



El vino y su análisis

Departamento de Nutrición y Bromatología II
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

AUTORES

M^a Dolores Tenorio Sanz (Coordinadora)

Inmaculada Mateos-Aparicio Cediel

Jose Manuel de Prádena Lobón

Mercedes García Mata

María Luisa Pérez Rodríguez

Araceli Redondo Cuenca

M^a José Villanueva Suárez

M^a Aurora Zapata Revilla

Subvencionado por el Proyecto de innovación Educativa y mejora de la calidad docente UCM:
“Herramientas online de aprendizaje y autoevaluación en el ámbito del control de calidad de los alimentos”. Convocatoria 2014.

ÍNDICE

Introducción	3
Importancia del vino y su análisis.....	3
Procedimientos Normalizados en la analítica del vino	4
1. pH.....	5
Interés de la determinación	5
PNT de pH	7
2. Acidez Total.....	15
Interés de la determinación	15
Procedimiento normalizado de Trabajo (PNT).....	17
3. Acidez Volátil	27
Interés de la determinación	27
Procedimiento normalizado de Trabajo (PNT).....	29
4. Grado alcohólico.....	41
Interés de la determinación	41
Procedimiento normalizado de Trabajo (PNT).....	43
5. Anhídrido sulfuroso	53
Interés de la determinación	53
Procedimiento normalizado de Trabajo (PNT).....	55
6. Índice de Folin-ciocalteu.....	63
Interés de la determinación	63
Procedimiento normalizado de Trabajo (PNT).....	65

Importancia del vino y su análisis

El sector vitivinícola es uno de los más importantes en la agricultura mundial, ascendiendo la producción mundial de vino en 2014 (excluyendo zumos y mostos) a 271 millones de Hl. Europa es el primer productor de vino, y encabezan la lista países como Francia, Italia y España.



Aurand, J.M. (2014). *State of World Vitiviniculture situation*. 37º Congreso Mundial de la Viña y el Vino.

El sector vitivinícola español es muy relevante, tanto por el valor económico que genera, como por la población que ocupa y por el papel que desempeña en la conservación del medioambiente. La situación geográfica, las diferencias climáticas y edáficas, hacen de nuestro país un lugar privilegiado para la producción de vinos de características muy diversas.

Aunque históricamente los vinos iban destinados a satisfacer en mayor medida la demanda de vinos a granel y vinos de mesa, en la actualidad España produce vinos de calidad y cuenta con 85 zonas de producción de vinos con Denominación de Origen Protegida (DOP), las cuales siguiendo el modelo europeo de producción, mantienen un estricto control sobre la cantidad producida, las prácticas enológicas, y la calidad de los vinos que se producen en cada zona.

El sector vitivinícola español se encuentra inmerso en un importante proceso de actualización y renovación. En este contexto es interesante resaltar la actividad y la innovación de muchas bodegas que experimentan con nuevas variedades de uva y la utilización de las uvas autóctonas, así como con nuevas tecnologías para producir vinos más adaptados al gusto del consumidor. Todos estos cambios conllevan la necesidad de un análisis y control de calidad acorde a las exigencias del mercado actual.

Procedimientos normalizados de trabajo en la analítica del vino

Los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) forman parte de la estructura documental de cualquier sistema de aseguramiento de la calidad, es el documento de uso del técnico u operador. Los PNT son la herramienta que permite asegurar que un análisis se realice, primero: de acuerdo a las normas o métodos oficiales que les sirven de referencia; segundo: asegura la adecuación de los mismos a las características particulares del laboratorio, (equipamiento, tamaño, personal...) y tercero, y tal vez lo más importante, va a permitir repetir el análisis idéntica e indefinidamente, es decir se van a minimizar las variaciones que se producen a lo largo del tiempo o en condiciones variables, recogiendo documentalmente toda la información necesaria para permitir reconstruir el análisis en caso de necesidad.

Todo esto se consigue asegurándonos que durante la redacción inicial, las referencias documentales están actualizadas, los métodos y normas se revisan y una vez revisada la anterior ya no es un método de referencia. Nos aseguraremos que con la información escrita un operado con una formación inicial pueda realizar el análisis sin detenciones o dudas, y que preguntas como las siguientes sean contestadas

- ¿Qué hacemos?: Finalidad del PNT
- ¿Cómo se hace? Fundamento del método del PNT
- ¿Cuándo se hace? Cronología de los trabajos a realizar en su orden adecuado
- ¿Con Qué se hace? Equipamiento y reactivos necesarios, indicando precisión de equipos y purezas mínimas de reactivos
- ¿Quién lo hace? Nivel laboral precisa para la realización de las distintas actividades del PNT
- ¿Cómo se manejan los resultados? Criterios de aceptación o rechazo de un resultado dado, niveles de imprecisión (incertidumbres)

Una vez el documento en funcionamiento no debemos olvidar la necesidad de las revisiones periódicas que obligatoriamente se han de hacer. El PNT es un documento en un ciclo constante de optimización: describe lo que hay que hacer y si algo no es posible hay que modificar el documento para que sea realizable, sin desvirtuar la finalidad del análisis. Hay que seguir el axioma de los sistemas de calidad “Escribir lo que hay que hacer, cumplirlo fielmente y registrar sus resultados“

Los laboratorios de control de vino están ligados a bodegas o cooperativas, generalmente pequeñas o medianas empresas, que no pueden o les es muy costoso implantar todo estos sistemas documentales o sistemas de calidad, por ello se plantea la necesidad de dotarles de documentos de inicio, PNT que cumplan los requisitos anteriormente indicados, dejándoles tan sólo el trabajo de adecuación a sus características, tarea que sólo puede hacerse desde el conocimiento de cada organización.

Esta es una de las ideas que impulsa la realización de este e-book, la de trasladar información desde el ámbito docente -investigador hacia la empresa vitivinícola, facilitando su trabajo. Otro de los fines es cubrir la necesidad que tiene el estudiante de conocer, al menos en sus primeros estadios, los sistemas de trabajo que se va a encontrar en la industria alimentaria.

EL PNT es tal vez el documento desde el punto de vista formativo en el seno de un laboratorio más agradecido, el neófito puede estudiar antes de entrar en el trabajo manual todo el proceso, aunque no es necesaria la memorización del mismo, su conocimiento en profundidad acelera y optimiza los resultados de la formación precisa para el desarrollo de su actividad.

De terminación del pH en vinos

Interés de la determinación

La acidez es una característica de los vinos, es un atributo, ya que de su nivel, depende gran parte el equilibrio gustativo. El nivel de acidez de cada vino, depende de dos parámetros, la llamada acidez fija debida a los ácidos orgánicos presentes en la uva, el tartárico, el málico y el cítrico, y por otro a la llamada acidez volátil originada durante la vinificación, donde se forman cantidades limitadas de ácido acético, y en la fermentación maloláctica que transforma el ácido málico en ácido láctico, mejorando la sensación gustativa.

La acidez se puede expresar en forma de concentración de los ácidos presentes, tartárico (acidez total) o acético (acidez volátil) o en forma de pH.

El pH en los vinos varía entre 3 a 4, el de un vino blanco se encuentra aproximadamente entre 3,0-3,3, mientras que el de un vino tinto entre 3,3 y 3,6.

El concepto el pH

El pH (*pondus hydrogenii* peso de hidrógeno) es el cologaritmo de la actividad (concentración) de iones hidrógeno: $\text{pH} = -\log_{10} a_{\text{H}^+}$

Su medida se realiza por potenciometría, mediante un pHmetro que es un voltímetro de alta impedancia que mide la diferencia de potencial en mV (voltaje) generada entre el interior del electrodo de pH y el electrodo de referencia que está en contacto con la muestra analizada.

Este voltaje es transformado en unidades de pH siguiendo la ecuación de NERST

$$E = E_0 + \frac{2.3RT}{NF} \cdot \log A_H$$

Donde:

E: Potencial medido

E_0 : Potencial del electrodo de referencia

R: constante de los gases

T: Temperatura absoluta

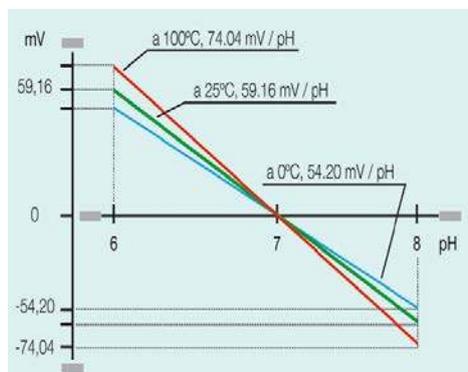
N: Valencia del ion a medir ($\text{H}^+=1$)

F= Constante de Faraday (96484,5561 C/mol)

De terminación del pH en vinos

Sustituyendo $S = 2.3RT/NF$, la ecuación queda:

$$E = E_0 - S \cdot pH$$



Ecuación de una recta de pendiente negativa donde el Potencial es la variable dependiente (Y) y el pH la variable independiente (X), siendo S la pendiente de la recta. Según la ecuación de Nerst, la pendiente teórica a 25°C es 59,16 mv /unidad pH.

Pero esta pendiente varía con la temperatura según la siguiente tabla, por lo que en la determinación del pH es necesario medir la temperatura para su corrección.

Calibración

El pHmetro se calibrará cada jornada de trabajo. En la calibración se van a utilizar dos soluciones tampón de pH 7,00 y 4,00 o 10,00 según rango previsto de medida, en nuestro caso se utilizará siempre 4,00.

En la medida a pH 7 obtendremos la comprobación del punto isopotencial del electrodo (voltaje = $\pm 20\text{mV}$), en caso afirmativo el equipo nos pedirá el segundo patrón.

Con el tampón de 4,00 obtendremos la curva de calibrado. En función de la temperatura la pendiente de ésta debe coincidir con la tabulada (pendiente de Nerst), en caso contrario rechazará la calibración y habrá que repetir (el valor de voltaje teórico será aproximadamente de 177mv).

