

MANUAL BÁSICO DE LABORATORIO ENOLÓGICO

Europa
invierte en las zonas rurales



UNIÓN EUROPEA

Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural



**Junta
de Andalucía**

Consejería de Agricultura, Pesca
Agua y Desarrollo Rural

Instituto Andaluz de Investigación
y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria
y de la Producción Ecológica

MANUAL BÁSICO DE LABORATORIO ENOLÓGICO



Junta de Andalucía

Consejería de Agricultura, Pesca,
Agua y Desarrollo Rural

Instituto Andaluz de Investigación
y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria
y de la Producción Ecológica

Manual Básico de Laboratorio Enológico/ [Juan Manuel León Gutiérrez, Susana Cruz García, Pedro Manuel Pérez Juan, José Morales Ordóñez, Pilar Ramírez Pérez]. - Sevilla. Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo Rural. Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica. 2024.

Ortografía revisada según la 23 edición de la RAE

Coordinación:

Pilar Ramírez Pérez¹

Autoría:

Juan Manuel León Gutiérrez¹

Susana Cruz García¹

Pedro Manuel Pérez Juan¹

José Morales Ordóñez¹

Pilar Ramírez Pérez¹

Agradecimientos:

La elaboración de este manual se enmarca dentro de las actividades del proyecto Formación Especializada en Vitivinicultura Sostenible (PP.FES.FES2022.022) cofinanciado al 90 % por el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural, dentro del Programa de Desarrollo Rural de Andalucía 2014-2022.

Edita y Publica:

Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA). Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía.

Serie:

Ingeniería y Tecnología Agroalimentaria. Formación

D.L. SE 1441-2024

I.S.B.N. 978-84-8474-313-2

Diseño y Maquetación:

M^a del Carmen Yruela Morillo², María Ruano García², Alicia González Vicente²



Este documento está bajo Licencia Creative Commons
Reconocimiento-No comercial-Sin obra derivada

1. Centro IFAPA de Cabra. Junta de Andalucía.

2. Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía. Junta de Andalucía.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	5
2. NORMAS DE SEGURIDAD EN LABORATORIO	7
2.1 Riesgos en el laboratorio	7
2.2 Normas básicas de seguridad.....	8
3. PROTOCOLO GENERAL DE CONTROL DE MADURACIÓN.....	13
3.1 Toma de muestras de uva.....	13
3.1.1 Metodología de la toma de muestra.....	15
3.2 Tratamiento de la muestra	16
3.3 Determinaciones analíticas	17
3.4 Determinación de la fecha de vendimia	18
4. PARÁMETROS BÁSICOS DE ANÁLISIS EN MOSTOS Y VINOS	21
4.1 Peso medio de la baya	21
4.2 Sólidos solubles.....	22
4.2.1 Determinación de sólidos solubles por refractometría.....	23
4.2.2 Determinación de sólidos solubles por areometría.....	26
4.3 pH y acidez total	28
4.3.1 Método de análisis del pH	29
4.3.2 Método de análisis de la acidez total.....	30
4.4 Nitrógeno fácilmente asimilable	32
4.5 Azúcares reductores.....	34
4.5.1 Método <i>Rebelein</i>	35
4.5.2 Método simplificado	37
4.6 Grado alcohólico volumétrico	38
4.6.1 Determinación del grado alcohólico volumétrico por destilación e hidrometría.....	39
4.6.2 Determinación del grado alcohólico volumétrico por ebulliometría	41
4.7 Acidez volátil.....	43
4.7.1 Acidez volátil con destilación por arrastre de vapor.....	44
4.7.2 Método <i>García Tena</i>	46
4.7.3 Método <i>Mathieu</i>	47
4.8 Sulfuroso libre y total.....	49
4.8.1 Método <i>Paul</i>	51
4.8.2 Método <i>Ripper</i>	53
4.9 Ácido málico	56
4.10 Hierro	58
5. BIBLIOGRAFÍA.....	61
6. ANEXOS	63

1

INTRODUCCIÓN

El Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica tiene como objetivo la contribución a la modernización de los sectores agrario, pesquero y alimentario de Andalucía y a la mejora de su competitividad a través de la investigación, la innovación, la transferencia de tecnología y la formación de agricultores, pescadores, técnicos y trabajadores de estos sectores, desde su creación con la Ley 1/2003 de 10 de abril, y la aprobación de sus estatutos a través del Decreto 359/2003 de 22 de diciembre.

Una de las principales herramientas disponibles para contribuir a mejorar la cualificación de los profesionales del sector agroalimentario son los Proyectos de Formación Especializada en los que se enmarca el Proyecto de “Formación Especializada en Vitivinicultura Sostenible” (PR.FES. FES2022.022), que está cofinanciado al 90 % por el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural, dentro del Programa de Desarrollo Rural de Andalucía 2014-2020. Este tiene como objetivo principal proporcionar a viticultores, bodegueros y trabajadores de las empresas vitivinícolas, formación y actualización de conocimientos en técnicas de cultivo y vinificación. Uno de los objetivos específicos es formar a personas del sector vitivinícola para que, a través del análisis químico y sensorial, puedan evaluar y mejorar la calidad de sus vinos, del cual nace la iniciativa de elaborar este manual.

En el sector vitivinícola andaluz se encuentran grandes bodegas de proyección internacional, cooperativas que agrupan a gran parte de los viticultores y producen importantes volúmenes, así como pequeñas bodegas y lagares ya sean tradicionales o nuevos proyectos que van naciendo a lo largo de toda la geografía andaluza.

Tanto las grandes bodegas como las cooperativas poseen personal altamente cualificado dedicado al control químico enológico de la uva, el mosto y el vino. Sin embargo, en las pequeñas bodegas y lagares, con un marcado carácter familiar, no es tan frecuente dicha especialización.

Este manual podrá servir de apoyo y consulta a todos ellos, incluso a los que no están tan familiarizados con la química, poniendo a su alcance métodos básicos de trabajo que les permitan el control suficiente de las elaboraciones, desde la elección de la fecha de vendimia hasta el momento de embotellado, pasando por los procesos de fermentación.

Los parámetros analíticos han sido seleccionados por su importancia en la elaboración de vinos blancos, tintos y generosos por ser los más frecuentes en Andalucía, descartándose en este manual básico parámetros en los que todos los métodos posibles requieran un equipamiento costoso y difícilmente amortizable por bodegas con bajos volúmenes de producción. A su vez, siempre que ha sido posible, se han presentado distintos métodos analíticos con los que determinar un mismo parámetro, que puedan seleccionarse según el equipamiento del que se disponga, la sencillez, el tiempo de ejecución y la precisión requerida. Aun así, todos los métodos presentados son suficientemente precisos y sencillos para poder realizar un adecuado seguimiento de los procesos de elaboración de vino.

Parte de este trabajo está inspirado en el “Manual Básico de Laboratorio de Bodega”, de Pedro Manuel Pérez Juan y José Morales Ordóñez, antiguos compañeros del IFAPA de Cabra, editado por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía en 1998. Este nuevo manual supone una completa revisión y actualización del editado hace 25 años, con la inclusión de parámetros que resultan imprescindibles para el control de las elaboraciones actuales y teniendo en cuenta los métodos propuestos por la Organización Internacional de la Vid y el Vino.

Esperamos que este manual básico se convierta en una herramienta útil como lo fue su antecesor, pues es el resultado del conocimiento y la experiencia de un equipo de personas a fin de contribuir a la mejora del sector vitivinícola.

2

NORMAS DE SEGURIDAD EN LABORATORIO

Teniendo en cuenta los objetivos del presente libro y el tipo de laboratorio al que está destinado, se exponen en primer lugar los riesgos asociados a los laboratorios y a continuación, algunas normas básicas de higiene y seguridad.^{2,3}

2.1 Riesgos en el laboratorio

En los laboratorios en general, no solo se deben considerar los riesgos derivados de la manipulación de productos químicos y de las operaciones que se realicen con ellos, sino también las instalaciones, equipos e instrumentos.

En este apartado se hará un repaso a los principales riesgos derivados de la utilización de algunos equipos y las medidas que se deben tomar para minimizarlos. Se parte de la base de que todos estos equipos, servicios y materiales cumplen con la legislación que le es aplicable, desde el punto de vista constructivo de los mismos, de su instalación y respecto a su correcto funcionamiento.

Riesgos asociados a la utilización de aparatos eléctricos

- Electrocución por contacto directo o indirecto.
- Inflamación o explosión por chispas o calentamiento del aparato eléctrico.

Se debe evitar sobrecargar los enchufes (utilización de ladrones) así como evitar que se mojen los aparatos.

Riesgos asociados a la utilización de material de vidrio

- Cortes o heridas por rotura del material de vidrio debido a su fragilidad mecánica, térmica, cambios bruscos de temperatura o presión interna.
- Cortes o heridas por la apertura de material de vidrio obturado: tapones esmerilados, llaves de paso, conectores, etc.

- Explosión, implosión e incendio por rotura del material de vidrio en operaciones realizadas a presión o al vacío.

Riesgos asociados a la utilización de refrigerantes

- Corte del suministro de refrigerante (agua) de manera que no se produce enfriamiento, el producto no condensa y los vapores pasan a la atmósfera.
- Rotura interna con entrada de agua a la mezcla de reacción con riesgo de incendio, explosión o fuga de vapores.
- Desconexión del tubo que suministra el refrigerante y riesgo de inundación.

Riesgos asociados a la utilización de pipetas

- Ingestión de un líquido tóxico o corrosivo.
- Cortes por rotura.

Riesgos asociados a la utilización de aparatos con llama (mecheros)

- Incendio y explosión.
- Quemaduras.

Las dos alternativas para minimizar estos riesgos son suprimir la llama o la presencia de sustancias inflamables, mediante su separación o alejamiento o una buena ventilación.

2.2 Normas básicas de seguridad

A continuación, se exponen algunas normas básicas en cuanto a la organización en el laboratorio, hábitos personales, medidas de protección, manipulación de vidrio, productos químicos, calefacción, eliminación de residuos y accidentes personales.

Organización

La organización dentro del laboratorio debe ser estudiada con el fin de procurar que sea adecuada para el mantenimiento de un nivel preventivo. La limpieza y el orden son de gran importancia. Las instalaciones, aparatos e instrumentos deben mantenerse en perfecto estado. Es necesario mantener una adecuada ventilación en los laboratorios a fin de prevenir la acumulación de productos que puedan dar lugar a accidentes posteriores.

Los reactivos químicos deben estar etiquetados, almacenándose en el laboratorio en un lugar adecuado, protegido del sol, y en estanterías no demasiado altas.

Los compuestos inflamables y altamente reactivos deben permanecer en las mesas de trabajo el tiempo mínimo indispensable para su utilización, posteriormente serán llevados a su lugar de almacenamiento fuera del área de trabajo. Antes de su utilización el usuario debe asegurarse de que no se encuentran cerca mecheros encendidos, calentadores o cualquier otro foco de ignición.

Hábitos personales

En la realización del trabajo de laboratorio deberán observarse las siguientes normas:

- Nunca se debe fumar, comer o beber en los laboratorios.
- El trabajo se realizará en todo momento con las batas abrochadas.
- Se evitará cualquier acción que provoque transferencia de agentes químicos a la boca. No se pipeteará con la boca y se utilizarán pipeteadores manuales o automáticos para tal fin.
- No se olerá ningún producto químico para intentar su identificación, ya que puede ser nocivo o tóxico.
- Utilizar gafas de seguridad siempre que se manipulen productos químicos que supongan riesgo para el manipulador.
- Durante el trabajo en el laboratorio no es aconsejable llevar lentes de contacto, ya que, en caso de accidente por salpicaduras o vapores, estas pueden fundirse y el tiempo para retirarlas puede aumentar el riesgo de lesiones oculares.
- Se evitará el uso de pulseras, anillos, colgantes o mangas anchas que pudieran introducirse o engancharse en los objetos o montajes de trabajo. El pelo se llevará recogido.
- Las manos deben lavarse en cualquier operación que implique el contacto con material irritante, tóxico o cáustico, siempre que se usen guantes protectores y antes de abandonar el laboratorio.

