayo, (1988).*

SOLUCION PATRON DE POTASIO 10⁻⁴ M. Pipetear 10.00 de la solución anterior en un matraz aforado de 1 litro y enrasar con agua destilada.

SOLUCION DE CLORURO SODICO 5M. Ajustador de fuerza iónica.

SOLUCION DE CLORURO SODICO 0.1 M. Solución interna del electrodo de referencia.

Técnica operativa

1. Es necesario calibrar periódicamente el electrodo. El calibrado se hace en la escala de pX⁶ del micropH 2002.
2. Llenar, si es necesario, el electrodo de referencia con la solución de cloruro sódico 0.1 M. El nivel del electrolito debe mantenerse aproximadamente a 1 cm por debajo del orificio de llenado.
3. El micropH en la escala pX no realiza compensación de temperatura, por tanto es importante que todas las soluciones estén a la misma temperatura, con una diferencia de 1 °C.
4. En un vaso de precipitados, se vierten 50.00 mL del patrón de pX=4 (solución de 10⁻⁴ M) y añadir 2 mL de cloruro sódico 5 M.
5. Se prepara en otro vaso el patrón de pX = 2, con 50.00 mL de la solución patrón de potasio 0.01 M.
6. Una vez conectados los electrodos, seguir las siguientes instrucciones: Pulsar pX y después repetidas veces pX, hasta que aparezca en pantalla «4» (pX=4).
7. Sumergir los electrodos en el patrón pX4, ajustar la velocidad de agitación para que sea intensa y pulsar la tecla con «dibujo de botella».
8. Una vez hecha la lectura, aparecerá en pantalla «3», sugiriendo la utilización del patrón de pX=3. Pulsar de nuevo pX y en pantalla aparecerá «2».

9. Sumergir los electrodos en patrón pX2 (0.01 M) y pulsar de nuevo la tecla de medición.
10. Después de este calibrado, el aparato estará preparado para medir pX. La pendiente obtenida en el calibrado, puede consultarse pulsando la tecla que indica «electrodo» (ver manual instrucciones).
11. En un matraz aforado de 100 mL, se vierten 10.00 mL del vino y se completa a volumen con agua destilada.
12. En un vaso de precipitados, se vierten 50.00 mL del vino diluido y se añaden 2 mL de la solución de cloruro sódico 5 M.
13. Sumergir los electrodos y pulsar pX. El aparato indicará en pantalla el valor de la lectura de potencial considerado como estable.

Cálculos

El aparato micropH 2002, da los resultados en pX. Para transformar estas unidades a g/L de potasio, es necesario realizar el siguiente cálculo: $10 \times 390.98 = g \text{ potasio/L}$.

Observaciones

- a) Los electrodos, antes de sumergirlos en una nueva disolución, deben ser lavados con abundante agua destilada y secados por contacto con un papel suave,
- b) Todas las medidas potenciométricas deben realizarse con la misma velocidad de agitación, la cual debe ser intensa.
- c) Es muy importante que la temperatura de todas las disoluciones, tanto de patrones como de muestras, no difieran más de 1 °C.

TEST DE BOULTON⁷

COMENTARIOS

Es un ensayo analítico muy interesante, ya que presenta un dato

⁷, J. Boulton, *Rev. Oenol. et Tech. Vitiv. et Oenol.*, diciembre, (1984).

6. La escala de pX es muy usada cuando se trabaja con electrodos selectivos. Es una forma de expresar la concentración que se define como: $pX = -\log [X]$ (en este caso $X=K^+$). Así, por ejemplo $[K^+] = 6.3 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, es lo mismo que $pX = 1.201$.

que puede aplicarse con seguridad, para evitar la precipitación del bitartrato potásico en el vino. Puede muy bien ser utilizado, para conocer cuando el tratamiento por frío del vino ha sido suficiente.

Principio del método

En este test, lo que tiene lugar es una precipitación rápida de los cristales de tartrato ácido de potasio, que se hallan sobresaturados en el vino.

La muestra de vino objeto de análisis, se enfría a 0 °C (temperatura considerada como la más fría durante el tiempo de comercialización) y se provoca una precipitación rápida de los cristales, por adición de aproximadamente 10 g/L de tartrato ácido de potasio en polvo (calidad reactivo).

Se sigue la disminución del potasio por un método conductométrico. Cuando la sobresaturación se reduce a cero, ya no hay más precipitación y el valor de la conductividad permanece constante. La muestra tiene en estos momentos, las características de un vino estable, y esta conductividad es la que debe tenerse en cuenta. La medida de la conductividad es muy fácil de realizar.

Aparatos

Conductímetro con compensación de temperatura, si no es así, se necesita además un buen termómetro.

Baño termostático a 0 °C.

Probeta graduada de 100 mL.

Vaso de precipitados de 250 mL.

Un agitador magnético.