En algunos equipos nos indica el porcentaje de correlación entre la pendiente teórica y la práctica, consideraremos que por encima del 90% ésta es correcta.



**DEPARTAMENTO DE
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA**

PROCEDIMIENTO PE/BR/01

DETERMINACIÓN DE pH DEL VINO

Edición: 1 Rev. 0

REV.	FECHA	HOJA/S	CAUSAS DEL CAMBIO

<u>Realizado</u> <u>Fecha</u> <u>Firma</u>	<u>Aprobado</u> <u>Fecha</u> <u>Firma</u>
---	--

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL pH EN VINO	PE/BR/01
		Rev 0.
		Página 2 de 6

ÍNDICE

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS
4. GENERAL
5. DESCRIPCIÓN
 - 5.1 EQUIPOS Y MATERIALES
 - 5.2 OPERACIONES PREVIAS
 - 5.3 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS
6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS
 - 6.1 CÁLCULOS DE RESULTADO y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
7. ANEXOS

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL pH EN VINO	PE/BR/01
		Rev 0.
		Página 3 de 6

1. OBJETO

El fin de este procedimiento es la medida potenciométrica del pH de vino.

2. ALCANCE

El procedimiento es válido para todo los tipos de vinos en un intervalo de temperatura ambiental entre 10- 45°C.

3. REFERENCIAS

- PC-BR-01:- Procedimiento General de elaboración de Procedimientos del Laboratorio de Bromatología.
- DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. Reglamento (CEE) N° 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. 121-122 (1990).
- Manual de uso del pHmetro Crisón 2000.

4. GENERAL

La determinación del pH en el mosto y el vino es una medida complementaria de la acidez total. La estabilidad de un vino, la fermentación maloláctica, el sabor ácido, el color, el potencial REDOX y la relación de dióxido de azufre libre y total están estrechamente relacionados con el pH del vino.

5. DESCRIPCIÓN

5.1 Equipos y Materiales

- pHmetro *Crisón 2000* (sensibilidad $\pm 0,01$ U. de pH)
- Electrodo de Ag/ AgCl
- Termómetro calibrado de 0-50 °C, con sensibilidad $\pm 0,5$ °C (sustituible por sonda temperatura pHmetro)

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL pH EN VINO	PE/BR/01
		Rev 0.
		Página 4 de 6

- Vaso de precipitado de 100 ml
- Vaso de precipitado de 250 ml
- Agitador magnético con imán
- Solución patrón (tampón) pH 7,00±0,02 (20°C)
- Solución patrón (tampón) pH 4,00±0,02 (20°C)
- Solución Potasio Cloruro 3 Molar
- Agua destilada
- Paño limpio y seco

5.2 Operaciones Previas

Los patrones guardados en frigorífico, han de ser recientes, por lo que se verificará la fecha de apertura del envase, en caso de ser superior a 1 mes, se desecha y se utiliza uno nuevo.

Para la realización de la medida y de su calibración previa, los patrones y las muestras se dejarán un mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente para asegurar que están a la misma temperatura.

5.3 Realización análisis

5.3.1 Calibración

El pHmetro se calibrará cada jornada de trabajo. En la calibración se van a utilizar soluciones tampón de pH 7,00 y 4,00.

Encender el pHmetro. Pasado este tiempo veremos en la Pantalla

0000 20.0 (pH / temperatura)

Pulsar el símbolo del termómetro para ajustar manualmente la temperatura medida con el termómetro en los líquidos (pulsando la parte superior sube la temperatura y la inferior la

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL pH EN VINO	PE/BR/01
		Rev 0.
		Página 5 de 6

baja). El electrodo de pH suele estar combinado con un termómetro en la misma pieza por lo que no será siempre necesario este ajuste.

En un vaso de precipitado de 100 ml se añade un volumen suficiente de tampón para asegurar que la altura del mismo implica la inmersión del electrodo hasta cubrir el diafragma.

Se añade un imán y se conecta el agitador magnético a una velocidad baja (que no genere saltos del imán). Al electrodo se le retira el tapón de goma de su lateral, lavar el electrodo con agua destilada, secarlo y sumergirlo en la solución 7,02 (siempre debe ser ésta la primera).

Agitar suavemente y pulsar el símbolo de la botella y del pH. La luz de pH parpadeará, (está comprobando el punto isopotencial del electrodo) en caso afirmativo el equipo nos pedirá el segundo patrón se fijará la luz y aparezca en la pantalla.

4 25,0

Lavar el electrodo con agua destilada y secadlo. Una vez seco introducirlo en la solución 4,00, agitar y volver a pulsar el botón con el símbolo de la botella. La luz de pH parpadeará, esperar hasta que se fije y en la pantalla aparezca el

4,0 25,0

5.3.2 Medida de la muestra

Una vez calibrado se puede realizar la medida del pH sumergiendo el electrodo en el vino, siguiendo las indicaciones anteriores, dejar durante unos 15 s. Repetir la medida dos veces y anotar los resultados en la hoja de toma de datos H01-01

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL pH EN VINO	PE/BR/01
		Rev 0.
		Página 6 de 6

Recordar siempre que entre lectura y lectura se lava el electrodo con agua destilada sobre un vaso de precipitado de 250 ml y se seca con paño de celulosa.

Una vez terminada la lectura, tras su limpieza, se colocará el tapón del electrodo y se dejará sumergido en una solución de NaCl 3M o en solución tampón pH 7,00.

6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

6.1 Cálculos de resultado y criterios de aceptación

La lectura de pH es directa y se expresa con dos decimales. El valor obtenido será la media de las lecturas. El criterio de aceptación de las lecturas será que su diferencia sea menor a 0,1 unidades de pH. En caso de discordancia repetir hasta valores aceptables

$$\text{Valor final} = (\text{medida}_1 + \text{medida}_2) / 2$$

HOJA DE TOMA DE DATOS: MEDIDA pH

(PNT/BR/01)

Operador	Fecha:
-----------------	---------------

calibración Tª medición : °C

Tampones utilizados pH :7,02 fecha apertura : (menor a 1 5 días)
 pH: fecha apertura :

Pto isotencial Correcto
 Pendiente Correcto

Lecturas

Muestra	Tª °C	pH 1º	pH 2º	pH 3º	media (Sólo si dif <0,1)

Equipos empleados

Observaciones e incidencias

De terminación de la acidez total en vinos

Introducción

Las uvas contienen cantidades significativas de ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos mayoritarios en el mosto son tartárico, málico y cítrico. De estos tres, los ácidos tartárico y málico representan alrededor del 90% de los constituyentes ácidos del zumo (Amerine and Joslyn 1950). Durante la maduración, el contenido de tartrato y malato de la fruta desciende. Esto se acompaña por un ligero incremento en el pH. Debido a la variación en la capacidad tampón, no hay una relación directa entre la acidez titulable y el pH. En general, sin embargo, mayores niveles de acidez en la fruta se asocian a menudo con menores valores de pH y viceversa. Por tanto, los ácidos de la fruta tienen una influencia significativa sobre el pH. También juegan un papel importante en el sabor, color y estabilidad microbiana del zumo.

Los ácidos orgánicos del vino derivan principalmente de las uvas. Sin embargo, muchos otros ácidos se forman durante la fermentación. Los principales ácidos producidos durante y después de la fermentación alcohólica son acético, láctico y succínico.

Un buen conocimiento de la composición de ácidos orgánicos del mosto es muy importante para el vinatero por las siguientes razones:

1. Para determinar el momento de la vendimia
2. Para decidir el tipo de vino
3. Para determinar el tratamiento del mosto previo a la fermentación
4. Para monitorizar la estabilidad de un vino (p.e. ¿se está produciendo una fermentación maloláctica cuando no se desea?)
5. Para cumplir con la reglamentación. Las regulaciones dictan unos niveles mínimos de acidez de 0,5% en vinos de mesa si el mosto o el vino se mejora. La mayoría de los vinos producidos comercialmente contienen niveles de acidez en el rango de 0,6 a 0,9 %

El contenido de acidez del mosto se determina mediante la valoración de una muestra (un determinado volumen) con una base como solución de hidróxido sódico hasta un punto final indicado por fenolftaleína o, alternativamente, hasta un pH de 8,2. La acidez titulable se expresa como gramos de ácido tartárico por 100 ml.



**DEPARTAMENTO DE
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA**

PROCEDIMIENTO PE/BR/02

DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL DEL VINO

Edición: 1 Rev. 0

REV.	FECHA	HOJA/S	CAUSAS DEL CAMBIO

<u>Realizado</u> <u>Fecha</u> <u>Firma</u>	<u>Aprobado</u> <u>Fecha</u> <u>Firma</u>
---	--

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL EN VINO	PE/BR/02
		Edición 1- Rev. 0.
		Página 2 de 7

ÍNDICE

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS
4. GENERAL
 - 4.1. Definición
 - 4.2. Principio del método
5. DESCRIPCIÓN
 - 5.1. MATERIALES Y REACTIVOS
 - 5.1.1. Materiales
 - 5.1.2. Reactivos
 - 5.2. OPERACIONES PREVIAS
 - 5.2.1. Preparación de la muestra: eliminación del dióxido de carbono en el vino
 - 5.2.2. Eliminación del dióxido de carbono del agua destilada
 - 5.2.3. Calibración del pHmetro (sólo si se sigue el apartado 5.3.2).
 - 5.3. REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS
 - 5.3.1. Valoración con determinación del punto final con azul de bromotimol
 - 5.3.2. Valoración con determinación del punto final con pHmetro
 - 5.3.3. Criterios de aceptación de los resultados analíticos
6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS
 - 6.1. Cálculo de la Media
 - 6.2. Cálculo de acidez total para el vino
7. ANEXOS

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL EN VINO	PE/BR/02
		Edición 1- Rev. 0.
		Página 3 de 7

1. OBJETO

El fin de este procedimiento es la medida de la acidez total en cualquier tipo de vino.

2. ALCANCE

El procedimiento es válido para todos los tipos de vinos con valores de acidez hasta 10g ácido tartárico/litro.