Medidas de protección

- Se debe conocer la localización y el funcionamiento de los equipos extintores cuyo mantenimiento periódico asegura su perfecto estado.
- Es necesario conocer el funcionamiento y situación de las duchas de emergencia y lavaojos.
- Debe existir un botiquín de primeros auxilios. Los teléfonos de urgencia en caso de necesidad deben tenerse a mano.
- La bata deberá emplearse durante toda la estancia en el laboratorio. Es conveniente la utilización de bata, ya que evita posibles proyecciones de sustancias químicas a la piel. Además, evitará posibles deterioros en las prendas de vestir.
- Se recomienda disponer de gafas de seguridad que deberán ser de uso individual.
- Se utilizarán los guantes adecuados en función de la tarea que se vaya a desarrollar.

Manipulación de vidrio

- Es importante saber el tipo de vidrio que se está manejando: vidrio sódico que no soporta las altas temperaturas o borosilicato (vidrio pyrex), que es el único que puede calentarse.
- Antes de calentar el vidrio se comprobará la existencia de grietas, debiéndose desechar todo material que presente defectos.
- El vidrio tiene el mismo aspecto cuando está frío que cuando está muy caliente. Antes de tocar los recipientes que hayan estado sometidos a calor, se comprobará cuidadosamente su temperatura.
- Todo el material de vidrio será manipulado con máxima precaución. Los montajes de reflujos, destilaciones, etc, se deben realizar con especial cuidado, evitando forzar las piezas al querer unirlos y tensiones, empleando soportes-abrazaderas.
- Evitar que las piezas de unión queden atascadas dando una fina capa de grasa de silicona entre las superficies de vidrio.
- Las gomas de los refrigerantes se cortarán cuando no se puedan sacar con facilidad.
- Cuando se calienten recipientes del tipo vasos de precipitados o matraces *erlenmeyer* a temperaturas elevadas, se deberán colocar en un soporte adecuado, no se llenarán más de la mitad de su capacidad y se introducirán trozos de porcelana porosa para evitar que la ebullición sea muy activa y se produzcan proyecciones del líquido caliente.

Productos químicos

- Toda persona que manipule un producto químico deberá conocer sus características fisicoquímicas y su toxicidad.
- La apertura de frascos que contengan sustancias químicas deberá hacerse con cuidado y lentamente, asegurándose de que no haya ningún desprendimiento violento. Después de su utilización, se tendrá especial cuidado en cerrar las botellas y frascos, especialmente si son de sustancias inflamables.
- No se devolverá el sobrante de un producto químico a su envase original.
- Los ácidos se diluirán echándolos sobre agua y nunca echando agua sobre los ácidos concentrados.
- Los productos químicos nunca se tocarán con las manos ni se probarán.
- No se pipeteará nada con la boca. Se utilizarán peras de goma o pipeteadores automáticos.
- Se han de etiquetar debidamente las disoluciones preparadas en el laboratorio indicando el producto químico, la concentración, la fecha de preparación y el operario que la ha preparado. No se reutilizarán envases para otros productos sin quitar la etiqueta original. No se sobrepondrán etiquetas.

Calefacción

- Los recipientes o sistemas totalmente cerrados nunca se calentarán.
- Antes de encender un mechero se comprobará que no existen sustancias inflamables en los alrededores.

Eliminación de residuos de productos químicos

- La eliminación de ácidos y bases poco corrosivas se puede hacer diluyéndolas primero con abundante agua para su eliminación posterior por el desagüe normal. La dilución debe hacerse de forma que no se supere una concentración del 5-10 %.
- Los sólidos nunca se eliminarán por el desagüe. Si no son tóxicos o nocivos, se tirarán con el resto de desechos. Si son tóxicos se eliminarán en recipientes específicos.
- Los recipientes de productos no tóxicos se enjuagarán tres veces antes de tirarlos.

Accidentes personales

- **Salpicaduras.** Si estas se producen sobre la piel o los ojos, se lavarán con abundante agua mediante ducha o lavajos respectivamente, y en ningún caso se intentará su neutralización. Si ocurren sobre la ropa, esta deberá quitarse lo antes posible para evitar que el producto entre en contacto con la piel.
- **Quemaduras.** Si son producidas por ácidos o sustancias fuertemente oxidantes, se lavarán con agua abundante. Si la ropa está impregnada de ácido, se debe quitar inmediatamente. Si la salpicadura es de ácido sulfúrico concentrado, antes de lavar la zona con agua es conveniente eliminar la mayor parte del ácido mediante un trapo o papel secamanos, ya que la reacción de este compuesto con el agua es extremadamente exotérmica. Los últimos restos de ácido pueden neutralizarse por aplicación de una disolución de bicarbonato de sodio al 5 %. Si la quemadura es por productos alcalinos, el tratamiento es el mismo que para las quemaduras por ácidos, con la salvedad de que, para eliminar los últimos restos de producto, después del lavado con agua puede aplicarse una disolución de ácido acético al 1 % sobre la zona afectada. Si son producidas por fuego o por superficies calientes, el tratamiento dependerá de la profundidad y extensión de la zona afectada. En casos leves se podrá aplicar agua fría abundante y un apósito con cremas comerciales adecuadas, en casos más severos se buscará lo antes posible atención médica y no se aplicarán pomadas o cremas grasas.
- **Cortes.** Se lavarán con abundante agua fría para intentar cortar la hemorragia. Si son cortes pequeños, se tapanán con venda o apósito al efecto y se acudirá al servicio médico. Si son de consideración, se intentará aplicar un torniquete, y se buscará atención médica lo antes posible.
- **Ingestión.** Se consultará lo antes posible la ficha de seguridad del producto ingerido, o se contactará con el servicio de información toxicológica (cuyo teléfono debe estar a mano en el laboratorio). Por lo general no se provocará el vómito, salvo indicación expresa. Se acudirá al servicio médico con una etiqueta del producto.

- **Inhalación.** Como norma general no se olerá ningún producto para su identificación, pues puede resultar nocivo o tóxico. En caso de intoxicación por inhalación, se colocará al afectado en un lugar ventilado y se procederá como en el apartado anterior. En caso de duda, se consultarán las fichas de seguridad de los productos químicos implicados.



3

PROTOCOLO GENERAL DE CONTROL DE MADURACIÓN

La maduración se define como el periodo comprendido entre el envero de la uva y la vendimia. En este tiempo, se produce un complejo proceso de transformación en el fruto, que engloba fenómenos tales como el engrosamiento y ablandamiento de la baya, enriquecimiento en azúcares, pérdida de acidez, acumulación de compuestos polifenólicos y formación de aromas.

3.1 Toma de muestras de uva

La toma de muestras es fundamental en el seguimiento de maduración de la uva, pues a partir de los datos obtenidos se tomará la decisión de vendimiar la uva para vinificarla, y esta debe tener las características y la madurez adecuada para el vino que queramos elaborar.

Es primordial, por tanto, obtener una muestra representativa de nuestra parcela, para poder tomar una decisión correcta. La forma de realizar el muestreo es esencial y debe cumplir una serie de requisitos.⁴

1. Es preciso dividir la zona vitícola a controlar en unidades homogéneas de cultivo, donde se suponga que su producción resultará homogénea a lo largo de los años. Se agruparán los viñedos o parcelas con la misma variedad y clon de cultivo, también los que posean un terreno de similares características, con microclimas parecidos y con los mismos sistemas de conducción. El análisis de las submuestras se realizará independientemente. Los resultados obtenidos ayudarán a organizar la vendimia como más interese.
2. El recorrido para la toma de muestras debe realizarse siguiendo la dirección de mayor longitud.
3. La muestra de uva debe tomarse de cepas con un comportamiento normal dentro de la parcela (o subparcela) considerada. Deben descartarse las extremas (excesivamente vigorosas o débiles) y las enfermas.
4. Seleccionar un número de cepas repartidas por la parcela, proporcional a su extensión, cuidando de que sean las más representativas.

5. Es preferible comenzar los muestreos en el envero, aunque unas dos semanas después será suficiente. El intervalo entre muestreos al principio será semanal y después, cuando se acerca la maduración, habrá que coger muestras con mayor frecuencia, para evitar que, en climas cálidos sobre todo, se pase el momento óptimo de madurez.
6. El número de racimos por muestra deberá establecerlo la persona que realice el muestreo en base a parámetros de tamaño de la parcela, grado de heterogeneidad de las cepas, experiencia, etc. Los resultados están más determinados por la forma de tomar la muestra que por el tamaño de la misma, dentro del intervalo anterior.
7. Es preciso tomar muestras tanto de los racimos situados bajo las hojas como de los expuestos a la luz, tomando alternativamente de cada lado de la fila.
8. La maduración de los racimos se ve condicionada por su posición en la cepa, por lo que se cogerán racimos de la parte alta, media y baja de la misma.



Figura 1. Proceso de toma de muestra de uva



Figura 2. Muestra recogida en una subparcela

3.1.1 Metodología de la toma de muestra

El procedimiento que se propone en la obtención de la muestra consiste en recoger con tijeras fragmentos de racimos (escadas) de 5 a 10 bayas de un hombro, cola y zona intermedia de racimos situados en distintas posiciones de la cepa, más o menos alejados del tronco, primer o segundo racimo del pámpano, y racimos soleados y no soleados. Esto es debido a que la maduración no es homogénea en la cepa ni en el racimo y la muestra debe ser representativa.

Cuando se trabaja con variedades de racimos compactos, los granos situados en el interior del racimo a menudo están menos adelantados en su maduración. Se recomienda en estos casos tomar muestras de racimos enteros para tener una idea más precisa del nivel de maduración de la parcela. Esto es aplicable también en variedades con racimos pequeños.

Las muestras se recogerán en bolsas de plástico con la suficiente capacidad y resistencia. Hay que evitar los golpes sobre la muestra durante la ejecución del muestreo y el transporte posterior. Asimismo, debe evitarse su exposición al sol, ya que la uva se puede deshidratar y ello repercute en los resultados analíticos.

El momento ideal de toma de muestras es a primera hora de la mañana, una vez que se haya evaporado el rocío nocturno.



Figura 3. Racimo de variedad tinta



Figura 4. Detalle de las porciones muestreadas por racimo

3.2 Tratamiento de la muestra

Una vez recolectada la muestra de uva, debe trasladarse con precaución y rapidez al laboratorio. El tratamiento al que se someterá la muestra es el siguiente:

En primer lugar, se separan las uvas para el cálculo del peso medio de la baya. El procedimiento se detalla en el apartado 4.1 de este manual. Con el resto de la muestra se procede a su estrujado y prensado para obtener el mosto que posteriormente analizaremos. Lo ideal es realizarlo con una estrujadora y una prensa de laboratorio, pero si no se cuenta con este material, puede hacerse de forma manual. Hay que extraer todo el mosto, pero sin llegar a la rotura de las semillas ni de los raspones.

En el caso de uvas tintas puede utilizarse también una batidora eléctrica o licuadora.



Figura 5. Estrujadora y prensa manuales utilizadas para la extracción de mosto de muestras de uva blanca



Figura 6, 7 y 8. Proceso de estrujado, trasvase de la masa al jaulón de la prensa, prensado y obtención del mosto



Figura 9. Extracción de mosto de uva tinta mediante licuadora

El mosto obtenido es recogido en un vaso de precipitados de 1 o 2 litros de capacidad en el que se ha de dejar reposar durante 15-20 minutos para que decanten las partículas sólidas de mayor tamaño.

Transcurrido este tiempo, se vierte con cuidado el mosto clarificado con la ayuda de un colador a otro recipiente. Este mosto clarificado puede utilizarse para los análisis que se consideren de interés.