Técnica operativa

1. En el vaso de precipitados se vierten 100 mL de la muestra de vino, medidos con la probeta.
2. Se coloca la varilla agitadora y se sitúa en el baño sobre el agitador.
3. Se introduce en el vaso la célula de conductividad y el termómetro, si es necesario, y se inicia la agitación.

4. Si el conductímetro no incorpora compensador de temperatura, observar la temperatura para que esté estabilizada a 0 °C.
5. A continuación se añade un gramo de tartrato ácido de potasio y se lee la conductividad cada dos minutos.
6. Continuar las lecturas, hasta comprobar que por dos o tres veces consecutivas, la conductividad sea la misma.

Observaciones

a) El valor de la conductividad final, será la que corresponde a este vino estabilizado. Este valor se compara con la muestra del tratamiento de frío, para determinar el momento en que se obtiene la estabilidad.

b) La diferencia entre la conductividad antes de la adición del bitartrato y la final, proporciona una medida de la estabilidad potencial respecto al bitartrato. En general, si esta diferencia es inferior al 5% del valor inicial, el vino es estable; si es superior al 5%, el vino es inestable.

Sodio

de agua destilada. Aparte, en 400 mL de agua, se disuelven los siguientes productos:

Alcohol absoluto	10 MI
Acido cítrico	700 mg
Sacarosa	300 mg
Glicerol	1000 mg
Tart. ácido potasio	481.3 mg
Cloruro cálcico seco	10 mg
Cloruro magnésico seco	10 mg
Cloruro de sodio seco	50.84 mg

Este volumen se añade al matraz y se completa el volumen a un litro.

SOLUCION DE DILUCION. En un matraz de 1000 mL se disuelven los siguientes productos:

Alcohol 96%	10 mL
Acido cítrico	700 mg
Sacarosa	300 mg
Glicerol	1000 mg
Tart. ácido potasio	481.3 mg
Cloruro cálcico seco	10 mg
Cloruro magnésico seco	10 mg

completando a volumen con agua destilada.

Observaciones

Técnica fácil y rápida. Seguir las instrucciones indicadas en el manual del aparato.

ABSORCION ATOMICA

Como en el análisis del potasio, considerando que la lámpara a emplear será la correspondiente al sodio. Tampoco serán necesarias diluciones tan elevadas, e inclusive podrá realizarse la introducción de la muestra del vino, directamente al espectrofotómetro (previa filtración).

COMENTARIOS

La cantidad presente de sodio en el vino, es relativamente baja, del orden de 20 a 40 mg/L. Existen limitaciones legales de este elemento, concretando en el caso de España, se permite un máximo de un gramo de cloruro sódico por litro de vino.

Concentraciones mayores pueden ser debidas, al empleo de sales sódicas de algunos productos, tratamiento con resinas de cambio iónico, o también a las bentonitas sódicas.

FOTOMETRIA DE LLAMA

Se repite todo lo referido al potasio, con la excepción de que deberán sustituirse el filtro, las soluciones patrón y las de dilución.

Reactivos

SOLUCION PATRON DE 20 mg de Na/L. Se prepara disolviendo en un matraz aforado de 1000 mL, 481.3 miligramos de tartrato ácido de potasio, reactivo análisis con 500 mL

Calcio

COMENTARIOS

La determinación del calcio es un análisis muy importante, a causa del problema que presenta la precipitación del tartrato cálcico. Esta precipitación tiene lugar muy lentamente y generalmente después de haber embotellado el vino.

El contenido de calcio en el vino, es causado principalmente por las condiciones del suelo, por tratamiento de los mostos con carbonato cálcico, por coadyuvantes de la filtración en forma de tierras, bentonitas, conservación de envases de cemento, etc. También son factores influyentes en la precipitación, la concentración alcohólica, el pH y la temperatura de conservación.

La analítica del calcio es fácil y rápida.

METODOS COLORIMETRICOS

Principio del método

En solución alcalina, el calcio forma un complejo coloreado en violeta, con la o-cresoltaleína-complexona. Los iones magnesio no in-

terfieren en la reacción. No es necesario efectuar tratamiento alguno a la muestra de vino, ni dilución alguna.

Reactivos

Test analítico de la firma Boehringer Mannheim número 204382, para unas 30 a 80 determinaciones. Contiene tres frascos con reactivos: patrón de 80 mg de Ca por litro, tampón pH 10.7 y cromógeno, que tienen una conservación muy duradera.

Técnica operativa

1. Espectrofotómetro a la longitud de onda de 570 nm y cubetas de plástico de 10 mm de paso de luz.
2. Se ajusta el espectrofotómetro frente a un blanco reactivo, preparado con 1 mL de la solución 2 y 1 mL de la solución 3.
3. En una cubeta se prepara el patrón para el análisis con 0.05 mL de la solución patrón, 1 mL de la solución 2 y 1 mL de la solución 3.
4. Se mide la absorbancia y se asigna como A_p .
5. En otra cubeta se colocan 0.05 mL del vino, 1 mL de solución 2 y 1 mL de la solución 3.
6. Se mide la absorbancia asignándola como A .