En caso de valores mayores diluir en la proporción necesaria hasta valores incluidos en el alcance.

3. REFERENCIAS

- PC-BR-01: Procedimiento General de elaboración de Procedimientos del Laboratorio de Bromatología
- DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. Reglamento (CE) nº 1234/2007 del Consejo
- PNT/BR/01. Procedimiento determinación potenciométrica del pH en vinos
- Manual de uso el pHmetro

4. GENERAL

4.1. Definición

La acidez total es la suma de los ácidos orgánicos valorables cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución alcalina valorada. El dióxido de carbono no se incluye en la acidez total.

4.2. Principio del método

Valoración volumétrica ácido base midiendo el final de la valoración con un indicador (azul de bromotimol), mediante comparación con un patrón de coloración o mediante la lectura con un pHmetro hasta $\text{pH} = 7,00 \pm 0,5$



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL EN VINO

PE/BR/02

Edición 1- Rev. 0.

Página 4 de 7

5. DESCRIPCIÓN

5.1. MATERIALES Y REACTIVOS

5.1.2 Materiales

- Sistema desgasificación a vacío: Trompa de vacío conectada a Matraz Kitasato de 500 ml
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 1000 ml
- Bureta 50 ml resol 0,1 ml
- Pipetas aforadas de 10 ml, 50 ml
- Balanza analítica resolución 0,005 g
- Pipetas graduadas de 2 ml
- Cronometro minuterero
- Probeta 50, y 100 ml
- Matraz aforado de 500, 1000ml
- Cápsula de porcelana de 250 ml
- Embudos pesasustancias, varilla de vidrio
- pHmetro resolución 0.01 unidades de pH
- Agitador magnético e imán válido para un vaso de precipitados de 100ml

5.1.2. Reactivos

- Solución amortiguadora de pH 7,02 y 4,00
- Solución 0,1M de hidróxido sódico (NaOH)
- Solución de azul de bromotimol de 4g/l

La preparación de los reactivos se describe en el *anexo 1*

5.2. OPERACIONES PREVIAS

5.2.1 Preparación de la muestra: eliminación del dióxido de carbono en el vino

Tomar 50 ± 1 ml de vino, y verter lo en matraz Kitasato de 500 ml agitar y, al mismo tiempo, hacer el vacío abriendo el grifo de la trompa de agua. La agitación y el vacío deben durar de 1 a 2 minutos.



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL EN VINO

PE/BR/02

Edición 1- Rev. 0.

Página 5 de 7

5.2.2 Eliminación del dióxido de carbono del agua destilada:

En un vaso de precipitado de 100 ml hervir 100 ± 5 ml de agua destilada y dejar enfriar hasta temperatura ambiente antes de su uso.

5.2.3. Calibración del pHmetro (sólo si se sigue el apartado 5.3.2).

Seguir lo descrito en el apartado (5.2 y 5.3) del procedimiento PNT/BR/01 determinación potenciométrica del pH en vinos

5.3 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS

5.3.1. Valoración con determinación del punto final con azul de bromotimol

5.3.1.1 Ensayo previo: obtención del patrón de color

Seleccionar un capsula de porcelana de 250 ml verter 25 ± 1 ml del agua destilada anterior hervida, $1 \pm 0,1$ ml de solución de azul de bromotimol $10 \pm 0,1$ ml, de vino, de muestra sin dióxido de carbono (ver 5.2.1). Con la ayuda de una bureta añadir gota a gota, la solución 0,1M de hidróxido sódico hasta obtener una coloración verde-azulada.

A continuación incorporar 5 ± 1 ml de la solución amortiguadora de pH 7, la muestra cambia de color, ese color, obtenido es al que debemos llegar (igualar) en la valoración.

5.3.1.2 Valoración del vino

Seleccionar un capsula de porcelana de 250ml verter 25 ± 1 ml del agua destilada anterior hervida, $1 \pm 0,1$ ml de solución de azul de bromotimol, $10 \pm 0,1$ ml, de vino, de muestra sin dióxido de carbono (5.2.1). Con la ayuda de una bureta añadir gota a gota, la solución 0,1M de hidróxido sódico hasta obtener una coloración semejante a la del patrón de color (5.3.1.1)

Anotar en la hoja de toma de datos formato HD 02-01 el volumen gastado (n ml).

Repetir la valoración el volumen gastado (n' ml).



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL EN VINO

PE/BR/02

Edición 1- Rev. 0.

Página 6 de 7

5.3.2. Valoración con determinación del punto final con pHmetro

En un vaso de precipitado de 100 ml verter 25 ± 1 ml del agua destilada anterior hervida, $10 \pm 0,1$ ml, de vino, de muestra sin dióxido de carbono (ver 5.2.1). Colocarlo en el agitador magnético e introducir el imán. Colocar ahora el electrodo del pHmetro ya calibrado y comenzar a medir (seguir lo descrito en el manual de uso del equipo), poner en marcha la agitación a una velocidad baja (que no genere turbulencias asegurándose que el imán no choca con el electrodo y que su zona de lectura (bola terminal) está totalmente cubierta por el líquido).

Con la ayuda de una bureta añadir gota a gota, la solución 0,1M de hidróxido sódico, comprobando como el valor de pH va aumentando terminar la valoración cuando el mismo se encuentre en $7 \pm 0,5$.

Anotar en la hoja de toma de datos HD 02-01 el volumen gastado (n ml).

Repetir la valoración el volumen gastado (n' ml).

5.3.3 Criterios de aceptación datos analíticos

Los valores se consideran aceptables si la diferencia entre los mismo es inferior a 0,2 ml, de no será sí repetir un tercera vez y utilizar hasta que dos valores que cumplan este criterio.

Calcular la media que se utilizará para los cálculos (el número de cifras significativas serán iguales a la de n y n')

6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

a. Cálculo de la Media

$$(M) \text{ ml} = (n + n') / 2$$

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL EN VINO	PE/BR/02
		Edición 1- Rev. 0.
		Página 7 de 7

b. Cálculo de acidez total para el vino :

Expresada en miliequivalentes por litro, será: $AT \text{ mEq/litro} = 10 \cdot M$

Los resultados se mostraran con 1 decimal

Expresada en gramos de ácido tartárico por litro, $AT \text{ mg ac. tartárico/litro} = 0,075 \cdot M$

Los resultados se mostrarán con 3 decimales.

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos

Anexo 1

Preparación de reactivos

Solución amortiguadora de pH 7,0

En un vaso de precipitado de 1000ml pesar $107,3 \pm 0,05$ g de fosfato monopotásico, añadir 500 ± 5 ml de una solución comercial 1M de hidróxido sódico disolver, con la ayuda de una varilla de vidrio hasta que los líquidos queden transparentes y verter con ayuda de un embudo a un matraz aforado de 1000 ml, lavar el vaso y la varilla con agua destilada y verter el contenido en el matraz, finalmente enrasar el matraz con agua destilada.

Solución 0,1 M de hidróxido sódico

Tomar $50 \pm 0,2$ ml de una solución comercial de sosa 1N verter sobre un matraz aforado de 500 ml y completar con aguas destilada hasta enrase. Agitar 2-3 veces para homogeneizar la solución.

Solución de azul de bromotimol de 4g/l

Pesar un embudo pesa sustancias $4 \pm 0,05$ g de azul de bromotimol, verter el contenido en un matraz aforado de 1000 ml. Lavar el embudo con 200 ± 2 ml de alcohol etílico y verterlo al matraz. Agitar el matraz tapado hasta disolución total del colorante, añadir 200 ± 2 ml de agua recién destilada fría, mezclar hasta uniformidad y añadir 7 ± 1 ml de una solución comercial 1M NaOH hasta coloración verde-azulada. Una vez obtenida enrasar con agua destilada y agitar hasta uniformidad.

HOJA DE TOMA DE DATOS: ACIDEZ TOTAL

(PNT/BR/02)

Operador	Fecha:
<input type="checkbox"/> Azul bromotimol → Patrón color <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> pHmetro * → Calibración <input type="checkbox"/>	

Muestra :

Tiempo desgasificado: _____ min

Gastos

valoración	ml	pH*	Dif. [0,2]	ml · factor	Resultado ml
1ª					
2ª					
3ª					
4ª					

factor de la
NaOH:

Cálculos

media ml (Σ resultados / 2)

Acidez Total

mEq/litro :		(10 • media)
mg ac tartárico/litro :		(0,075 • media)

Equipos empleados

Observaciones e incidencias

De terminación de la acidez volátil en vinos

Interés de la determinación

Los ácidos presentes en el vino presentan dos orígenes, primario que serían aquellos ácidos que proporciona el mosto (zumo de la uva) y, secundario, aquellos que aparecen tras la fermentación. Los ácidos presentes en el mosto de uva son principalmente el málico y el tartárico, y los ácidos que presenta el vino tras la fermentación son el succínico, láctico, acético, etc.

Por otro lado, el vino contiene en disolución diferentes gases como oxígeno, nitrógeno, anhídrido carbónico y anhídrido sulfuroso. Este último, el anhídrido sulfuroso y sus derivados los sulfitos se utilizan como conservantes en el vino, lo que aumenta la presencia de estas sustancias, que también pueden acidificar el medio. Estos gases se pueden eliminar por ebullición, aunque no es tan sencillo con el anhídrido sulfuroso, que además de libre está combinado. Esta combinación puede ser inestable con azúcares, ácidos y antocianos o estable por unión al acetaldehído.

La acidez total recoge todas las acideces del vino, es decir tiene en cuenta todos estos ácidos, sin embargo la acidez volátil está constituida por los ácidos grasos de cadena corta pertenecientes a la serie acética (acético, fórmico, propiónico y butírico) en estado libre o en forma de sal, formados durante la fermentación por *Saccharomyces cerevisiae* o como consecuencia de fermentaciones bacterianas (*Lactobacillus*). Los ácidos láctico y succínico, el ácido carbónico y el anhídrido sulfuroso libre y combinado se excluyen de esta determinación.