Existen otros procedimientos de retirada de los fangos del mosto, como la filtración a vacío o por centrifugación. Sin embargo, el método propuesto es suficientemente válido para los parámetros que se proponen y proporciona resultados óptimos.

En el caso de las uvas tintas, puede realizarse también el seguimiento de la madurez fenólica, para lo cual habría que reservar una submuestra de escadas con las bayas enteras. En este caso, el tamaño de la muestra tomada en campo debe ser mayor, con el fin de contar con uva suficiente para todas las analíticas.

3.3 Determinaciones analíticas

Los análisis físico-químicos mínimos que deben realizarse durante la maduración de la uva con el fin de determinar la fecha óptima de vendimia son:

- Peso medio de la baya
- Contenido en sólidos solubles
- pH y acidez total

La metodología de cada uno de estos análisis se describe en el apartado 4 de este manual.

3.4 Determinación de la fecha de vendimia

Con respecto al momento de recolección de la uva, hay que distinguir entre el momento de madurez fisiológica de la uva y el momento óptimo de vendimia. Dichas situaciones podrán o no coincidir según el criterio de recolección que se considere por parte del elaborador en base al tipo de vino que se quiera producir.

Fisiológicamente hablando, la madurez se logra cuando se obtiene el máximo de peso de vendimia con la mayor concentración de azúcares o también cuando la relación azúcares/acidez es máxima⁵. Este momento también es conocido como madurez de la pulpa o madurez industrial. Los posteriores incrementos de azúcares se deben únicamente a la pasificación o sobremaduración del fruto.

La facilidad para la sobremaduración de la uva depende, fundamentalmente, de la variedad y de las condiciones climatológicas del año. Por ejemplo, la variedad Pedro Ximénez se caracteriza por su rapidez de sobremaduración, lo que le permite alcanzar elevadas graduaciones alcohólicas potenciales de sus mostos.

El momento óptimo de vendimia o madurez enológica corresponde al momento de realizar la vendimia que permitirá elaborar, en una situación y en una añada determinada, el mejor vino posible⁶. Dependiendo también del tipo de vino a elaborar, en muchas ocasiones no coincidirá con la madurez de la pulpa, pues se atienden otros criterios como la madurez aromática ligado a la formación de aromas varietales, o la madurez fenólica, relacionada con el contenido en antocianos y taninos y la facilidad de extracción de los mismos, de gran importancia para la elaboración de vinos tintos⁷.

A continuación, se exponen las características que debe tener la uva en el momento de la vendimia para las elaboraciones de vino más comunes:

Vinos blancos jóvenes

En los vinos blancos jóvenes es importante conseguir una uva madura con el máximo potencial aromático y una acidez suficiente. En climas cálidos esto es complicado debido a las altas temperaturas durante la maduración. La situación óptima sería recoger la uva en un momento anterior a la madurez industrial, evitando todo efecto de sobremaduración y con una acidez aproximada del mosto de 8 g/L expresados en ácido tartárico.

De forma genérica, y en función de las características de la uva, sería conveniente vendimiar la uva con un contenido en sólidos solubles en el intervalo 18,0-21,7 °Brix (10-12,5 % v/v de alcohol probable) y con una acidez en el mosto de 5 a 8 g/L expresados en ácido tartárico.

Mostos destinados a la elaboración de vinos generosos

Estos son finos, manzanillas, amontillados, olorosos, palos cortados, etc.

Debido a la propia naturaleza de la elaboración, lo ideal es recolectar la uva con el máximo de azúcares, aún a riesgo de perder peso y acidez por efecto de la sobremaduración.

Vinos tintos jóvenes

En estos vinos se buscan colores rojos intensos o violáceos, aromas frutales, que sean frescos y que tengan cuerpo, pero hay que evitar en ellos una acusada sensación tánica y herbácea. Se propone como momento de la vendimia para vinos tintos jóvenes un contenido en sólidos solubles de 20,9-23,8 °Brix (12-14 % v/v de alcohol probable) y una acidez del mosto de 6 a 7 g/L expresados en ácido tartárico. En general, el índice de polifenoles totales (IPT) en tinto joven de calidad debe estar comprendido entre 35-40 y el contenido de antocianos en estos vinos debe ser como mínimo de 400 mg/L⁷.

Vinos tintos de crianza

Lo que se persigue conseguir en estos vinos principalmente es un buen contenido en polifenoles. Para ser destinado a crianza, un vino debe poseer como mínimo un IPT de 60, de lo contrario probablemente se oxide y al final del proceso habrá perdido gran parte de su color. Además, los vinos que se destinen a crianza deben ser vinos con un grado alcohólico elevado y un pH bajo (menor de 3,50 unidades). Para que un vino sea apto para la crianza, las condiciones óptimas serían un contenido mayor de 800 mg/L de antocianos, más de 3 g/L de taninos y más de 60 de IPT⁷. Ello se consigue en gran medida ajustando lo más posible el momento de la recolección a la madurez fenólica. Para conseguir estas condiciones en la uva en climas cálidos, como es el caso de algunas zonas vitícolas andaluzas, será necesario vendimiar con una cierta sobremaduración de la pulpa, con contenidos de sólidos solubles cercanos a 23,8-24,6 °Brix (14-14,5 % v/v de alcohol probable) para conseguir una proporción de polifenoles adecuada y sobre todo una mayor maduración de las pieles y las semillas. Aun así, a veces ocurre que cuando la maduración de la pulpa es muy rápida por las elevadas temperaturas del verano, se llega a concentraciones de azúcar muy elevadas y a contenidos de antocianos adecuados, pero las semillas aún no están maduras.

4

PARÁMETROS BÁSICOS DE ANÁLISIS DE MOSTOS Y VINOS

4.1 Peso medio de la baya

Definición

El peso medio de la baya es la medida representativa de la masa de los frutos de una parcela expresada como g por 100 bayas o g por baya.

Es un carácter varietal y está relacionado con el estado hídrico de la planta sobre todo durante el periodo preenvvero y en menor medida durante la maduración.

Importancia enológica

El incremento del peso medio de las bayas es mayor al inicio de la maduración y conforme transcurre esta, el ritmo es cada vez menor hasta llegar a un máximo y estabilizarse al alcanzar la madurez. A partir de entonces, comienza la sobremaduración, momento en el que se producen pérdidas motivadas por la evaporación de agua y la combustión respiratoria de los ácidos, y por lo tanto, valores menores del peso medio de la baya. Controlando el peso de un muestreo representativo de bayas, es posible definir la maduración y el inicio de la sobremaduración del viñedo, ayudando a decidir el momento de vendimia y evitar mermas de producción indeseadas.

Método de análisis

Material

- Tijeras.
- Balanza analítica.
- Vasos de precipitados de 500 mL.

Procedimiento

- Si la muestra llega como racimos enteros, trocearlos en escadas de entre 15 a 20 bayas.
- Extender la muestra en una bandeja.
- Tomar unas 5 bayas por escada y cortar con cuidado con unas tijeras a ras de la cabeza del pedúnculo, sin arrancarlo. Obtener de esta forma 200 bayas.
- Tarar en la balanza los vasos de precipitados.
- Repartir las bayas al azar en 2 vasos de precipitados con 100 bayas y pesar cada grupo en una balanza analítica.

Cálculo y expresión de los resultados

El resultado es la media de las dos medidas expresada en g con un decimal.



Figura 10, 11 y 12. Proceso de corte, conteo y pesaje de 100 bayas de uva Pedro Ximénez

4.2 Sólidos solubles

Definición

Los sólidos solubles de los mostos y los vinos constituyen el conjunto de las sustancias presentes, diferentes al agua, que se encuentran en la muestra en fase líquida. Su medida en los mostos refleja la influencia de los compuestos disueltos más pesados que el agua (azúcares, ácidos, sales, etc), mientras que, en el caso de los vinos, su determinación refleja la influencia resultante de los efectos contrapuestos de las sustancias más pesadas (azúcares, ácidos, sales, etc) y de las más ligeras (etanol, ésteres, etc) presentes en la muestra que se analiza.

Importancia enológica

El conocimiento de los sólidos solubles aporta información acerca de la maduración de la pulpa de la uva, lo que ayudará a optimizar el momento de vendimia. Este parámetro está relacionado con el alcohol probable del vino.

Métodos de análisis

Existen varios métodos para su determinación, los más habituales son los métodos físicos refractometría y areometría.

Los resultados pueden expresarse en diferentes unidades:

- **Grado Brix o Balling (°Brix o % m/m sacarosa).** Indican los g de sacarosa en 100 g de líquido. Por ejemplo: un mosto con 180 g de azúcares por kg de mosto tiene 18 °Brix.
- **Grado Baumé (°Bé).** Es una unidad muy utilizada para expresar la densidad de las disoluciones de sal común. El agua pura tiene 0 °Bé a 15 °C, mientras que una disolución acuosa del 15 % de cloruro sódico a la misma temperatura le corresponden 15 °Bé. El uso de esta unidad en enología se debe a que su determinación en mosto proporciona un dato muy aproximado sobre su grado alcohólico potencial. Estrictamente hablando es exacto únicamente para 10 °Bé que corresponden a 10 % v/v de alcohol probable, mientras que valores por debajo o por encima de dicho valor proporcionan diferencias.
- **Masa volúmica (g/mL),** o densidad, es el cociente de la masa de un determinado volumen de mosto o vino a 20 °C por ese volumen. La temperatura de referencia es 20 °C y se simboliza por ρ_{20} . Se expresa en gramos por mililitro (g/mL), en gramos por centímetro cúbico (g/cm³), en gramos por litro (g/L) o en gramos por decímetro cúbico (g/dm³).
- **Grado alcohólico volumétrico potencial o grado alcohólico probable (% v/v o % vol.).** Es el número de volúmenes de alcohol puro, a temperatura de 20 °C, que pueden obtenerse por fermentación total de los azúcares contenidos en 100 volúmenes de mosto a dicha temperatura (R 1308/2013). Se considera que existe una correlación lineal entre los valores de azúcar en g/L y el grado alcohólico probable. Aproximadamente 17 g/L de azúcar producirán 1 % v/v.

$$\text{Azúcares (g/L)} \times 0,05943 = \text{Grado alcohólico probable (\% v/v)}$$

Como muestra de control es posible utilizar una disolución de 25 °Brix preparada a partir de 25 g de sacarosa de alta pureza y completando hasta 100 g con agua destilada.

4.2.1 Determinación de sólidos solubles por refractometría

El fundamento de este análisis radica en las variaciones que experimenta el índice de refracción de un líquido al modificarse su contenido en sustancias disueltas. Los refractómetros son instrumentos ópticos de precisión que pueden ser manuales o de mesa. La refractometría es el método de referencia para la determinación de la concentración de azúcares en mostos, mostos concentrados y mostos concentrados rectificados (OIV-MA-A52-02⁸).

Los refractómetros de mesa más frecuentes en la actualidad suelen disponer de compensación de temperatura automática a 20 °C. En caso contrario, es necesario hacer la correspondiente corrección usando la tabla del [Anexo I](#). Es posible encontrar refractómetros que presentan los valores en distintas unidades como °Brix, °Bé, grado alcohólico probable, el propio índice de refracción y otras escalas menos frecuentes o escalas utilizadas para otros alimentos (°Oechsle, °Plato, etc).

El alcohol constituye la principal interferencia en la medición del índice de refracción. Por ello no se deben usar refractómetros para determinar los sólidos solubles de mostos que estén fermentando.

Una de las grandes ventajas del método es la mínima cantidad de muestra necesaria, aunque a su vez conlleva el principal inconveniente, que son los graves errores que se cometen si las muestras no son representativas. Por este motivo, se insta a realizar el análisis sobre mosto de una muestra de uva suficientemente representativa de la parcela, o mosto de un depósito bien homogeneizado.

Equipos y material

- Refractómetro manual o digital.
- Termómetro.
- Agua destilada.
- Pipetas *Pasteur* desechables.
- Papel secamanos.