Cálculos

La concentración de calcio en la muestra de vino se halla con la ayuda de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = 80 \times \frac{A_v}{A_p} \text{ en mg/L}$$

Observaciones

a) Este test es muy sensible, y por ello se recomienda utilizar solamente material de un solo uso.

b) Para análisis de vinos tintos, es necesario realizar un blanco de prueba, con 0.05 mL del vino, 1 mL de la solución 2 y 1 mL de agua destilada. La absorbancia de este blanco, se resta de la absorbancia del análisis de la muestra y esta diferencia es la que se emplea para el cálculo.

c) Se emplea el contenido de los frascos, sin dilución ni tratamiento alguno.

d) Los reactivos son estables conservados a la temperatura ambiente de 15-25 °C. Se recomienda conservar los frascos bien tapados.

METODO O.I.V.

Principio del método

El método que se describe a continuación es el indicado por la OIV8 y se basa en un análisis complexométrico con EDTA. Los compuestos interferentes se eliminan del vino, por paso del mismo a través de una resina cambiadora de iones de base fuerte.

Reactivos

RESINA MERCK III.

ACIDO ACETICO al 30%.

ACIDO ACETICO al 0.5%.

ACIDO CLORHIDRICO 2 M.

SOLUCION HIDROXIDO SODICO al 20 %.

INDICADOR CALCON.

SOLUCION DE EDTA 0.005 M.

Técnica operativa

1. Dejar sumergida 100 g de resina en 200 mL de ácido acético al 30%, al menos 24 horas.
2. Llenar un tubo de vidrio de 10-11 mm de diámetro y 300 mm de longitud, con la resina, teniendo cuidado de que no queden burbujas en la columna.

3. Lavar la resina con ácido acético al 0.5%, por lo menos cuatro veces, con volúmenes de 10-12 mL.
4. Verter en la columna 10.00 mL de vino y dejar fluir el líquido a una velocidad de 1 a 1.5 gotas por segundo, recogiendo en un matraz aforado de 100 mL.
5. Lavar siete veces con 10 mL de agua destilada cada vez y completar al volumen de 100 mL con agua.
6. Tomar 50 mL de esta solución y colocarla en una cápsula de platino.
7. Evaporar el líquido a sequedad a 100 °C e incinerar a la temperatura de 525 °C.
8. Disolver las cenizas en 5 mL de ácido clorhídrico 2 M y pasar cuantitativamente a un erlenmeyer de 200 mL.
9. Añadir 2 mL de solución de hidróxido sódico al 20% y 1 mL de solución de trietanolamina.
10. Valorar con la solución de EDTA 0.005 M, hasta que el color rojo cambie a azul.

Cálculos

La siguiente fórmula nos dará la concentración de calcio en mg por litro de vino:

$$\text{Calcio mg/L} = \frac{V \times M \times 400.8 \times 1000}{V}$$

en donde:

V es el volumen de la solución de EDTA en la valoración.

M es la molaridad del EDTA.

v es el volumen de la muestra de vino.

METODO VOLUMETRICO⁹

Principio del método

Precipitación del calcio bajo forma de oxalato, solubilización de la sal con ácido sulfúrico caliente y valoración volumétrica con permanganato potásico. El método es válido, siempre que haya ausencia de secuestrante.

Reactivos

SOLUCION DE OXALATO AMONICO, saturada.

SOLUCION DE ACIDO OXALICO, saturada.

SOLUCION ANARANJADO DE METILO al 1 %.

ACIDO SULFURICO DILUIDO 1:4 v/v.

SOLUCION DE PERMANGANATO POTASICO 0.02 M.

Técnica operativa

1. Se colocan en un vaso de 250 mL, 50.00 mL de vino, se calientan a baño maría, se añaden 5 mL de la solución de oxalato amónico y ácido oxálico hasta reacción ácida.
2. Se agita y se deja en el baño maría durante unos 30 minutos.
3. Filtrar sobre papel sin pliegues, se lava bien el filtro y el vaso con agua destilada hirviendo, hasta reacción negativa de ácido oxálico en el líquido filtrado.
4. El filtro con el residuo, se coloca en el mismo vaso de precipitados y se disuelve con el ácido sulfúrico diluido y unos 100 mL de agua destilada.
5. Se valora con permanganato potásico 0.02 M, hasta coloración rosa persistente.

Cálculos

Para el cálculo, hay que tener presente la siguiente fórmula:

$$\text{Calcio en g/L} = \text{mL de permanganato} \times 0.002$$

9. P.G. Garoglio, *Enciclop. Vitivinícola Mondiale*, (1973).

ABSORCION ATOMICA¹⁰

Principio del método

Es ésta una metódica comunmente empleada para la determinación del calcio en vinos y mostos. La posible interferencia de los fosfatos es eliminada por la adición de cloruro de lantano a la muestra. El vino a analizar se diluye previamente unas 20 veces. No interfieren el sodio, magnesio, sulfatos, fosfatos, etanol o glucosa.