La determinación de la acidez volátil se realiza por el método de Jaulmes. Este método se basa en la separación de los ácidos volátiles por destilación fraccionada y arrastre con vapor de agua y rectificación de los vapores (destilación fraccionada). La técnica de arrastre con vapor de agua se utiliza para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles de otras no volátiles. Las sustancias no miscibles entre sí siguen la Ley de Dalton sobre presiones parciales (*Anexo 2*). Como resultado de este comportamiento, cuando uno de los componentes es agua, se puede separar un componente de punto de ebullición mayor que el agua a una temperatura inferior a 100°C a presión atmosférica.

De terminación de la acidez volátil en vinos

Previo a la destilación, se acidifica el vino con unos cristales de ácido tartárico, con lo cual logramos una mayor proporción de ácidos volátiles libres.

Se deben tomar las precauciones necesarias para evitar la presencia del gas carbónico en el destilado, ya que este acidificaría el medio.

El indicador empleado es la fenolftaleína. La acidez del anhídrido sulfuroso libre y combinado destilado, no debe estar comprendida en la acidez volátil y debe restarse su equivalencia de la acidez del destilado, así como el ácido sórbico eventualmente presente.

La acidez volátil se expresa en g de ácido acético/litro de vino.



**DEPARTAMENTO DE
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA**

PROCEDIMIENTO PE/BR/03

DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ VOLATIL DEL VINO

Edición: 1 Rev. 0

REV.	FECHA	HOJA/S	CAUSAS DEL CAMBIO

Realizado

Fecha

Firma

Aprobado

Fecha

Firma



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ VOLATIL EN VINO

PE/BR/03

Rev 0.

Página 2 de 7

ÍNDICE

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS
4. GENERAL
 - 4.1. Definición
 - 4.2. Principio del método
5. DESCRIPCIÓN
 - 5.1. Materiales y reactivos
 - 5.1.1. Equipos y materiales
 - 5.1.2. Reactivos
 - 5.2. Operaciones previas
 - 5.2.1. Validación borboteador
 - 5.3. Realización del análisis
 - 5.3.1. Preparación de la muestra
 - 5.3.2. Arrastre por vapor de agua
 - 5.3.3. Valoración
6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS
 - 6.1. Cálculo de la Media
 - 6.2. Cálculo de acidez total para el vino:
7. ANEXOS



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ VOLATIL EN VINO

PE/BR/03

Rev 0.

Página 3 de 7

1. OBJETO

El fin de este procedimiento es la medida de la acidez volátil de un vino previo arrastre, de los ácidos volátiles, por vapor de agua.

2. ALCANCE

El procedimiento es válido para todos los tipos de vinos. Se ha de trabajar en un intervalo de temperatura ambiental entre 10- 45°C

3. REFERENCIAS

- PC-BR-01: Procedimiento General de elaboración de Procedimientos del Laboratorio de Bromatología
- Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos. Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Ed. 2015
- Manual de uso del equipo de arrastre por vapor de agua

4. GENERAL

4.1. Definición

La acidez volátil se define como el conjunto de ácidos grasos de cadena corta (acético, fórmico, propiónico y butírico) que se encuentran en el vino.

4.2. Principio del método

Este método se basa en la separación de los ácidos volátiles por arrastre con vapor de agua. Antes del arrastre se acidifica el vino con unos cristales de ácido tartárico, con lo cual logramos una mayor proporción de ácidos volátiles libres. El indicador empleado es la fenolftaleína. La acidez del anhídrido sulfuroso libre y combinado destilado, no debe estar comprendida en la acidez volátil



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ VOLATIL EN VINO

PE/BR/03

Rev 0.

Página 4 de 7

5. DESCRIPCIÓN

5.1. MATERIALES Y REACTIVOS

5.1.1. Equipos y Materiales

- Equipo de arrastre de vapor de agua (*Anexo 1*):
 - Un generador de vapor de agua
 - Un borboteador
 - Una columna rectificadora
 - Un refrigerante
- Matracas erlenmeyer de 250 ml y 500 ml
- Matraz aforado de 250 ml
- Pipetas aforadas de 20 ml
- Bureta de 50 ml, precisión 0,05 ml
- Soporte para bureta
- Espátula

5.1.2. Reactivos

- Ácido tartárico cristalizado ($C_4H_6O_6$)
- Solución N/10 de hidróxido sódico (NaOH)
- Solución de fenolftaleína
- Ácido clorhídrico concentrado 36,5-38%
- Solución N/100 de yodo (I_2)
- Yoduro potásico cristalizado (KI)
- Engrudo de almidón
- Solución saturada de borato sódico (bórax)
- Solución de hidróxido sódico 0,1 M (*)
- Solución de ácido acético 0,1 M (*)
- Solución 1M de ácido láctico (*)

La preparación de los reactivos se describe en el *Anexo 2*.

(*): Sólo se utilizan en la fase de valoración del borboteador



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ VOLATIL EN VINO

PE/BR/03

Rev 0.

Página 7 de 7

5.2. OPERACIONES PREVIAS

5.2.1 Validación del borboteador

El aparato de arrastre por vapor de agua debe responder a los tres ensayos siguientes:

1º) Determinación de la ausencia de dióxido de carbono en el vapor de agua

Poner en el borboteador 20 ± 1 ml de agua hervida; ponerlo en funcionamiento según indica las instrucciones del aparato. Recoger $250 \pm 0,15$ ml de destilado y añadirles $0,1 \pm 0,001$ ml de solución de hidróxido sódico 0,1M factorizada y 2 gotas de la solución de fenolftaleína; la coloración rosa debe permanecer estable al menos 10 segundos.

2º) Determinación de la capacidad de arrastre de ácidos volátiles (ácido acético arrastrado $\geq 99,5$ %)

Poner en el borboteador $20 \pm 0,03$ ml de solución de ácido acético 0,1M factorizada. Recoger $250 \pm 0,15$ ml de destilado. Valorar con la solución 0,1M de hidróxido sódico factorizada. El volumen empleado por su factor debe ser al menos igual a 19,9 ml.

3º) Determinación de la capacidad de arrastre de ácidos no volátiles (ácido láctico destilado $\leq 0,5$ %)

Poner en el borboteador $20 \pm 0,03$ ml de solución 1M de ácido láctico factorizada. Recoger $250 \pm 0,15$ ml de destilado y valorar su acidez con una solución 0,1M de hidróxido sódico factorizada. El volumen empleado por su factor debe ser inferior o igual a 1ml

Todo aparato o técnica que satisfaga estos tres ensayos constituye un aparato apto para la determinación.

5.3. REALIZACIÓN ANÁLISIS

5.3.1. Preparación de la muestra

Tomar 50 ± 1 ml de vino, y verterlo en matraz Kitasato de 500 ml agitar y, al mismo tiempo, hacer el vacío abriendo el grifo de la trompa de agua. La agitación y el vacío deben durar de 1 a 2 minutos.



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ VOLÁTIL EN VINO

PE/BR/03

Rev 0.

Página 7 de 7

5.3.2. Arrastre por vapor de agua

Disponer $20 \pm 0,03$ ml de vino desprovisto de dióxido de carbono (5.3.1) sobre un matraz aforado de 250 ml. Añadir aproximadamente una punta de espátula de ácido tartárico. Llevarlo al borboteador (*Anexo 1*) y recoger, al menos, 250 ml de destilado.

Repetir el proceso al menos una vez más.

5.3.2. Valoración

La determinación de la acidez volátil del vino se lleva a cabo realizando tres valoraciones:

5.3.2.1. Primera valoración

Disponer todo el destilado recogido en 5.3.2 en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y añadir dos gotas de solución de fenoltaleína. Valorar el destilado, gota a gota en bureta, con la solución N/10 de hidróxido sódico factorizado.

Anotar en la hoja de toma de datos formato HD 03-01 el volumen gastado (V ml)

Repetir la valoración el volumen gastado será (V' ml).

5.3.2.2. Segunda valoración

Continuar la valoración sobre el Erlenmeyer anterior (5.3.2.1) añadiendo 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, 2-3 gotas de engrudo de almidón y una punta de espátula de yoduro potásico. Valorar el dióxido de azufre libre con la solución N/100 de yodo factorizada.

Anotar en la hoja de toma de datos formato HD 03-01 el volumen gastado (V1 ml).

Repetir la valoración el volumen gastado (V1' ml).

5.3.2.3. Tercera valoración

Añadir 20 ± 1 ml de solución saturada de borato sódico. Valorar con la solución N/100 de yodo el dióxido de azufre combinado.

Anotar en la hoja de toma de datos formato HD 03-01 el volumen gastado (V2 ml).

Repetir la valoración el volumen gastado (V2' ml).



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ VOLATIL EN VINO

PE/BR/03

Rev 0.

Página 7 de 7

Las reacciones de estas valoraciones se encuentran en *Anexo 3*.

6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

6.1. Cálculo de las medias

$$(M) \text{ ml} = (V + V') / 2$$

$$(M) \text{ ml} = (V1 + V1') / 2$$

$$(M) \text{ ml} = (V2 + V2') / 2$$

6.2. Cálculo acidez volátil

$$(V \times f) - (V1/10 + V2/20) \times f'$$

1 equivalente NaOH = 1 equivalente CH₃COOH

Expresar en g acético/ 1 Litro vino

$$\frac{[(V \times f) - \left(\frac{V1}{10} + \frac{V2}{20}\right) \times f'] \times \left(\frac{P_{\text{Macético}}}{10}\right)}{1000} = g \text{ acético}$$

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos

Anexo 2.

Apéndice 1-Instrucciones de uso del borboteador

Apéndice 2-Figuras

Anexo 3. Reacciones

Anexo 1

Preparación de reactivos

Solución de hidróxido sódico N/10

Tomar $50 \pm 0,1$ ml de una solución comercial de sosa 1N verter sobre un matraz aforado de 500 ml y completar con agua destilada hasta enrase. Agitar 2-3 veces para homogeneizar la solución.