Procedimiento

Se utiliza el mosto previamente decantado, para que no haya sólidos visibles en suspensión.

Refractómetro manual:

- Previamente a la realización de la medida, se ha de verificar la calibración. Para ello, limpiar con agua destilada y secar cuidadosamente la tapa y el prisma con papel secamanos por absorción sin frotar. A continuación, poner unas gotas de agua destilada a 20 °C en el prisma con la ayuda de una pipeta *Pasteur*. Al cerrar la tapa se forma una película repartida homogéneamente entre la tapa y el prisma. Evitar que se formen burbujas de aire, ya que esto podría tener un efecto negativo en el resultado de la medición.
- Sostener el refractómetro hacia la luz solar y observar la escala a través del ocular. El límite claro/oscuro (línea de agua) ha de estar situado en el 0. Si el límite claro/oscuro no se encuentra en 0, ajustar con el tornillo de calibración con la ayuda de un destornillador.
- En primer lugar, tomar nota de la temperatura del mosto.

- Lavar tres veces con la muestra el prisma y la tapa, vertiendo unas gotas de muestra sobre el prisma, cerrando la tapa, abriendo y secando con papel secamanos. Poner unas gotas de muestra en el prisma, cerrar la tapa evitando burbujas, dirigir el refractómetro hacia la luz y observar el valor del límite claro/oscuro obteniendo la lectura. Es conveniente realizar dos lecturas de cada muestra.
- Si la temperatura del mosto fuese diferente a 20 °C, la lectura obtenida ha de corregirse utilizando las diferentes tablas disponibles en el [Anexo I](#).



Figura 13. Refractómetro manual y sus partes



Figura 14. Carga de muestra en el refractómetro manual

Refractómetro digital o de mesa:

Aunque existen diferencias de manejo según el modelo, el procedimiento a seguir es similar. En todos los casos, previo a la medida de la muestra, se ha de calibrar utilizando agua destilada para posteriormente proceder a realizar la medición de las muestras.

- Comprobar que el equipo se encuentra situado en una superficie firme y no presenta desperfectos, prestando atención sobre todo a las tomas de electricidad si las tuviese.
- Limpiar tres veces con agua destilada y secando con papel secamanos por absorción el prisma y la tapa si el equipo dispusiese de ella, y terminar depositando unas gotas de agua destilada en el prisma. Cerrar la tapa o en caso de no disponer, evitar la luz directa sobre el prisma.
- En refractómetros no automáticos, ajustar con la rueda la línea claro/oscuro sobre la marca visible a través del visor (en refractómetros automáticos no es necesario ni posible) y pulsar en el botón de “calibrado” o “zero”.
- Limpiar tres veces el prisma con la muestra a medir, depositar unas gotas sobre el prisma y tomar la medida pulsando el botón “lectura” o “read”.



Figura 15. Refractómetro digital con corrección de temperatura

- Entre muestras no es necesario limpiar con agua. Lo adecuado es limpiar tres veces con la muestra siguiente.
- Es conveniente realizar dos lecturas de cada muestra.
- Si el refractómetro no dispusiese de corrección de temperatura automática, se ha de tomar la temperatura de cada muestra antes de cada medida para posteriormente corregir a 20 °C usando la tabla del [Anexo I](#).
- Una vez acabada la sesión de análisis, limpiar con agua destilada tres veces el prisma absorbiendo con papel secamanos.

4.2.2 Determinación de sólidos solubles por areometría

Los areómetros o densímetros, basados en el principio de Arquímedes, flotan en el líquido a analizar y dan una medida del peso específico de la disolución, que está relacionado con el contenido total de sólidos solubles en esa disolución. La areometría se considera método auxiliar por la OIV para la determinación de la masa volúmica (OIV-MA-A52-01B)⁸.

Equipos y material

- Areómetros de escala variable graduados en °Brix, °Bé o masa volúmica.
- Termómetro.
- Probetas cilíndricas de 250 mL de capacidad.



Figura 16. Densímetros escalados en g/dm³ a 20 °C

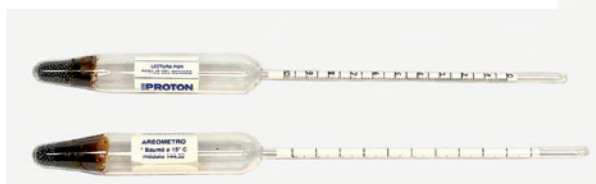


Figura 17. Areómetros con escala °Bé a 15 °C

Procedimiento

- Transferir a la probeta unos 200 mL de mosto, teniendo cuidado para que se formen la menor cantidad de burbujas. La probeta debe estar sobre una superficie nivelada.
- Sumergir el termómetro y agitar para uniformar la temperatura. Después de un minuto, se lee la temperatura y se retira el termómetro. Si la temperatura de la muestra no es de 20 °C, es posible atemperar la muestra a dicha temperatura o corregir los resultados a posteriori para expresarlos a 20 °C. Usando el [Anexo II](#) es posible corregir la masa volúmica cuando es medida a temperatura diferente de 20 °C en mostos, mostos concentrados y vinos.
- Elegir un areómetro con la escala en un rango apropiado y sumergirlo en la solución con un suave movimiento de rotación.
- Cuando alcance el nivel estable de flotación, anotar la lectura. Dependiendo del areómetro utilizado, la lectura se realizará por encima o debajo del menisco, esta información está indicada en el cuerpo del areómetro.

- Si el areómetro se hunde al fondo, hay que utilizar uno de escala inferior. Si queda flotando, dejando al aire todo el vástago, hay que utilizar uno de escala superior.



Figura 18. Determinación de sólidos solubles por areometría

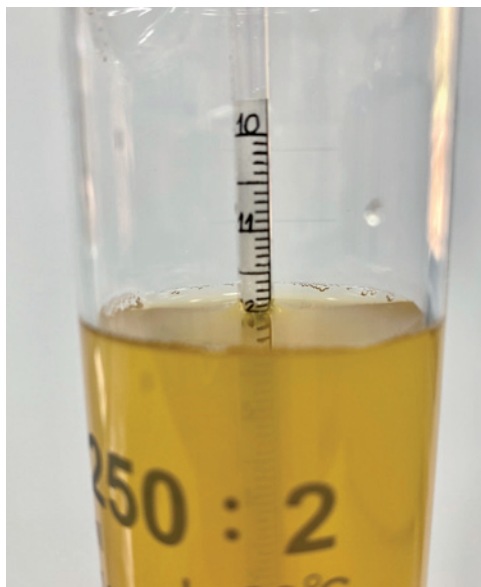


Figura 19. Detalle del menisco sobre el vástago donde se realiza la lectura

Cálculos y expresión de resultados

El resultado puede representarse en las diferentes unidades ya mencionadas, siendo las más frecuentes el °Brix o °Bé expresados con un decimal y el grado alcohólico probable (% v/v) expresado con dos decimales. La expresión de los resultados como masa volúmica expresada en g/mL o g/cm³ con cuatro decimales también es frecuente, o directamente el índice de refracción con cinco decimales.

Es posible transformar los valores de una unidad a otra usando tablas de equivalencia como la propuesta por la OIV en la Resolución OIV-ENO 466-2012⁸, donde se incluye el porcentaje en masa de sacarosa o °Brix, índice de refracción, masa volúmica, azúcares en g/L, azúcares en g/kg y grado alcohólico probable o la presentada en el [Anexo III](#), donde además se incluyen los sólidos solubles en °Bé.

Para la transformación entre unidades también es posible utilizar las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned}\text{Grado alcohólico probable (\% v/v)} &= (0,6757 \times \text{°Brix}) - 2,0839 \\ \text{Sólidos solubles (°Brix)} &= (600,90502 \times \text{Índice de refracción}) - 799,58215 \\ \text{Sólidos solubles (°Brix)} &= 1,8 \times \text{Sólidos solubles (°Bé)}\end{aligned}$$

Estas fórmulas son buenas aproximaciones en el rango de 15 a 25 °Brix.

4.3 pH y acidez total

Definición

En enología, la acidez de un mosto o vino se expresa a través de dos conceptos complementarios: la acidez real o pH y la acidez total. Cada una de ellas reviste una importancia distinta con respecto al equilibrio fisicoquímico u organoléptico.

La acidez real expresada por el pH, constituye una medida de los protones cedidos al agua por parte de las especies con actividad ácida en la muestra¹. El valor del pH del mosto o vino depende más del tipo de ácido que de la concentración, ya que unos ácidos son más fuertes y otros más débiles, disociándose en mayor o menor medida.

El pH se mide mediante la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en el líquido que se estudia. Uno de los electrodos tiene un potencial que es una función definida del pH del líquido, el otro tiene un potencial fijo y conocido y constituye el electrodo de referencia.

La acidez total o titulable es la suma de todos los ácidos presentes en la muestra cuando se titula o valora con hidróxido sódico (NaOH) hasta pH 7. El dióxido de carbono (CO₂) y dióxido de azufre (SO₂) no se incluyen en la acidez total.

Otros conceptos utilizados clásicamente en enología son la acidez fija, que refleja el contenido en ácidos libres del vino no susceptibles de ser eliminados por destilación, y la acidez volátil, que se refiere a los ácidos libres y salificados que se pueden eliminar por destilación. La acidez total corresponde a la suma de la acidez fija y la acidez volátil.

Importancia enológica

El pH y la acidez total son de gran importancia durante todas las etapas. En la maduración de la uva se utiliza junto con los azúcares como índice de madurez para determinar la fecha óptima de vendimia. La fermentación alcohólica se desarrolla con menos desviaciones y los vinos que se obtienen son más equilibrados química y organolépticamente cuando su pH y acidez son los adecuados.

Generalmente, muestras de vino con pH bajo se corresponden con unos elevados contenidos en acidez total y viceversa. Sin embargo, es posible encontrar vinos que, teniendo un pH relativamente alto, contienen una acidez alta. Esto es debido en la mayoría de los casos a contenidos altos de acidez volátil.

La estabilidad de un vino, la fermentación maloláctica, el color, el potencial redox y la efectividad del dióxido de azufre están estrechamente relacionados con el pH del vino. Por tanto, su valor influye en la calidad organoléptica y en la evolución química y microbiológica de los vinos.

Los valores de acidez total en un vino no deben ser inferiores a 3,50 g/L expresados en ácido tartárico⁹.

4.3.1 Método de análisis del pH

El método descrito corresponde al método OIV-MA-AS313-15. Método de referencia⁸.

Equipos y material

- pHmetro con compensación de temperatura.
- Vaso de precipitados de 100 mL.

Reactivos

- Agua destilada.
- Disolución Tampón pH 7 (20 °C).
- Disolución Tampón pH 4 (20 °C).

Procedimiento

- Comprobar que el equipo no presenta desperfectos ni roturas. Verificar el nivel de KCl 3 M del interior del electrodo y rellenar si fuera necesario. Comprobar que no queden burbujas en el cuerpo del mismo.
- Calibrar el pHmetro con las soluciones tampón, usando los vasos de precipitados lo suficientemente llenos para que el borde inferior de la membrana del electrodo quede sumergido en la disolución, manteniendo la agitación constante ya sea mediante agitador magnético, agitador mecánico o manualmente, y teniendo la precaución de enjuagar bien el electrodo y la sonda de temperatura con agua destilada y secar por contacto con papel secamanos entre un tampón y otro.
- Verter una cantidad suficiente de mosto o vino en el vaso de precipitados como para poder introducir el electrodo del pHmetro en el líquido y agitar continuamente mientras se hace la medida, que se ha de hacer eligiendo la opción de medida por estabilidad en el pHmetro.
- Cuando la medida se detenga, anotar el valor de pH.
- Lavar el electrodo entre muestras con agua destilada y secar con papel secamanos por contacto sin fricción.
- Durante la jornada, el electrodo y la sonda de temperatura se dejan sumergidos en agua destilada.
- En el caso de que el pHmetro no cuente con compensación automática de la temperatura, o bien llevar la muestra a 20 °C o medirla con un termómetro e introducirla en el equipo.