Reactivos

Espectrofotómetro equipado con lámpara para análisis del calcio. Longitud de onda 422.7 nm. Gases para la llama: aire y acetileno.

SOLUCION DE CLORURO DE LANTANO al 10%, preparada con 26.7 g de cloruro de lantano cristalizado, disueltos en 100 mL de agua.

Técnica operativa

1. Se diluye el vino 20 veces, utilizando la solución de lantano como diluyente.
2. La solución patrón de calcio, también deberá contener lantano en la misma cantidad que la muestra.

Observaciones

Se prepararán patrones de calcio en concentraciones de 0, 2, 5, 8 y 10 mg de calcio por litro, para poder trazar la gráfica standard.

10. J.P. Bonnemaire y otros, *Trav. Soc. Pharm. (Montpellier)*, 31, páginas 245-252, (1971).

Magnesio

COMENTARIOS

Este metal es el tercero en cantidad presente en el vino, después del potasio y calcio. De hecho poca importancia se le ha dado al contenido de éste metal en el vino, aunque puede estar ligado en los fenómenos de precipitación de los tartratos.

El contenido puede estar influenciado por el uso de las tierras filtrantes, depósitos de cemento, el pH y por el tiempo y temperatura del almacenaje. Según A. Corrao y otros", durante la fermentación el contenido de calcio disminuye y la relación entre magnesio/calcio, aumenta considerablemente.

Observaciones

El magnesio puede determinarse por valoración con EDTA, al igual que el calcio. El método más comunmente utilizado es de absorción atómica o también el de fotometría de llama.

11. A. Corrao, A.M. Gattuso y G. Fazis, *Agric. Ital.* 69, 368-381, (1969).

Hierro

COMENTARIOS

El contenido de hierro en el mosto, se elimina en parte, por el metabolismo de las levaduras durante la fermentación. La pérdida puede alcanzar hasta un 70%, dependiendo de la aireación y compuestos polifenólicos presentes.

En la elaboración moderna, el aumento de hierro en el vino es muy reducido, dados los materiales empleados en la misma, así como también en los recipientes de conservación.

Es un metal a tener en consideración por el elaborador, ya que niveles superiores a 8-10 mg/L, puede causar enturbiamientos o cambios de color. La oxidación del vino viene acelerada por la presencia de hierro. Los vinos que se conservan embotellados, tienen la mayor parte del hierro en forma ferrosa. El enturbiamiento de algunos vinos, conocido como «casse blanca», es producida por la precipitación coloidal del fosfato férrico. El ácido cítrico protege la formación de éste último compuesto.

Los métodos analíticos químicos, se basan en la determinación colorimétrica, directa en los vinos blancos, o por extracción del color con algún disolvente, en el caso de vinos tintos. La metódica por absorción atómica es la más exacta y sencilla, pero requiere de instrumental caro.

METODO DEL TIOCIANATO

Principio del método

El hierro se combina con el ión tiocianato, una vez oxidado con agua oxigenada y en medio clorhídrico. Aparece una coloración roja, que se utiliza para comparar con una solución patrón. Si los vinos son blancos, puede apreciarse directamente en el vino; si son tintos será necesario extraer el color con un disolvente, como el éter etílico u otro disolvente: alcohol isoamílico, acetato de etilo o mezcla de ellos.

En el caso de interesar conocer solamente el hierro trivalente (férrico), no se añade el agua oxigenada. Este procedimiento analítico es ampliamente utilizado¹².

Reactivos

SOLUCION PATRON HIERRO de 1 g/L, preparada a partir de un standard ya preparado, Merck o Carlo Erba.

ACIDO CLORHIDRICO 3 M.

AGUA OXIGENADA DE 10 volúmenes.

SOLUCION DE TIOCIANATO POTASICO al 20 %.

DISOLVENTE EXTRACTOR mezcla de alcohol isoamílico y metanol 2:1 (v/v).

Técnica operativa

1. En dos tubos de ensayo, marcados como *A* y *B* se vierten 10.00 mL de vino.
2. También a cada uno de los tubos, se añaden 2 mL de ácido clorhídrico y 1 mL de solución de tiocianato.
3. Al tubo *A* se añaden 5 gotas de agua oxigenada y al tubo *B*, 5 gotas de agua destilada.
4. Mezclar bien y se extrae el color con 10.00 mL de la mezcla disolvente.