Solución de fenolftaleína 1%

Pesar en un vaso de precipitado de 250 ml, $1 \pm 0,05$ g del producto comercial y añadir $100 \pm 0,5$ ml de alcohol neutro de 96 % vol. Disolver hasta homogeneidad

Engrudo de almidón

Pesar en un vaso de precipitado de 1000ml, $5 \pm 0,1$ g de almidón añadir $500 \pm 0,5$ ml de agua y deslíelos. Llevar a ebullición agitando y mantener hirviendo durante $10 \pm 0,5$ minutos; añadir 200 ± 1 g de cloruro sódico. Una vez frío, volcar en matraz aforado de $1000 \pm 0,3$ ml y completar con agua destilada hasta enrase. Agitar 2-3 veces para homogeneizar la solución

Solución saturada de borato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)

Pesar en un vaso de precipitado de 2000 ml, $55 \pm 0,0$ g de borato sódico y añadir 1000 ± 5 ml de agua a 20°C . Agitar hasta su disolución. Es previsible la no completa solución de todo el sólido.

Anexo 2

Apéndice 1-Instrucciones de uso del borboteador (ver apéndice 2)

- 1- Comprobar que el bidón (10 l) al lado del aparato tiene siempre agua. Si no fuera así se debe rellenar con agua destilada y añadir 5 ± 1 g NaCl
- 2- Enchufar
- 3- Abrir el grifo del agua
- 4- Encender (apretar botón POWER)
- 5- Colocar un tubo con agua destilada en el borboteador apretando el soporte inferior hacia abajo
- 6- Colocar un matraz Erlenmeyer o vaso de precipitados en el colector
- 7- Encender botón MANUAL
- 8- Esperar 5 minutos mientras el agua destilada del tubo (5) borbotea
- 9- Apagar botón MANUAL
- 10- Preparar tubo con la muestra y colocar como se indica en el punto 4
- 11- Poner un matraz de aforo 250ml en el colector
- 12- Encender MANUAL
- 13- Cuando se haya recogido el volumen deseado apagar MANUAL
- 14- Cuando se haya terminado de destilar las muestras repetir paso 4-6
- 15- Esperar 10 minutos
- 16- Apagar POWER
- 17- Cerrar grifo de agua
- 18- Desenchufar
- 19- Abrir la puerta de atrás del aparato y abrir una llavecita negra para vaciar el agua caliente.
Cuando no salga agua cerrar la llavecita negra y la puerta del aparato

Apéndice 2. Figuras

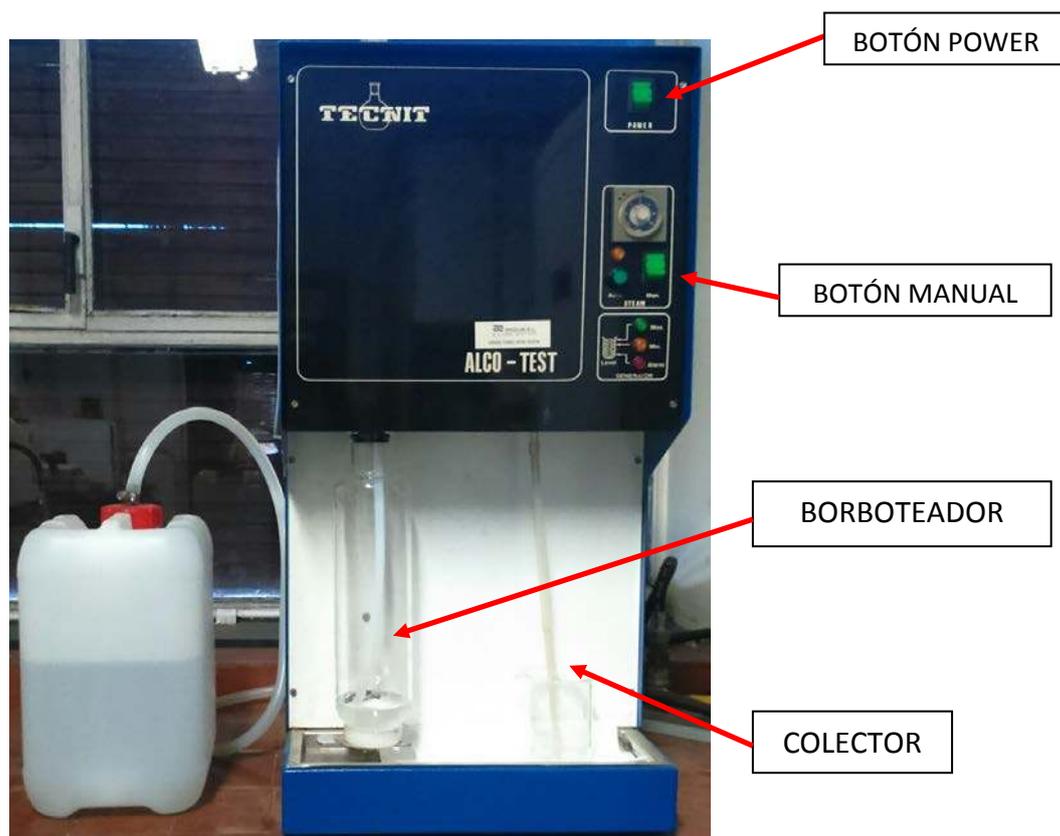
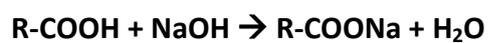


Figura 1. Imagen del equipo de arrastre por vapor de agua

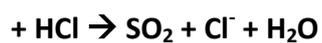
Anexo 3

Reacciones

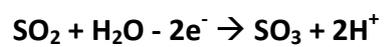
Primera valoración:



Segunda valoración:



Tercera valoración:



Operador:	Fecha:
<u>Método empleado</u>	<input type="checkbox"/> Acidez volátil → <input type="checkbox"/> Validación borboteador

Validación borboteador

Operaciones	factor	Resultado ml	Estado
Ausencia CO ₂			
Capacidad arrastre ácidos volátiles			
Capacidad arrastre ácidos no volátiles			

Muestra :

1ª valoración	ml	Dif. [< 0,2]	factor	Resultado ml
1				
2				
3				
2ª valoración	ml	Dif. [< 0,2]	factor	Resultado ml
1				
2				
3				
3ª valoración	ml	Dif. [< 0,2]	factor	Resultado ml
1				
2				
3				

Cálculos

Media ml (Σ resultados/2)

Acidez Volátil

g ácidoacético/litro	
	(0,075 • media)

Equipos empleados

Observaciones e incidencias

De terminación grado alcohólico en vinos

Interés de la determinación

Cuando hablamos del alcohol nos referimos al alcohol etílico o etanol. La presencia de alcohol en una bebida es el aspecto diferencial, por ello hablamos de bebidas alcohólicas.

El mosto o zumo de uva contiene cantidades variables de azúcares. La uva contiene entre un 15 a un 25% de glucosa y fructosa. En las uvas maduras estos azúcares se encuentran casi en la misma proporción aunque siempre hay un poco más de fructosa que de glucosa, siendo la relación glucosa/fructosa aproximadamente de 0,95.

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras y pertenecientes al género *Saccharomyces*. Se produce de forma espontánea o conducida por las levaduras seleccionadas. Durante el proceso de fermentación los azúcares (glucosa o fructosa) contenidos en el mosto o zumo de uvas se transforman por la acción de las levaduras en alcohol etílico (etanol) y anhídrido carbónico. Además de estas dos sustancias, se producen otras minoritarias pero que tienen gran trascendencia en las posteriores características del vino, aromas y gustos de origen fermentativo. La fermentación hace que la relación glucosa/fructosa disminuya siendo al final la relación en torno a 0,3.

Para que la fermentación alcohólica se realice en buenas condiciones es preciso mantener un control sobre la temperatura. Las levaduras alcanzan su mayor grado de desarrollo en torno a los 20°C, mientras que por debajo de 13 o 14°C el inicio de la fermentación es prácticamente imposible y por encima de 32-35°C las levaduras cesan en su actividad, provocando paradas de la fermentación. Una temperatura elevada acelera la fermentación, pero el grado alcohólico del vino obtenido será menor. Por contra, una fermentación a baja temperatura culminará con vinos con mayor concentración alcohólica.

La proporción de alcohol de una bebida, para un volumen dado de la misma, se denomina grado alcohólico. La graduación de los vinos varía entre un 7 y un 16% de alcohol por volumen, aunque la mayoría de los vinos embotellados oscilan entre 10 y 14 grados. Los vinos dulces tienen entre un 15

De terminación grado alcohólico en vinos

y 22% de alcohol por volumen.

Tipos de bebidas alcohólicas: Éstas pueden ser bebidas fermentadas y bebidas destiladas.

- La bebida fermentada procede de un fruto o de un grano (uva, manzana, cebada) que, por la acción de levaduras, ha sufrido una fermentación alcohólica. Durante ese proceso, la mayor parte de los azúcares se transforman en alcohol.
- A las bebidas que han sufrido fermentación alcohólica y, posteriormente, son sometidas a un proceso de destilación, se las conoce como bebidas destiladas (brandy, whisky, ron, ginebra y licores en general) que tienen mayor contenido en alcohol que las bebidas fermentadas.



DEPARTAMENTO DE
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA

PROCEDIMIENTO PE/BR/04

DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHOLICO DEL
VINO

Edición: 1 Rev. 0

REV.	FECHA	HOJA/S	CAUSAS DEL CAMBIO

Realizado

Fecha

Firma

Aprobado

Fecha

Firma



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHOLICO EN VINO

PE/BR/04

Rev 0.

Página 2 de 6

ÍNDICE

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS
4. GENERAL
 - 4.1. Definición
 - 4.2. Principio del método
5. DESCRIPCIÓN
 - 5.1. MATERIALES Y REACTIVOS
 - 5.1.1. Equipo y materiales
 - 5.1.2. Reactivos
 - 5.2. OPERACIONES PREVIAS
 - 5.2.1. Montaje del aparato de destilación
 - 5.3. REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS
6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS
 - 6.1. CÁLCULOS DE RESULTADO y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
7. ANEXOS



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHOLICO EN VINO

PE/BR/04

Rev 0.