4.3.2 Método de análisis de la acidez total

El método de determinación de la acidez total es una valoración ácido - base hasta un valor de pH 7. Se puede determinar el punto final de la valoración empleando un método potenciométrico, con un pHmetro o bien utilizando una sustancia indicadora de pH. El método OIV-MA-AS313-01 es considerado de referencia⁸.

El tratamiento de muestra es igual en ambos métodos. Esta debe estar decantada o centrifugada o filtrada y libre de CO₂. En muestras con CO₂ evidente como vinos espumosos o de aguja, se debe desgasificar bien por agitación, ultrasonidos o filtración al vacío.

Valoración por potenciometría

Equipos y material

- pHmetro con compensación de temperatura.
- Bureta de 25 mL con divisiones de 0,1 mL.
- Pipeta aforada de 10 mL.
- Vaso de precipitados de 100 mL.

Reactivos

- Solución Tampón pH 7 (20 °C).
- Solución Tampón pH 4 (20 °C).
- Hidróxido sódico 0,1 M.

Procedimiento

- Calibrar el pHmetro con las disoluciones tampón pH 7 y pH 4 a 20 °C como se explica en el apartado 4.3.1.
- Pipetear 10 mL de muestra en un vaso de precipitados de 100 mL.
- Añadir agua destilada hasta conseguir suficiente volumen para que el borde inferior de la membrana del electrodo quede sumergido.
- Introducir el electrodo de pH junto con la sonda de temperatura y realizar la medida de pH en la opción de medida en continuo con agitación constante de la muestra ya sea mediante agitador magnético o manualmente.



Figura 20. Medida de acidez total por potenciometría

- Valorar vertiendo con la bureta lentamente y en agitación continua, el hidróxido sódico 0,1 M. Se considera el punto final de la valoración cuando se llega a pH 7. Anotar los mL gastados de hidróxido sódico 0,1 M.

Valoración con indicador de pH

Equipos y material

- Bureta de 25 mL con divisiones de 0,1 mL.
- Pipeta aforada de 10 mL.
- Vaso de precipitados de 100 mL.

Reactivos

- Hidróxido sódico 0,1 M.
- Azul de bromotimol 4 g/L.

Procedimiento

- En el vaso de precipitados, añadir unos 30 mL de agua destilada, 1 mL de azul de bromotimol y pipetear 10 mL de la muestra.
- En agitación constante mediante agitación magnética o manualmente, valorar utilizando la bureta, añadiendo lentamente hidróxido sódico 0,1 M hasta que se observe el viraje de verde a verde azulado.
- Anotar el volumen gastado de hidróxido sódico 0,1 M.

Cálculos y expresión de los resultados

La acidez total en mostos y vinos se expresa en g/L de ácido tartárico o en g/L de ácido sulfúrico con dos decimales tras haber realizado la medida por duplicado. El factor de multiplicación procede de las fórmulas siguientes:

$$\text{Acidez total (g ác. Tartárico/L)} = \frac{N_{\text{NaOH}} \times P_{\text{equivalente del ác. Tartárico}} \times V_{\text{NaOH}} \text{ (mL)}}{V_{\text{muestra}} \text{ (mL)}}$$

$$\text{Acidez total (g ác. Sulfúrico/L)} = \frac{N_{\text{NaOH}} \times P_{\text{equivalente del ác. Sulfúrico}} \times V_{\text{NaOH}} \text{ (mL)}}{V_{\text{muestra}} \text{ (mL)}}$$

Siendo:

$P_{\text{equivalente del } \text{ác. Tartárico}} = 75 \text{ g/mol}$

V_{NaOH} : volumen de hidróxido sódico consumido

$P_{\text{equivalente del } \text{ác. Sulfúrico}} = 49 \text{ g/mol}$

V_{muestra} : volumen de muestra

N_{NaOH} : concentración del hidróxido sódico

Para 10 mL de muestra e hidróxido sódico 0,1 M se obtienen los siguientes factores de multiplicación:

$$\text{Acidez total (g } \text{ác. Tartárico/L)} = 0,75 \times V_{\text{NaOH}}$$

$$\text{Acidez total (g } \text{ác. Sulfúrico/L)} = 0,49 \times V_{\text{NaOH}}$$

Para cambiar de la expresión en g de ácido tartárico a g de ácido sulfúrico y viceversa se utilizan los siguientes factores:

$$\text{g } \text{ác. Tartárico/L} = 1,53 \times \text{g } \text{ác. Sulfúrico/L}$$

$$\text{g } \text{ác. Sulfúrico/L} = 0,653 \times \text{g } \text{ác. Tartárico/L}$$

Notas

- Si se emplea para la valoración la solución comercial de hidróxido sódico 0,204 M (N/4,9) y el volumen de muestra utilizado es de 10 mL, el volumen en mL de hidróxido sódico consumido es directamente la acidez total expresada en g de ácido sulfúrico/L.
- Es posible realizar el análisis de pH y acidez total a la vez mediante potenciometría pipeteando 50 mL de muestra, midiendo el pH de la misma, y sobre esta, sin necesidad de añadir agua destilada, titular con hidróxido sódico 0,5 M hasta pH 7. Los factores de multiplicación son iguales a los descritos anteriormente.

4.4 Nitrógeno fácilmente asimilable

Definición

El nitrógeno puede encontrarse en los mostos en distintas formas, distinguiéndose el nitrógeno mineral como el catión amonio (NH_4^+) y el nitrógeno orgánico como aminoácidos libres, polipéptidos, proteínas, nitrógeno nucleico y aminos biógenas.

El parámetro “Nitrógeno Fácilmente Asimilable” (NFA) incluye el catión amonio (nitrógeno inorgánico) y los aminoácidos (nitrógeno orgánico), que son las formas nitrogenadas indispensables para la nutrición de las levaduras.

Importancia enológica

Los compuestos nitrogenados presentes en el mosto desempeñan una función importante en la fermentación. La concentración de nitrógeno asimilable es un factor influyente sobre la cinética en la mayoría de las fermentaciones y por eso su control es fundamental para que se desarrolle esta sin problemas, ya que un exceso puede provocar uretanos, sustancias carcinogénicas con límites máximos en diferentes países y un defecto puede dar lugar a fermentaciones lentas, paradas de fermentación y formación de compuestos azufrados en el vino final. La proporción entre nitrógeno orgánico e inorgánico también afecta a la calidad sensorial del vino, ya que la formación de alcoholes superiores y los ésteres aromáticos de estos, dependen de los aminoácidos consumidos.

El valor de NFA necesario depende del contenido en sólidos solubles del mosto, de la variedad de vid y de la cepa de levadura inoculada; valores por debajo de 150 mg/L pueden ocasionar finales de fermentación difíciles.

Método de análisis

Para la determinación del NFA uno de los métodos más empleados es el de *Sørensen* o titulación con metanal. Este método consiste en la adición al mosto de una solución de metanal (formaldehído) en unas condiciones de pH adecuadas y posterior valoración con hidróxido sódico. Este método no está recogido en el Compendio de Métodos de Análisis Internacional de Vinos y Mostos de la OIV. El procedimiento es similar al método “Índice de formol” descrito en “Métodos oficiales de análisis. Productos derivados de la uva aguardientes y sidras” publicado por *Panreac* en 1999¹⁰, y utilizando un factor de multiplicación para convertir dicho índice en mg de NFA/L¹¹.

Equipos y material

- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Bureta.
- pHmetro.
- Pipeta de 25 mL.
- Cuentagotas.

Reactivos

- Hidróxido sódico 1 M.
- Hidróxido sódico 0,1 M.
- Solución de metanal al 35 % corregida a pH 8,1 con hidróxido sódico 0,1 M.
- Peróxido de hidrógeno 30 % p/v (100 volúmenes).

Procedimiento

- Transferir 25 mL de muestra filtrada a un vaso de precipitados, añadir 3 o 4 gotas de peróxido de hidrógeno y ajustar a pH 8,1 adicionando hidróxido sódico 1 M y finalmente 0,1 M (puede emplearse fenolftaleína como indicador, siendo preferible el uso de pHmetro).
- Adicionar 10 mL de la solución de metanal (al 35 % neutralizada con hidróxido sódico hasta pH 8,1).
- Agitar bien y esperar 1 minuto exacto.
- Valorar hasta pH 8,1 con hidróxido sódico 0,1 M.
- Anotar los mL consumidos.

Cálculos y expresión de los resultados

El cálculo se realiza con la fórmula siguiente:

$$\text{NFA (mg/L)} = n \times 56$$

Siendo n los mL de hidróxido sódico 0,1 M consumido.

El resultado es la media de las dos medidas realizadas y expresada sin decimales.

4.5 Azúcares reductores

Definición

Los azúcares reductores son el conjunto de los azúcares con función cetónica o aldehídica presentes en mostos de uva y vinos, y que presentan un efecto reductor sobre una disolución alcalina de cobre (II).

Los azúcares predominantes en la uva son la glucosa y la fructosa, fácilmente consumibles por levaduras y bacterias. En los vinos secos, donde durante la fermentación alcohólica se han consumido toda la fructosa y la glucosa, la fracción de azúcares reductores está compuesta principalmente por pentosas (arabinosa, xilosa y ribosa) no fermentables. Las cantidades de azúcares reductores que queda en los vinos tras la fermentación oscila entre los 0,3 y 2 g/L.

Importancia enológica

Esta determinación tiene por objeto conocer la concentración de azúcar en la uva, mosto y vino. En el caso de la uva, permite seguir la evolución de la maduración y ayuda a determinar la fecha de vendimia. Durante la fermentación del mosto, su determinación posibilita un seguimiento del proceso para detectar posibles paradas fermentativas y es necesaria para fijar

el momento de intervención en el caso de perseguir vinos no secos y con contenidos variables de azúcar. En el vino es útil para detectar fehacientemente el fin de la fermentación alcohólica y controlar la posible presencia de azúcares residuales para evitar fenómenos de refermentación que puedan provocar alteraciones fisicoquímicas importantes.

También se utiliza en la clasificación de los vinos según su concentración de azúcares.

4.5.1 Método de Análisis *Rebelein*

El método *Rebelein*¹² se basa en la capacidad de la glucosa y la fructosa de reducir sales cúpricas. El cobre en exceso que queda después de la reacción con el azúcar se reduce con ion yoduro produciendo una cantidad equivalente de yodo, el cual se valora a continuación con tiosulfato sódico. Para no tener que normalizar los reactivos, se valora un blanco (sin azúcares) de agua destilada. El resultado se calcula comparando la valoración de la muestra con la del blanco.

Equipos y material

- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Matraces *erlenmeyer* de 200 mL.
- Pipetas de 2, 5 y 10 mL o micropipetas regulables de 5 y 10 mL.
- Placa calefactora.
- Bureta de 25 mL.
- Papel de filtro.
- Granos de piedra pómez.

Reactivos

- Solución de sulfato de cobre: pesar 41,95 g de sulfato de cobre pentahidratado, disolver con agua destilada y enrasar hasta un volumen final de 1 L.
- Solución alcalina (sal de *Seignette*): puede utilizarse la solución comercial de *Fehling B* o bien prepararla de la siguiente forma:
 - * Solución a: en aproximadamente 400 mL de agua destilada, disolver 250 g de tartrato sódico potásico.
 - * Solución b: en aproximadamente 400 mL de agua destilada, disolver 80 g de hidróxido sódico.
 - * Combinar cuidadosamente las soluciones a y b en un matraz aforado de 1 L y enrasar con agua destilada.
- Solución de yoduro potásico: pesar 300 g de yoduro potásico, adicionar 300 mL de agua destilada. Una vez mezclado y disuelto, completar hasta un volumen final de 1 L con agua destilada.