12. F. Bermejo, C. Baluja y J.A. Ravina, *Análisis*, 3, 157-163, (1975).

5. La capa disolvente se decanta y se deseca con sulfato sódico anhidro y se filtra.
6. Se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 490 nm.
7. Previamente se habrá preparado una gráfica, preparando soluciones con 1, 2, 5 y 10 mg de hierro por litro, a partir de la solución patrón de 1 g/L.

Cálculos

Las absorbancias de la muestra de vino, se comparan con la gráfica, preparada de antemano. La concentración de hierro obtenida de la absorbancia del tubo *A*, expresa el hierro inorgánico total, mientras que la del tubo *B* es la del hierro al estado férrico.

METODO FERRE MICHEL¹³

Principio del método

El mismo que el método anterior. No hace uso de esta técnica, de espectrofotómetro, por ello no puede exigirse gran precisión, pero es suficiente para valores muy aproximados.

Reactivos

ACIDO CLORHIDRICO al 50%.

SOLUCION TIOCIANATO POTASICO al 5%.

AGUA OXIGENADA 70 volúmenes.

SOLUCION PATRON DE HIERRO de 0.200 g/L.

Técnica operativa

1. Se toma un cuenta gotas que dé 20 gotas por mL.

13. Ferré Michel simplifican la metódica colorimétrica con tiocianato. Técnica clásica muy fácil.

2. En dos tubos de ensayo de 16 x 160 mm, se vierten 1 mL de ácido clorhídrico y 5.00 mL de solución de tiocianato.
3. A uno de los tubos se adicionan 5.00 mL de la muestra de vino. Se agita.
4. Al otro tubo se añaden 5.00 mL de agua destilada y cuatro gotas de agua oxigenada. Se agita.
5. A este último tubo que contiene el agua destilada, se añaden con el cuentagotas, 1, 2, 3, etc. gotas de la solución patrón de hierro, hasta obtener una coloración igual a la del tubo con la muestra de vino.
6. El número de gotas gastadas, multiplicadas por 2, dará el hierro al estado *férrico*, en mg/L.
7. A continuación, al mismo tubo de la muestra, se adicionan 3 gotas de agua oxigenada. La coloración rojiza aumentará, si el vino contiene iones ferrosos.
8. Al tubo que contiene el agua, se añadirán de nuevo, gotas de la solución patrón hasta obtener un color igual al de la muestra.
9. El número de gotas necesarios, multiplicados por 2 representará el hierro al estado *ferroso*.

Observaciones

a) Si el vino a analizar es tinto, se procede de igual forma que en la técnica operativa anterior, pero se añadirán 10 mL de éter para extraer la coloración formada por el tiocianato.

b) La adición del éter tendrá lugar en las operaciones números 3 y 4. Por lo demás la técnica se desarrolla igual, teniendo cuidado al agitar los tubos cuando contienen el éter.

METODO C.E.E. usual

Principio del método

El hierro total, después de la mineralización con agua oxigenada, en presencia de ortofenantrolina, produce una coloración roja, cuya absorbancia se mide en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 508 nm.

Mineralización

Reactivos

AGUA OXIGENADA 100-110 volúmenes, (30%) exenta de hierro.

ACIDO CLORHIDRICO 1 M, exento de hierro.

HIDROXIDO AMONICO CONCENTRADO.

PIEDRA POMEZ lavada y exenta de hierro.

Técnica operativa

1. En un balón Kjeldahl de 100 mL se colocan un poco de piedra pómez, 25.00 mL de vino y 10 mL de agua oxigenada.

2. Se coloca el matraz sobre un baño de arena y se concentra hasta reducir el volumen a unos 2-3 mL.

3. Después de frío, se añaden, gota a gota, 3 a 4 mL de hidróxido amónico. Es importante que las gotas no toquen las paredes del matraz.

4. Es necesario añadir un ligero exceso de amoníaco, para poder precipitar el hidróxido metálico, que se apreciará por el color.

5. La reacción entre el agua oxigenada y el amoníaco, se controlará enfriando con agua o calentando a baño maría.

6. Después de frío, se añade ácido clorhídrico 1 M en cantidad suficiente hasta disolución del precipitado del hidróxido formado.

7. Trasvasar todo a un matraz aforado de 100 mL, lavar bien el Kjeldahl con ácido clorhídrico 1 M y completar a volumen con el mismo ácido.

Dosado espectrofotométrico

Reactivos

SOLUCION DE HIDROQUINONA al 2.5%, en agua acidulada (10 mL de ácido sulfúrico concentrado por litro). Debe conservarse en vidrio topacio en frigorífico y cambiar en cuanto se aprecie un oscurecimiento.

SOLUCION SULFITO SODICO al 20%.

SOLUCION DE ACETATO AMONICO al 20 %.

SOLUCION DE ORTOFENANTROLINA al 0.5%, en alcohol del 96%.

SOLUCION PATRON DE HIERRO de 1 g/L, preparada con un standard Carlo Erba o Merck.