Página 3 de 6

1. OBJETO

El objetivo de este procedimiento es la determinación el contenido de etanol en una bebida alcohólica (grado alcohólico).

2. ALCANCE

El procedimiento es válido para vinos con grado alcohólico $\leq 25\%$.

3. REFERENCIAS

- PC-BR-01: Procedimiento General de elaboración de Procedimientos del Laboratorio de Bromatología
- Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos. Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Ed. 2015

4. GENERAL

4.1. Definición

Se denomina grado alcohólico (GA), al número de litros de alcohol etílico contenidos en cien litros de vino, medidos ambos volúmenes a una temperatura de $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Se expresa en grados alcohólicos volumétricos (%).

4.2. Principio del método

El método se desarrolla mediante una destilación simple. En dicho proceso separamos una mezcla líquida en sus componentes, mediante un proceso de evaporación, seguido de condensación. Se basa en el hecho de que el vapor obtenido al calentar la mezcla es más rico en el componente más volátil (el que tiene punto de ebullición más bajo).

El método se desarrolla en dos etapas. En la primera se lleva a cabo una destilación simple del vino, previamente alcalinizado, y posteriormente se pesará la masa volumétrica del destilado por picnometría a temperatura ambiente.

La diferencia entre el peso de un volumen de destilado con el de un volumen exactamente



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHOLICO EN VINO

PE/BR/04

Rev 0.

Página 4 de 6

igual de agua destilada permite conocer la medida de la densidad del destilado por picnómetro. La relación entre ambos pesos da el peso específico del destilado, que a través de las tablas de Windish se relaciona con el contenido alcohólico del mismo (expresado en %).

5. DESCRIPCIÓN

5.1. MATERIALES Y REACTIVOS

5.1.1. Material

- Aparato de destilación está compuesto por: mechero Bunsen, matraz de destilación de fondo redondo de 1L de capacidad, refrigerante, tubo acodado con terminación afilada para conducir el destilado al matraz aforado receptor del destilado. (ver montaje en el *Anexo 2*)
- Perlas de vidrio.
- Matraz aforado de 100ml.
- Picnómetro de 10ml.
- Termómetro de 0-35°C, precisión 0,25°C.
- Baño maría a $20 \pm 1^\circ\text{C}$
- Balanza analítica resolución 0,0005g.

5.1.2. Reactivos

- Lechada de cal u oxido de calcio al 12% p/v

La preparación de los reactivos se describe en el *anexo 1*.

5.2. OPERACIONES PREVIAS

5.2.1. Montaje del destilador

Colocar y conectar correctamente todas las partes del aparato de destilación; conectar la entrada y salida del refrigerante con gomas apropiadas para la circulación del agua (ver *Anexo 2*).



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHOLICO EN VINO

PE/BR/04

Rev 0.

Página 5 de 6

5.2.2. Baño enfriamiento

Se prepara un baño de hielo picado para enfriar el destilado y el agua hasta alcanzar los $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

5.3. REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS

5.3.1. Destilación del vino

Introducir 200 ml de vino medidos con un matraz aforado en el matraz del destilador, alcalinizar con 5 ± 1 ml de hidróxido cálcico 2M. Añadir 2-3 perlas de vidrio y conectarlo al destilador. Colocar un matraz aforado de 200 ml conectado a la salida del destilador, y sumergido en un baño de hielo. Abrir el flujo de agua a través del refrigerante y encender el mechero del destilador. Continuar la destilación durante unos 30 minutos, completando con agua destilada a volumen el matraz aforado.

5.3.2. Cuantificación del alcohol en el destilado

Tomar dos picnómetros limpios y secos y pesarlos con aproximación al 0,1 mg a $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (p_1 , p_2). Anotar p_1 y p_2 en la hoja de datos HD 04-01. Llenarlos completamente y taparlos desplazando el líquido sobrante y evitando la formación de burbujas de aire: uno de ellos con el agua destilada del baño $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$, anotando el peso (p') en la hoja de toma de datos HD 04-01; llenar el otro con el destilado también a $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$, pesar (p'') y anotar en hoja de datos HD 04-01.

6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

6.1. Cálculos de resultado y criterios de aceptación

La densidad del destilado a $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$:

$$\frac{p'' - p_1}{p' - p_2} \times 1 \text{ g/ml}$$

p_1 , p_2 = peso en g de los picnómetro vacíos (destilado y agua, respectivamente)

p' = peso en g del picnómetro lleno de agua destilada

p'' = peso en g del picnómetro lleno del destilado de vino

Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los resultados de la



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHOLICO EN VINO

PE/BR/04

Rev 0.

Página 6 de 6

determinación. La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder del 0,20%; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

Una vez conocida la densidad del líquido destilado, con ayuda de las tablas de Windisch (ver *Anexo 3*), podremos saber el % de alcohol en volumen que contiene la bebida analizada.

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación reactivos

Anexo 2. Montaje equipo de destilación

Anexo 3. Tablas Windisch: % alcohol en volumen respecto a la gravedad específica a 20°C

Anexo 1

Preparación de reactivos

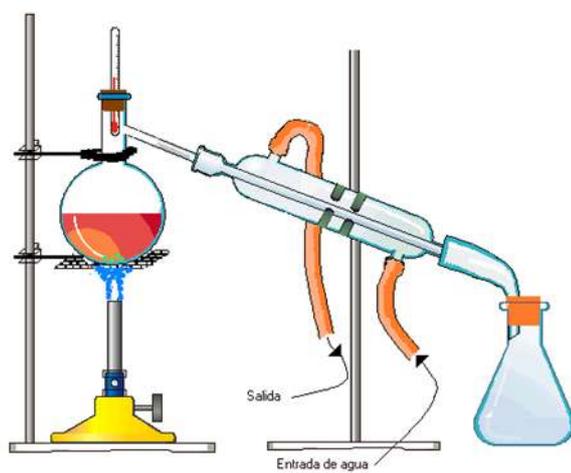
Lechada de cal

Weight 120 ± 0.05 g of calcium oxide in a beaker of 2000 ml, add 1000 ± 5 ml of water at 20°C .

Stir until dissolved.

Anexo 2

Montaje equipo de destilación



Anexo 3

Tablas Windisch: % alcohol en volumen respecto a la gravedad específica a 20° C

Densidad g/ml	Alcohol % (v/v)	Densidad g/ml	Alcohol % (v/v)
1,00000	0,00	0,98530	11,00
0,99851	1,00	0,98471	11,50
0,99704	2,00	0,98412	12,00
0,99560	3,00	0,98297	13,00
0,99419	4,00	0,98182	14,00
0,99281	5,00	0,98071	15,00
0,99149	6,00	0,97960	16,00
0,99020	7,00	0,97850	17,00
0,98894	8,00	0,97743	18,00
0,98771	9,00	0,97638	19,00
0,98711	9,50	0,97532	20,00
0,98650	10,00	0,97425	21,00
0,98590	10,50	0,97318	22,00

HOJA DE TOMA DE DATOS: Grado alcohólico (PNT/BR/04)

Operador

Fecha:

Muestra Nº	Tº destilado min	Peso P_{C_1} Vacío₁ (g)	Tª H₂O (°C)	Peso P_{C_1} H₂O (g)	Δ_1 H₂O- vacío₁ (g)	Peso P_{C_2} Vacío (g)	Tª Destilado (°C)	Peso P_{C_2} Destilado (g)	Δ_2 H₂O- vacío₂ (g)	Densidad $\rho = (\Delta_1 / \Delta_2) \cdot 1$ (g/ml)	Densidad media (g/ml)	Grado Alcohólico ml/100ml

Equipos empleados

Observaciones e incidencias

Interés de la determinación

El SO₂ y los sulfitos han sido ampliamente utilizados a lo largo de la historia debido a sus múltiples funciones. Pueden encontrarse en bebidas y alimentos, empleándose como aditivos alimentarios de acción conservadora y antioxidante. Su mecanismo de acción es la inhibición del deterioro provocado por:

- Bacterias, hongos y levaduras,
- Reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimático que tienen lugar durante el procesado de los alimentos o el almacenamiento de los mismos.

En España, el uso del dióxido de azufre y los sulfitos se permite en determinadas condiciones, en una amplia variedad de alimentos entre ellos el vino y está regulado por el RD 142/2002 y su modificación, RD 1118/2007, referente a los aditivos distintos de los colorantes y edulcorantes. Las dosis máximas permitidas dependen del alimento y oscila entre los 10 y los 2000 mg/kg de SO₂.

En los vinos: La Unión Europea (Reglamento Comunidad Europea nº 1493/1999 y 1622/2000) establece los límites del contenido total de SO₂

- Tintos máx. 160 mg/L
- Blancos y rosados máx. 210 mg/L.

Si el contenido de sulfitos en los alimentos es ≥ 10 ppm (mg/kg) su presencia se debe declarar en la etiqueta, a pesar de que la concentración que puede provocar reacciones adversas en algunas personas puede ser más baja

La IDA media 0,7 mg/kg de peso corporal establecida por la OMS, se está rebasando en ciertos grupos de la población debido principalmente a la existencia de niveles de sulfitos mayores que los permitidos, en los alimentos que consumen, por lo que se está sugiriendo revisar la misma.

Los principales efectos adversos afectan principalmente a:

De terminación de anhídrido sulfuroso en vinos

- Los individuos asmáticos (5-10 %), particularmente niños, son muy sensibles a los sulfitos, desencadenándose los síntomas a los pocos minutos de su ingestión.
- Pueden registrarse reacciones alérgicas adversas como dermatitis, dolor de cabeza, irritación del tracto gastrointestinal, urticarias, exacerbación del asma e incluso shock anafiláctico.
- A personas con un déficit de la enzima sulfito-oxidasa, que interviene en el metabolismo de los sulfitos puede ocasionar lesiones oculares y daño cerebral grave.
- Pérdida del valor nutritivo de los alimentos ricos en Vitamina B₁ o tiamina (p.e. carne), por la capacidad que tienen los sulfitos para descomponerlo en sus componentes, tiazol y pirimidina.