- Solución de almidón 2 %: preparar disolviendo 20 g de almidón soluble en 800 mL de agua hirviendo. Mantener la ebullición durante 10 minutos. Una vez fría, filtrar si fuese necesario y enrasar hasta 1 L con agua destilada.
- Ácido sulfúrico 16 % v/v: en un matraz aforado de 1 L, introducir unos 700 mL de agua destilada fría, y verter sobre ella lentamente y con la máxima precaución 160 mL de ácido sulfúrico al 98 %. Dejar enfriar hasta unos 20 °C y enrasar hasta 1 L con agua destilada.
- Tiosulfato sódico: pesar 13,66 g de tiosulfato sódico pentahidratado, añadir unos 200 mL de agua destilada y disolver. Enrasar hasta un volumen final de 1 L con agua destilada. También es posible preparar a partir de 55,1 mL de tiosulfato sódico 1 M enrasado a 1 L con agua destilada.
- Carbón activo.

Procedimiento

Tratamiento de la muestra

El tratamiento consiste en la eliminación de la muestra de sustancias que pudieran interferir en el análisis, principalmente polifenoles, ya que, al ser también sustancias reductoras, se produciría un error por exceso.

Tradicionalmente, la eliminación de estas interferencias se ha realizado mediante defecado con acetato de plomo. Como método alternativo se propone realizar una decoloración con carbón activo.

- Disolver entre 0,5 y 2 g (según sea vino blanco o tinto) de carbón activo en unos 50 mL de vino.
- Filtrar con papel de filtro doble para retirar el carbón activo. Si la muestra todavía presentase color tinto, se debe añadir más carbón activo y volver a filtrar.

Si se estimase que la muestra presenta un contenido en azúcares reductores superior a 25 g/L, como en el caso de los mostos, es necesario realizar diluciones que han de tenerse en cuenta a la hora de realizar los cálculos.

Valoración de la muestra

- En un matraz *erlenmeyer* de 200 mL añadir 2 mL de muestra decolorada, 10 mL de la disolución de sulfato de cobre, 5 mL de solución alcalina y 4 o 5 gránulos de piedra pómez.
- Llevar a ebullición, mantenerla durante 1 minuto y medio exactamente. Enfriar rápidamente con un chorro de agua fría.
- Cuando este fría adicionar 10 mL de solución de yoduro potásico, 10 mL de solución de ácido sulfúrico al 16 % y 10 mL de la solución de almidón.
- Mezclar y valorar con tiosulfato sódico hasta un punto final de color blanco-amarillo-crema.
- Anotar los mL consumidos (V_M).

Valoración del blanco

- La valoración del blanco ha de realizarse en cada sesión de análisis y cada vez que se sustituyan reactivos.
- Realizar el procedimiento anterior sustituyendo los 2 mL de muestra por 2 mL de agua destilada.
- Anotar los mL consumidos (V_B).

Cálculos y expresión de resultados

La concentración de azúcares reductores se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{g/L de azúcares reductores} = (V_B - V_M) \times \text{Dilución}$$

Siendo:

V_M = mL consumidos en la valoración con el tiosulfato para la muestra de vino.

V_B = mL consumidos en la valoración con el tiosulfato para la muestra de agua.

Dilución = factor de dilución al que se ha sometido la muestra.

Se realizarán dos medidas por cada muestra. El resultado se expresa con un decimal.

4.5.2 Método simplificado

Este método cualitativo permite determinar el final de fermentación alcohólica, es decir, si el contenido en azúcares reductores es menor de 2 g/L.

Material y equipos

- Matraces *erlenmeyer* de 50 mL.
- Pipetas de 2 y 5 mL o micropipeta regulable de 5 mL.
- Placa calefactora.
- Granos de piedra pómez.

Reactivos

- *Fehling A* (Solución de Sulfato cúprico): disolver 69,298 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en aproximadamente 600 mL de agua destilada y enrasar a 1 L con agua destilada.
- *Fehling B* (comercial).

Procedimiento

- En un matraz introducir 5 mL de vino, 2 mL de *Fehling A*, 2 mL de *Fehling B*, piedra pómez y un poco de agua destilada.
- Calentar sobre la placa calefactora hasta ebullición que se mantiene durante 2 minutos agitando. Retirar del fuego, enfriar y dejar que se deposite el precipitado en el fondo del matraz.
- Observar el color del líquido sobrenadante:
 - * Azul: menos de 2 g/L
 - * Amarillo: más de 2 g/L



Figura 21. Análisis cualitativo de fin de fermentación alcohólica. De izquierda a derecha: blanco con 0 g/L de azúcares reductores, muestra de vino con 1, 2, 5 y 10 g/L de azúcares reductores

4.6 Grado alcohólico volumétrico

Definición

El grado alcohólico volumétrico de una bebida es igual al número de litros de etanol contenido en 100 litros de solución hidroalcohólica con la misma densidad que el destilado de la bebida, medidos ambos volúmenes a la temperatura de 20 °C. En el grado alcohólico volumétrico están comprendidos el etanol y sus homólogos (metanol, alcoholes superiores, 2,3-butanodiol, etc) producidos durante la fermentación alcohólica y las posibles adiciones posteriores, como en los encabezados de los vinos de licor. Su símbolo es % vol. o % v/v.

Importancia enológica

El contenido en alcohol es importante porque de él dependen aspectos sensoriales como son el cuerpo y el sabor. Además, también ejerce efecto sobre la estabilidad y el color.

El grado alcohólico volumétrico adquirido de los vinos debe figurar obligatoriamente en la etiqueta del vino con un error de $\pm 0,5$ % v/v¹³.

Métodos de análisis

Los métodos de referencia están basados en la destilación del vino previa alcalinización con una suspensión de hidróxido cálcico para prevenir la entrada de ácidos volátiles y posterior medida de la densidad del destilado. La medida de la densidad se puede realizar por picnometría, mediante densímetro electrónico usando oscilador de frecuencia o mediante balanza hidrostática. Métodos comunes pero no de referencia, son la medición por hidrometría y refractometría.

Un método de rutina de uso muy común en bodegas es la ebuliometría. Este está basado en la disminución del punto de ebullición de las mezclas de agua y alcohol.

Los equipos necesarios para la determinación de la densidad de los destilados usando los métodos de referencia no suelen estar presentes en bodegas pequeñas y medianas, por lo que en este manual se recogen las dos posibles vías de destilación (común para los métodos de referencia y métodos comunes) y la determinación por hidrometría (OIV-MA-AS312-01B)⁸. Además, se describe el método de rutina ebuliométrico.

4.6.1 Determinación del grado alcohólico volumétrico por destilación e hidrometría

Equipos y material

- Montaje de destilación directa compuesto por:
 - * Matraz de fondo redondo de 1 L de capacidad con rodaje esmerilado.
 - * Columna rectificadora de 20 cm de largo o cualquier dispositivo para impedir el arrastre.
 - * Fuente de calor. Debe evitarse toda pirogenación de las materias extractivas mediante un dispositivo adecuado.
 - * Refrigerante de West de 40 cm de longitud, con circulación rápida de agua y dispuesto verticalmente.
 - * Terminación en un tubo afilado que conduzca el destilado al fondo del matraz aforado receptor.
- También puede utilizarse un equipo de destilación por arrastre a vapor. El resto de materiales, los reactivos y el procedimiento es similar.
 - * Matraz aforado de 200 mL.
 - * Termómetro.
 - * Alcohómetros normalizados.
 - * Probeta cilíndrica de 250 mL.
 - * Granos de piedra pómez.



Figura 22. Montaje de destilación directa para la determinación del grado alcohólico

Reactivos

- Lechada de cal. Suspensión de hidróxido cálcico 2M. Se prepara vertiendo con cuidado 1 L de agua caliente (60-70 °C) sobre 120 g de cal viva (CaO).
- Papel indicador de pH.

Procedimiento

- Medir 200 mL de vino utilizando el matraz aforado.
- Anotar la temperatura del vino. Usar vino atemperado a 20 °C simplifica los cálculos.
- Verter los 200 mL en el matraz del montaje de destilación. Lavar el matraz aforado cuatro veces con 5 mL de agua destilada que se verterán en el matraz del equipo de destilación.
- Añadir 10 mL de lechada de cal. Comprobar que se tiene un medio básico utilizando el papel indicador.
- Añadir fragmentos de material poroso (piedra pómez o fragmentos de porcelana).
- Introducir el tubo final de salida del destilador en el matraz aforado de 200 mL que se utilizó para medir el volumen de vino.
- Encender la fuente de calor e iniciar la destilación. Se debe recoger un volumen de destilado aproximadamente las tres cuartas partes del volumen inicial (150 mL).
- Enrasar con agua destilada a una temperatura igual a la de la muestra de vino.
- Mezclar con precaución mediante un movimiento circular.
- La lectura del grado alcohólico se realiza por areometría. Para ello, verter el destilado en la probeta cilíndrica, mantener la probeta en posición vertical, introducir el termómetro y anotar la lectura. A continuación, introducir el alcoholómetro y leer el grado tras un minuto de reposo. Realizar al menos tres lecturas.

Cálculos y expresión de los resultados

El grado aparente medido a una determinada temperatura, medida en grados centígrados debe corregirse del efecto de la temperatura con el uso del [Anexo IV](#).

$$\% \text{ v/v (20 °C)} = \text{lectura grado alcohólico} \pm c$$

Siendo c el término que se obtiene por interpolación utilizando el [Anexo IV](#). El resultado se expresará con dos cifras decimales.

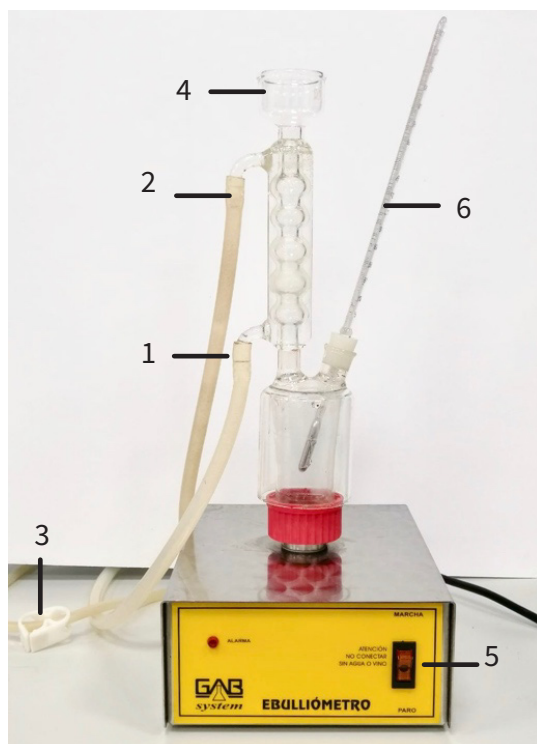
4.6.2 Determinación del grado alcohólico volumétrico por ebuliometría

La ebuliometría se basa en la disminución del punto de ebullición causado por la presencia del alcohol en una muestra acuosa. La diferencia entre el punto de ebullición de la muestra y el del agua pura se relaciona con el porcentaje de etanol. En condiciones normales (760 mmHg/cm³) el punto de ebullición del agua es 100 °C y el del alcohol 78,5 °C. Una mezcla de alcohol y agua que se mantenga constante mediante un refrigerante a reflujo, hervirá a una temperatura tanto más próxima a la del agua cuanto menos alcohol contenga y viceversa. La principal interferencia en esta determinación es el contenido en azúcares, por lo que para vinos dulces es preferible usar otro método de análisis, o realizar una destilación previa.

En ocasiones el método ebuliométrico da resultados más elevados, entre 1 y 2 décimas en comparación con el método oficial, por lo que es buen método de rutina, pero ha de utilizarse con precaución para partidas comerciales.

Equipos y material

- Ebuliómetro.
- Termómetro.
- Ábaco de interpretación de resultados.