Técnica operativa

1. A dos matraces de 50 mL provistos con tapón esmerilado, se adicionan a cada uno 20.00 mL de la solución de muestra, previamente mineralizada, como se ha indicado anteriormente.
2. A cada matraz, se añaden 2 mL de solución de hidroquinona, 2 mL de la solución de sulfito y 1 mL de solución de ortofenantrolina.
3. Se deja en reposo 15 minutos.
4. Añadir 10 mL de acetato amónico, la coloración de la ortofenantrolina ferrosa, se manifiesta súbitamente.
5. Se completa el volumen a 50 mL con agua destilada.
6. En el espectrofotómetro a 508 nm, se mide la absorbancia con cubeta de 10 mm de paso de luz y se compara con la gráfica obtenida con la solución patrón.
7. Se tendrá en cuenta las diluciones correspondientes de la muestra.

METODO ABSORCION ATOMICA¹⁴

Principio del método

Después de una adecuada dilución del vino y eliminación del alcohol, el hierro se determina directamente por espectrofotometría de absorción atómica.

Reactivos

SOLUCION PATRON DE HIERRO III de 1 g/L. Se emplea un standard del comercio. Puede también prepararse (aunque no recomendable) disolviendo 8.6341 de sulfato férrico y amonio, en agua destilada ligeramente acidulada con ácido clorhídrico 1 M y completando el volumen hasta un litro.

SOLUCION PATRON DE HIERRO de 100 mg/L, por dilución de la anterior.

Técnica operativa

1. Se prepara el aparato con la lámpara de cátodo hueco, para el hierro.
2. Eliminar el alcohol del vino, por concentración a mitad de volumen, en un evaporador rotativo a la temperatura de 50-60°C.
3. Recuperar el volumen inicial con agua destilada.
4. Efectuar, si es necesario, una dilución previa al análisis.
5. En una serie de matraces aforados de 100 mL, colocar: 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 y 5.00 mL de la solución patrón de 100 mg de hierro por litro y completar a volumen con agua destilada. Las soluciones obtenidas contienen respectivamente: 1, 2, 3, 4 y 5 mg de hierro/L. Estas soluciones deben conservarse en frascos de polietileno.

14. C.E.E. método de referencia.

6. Seleccionar la longitud de onda de 248.3 nm. Regular a cero la escala de absorbancias, con agua destilada.

7. Aspirar directamente la muestra preparada, alternando con las soluciones patrón.

Cálculos

Se traza la gráfica de absorbancias de las soluciones patrón. Contratar el valor de la absorbancia de la muestra en la gráfica y de estos valores se deduce la concentración de hierro.

Cobre

COMENTARIOS

En los mostos, la cantidad de cobre es relativamente pequeña, del orden de 0.1 a 0.3 mg/L. Esta cantidad puede ser mayor, debido al tratamiento antimildiú de las viñas. También el contacto en la bodega con bombas o grifos de bronce o latón puede aumentar el contenido de este metal.

Buena parte del cobre presente en el mosto es eliminado durante la fermentación o bien por precipitación en forma de sulfuro o por fijación por las levaduras.

Problemas causados por la presencia de cantidades altas de cobre pueden ser los enturbiamientos, cuando la concentración se sitúa entre 0.2 y 0.4 mg/L y particularmente en ausencia de aire (vinos embotellados).

Las técnicas analíticas clásicas se basan en reacciones colorimétricas: color amarillo (con dietilditiocarbamato) o color rojo (con 2,2-diquinolilo), siendo la metódica más precisa la de absorción atómica.

METODOS COLORIMETRICOS

*Cromógeno: 2,2-diquinolilo*¹⁵

Principio del método

El reactivo de 2,2-diquinolilo forma con el cobre una sal compleja de color rojo. Con el empleo de la hidroxilamina, se reduce el cobre divalente, en condiciones de pH adecuadas. Para ello se utiliza el acetato sódico como tampón.

El color se extrae con alcohol amílico como disolvente y la fase orgánica es la que se utiliza en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 546 nm. Esta reacción es 10 veces más sensible que la producida con el dietilditiocarbamato.

Reactivos

ACETATO SODICO trihidrato.

CLORHIDRATO DE HIDROXILAMINA.

REACTIVO DE 2,2-DIQUINOLILO. Se prepara por disolución de 0.2 gramos del reactivo en un litro de alcohol n-amílico.

SOLUCION PATRON DE COBRE a 5 mg/L, a partir de un standard Carlo Erba o Merck.

Técnica operativa

1. En un tubo de 20 mL provisto con tapón esmerilado, se vierten 5.00 mL del vino.
2. Se introduce, aproximadamente, 0.5 g de cristales de clorhidrato de hidroxilamina y 0.5 g de acetato sódico. No es necesario pesar estos reactivos. Agitar.
3. Se añaden 5.00 mL del reactivo de 2,2-diquinolilo. Tapar y agitar bien durante un minuto.
4. Esperar a que se separe la fase orgánica, que es la que va a emplearse en la medida espectrofotométrica.