DEPARTAMENTO DE
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA

PROCEDIMIENTO PE/BR/05

DETERMINACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO EN
VINO

Edición: 1 Rev. 0

REV.	FECHA	HOJA/S	CAUSAS DEL CAMBIO

<u>Realizado</u> <u>Fecha</u> <u>Firma</u>	<u>Aprobado</u> <u>Fecha</u> <u>Firma</u>
--	---



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO EN VINO

PE/BR/05

Rev 0.

Página 2 de 6

ÍNDICE

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS
4. GENERAL
 - 4.1. Definición
 - 4.2. Principio del método
5. DESCRIPCIÓN
 - 5.1. Materiales y reactivos
 - 5.1.1. Materiales
 - 5.1.2. Reactivos
 - 5.2. REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS
 - 5.2.1. Valoración del SO₂ libre
 - 5.2.2. Valoración del SO₂ combinado
 - 5.2.3. Valoración del SO₂ recombinado
 - 5.2.4. Valoración de otros reductores
6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS
 - 6.1. Cálculo de la media
 - 6.2. Cálculo del SO₂ libre
 - 6.3. Cálculo del SO₂ total
 - 6.4. Cálculo del SO₂ combinado
7. ANEXOS



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO EN VINO

PE/BR/05

Rev 0.

Página 3 de 6

1. OBJETO

El fin de este procedimiento es la medida del contenido de anhídrido sulfuroso total, libre y combinado en cualquier tipo de vino.

2. ALCANCE

El procedimiento es válido para todos los tipos de vinos.

3. REFERENCIAS

- Compendium of International Methods of Analysis - OIV Sulfur dioxide. Method OIV-MA-AS323-04B. Type IV method. Resolution Oeno 377/2009.
- DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. Reglamento (CE) nº 1234/2007 del Consejo
- PC-BR-01: Procedimiento General de elaboración de Procedimientos del Laboratorio de Bromatología.

4. GENERAL

4.1. Definición

El anhídrido sulfuroso libre se define como el anhídrido sulfuroso presente en el mosto o vino en las siguientes formas: H_2SO_3 , HSO_3^- , cuyo equilibrio como función del pH y de la temperatura es:



El anhídrido sulfuroso total se define como el total de todas las formas de anhídrido sulfuroso presentes en el vino, tanto en estado libre como combinado con sus constituyentes.

4.2. Principio del método

El anhídrido sulfuroso libre se determina directamente en el vino por valoración directa con iodo. El anhídrido sulfuroso combinado se determina a continuación por valoración iodométrica después de hidrólisis alcalina. La suma de ambos es el anhídrido sulfuroso total.



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO EN VINO

PE/BR/05

Rev 0.

Página 4 de 6

5. DESCRIPCIÓN

5.1. MATERIALES Y REACTIVOS

5.1.1. Materiales

- Pipetas aforadas de 50 ml Pipetas graduadas de 5 ml y de 10 ml
- Erlenmeyers de 500 ml
- Erlenmeyers 250 ml boca esmerilada
- Probeta 25 ml y de 50 ml
- Bureta 50 ml resolución 0,1 ml
- Balanza analítica resolución 0,005 g
- Vaso de precipitados de 250 ml
- Cronometro minuterero

5.1.2. Reactivos

- Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Hidróxido sódico (NaOH) 4N
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 10% (v/v)
- Engrudo de almidón (EA)
- Solución de I_2 N/20
- Etanal 0,7%

La preparación de los reactivos se describe en el *Anexo 1*.

5.2. REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS

5.2.1. Valoración del SO_2 libre

Tomar $50 \pm 0,05$ ml de vino y llevar a un erlenmeyer de 500 ml. Añadir $3 \pm 0,5$ ml de H_2SO_4 10% y 5 ± 1 ml de EA. Añadir 30 ± 1 mg de EDTA y agitar al menos durante 5 minutos hasta homogeneizar. Valorar volumétricamente con la solución de I_2 N/20 hasta color azul (persistente al menos 15 segundos).



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO EN VINO

PE/BR/05

Rev 0.

Página 5 de 6

Anotar en la hoja de toma de datos formato HD 05-01 el volumen gastado (V ml).

5.2.2. Valoración del SO_2 combinado

Añadir a los líquidos anteriores $8 \pm 0,5$ ml de NaOH 4N. Agitar y dejar en reposo 5 minutos. Añadir $10 \pm 0,5$ ml de H_2SO_4 10%. Valorar volumétricamente con la solución de I N/20 hasta color azul (persistente 15 segundos por lo menos).

Anotar en HD 05-01 el volumen gastado (V_1 ml).

5.2.3. Valoración del SO_2 recombinado

Añadir a los líquidos anteriores $20 \pm 0,5$ ml de NaOH 4N, agitar y dejar en reposo 5 minutos. Añadir 200 ± 1 ml de agua fría y agitar enérgicamente. Añadir $30 \pm 0,5$ ml de H_2SO_4 10%. Valorar volumétricamente con la solución de I N/20 hasta color azul (persistente 15 segundos por lo menos).

Anotar en HD 05-01 el volumen gastado (V_2 ml).

5.2.4 Valoración de otros reductores

Llevar $50 \pm 0,05$ ml de vino a un erlemeyer de 500 ml. Añadir $5 \pm 0,05$ ml de etanal 0,7% (p/v). Tapar y dejar en reposo 30 minutos. Después de este tiempo añadir $3 \pm 0,5$ ml de H_2SO_4 10% y 5 ± 1 ml de EA. Valorar volumétricamente con la solución de I N/20 hasta color azul (persistente 15 segundos por lo menos).

Anotar en HD 05-01 el volumen gastado (V_3 ml).



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANHÍDRIDO SULFUROSO EN VINO

PE/BR/05

Rev 0.

Página 6 de 6

Repetir las valoraciones hasta que cumpla criterio de valoración (ver 5.2.5). El volumen gastado en la segunda valoración aceptable. Los gastos a comparar serán V' ; ($V'_1 + V'_2$) y V'_3 ml respectivamente.

5.2.5. Criterios de aceptación datos analíticos

Los valores se consideran aceptables si la diferencia entre los mismo es inferior a 0,2 ml, de no será sí repetir una tercera vez y utilizar dos valores que cumplan este criterio. Calcular la media que se utilizará para los cálculos (el número de cifras significativas serán iguales a la de V).

6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

6.1. Cálculo de la media

$$(M) \text{ ml} = (V + V')/2$$

$$(M_1) \text{ ml} = (V_1 + V'_1)/2$$

$$(M_2) \text{ ml} = (V_2 + V'_2)/2$$

$$(M_3) \text{ ml} = (V_3 + V'_3)/2$$

6.2. Cálculo del contenido en SO_2 del vino

$$\text{Anhídrido sulfuroso libre (mg/l)} = 32 (M - M_3)$$

$$\text{Anhídrido sulfuroso total (mg/l)} = 32 ((M + M_1 + M_2)) - M_3$$

$$\text{Anhídrido sulfuroso combinado (mg/l)} = \text{Anhídrido sulfuroso total} - \text{anhídrido sulfuroso libre}$$

Los resultados se expresaran en números enteros.

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos

Anexo 1

Preparación de reactivos

Hidróxido sódico (NaOH) 4N

Llevar a una cápsula de porcelana de 500 ml $160 \pm 0,05$ g de hidróxido sódico, añadir 500 ± 5 ml de agua destilada y disolver agitando suavemente con una varilla de vidrio. Cuando los líquidos estén fríos llevarlo a un matraz aforado de 1l y enrasar con agua destilada. Agitar por inversión completa al menos tres veces.

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 10% (v/v)

Diluir $10 \pm 0,05$ ml de H₂SO₄ ($\rho_{T=20} = 1,84$ g/ml) en un matraz aforado de 100ml con agua destilada hasta el enrase. Agitar por inversión completa al menos tres veces.

Engrudo de almidón (EA)

Mezclar $5 \pm 0,01$ g de engrudo de almidón en un vaso de precipitados de 1l con $500 \pm 0,05$ ml de agua destilada. Llevar a ebullición en una placa calefactora agitando continuamente y mantener en ebullición de 10 a 11 minutos. Añadir 200 ± 1 g de cloruro sódico. Enfriar, llevar a un matraz aforado de 1l y enrasar con agua destilada. Agitar por inversión completa al menos tres veces.

I₂ N/20

Pesar $6,35 \pm 0,01$ g de yodo y llevarlos a un matraz aforado de 1l. Añadir agua destilada hasta la mitad del volumen del matraz, disolver completamente el sólido y enrasar con agua destilada. Agitar por inversión completa al menos tres veces.

Etanal 0,7%

Pesar, en un matraz aforado de 100ml, $7 \pm 0,01$ g de etanal con la ayuda de una pipeta graduada. Añadir agua destilada hasta la mitad del volumen del matraz, disolver completamente y enrasar con agua destilada. Agitar por inversión completa al menos tres veces.