Partes:

- 1- Entrada de agua refrigerante
- 2- Salida de agua refrigerante
- 3- Llave de purga
- 4- Embudo de llenado
- 5- Interruptor de encendido
- 6- Termómetro

Figura 23. Ebuliómetro y sus partes

Procedimiento¹⁴

Determinación del punto de ebullición del agua

- Antes de iniciar el análisis, hacer circular agua por el refrigerante (1, 2), que debe permanecer circulando durante toda la sesión de análisis. Colocar el termómetro (6) con el debido cuidado, ajustando bien el tapón.
- Cerrar la llave de purga (3) y por el embudo sobre el refrigerante (4), verter agua destilada hasta la marca de nivel en el cuerpo de vidrio.
- Accionar el interruptor del equipo (5). El interruptor permanece iluminado mientras está activado.
- Llevar a ebullición y esperar a que la temperatura se estabilice. Anotar la temperatura de ebullición del agua.

Determinación del punto de ebullición del vino

- Apagar el interruptor, abrir la llave de purga.
- En cuanto se vacíe del todo el tubo de purga, inmediatamente verter unos 15 mL de la siguiente muestra por el embudo, esperar a que vuelva a vaciarse, cerrar la llave de purga y llenar con la muestra hasta la marca de nivel en el cuerpo de vidrio.
- Encender el interruptor para llevar a ebullición hasta estabilidad de la temperatura y anotar la temperatura de ebullición del vino.
- Al final de la sesión, volver a cargar con agua destilada y llevar a ebullición a modo de limpieza. Cada cierto número de sesiones es conveniente realizar una carga de limpieza con una disolución de hidróxido sódico 0,5 N o incluso agua con unas gotas de hipoclorito sódico.
- Por último, tras apagar el equipo, cerrar el flujo de agua refrigerante y retirar el termómetro pasados unos minutos teniendo la precaución de que puede continuar caliente.

Notas

- Nunca debe ponerse en marcha el equipo sin agua o vino en su interior, así como con el flujo de agua del refrigerante cerrado.
- El punto de ebullición varía con la presión atmosférica por lo que, en periodos de tiempo inestable, se debe determinar la temperatura de ebullición del agua cada dos o tres horas.
- Los azúcares reductores a concentración superior a 2 g/L producen interferencias que dan lugar a puntos de ebullición erróneamente bajos y por lo tanto grados alcohólicos más elevados de los reales.
- En una sesión de análisis, la forma que por experiencia recomendamos es iniciar con una ebullición de agua para limpieza, la ebullición de agua para la lectura de la temperatura, una

carga de un vino de grado alcohólico del rango de las muestras a determinar del que no se anota la temperatura, la serie de muestras a analizar, anotando las temperaturas de ebullición, y por último una carga de agua para limpieza.

Cálculo y expresión de los resultados

El resultado se calcula empleando uno de los ábacos con doble escala (temperatura de ebullición y grado alcohólico volumétrico). Ajustar el cero de la escala del grado alcohólico con el valor de la temperatura de ebullición del agua. Mantener la posición del ábaco e ir anotando la equivalencia de las temperaturas de ebullición de las muestras de vino frente al grado alcohólico volumétrico.



Figura 24. Ábacos para el cálculo del grado alcohólico por ebulliometría

O bien, sustituyendo los valores en la fórmula siguiente¹⁵:

$$\begin{aligned} \text{Diferencia de Temperatura (DT)} &= T^a \text{ de ebullición del agua} - T^a \text{ de ebullición del vino} \\ \text{Grado alcohólico volumétrico (\% v/v)} &= (0,1036 \times DT^2) + (0,1729 \times DT) + 2,7447 \end{aligned}$$

El resultado tras una doble medida se expresa con dos cifras decimales.

4.7 Acidez volátil

Definición

La acidez volátil es el conjunto de ácidos grasos pertenecientes a la serie acética (ácido acético, fórmico, butírico, etc) que se hallan en un vino, libres o combinados formando sales. Se excluyen los ácidos láctico, succínico, salicílico, sórbico, así como el CO_2 y el SO_2 , ya que introducen errores por exceso en los resultados finales.

Importancia enológica

La acidez volátil de los vinos es un parámetro fundamental en el control de la calidad, existe una estricta normativa respecto a la cantidad máxima autorizada en los mismos para su comercialización. El límite máximo para vinos blancos y rosados es de 1,08 g ácido acético/L y de 1,2 g ácido acético/L para vinos tintos (Anexo I C del Reglamento Delegado (UE) 2019/934)¹⁶. Se admite que los Estados miembros puedan conceder excepciones en determinados vinos de denominaciones de origen protegida o vinos cuyo grado alcohólico volumétrico sea igual o superior a 13 % v/v siempre que el Estado lo notifique a la Comisión.

La acidez volátil está constituida en un 99 % por ácido acético. El ácido acético es un producto secundario normal del crecimiento de las levaduras y se forma principalmente en las primeras etapas de la fermentación. Varios factores extrínsecos pueden afectar a la formación del ácido acético, incluyendo pH, azúcares, nitrógeno disponible y temperatura de fermentación, así como los efectos interactivos de otros microorganismos como levaduras no *Saccharomyces* y bacterias. En la práctica esta cantidad es pequeña y está comprendida entre 0,1 y 0,5 g/L de ácido acético.

Niveles excesivamente altos de acidez volátil pueden deberse a varias causas, entre las que se puede destacar la utilización de uvas afectadas de podredumbre, arranques de fermentación por parte de determinadas especies de levaduras no *Saccharomyces*, el desarrollo anómalo de la fermentación alcohólica (fundamentalmente paradas de la fermentación), ataques de bacterias acéticas y/o de bacterias lácticas.

Métodos de análisis

Se presentan tres métodos de análisis de la acidez volátil. El método de referencia y dos métodos de rutina muy utilizados en los laboratorios de bodega.

4.7.1 Acidez volátil con destilación por arrastre de vapor

Se trata de una valoración de los ácidos volátiles separados del vino por destilación con arrastre de vapor y rectificación de los vapores. De esta forma se evita la interferencia de los ácidos excluidos. El método descrito corresponde con el método de referencia OIV-MA-AS313-02.⁸

Material y equipos

- Equipo de destilación por arrastre de vapor.
- Matraz especial para destilación.
- Pipetas de 5 y 20 mL.
- Pipetas *Pasteur* desechables.

- Matraces *erlenmeyer* de 500 mL.
- Tapones para matraces *erlenmeyer*.
- Vasos de precipitados de 100 mL.
- 2 buretas de 10 mL.
- Granos de piedra pómez.

Reactivos

- Disolución de ácido tartárico de 100 g/L. Disolver 100 g de ácido tartárico cristalizado ($C_4H_6O_6$) enrasando a 1 L con agua destilada.
- Solución de fenolftaleína al 1 % en alcohol neutro de 96 % v/v.
- NaOH 0,1 M.
- HCl 2 M o HCl 1 M.
- Yoduro potásico sólido.
- Engrudo de almidón 5 g/L. Diluir 5 g de almidón en 500 mL de agua destilada. Llevar a ebullición agitando y mantener durante 10 minutos. Añadir 200 g de cloruro sódico. Una vez frío, enrasar con agua destilada a 1 L.
- I_2 0,005 M (0,01 N).

Procedimiento

- Comprobar el estado del equipo de destilación, prestando atención a la toma de corriente, a las mangueras de refrigerante, a la toma de agua para vapor, a la manguera de desagüe del refrigerante y a la manguera de purga del calderín de vapor. Comprobar que las mangueras de desagüe están dirigidas a una pila para evitar derrames.
- Llenar el depósito de agua para producir el vapor (usualmente 5 litros de agua destilada con 0,25 g de cloruro sódico. Consultar las instrucciones del equipo).
- Cerrar la llave de purga del calderín y abrir la llave de entrada de agua refrigerante.
- Encender el equipo y esperar a que se llene el calderín. Si el testigo sonoro de llenado dejase de sonar y el testigo luminoso indicase que no se ha llenado, apagar y volver a encender las veces necesarias hasta que se expulsen las burbujas del sistema y el calderín se llene.
- Realizar una destilación de limpieza usando el matraz de destilación más estrecho del equipo con unos 10 mL de agua destilada y unos granos de piedra pómez. Asegurar el ajuste de la boca del matraz de destilación. Recoger unos 250 mL de destilado en un matraz *erlenmeyer* de boca ancha de 500 mL y desechar.
- En el matraz de destilación, pipetear 20 mL de muestra, 5 mL de disolución de ácido tartárico 100 g/L y adicionar unos granos de piedra pómez.
- Destilar unos 250 mL que se recogen en un matraz *erlenmeyer* de boca ancha de 500 mL. Tapar rápidamente.



Figura 25. Equipo de destilación por arrastre de vapor

- Sobre el destilado añadir unas gotas de fenolftaleína y valorar con NaOH 0,1 M hasta viraje rosa pálido que ha de mantenerse durante 5 segundos.
- Sobre el destilado ya valorado, adicionar aproximadamente 1 mL de HCl 2 M o 2 mL de HCl 1 M con una pipeta *Pasteur*, aproximadamente 2 mL de engrudo de almidón con una pipeta *Pasteur* y una pizca de yoduro potásico sólido.
- Valorar con I_2 0,005 M (0,01 N) hasta una coloración azul violeta pálido.
- Al terminar la jornada, realizar otro lavado de limpieza con agua destilada.
- Tras apagar el equipo, cerrar la llave de la toma de agua para refrigeración y abrir la llave de purga del calderín.

Cálculo y expresión de resultados

A partir de los volúmenes en mL de hidróxido sódico y yodo consumidos, se calcula la acidez volátil con la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez volátil (g ác. Acético/L)} = 0,3 \times (\text{Volumen NaOH} - 0,1 \times \text{Volumen } I_2)$$

Tras analizar la muestra por duplicado, el resultado se expresa en g de ácido acético/L con dos decimales.

4.7.2 Método *García Tena*

Es uno de los métodos más habituales¹⁷. Se trata de una destilación fraccionada y posterior valoración de los ácidos volátiles separados del vino.

Material y equipos

- Microdestilador con matraz esférico de 60 mL.
- Pipeta 11 mL.
- Probetas con marcas de graduación a 5,1 y 3,2 mL.
- Bureta de 10 mL.
- Matraz *erlenmeyer* de 100 mL.
- Granos de piedra pómez.

Reactivos

- Hidróxido Sódico 0,01 M.
- Solución de fenolftaleína al 1 % en alcohol neutro de 96 % v/v.



Figura 26. Montaje *García Tena* para determinación de acidez volátil

Procedimiento

- Comprobar el estado del material de vidrio y de la fuente de calor (mechero o resistencia). Usar un poco de silicona en las juntas esmeriladas si fuese necesario.
- Pipetear 11 mL de vino en el matraz esférico de 60 mL, añadir unos granos de piedra pómez y a continuación destilar.
- Recoger los 5,1 mL primeros del destilado en la probeta marcada para tal fin y rechazarlos.
- Cambiar rápidamente las probetas para recoger los siguientes 3,2 mL de destilado.
- Una vez recogidos los 3,2 mL, parar la destilación y transferir al matraz *erlenmeyer* para su valoración, enjuagar varias veces con agua destilada la probeta y recogerla en el matraz.
- Valorar el destilado con la solución de hidróxido sódico 0,01 M en presencia de unas gotas de fenolftaleína en agitación constante hasta el viraje a rosa pálido. El color debe permanecer unos 10 segundos.
- Al terminar la jornada, realizar un destilado con agua destilada en vez de muestra para la limpieza interna del montaje.

Cálculo y expresión de los resultados

La fórmula para el cálculo de la acidez volátil por el método *García Tena* es:

$$\text{Acidez volátil (g ác. Acético/L)} = 0,18 \times V$$

Siendo V: volumen en mL de hidróxido sódico 0,01 M consumido.

Tras la medida por duplicado, los valores se expresan en g de ácido acético/L con dos cifras decimales.