¹⁵ M. Boese, *Beckman Rep.*, 2, 13-15, (1973).

5. Es necesario efectuar un ensayo en blanco, en caso de vinos rosados o tintos, de la siguiente forma: 5.00 mL de vino, adición de los mismos reactivos y 5.00 mL de alcohol n-amílico sin el reactivo colorante.
6. Preparar una escala de concentraciones de: 0.20, 0.40, 0.80, 1, 2, 3 y 5 mg de cobre por litro.
7. El espectrofotómetro se coloca en la longitud de onda de 546 nm y se emplean cubetas de 10 mm de paso de luz.

Observaciones

- a) Puede acelerarse la separación de las dos fases líquidas, por centrifugación.
- b) Si la fase coloreada es turbia, se añade una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro.
- c) La coloración roja es estable durante varias horas.

*Cromógeno: ditiocarbamato*¹⁶

Principio del método

El reactivo dietilditiocarbamato sódico reacciona con el cobre, produciendo un complejo de color amarillo, proporcional en intensidad a la cantidad de cobre presente en la muestra.

Para evitar interferencias, debidas a otros cationes, se utiliza la mezcla de ácido clorhídrico y ácido cítrico.

Reactivos

SOLUCION DE DIETILDITIOCARBAMATO SODICO al 1 %, disolver 1 gramo en unos pocos mililitros de etanol y completar a volumen de 100 mL, con agua destilada.

REACTIVO CITRICO-CLORHIDRICO. Disolver 75 g de ácido cítrico en 300 mL de agua destilada, en un matraz aforado de 500 mL. Añadir 50 mL de ácido clorhídrico concentrado y completar a volumen con agua.

¹⁶ M.A. Amerine y M.A. Joslyn, *Table Wines, The Thecnology of their Production*, University of California, Berkley, 1970.

HIDROXIDO AMONICO 5 M.
ACETATO DE AMILO.
METANOL.

Técnica operativa

1. En un tubo de ensayo, se vierten 10.00 mL de vino.
2. Añadir 1 mL de la solución cítrico-clorhídrico y mezclar.
3. A continuación, se vierten 2 mL de amoníaco 5 M y se mezcla.
4. Se vierte 1 mL de la solución de ditiocarbamato y se mezcla bien durante un minuto.
5. Se añade a continuación 10 mL de acetato de amilo y 5 mL de metanol. Mezclar durante 30 segundos.
6. Se deja en reposo hasta que las dos fases se separen.
7. La fase coloreada se trata con sulfato sódico anhidro, para que quede perfectamente transparente, y ésta es la que se emplea en el espectrofotómetro.
8. El aparato debe estar previsto para medir en la longitud de onda de 435 nm, y empleo de cubetas de 10 mm de paso de luz.
9. Se preparará una gráfica a partir de soluciones patrón de cobre.

Cromógeno: ditiocarbamato (método rápido)"

Principio del método

Se fundamenta igualmente en el método anterior, pero se presenta una metodología muy simple de realizar y sin necesidad de espectrofotómetro, para su determinación. Como es de suponer no tiene igual exactitud, pero sí suficiente, para seguir su control.

17. J. García Barceló, *Metodología de Análisis de Vinos y Derivados*, (1976).

Reactivos

HIDROXIDO AMONICO concentrado.

ALCOHOL ISOAMILICO.

SOLUCION DE DIETILDITIOCARBAMATO SODICO, 1 g/L.

SOLUCION PATRON DE COBRE de 5 g/L, preparada a partir de un standard comercial.

Técnica operativa

1. En un tubo de ensayo de 16 x 160 mm, se introducen 10.00 mL de la muestra.
2. Se añade 1 mL de hidróxido amónico y se agita.
3. Seguidamente se vierte en el tubo, 5 mL de alcohol isoamílico y 0.5 mL de la solución cromógena.
4. Se agita suavemente, durante 1 a 2 minutos, evitando en lo posible la formación de emulsión.
5. Se observa el color de la capa superior y se compara a una serie de tubos con solución patrón y tratados de igual forma.
6. La escala de color se prepara con una serie de seis tubos de ensayo, de iguales dimensiones que el de la muestra.
7. A los tubos se añaden: 0, 1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL de la solución patrón de 5 g/L.
8. A los anteriores tubos se añaden: 9.9, 9.8, 9.6, 9.4, 9.2, 9.0 mL de agua destilada.
9. Las concentraciones en cobre de los tubos de la escala son de: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L.

METODO DE ABSORCION ATOMICA C.E.E.

Principio del método

Empleo de la espectrofotometría de absorción atómica.

Reactivos

COBRE METAL.

ACIDO NITRICO concentrado.

ACIDO NITRICO diluido 1/2 (v/v).