HOJA DE TOMA DE DATOS: Sulfuroso en vino (PNT/BR/05)

Operador	Fecha:
-----------------	---------------

Muestra :

Volumen muestra:

1ª Valoración. Valoración del SO₂ libre Factor I₂ N/20

Tº agitación

valoración	ml	ml ·factor	Dif. [< 0,2]	Media M
1ª				
2ª				

2ª Valoración del SO₂ combinado

Tª reposo:

valoración	ml	ml ·factor	Dif. [< 0,2]	Media M ₁
1ª				
2ª				

3ª Valoración del SO₂ combinado

Tª reposo:

valoración	ml	ml ·factor	Dif. [< 0,2]	Media M ₂
1ª				
2ª				

4ª Valoración de otros reductores

Tª reposo:

valoración	ml	ml ·factor	Dif. [< 0,2]	Media M ₃
1ª				
2ª				

CÁLCULOS

- Anhídrido sulfuroso libre (mg/l) = 32 (M-M₃)

$$32 \cdot (\quad - \quad) = \quad \text{mg SO}_2/\text{l}$$

- Anhídrido sulfuroso total (mg/l) = 32 ((M + M₁ + M₂) - M₃)

$$32 ((\quad + \quad + \quad)) - \quad = \quad \text{mg SO}_2/\text{l}$$

Observaciones

Determinación del índice de Folin-Ciocalteu en vinos

Introducción

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Químicamente los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento de las células vegetales. Se encuentran en frutas y verduras y en bebidas como té y vino (Kinsella et al., 1993). La estructura química de los polifenoles es especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante.

Al postularse la acción protectora del vino en algunas enfermedades crónicas como resultado de su capacidad antioxidante, diferentes grupos han abordado la medición de esta capacidad. Está demostrado, que las propiedades antioxidantes del vino se deben a sus componentes polifenólicos (Abu-amsha et al., 1996). El contenido total de polifenoles de un vino se correlaciona directamente con su capacidad antioxidante (Rice-Evans et al., 1997; Sato et al., 1998).

Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas y en las pepitas, su concentración es baja en la pulpa. El proceso de elaboración de los vinos comienza con la obtención del vino base procedente de uvas blancas o tintas. Los vinos base blancos y rosados se obtienen cuando la fermentación tiene lugar sin el contacto entre hollejo y mosto. En cambio, los tintos se elaboran en contacto con los hollejos y su color dependerá del tiempo y la intensidad de la maceración (Hidalgo et al., 2004). Por esta razón, la cantidad de compuestos fenólicos que se encuentran en el vino tinto es mayor que la de los vinos blancos y rosados, ya que en el proceso de elaboración del vino tinto se incluye el proceso de maceración del mosto con la piel y partes sólidas de la uva, principal origen de los polifenoles. Cabe destacar que los polifenoles contribuyen de forma notable en las características organolépticas del vino (color, astringencia, etc.).

La cantidad y calidad de polifenoles en la uva depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo. De todos estos factores condicionantes las prácticas de cultivo son el factor más fácil de modificar. Uno de los principales métodos de medida de los polifenoles totales es el índice de Folin-Ciocalteu (IFC).



**DEPARTAMENTO DE
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA**

PROCEDIMIENTO PE/BR/06

**DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE FOLIN-
CIOCALTEU DEL VINO**

Edición: 1 Rev. 0

REV.	FECHA	HOJA/S	CAUSAS DEL CAMBIO

Realizado

Fecha

Firma

Aprobado:

Fecha

Firma

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN ÍNDICE DE FOLIN-CIOCALTEU EN VINO	PE/BR/06
		Rev 0.
		Página 2 de 6

ÍNDICE

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS
4. GENERAL
 - 4.1. Definición
 - 4.2. Principio
5. DESCRIPCIÓN
 - 5.1. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS
 - 5.2. PREPARACIONES PREVIAS
 - 5.3. REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS
 - 5.3.1. Vinos tintos
 - 5.3.2. Vinos blancos
6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS
 - 6.1. Criterios de aceptación de los datos analíticos
 - 6.2. Cálculo de los resultados
7. ANEXOS



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN ÍNDICE DE FOLIN-CIOCALTEU EN VINO

PE/BR/06

Rev 0.

Página 3 de 6

1. OBJETO

El fin de este procedimiento es la determinación del índice de Folin-Ciocalteu en muestras de vino tinto y vino blanco.

2. ALCANCE

El procedimiento es válido para todos los vinos, que convenientemente diluidos, presenten una absorbancia a 750 nm de $0,35 \pm 0,05$ uA.

3. REFERENCIAS

- PC-BR-01:- Procedimiento General de elaboración de Procedimientos del Laboratorio de Bromatología.
- DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. Reglamento (CE) n° 1234/2007 del Consejo (publicadas de conformidad con el artículo 15, apartado 2, del Reglamento (CE) n°606/2009 de la Comisión, de 10 de julio de 2009). 19.2.2010. (Comunicaciones de la CE C43/01).

4. GENERAL

4.1. Definición

El índice de Folin-Ciocalteu es el parámetro que mide el nivel de polifenoles en el vino.

4.2. Principio del método

El conjunto de los compuestos fenólicos del vino se oxida con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este último está constituido por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, en la oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}).



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN ÍNDICE DE FOLIN-CIOCALTEU EN VINO

PE/BR/06

Rev 0.

Página 4 de 6

La coloración azul producida posee una absorción máxima en torno a 750 nm y es proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos.

5. DESCRIPCIÓN

5.1. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

○ Equipos y materiales

- Pipetas aforadas de 1ml y de 20 ml.
- Balanza analítica resolución 0,005 g.
- Cronómetro minuterero.
- Probeta 50, y 100 ml.
- Embudos pesasustancias, varilla de vidrio.
- Matraces aforados de 100 ml y de 1000 ml.
- Espectrofotómetro que permita trabajar a $750 \pm 0,1$ nm.
- Cubetas de 1cm de camino óptico para espectrofotómetro UV-VIS.

La bondad de los resultados depende de la utilización de un material rigurosamente limpio (matraces aforados y cubetas del espectrofotómetro)

○ Reactivos

Los reactivos deben ser de calidad analítica. El agua utilizada será agua destilada o agua de pureza equivalente.

- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro en solución al 20% (m/v)

5.2. PREPARACIONES PREVIAS

Encender el espectrofotómetro al menos 15 minutos antes del inicio de la determinación



PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN ÍNDICE DE FOLIN-CIOCALTEU EN VINO

PE/BR/06

Rev 0.

Página 5 de 6

para estabilizar la emisión de la lámpara.

Sólo en el caso de los vinos tintos tomar $20 \pm 0,02$ ml del mismo y verterlo a un matraz aforado de 100 ml. Completar con agua destilada homogeneizando por volteo completo al menos tres veces.

5.3 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS

5.3.1 Vinos tintos

Se preparan un matraz problema y otro blanco

- Matraz problema: En un matraz aforado de 100 ml, introducir respetando escrupulosamente este orden:
 - o $1 \pm 0,01$ ml de vino diluido al 1/5
 - o $50 \pm 0,02$ ml de agua destilada
 - o $5 \pm 0,02$ ml de reactivo de Folin-Ciocalteu
 - o $20 \pm 0,02$ ml de solución de carbonato de sodio
 - o Enrasar a 100 ml con agua destilada homogeneizando por volteo completo al menos tres veces
- Matraz blanco: En otro matraz aforado prepararemos un blanco de reactivos para lo cual añadiremos los mismos reactivos a excepción del vino que lo sustituiremos por $1 \pm 0,01$ ml de agua destilada. Mantener el mismo orden establecido anteriormente

En ambos casos y simultáneamente esperar 30 ± 1 minutos, para que se estabilice la reacción.

Determinar la absorbancia a 750 nm en una cubeta de 1 cm con relación al blanco. Si la absorbancia leída no está entre 0,25 y 0,35 modificar la dilución del vino hasta lograrlo.

Anotar en la hoja de toma de datos HD 06-01 la absorbancia leída (n uA).

	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN ÍNDICE DE FOLIN-CIOCALTEU EN VINO	PE/BR/06
		Rev 0.
		Página 6 de 6

Repetir la lectura en el espectrofotómetro y anotar la absorbancia (n' uA).

5.3.2. Vinos blancos

Operar de la misma forma descrita en 5.3.1 con $1 \pm 0,01$ ml de vino sin diluir. Mantener el mismo orden establecido anteriormente y realizar igualmente un blanco.

Anotar en la hoja de toma de datos HD 06-01 la absorbancia leída (n uA).

Repetir la lectura en el espectrofotómetro y anotar la absorbancia (n' uA).

6. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

6.1. Criterios de aceptación datos analíticos

La diferencia entre las absorbancias de dos determinaciones efectuadas simultáneamente o inmediatamente una después de otra por el mismo analista no debe ser superior a 0,01uA para los vinos tintos ni superior a 0,05uA para los vinos blancos.

En caso contrario determinar nuevamente hasta cumplir criterios.

El resultado para los cálculos se obtiene de la media entre ambas lecturas aceptables.

6.2. Cálculo de los resultados

El resultado se expresa en forma de índice, sin unidades.

Se obtiene

- Vino tinto: Al multiplicar la absorbancia por 20 y por la inversa del factor de dilución empleado (5 para 1/5)
- Vino blanco: Al multiplicar la absorbancia por 20

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos.

Anexo 1

Preparación de reactivos

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Este reactivo se encuentra en el comercio listo para su empleo.

Puede prepararse de la forma siguiente: disolver en 700 ml de agua destilada 100g de tungstato de sodio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) y 25 g de molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$); añadir 50ml de ácido fosfórico al 85% ($\delta = 1,71 \text{ g/ml}$) y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado ($\delta = 1,19 \text{ g/ml}$). Llevar a ebullición bajo reflujo durante 10 horas, añadir a continuación 150 g de sulfato de litio ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), algunas gotas de bromo y hervir de nuevo durante 15 minutos. Enfriar y completar hasta 1 litro con agua destilada.

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro en solución al 20% (m/v)

Pesar en un embudo pesa sustancias $200 \pm 0,05\text{g}$ de carbonato de sodio anhidro, verter el contenido en un matraz aforado de 1000ml. Enrasar con agua destilada y agitar hasta uniformidad.

HOJA DE TOMA DE DATOS: ÍNDICE DE FOLIN-CIOCALTEU EN VINOS (PNT/BR/06)

Operador	Fecha:
-----------------	---------------

Lecturas λ lectura : nm

Muestra	Tipo vino B/T	dilución	Tº espera min	1ª lectura	2ª lectura	Media dif <0,01) T / 0,05 B	Índice Folin 20 · dilución

Equipos empleados

Observaciones e incidencias