SOLUCION DE COBRE 1 g/L. Pesar 1.00 gramo de cobre metal y colocarlo en un matraz aforado de 1 litro. Añadir el ácido nítrico diluido en cantidad estrictamente suficiente para disolver el metal. Añadir 10 mL de ácido nítrico concentrado y completar a volumen con agua destilada. (Se recomienda utilizar un standard comercial).

SOLUCION DE COBRE de 100 mg/L. Tomar 10.00 de la solución anterior y verterlos en un matraz aforado de 100 mL y completar a volumen con agua destilada.

Técnica operativa

1. Tomar 20.00 de la muestra y verterlos en un matraz aforado de 100 mL, completar a volumen con agua destilada.
2. Leer en el espectrofotómetro la absorbancia de la muestra en la longitud de onda de 324.8 nm.
3. Preparar la gráfica patrón, por dilución adecuada del patrón de 100 mg/L, de forma para obtener concentraciones de cobre de 0.5, 1 y 2 mg/L.
4. Con los valores de las absorbancias de las diluciones anteriores, confeccionar la gráfica.

Observaciones

a) Las soluciones para confeccionar la gráfica, así como la dilución de la muestra, deben escogerse en función de la sensibilidad del aparato con que se está trabajando.

b) Para una serie de determinaciones, es necesario controlar, por lo menos, un punto de la gráfica, pasando una solución patrón por el aparato.

c) En el caso de bajas concentraciones de cobre en la muestra, deberá efectuarse una concentración, como se indica: Colocar en una cápsula de platino 100.00 mL de la muestra, evaporar a sequedad a 100 °C hasta consistencia siruposa. Añadir gota a gota 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, procurando cubrir todo el fondo de la cápsula. Proceder a la incineración, con precaución. Colocar la cápsula en un horno a 500 °C ± 25 °C y dejarlo durante una hora. Después de frío, humedecer las cenizas con 1 mL de ácido nítrico concentrado, evaporar e incinerar de nuevo en el horno durante 15 minutos. Repetir tres veces esta operación. Recoger las cenizas con 1 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de agua destilada. Pasarlo cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL y completar con agua destilada.

Plata

COMENTARIOS

Los mostos o vinos que han sido tratados con el método «Catadin», pueden contener iones plata. Variables son las cantidades de plata que naturalmente contienen los vinos. Según Siegmund¹⁸ los vinos alemanes analizados tienen un promedio de 29 microgramos por litro, los extremos hallados son: 0.7 y 270 microgramos/L.

ABSORCION ATOMICA C.E.E. _____

Principio del método

Empleo de la espectrofotometría por absorción atómica, precedida por la mineralización de la muestra.

18. H. Siegmund y K. Bächmann, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 164, páginas 1-7 (1977).

Reactivos

NITRATO DE PLATA.

ACIDO NITRICO concentrado.

ACIDO NITRICO diluido 1/10 (V/V).

SOLUCION DE PLATA de 1 g/L. Preparada disolviendo 1.5750 g de nitrato de plata, con ácido nítrico diluido, en un matraz aforado de 1 litro. Se completa a volumen con el mismo ácido.

SOLUCION DE PLATA de 10 mg/L, por dilución de 10.00 mL de la solución anterior a 1000 mL de ácido nítrico diluido.

Técnica operativa

1. Colocar 20.00 mL de la muestra en una cápsula de platino y evaporar a sequedad sobre baño maría hirviente a la temperatura de 100 °C
2. Incinerar al horno a 500-525 °C.
3. Tomar las cenizas con 1 mL de ácido nítrico concentrado, evaporar al baño maría a 100 °C y repetir esta operación otra vez.
4. Añadir a la cápsula 5 mL de ácido nítrico diluido y calentar ligeramente hasta disolución.
5. Cuando frío efectuar la medida de absorbancia en el espectrofotómetro de absorción atómica a la longitud de onda de 328.1 nm, en llama de aire-acetileno.
6. Se prepara la gráfica con las soluciones patrón, debidamente diluidas a partir del patrón de 10 mg de plata por litro. Las soluciones contendrán 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0 1.0y2.0
7. Llevar la absorbancia leída de la muestra a la gráfica y anotar la concentración en mg/L.
8. El contenido de plata en el vino se expresará en miligramos por litro. Deberán figurar dos decimales.

Observaciones

Las soluciones patrón para el trazado de la gráfica, la cantidad de la muestra empleada y el volumen final del líquido, se modificarán en función de la sensibilidad del aparato empleado.

Otros metales

COMENTARIOS

Además de los metales que se han citado anteriormente, son también objeto de control, metales como: plomo, plata, mercurio, cinc, etc. Casi todos ellos son analizados por método de absorción atómica, debido a la sensibilidad del proceso analítico, habida cuenta que estos metales se hallan en cantidades muy pequeñas en el vino o mosto. Remitimos a los interesados, a consultar la bibliografía correspondiente.