4.7.3 Método *Mathieu*

Consiste en realizar una destilación en continuo, agregando durante la operación agua a la muestra que se analiza¹⁷.

Material y equipos

- Montaje de destilación de *Mathieu* comercial. Consta de un matraz de fondo redondo de 60 mL, refrigerante, un embudo graduado posicionado encima del matraz marcado con los volúmenes 0, 6, 12 y 18 mL en sentido descendente y que ajusta mediante unión esmerilada con el elemento anterior, y una llave que permite la adición controlada del líquido depositado en el embudo. El destilado se recoge en una probeta graduada de 24 mL señalado con los volúmenes 6, 12, 18 y 24 mL.
- Matraz *erlenmeyer* de 100 mL.

- Mechero de alcohol.
- Bureta de 10 mL.
- Piedra pómez.

Reactivos

- NaOH 0,1 M.
- Disolución de fenolftaleína al 1 % en alcohol neutro de 96 % v/v.
- Disolución de HCl 2 M.
- Yodo 0,005 M (0,01 N).
- Engrudo de almidón 5 g/L. Diluir 5 g de almidón en 500 mL H₂O destilada. Llevar a ebullición agitando y mantener durante 10 minutos. Añadir 200 g de cloruro sódico. Una vez frío, enrasar con agua destilada a 1 L.
- Yoduro potásico sólido.



Figura 27. Montaje Mathieu para determinación de acidez volátil

Procedimiento

- Pipetear 10 mL de vino en el matraz de destilación junto con unos granos de piedra pómez, y situar en el montaje bajo el embudo.
- Añadir agua en el embudo hasta el enrase con la llave cerrada.
- Calentar a fuego suave.
- Cuando se han recogido 6 mL de destilado, retirar la llama y dejar caer 6 mL de agua del embudo.
- Volver a destilar hasta 12 mL y repetir sucesivamente las adiciones hasta tener un volumen de destilado de 24 mL.
- El destilado y las aguas de lavado de la probeta de recepción se pasan al matraz *erlenmeyer* de 100 mL.
- Valorar con una disolución de NaOH 0,1 M en presencia de fenolftaleína, hasta color rosa pálido persistente.
- Sobre el matraz valorado, añadir aproximadamente 1 mL de HCl 2 M, una pizca de yoduro potásico sólido y aproximadamente 1 mL de engrudo de almidón.
- Valorar con yodo 0,005 M (0,01 N) hasta coloración azul violeta pálido.
- Al finalizar la jornada, realizar una destilación con agua destilada en vez de muestra para la limpieza interna del montaje.

Cálculos y expresión de los resultados

Experimentalmente se ha comprobado que en las condiciones en las que se hace la destilación se recogen las 10/11 partes del ácido acético que contiene el vino. Siendo V el volumen (mL) gastado de NaOH 0,1 M y V' el volumen (mL) gastado de I₂ 0,005 M:

$$\text{Acidez volátil (g ácido acético/L)} = 0,66 \times (V - (V'/10))$$

Tras el análisis por duplicado de la muestra, el valor es expresado con dos unidades decimales.

4.8 Sulfuroso libre y total

Definición

Se denomina dióxido de azufre (anhídrido sulfuroso o sulfuroso) al dióxido presente en el mosto o el vino en las formas siguientes: H₂SO₃, HSO₃⁻, SO₃²⁻ cuyo equilibrio está en función del pH y de la temperatura.

El dióxido de azufre libre (SO₂ libre) abarca todas las formas inorgánicas del SO₂ no combinadas con componentes del mosto o vino, en sus formas libre y salificadas. El dióxido de azufre combinado (SO₂ combinado) se refiere a los compuestos de adición entre el ion bisulfito y otras sustancias como los aldehídos, antocianos, proteínas y azúcares.

El resultado de la suma de las dos fracciones anteriores es lo que se conoce como dióxido de azufre total, es decir, el conjunto de las distintas formas de dióxido de azufre presentes en el vino en estado libre o combinado con sus componentes.

$$\text{SO}_2 \text{ total} = \text{SO}_2 \text{ libre} + \text{SO}_2 \text{ combinado}$$

Importancia enológica

El dióxido de azufre se utiliza en vinificación por sus propiedades antisépticas (como inhibidor de la actividad microbiana), reductoras y antioxidantes.

Cuando se añade en un mosto o en un vino, una parte del SO₂ se combina con otros compuestos existentes en el medio, y otra parte queda libre como tal. Ahora bien, solo la parte libre tiene un efecto protector; es por lo tanto importante conocer cuál es la fracción libre y cual la combinada.

La acción antiséptica es más eficiente sobre las bacterias que sobre las levaduras. En el mosto, antes de fermentar, realiza una selección de la microflora disminuyendo de forma importante la población de bacterias, y realizando una selección de levaduras favoreciendo a las de fermentación más efectiva. El efecto reductor o de protección de ciertos componentes del mosto y del vino frente a la oxidación tiene especial importancia en el caso de vendimias atacadas por podredumbre, ya que tiene un efecto desnaturalizador sobre las enzimas oxidásicas: polifenoloxidasas (tirosinasas) y lacasa.

Es indispensable conocer el contenido de SO_2 libre de un vino para saber si está suficientemente protegido durante todo el proceso de elaboración y tras el embotellado.

Por otra parte, es necesario conocer el contenido en SO_2 total debido a que se encuentra limitado legalmente, y cuando las cantidades de SO_2 utilizadas son altas se corre el riesgo de sobrepasar dichos límites.

La legislación comunitaria establece límites legales para el SO_2 total según el tipo de vino.

Cantidad permitida de SO_2 total		
Vinos	< 5 g/L azúcares reductores	> 5 g/L azúcares reductores
Vinos blancos y rosados	200 mg/L	250 mg/L
Vinos tintos	150 mg/L	200 mg/L

Tabla I. Máximos permitidos de SO_2 según el Reglamento Delegado (UE) 2019/934¹⁶

En este mismo reglamento se especifican las excepciones a estas cantidades para ciertos vinos de diferentes denominaciones de origen.

En la producción de vinos ecológicos el contenido máximo de SO_2 total se encuentra aún más restringido.

Cantidad permitida de SO_2 total	
Vinos blancos y rosados	150 mg/L
Vinos tintos	100 mg/L
Resto de categorías de vinos	Nivel convencional - 30 mg/L

Tabla II. Máximos permitidos de SO_2 total en vinos ecológicos según Reglamento de Ejecución (UE) 1165/2021¹⁸

4.8.1 Método *Paul*

El método *Paul*, referencia para el cálculo del sulfuroso total (OIV-MA-AS323-04A1)¹⁹ y auxiliar para la determinación del sulfuroso libre (OIV-MA-AS323-04A2)¹⁹, se basa en la liberación del sulfuroso libre del vino o mosto por acidificación de la muestra con ácido fosfórico, arrastre por corriente de aire, oxidación por borboteo en agua oxigenada neutra y valoración con hidróxido sódico del ácido sulfúrico formado. Mediante ebullición moderada se libera el sulfuroso combinado, que queda en el vino después de la extracción del sulfuroso libre. Este es tratado de forma análoga a la determinación del sulfuroso libre. El sulfuroso total es la suma del sulfuroso libre y del combinado. También es posible determinar el sulfuroso total directamente acidificando el vino y actuando del mismo modo que en la determinación del sulfuroso combinado.

Material y equipos

- Montaje de *Paul*.
- Trompa de vacío o bomba, capaz de suministrar un flujo de 1 L/min.
- Matraz redondo de 100 mL o 250 mL.
- Matraz corazón.
- Frasco con agua y con tapón atravesado por el tubo que comunica con el borboteador para hacer vacío, y otro tubo sumergido en el agua para acusar la intensidad del vacío por la depresión de la columna de agua en el interior del tubo.
- Pipeta de 50 mL.
- Bureta de 25 mL.
- Baño de agua a 18-24 °C.
- Manta calefactora, mechero o llama.

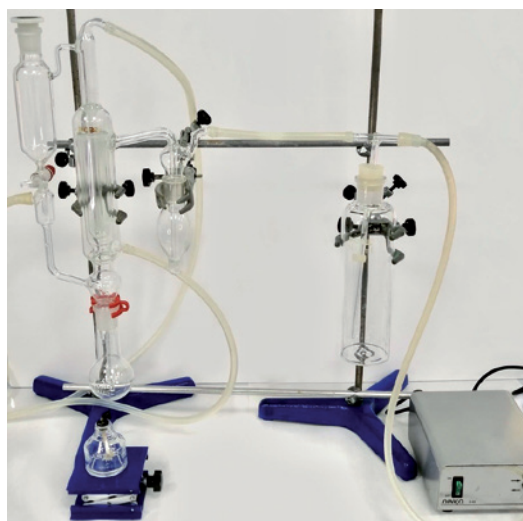


Figura 28. Montaje de *Paul* para la determinación de anhídrido sulfuroso

Reactivos

- Ácido orto-fosfórico al 25 %. Se prepara con 294 mL de ácido fosfórico al 85 % en un matraz aforado de 1 L enrasado con agua destilada.
- Indicador. Mezclar 100 mg de rojo de metilo, 50 mg de azul de metileno y 100 mL de etanol de 50 % v/v.
- Peróxido de hidrógeno 3 volúmenes por 100. Diluir 3 mL de peróxido de hidrógeno 30 % p/v (100 volúmenes) hasta 100 mL con agua destilada en un matraz aforado. Debe prepararse la dilución diariamente.
- Hidróxido de sodio 0,01 M.

Procedimiento

Determinación del SO₂ libre

- Antes de cada nueva determinación se recomienda limpiar el sistema con aire o nitrógeno durante unos 5 minutos.
- En el matraz de corazón, colocar 2-3 mL de peróxido de hidrógeno de 3 volúmenes con 2 gotas del reactivo indicador.
- Neutralizar el peróxido de hidrógeno con unas gotas de NaOH 0,01 M. La solución morada ha de tornar a un color verde oliva.
- Adaptar el matraz de corazón al borboteador del montaje.
- En el matraz de 250 mL pipetear 50 mL de vino.
- Una vez adaptado el matraz al montaje, adicionar 15 mL de ácido orto-fosfórico al 25 % mediante el embudo de la parte superior del montaje y adaptar el baño para mantener la temperatura de 18 a 24 °C en el matraz. Iniciar el flujo de aire simultáneamente a la adición del ácido.
- Hacer borbotear aire (o nitrógeno) durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, parar el flujo de aire y retirar el matraz de corazón del borboteador.
- Valorar el ácido formado con la solución de NaOH 0,01N. Anotar el volumen consumido como V.

Determinación del SO₂ combinado

- Después de terminar la valoración del sulfuroso libre, limpiar el matraz de corazón y volver a posicionarlo con 2-3 mL de peróxido de hidrógeno 3 volúmenes y 2 gotas de indicador y neutralizar con NaOH 0,01 M hasta conseguir la coloración verde oliva.
- Llevar a ebullición con manta calefactora o llama pequeña el vino que quedó en el matraz despojado del anhídrido sulfuroso libre por la determinación anterior.
- Mantener la ebullición con el paso de aire durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, parar el flujo de aire y retirar el matraz de corazón del borboteador.

- Valorar el ácido formado con la solución de NaOH 0,01 M. Anotar el volumen consumido como V'.

Cálculo y expresión de los resultados

Una vez realizadas las valoraciones y obtenidos los volúmenes en mL V y V' se aplican las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned}\text{SO}_2 \text{ libre (mg/L)} &= 6,4 \times V \\ \text{SO}_2 \text{ combinado (mg/L)} &= 6,4 \times V' \\ \text{SO}_2 \text{ total (mg/L)} &= \text{SO}_2 \text{ libre} + \text{SO}_2 \text{ combinado}\end{aligned}$$

El resultado se expresa en mg/L sin cifras decimales.

Notas

- Para vinos sensiblemente picados (con más de 2 g/L de ácido acético) pueden arrastrarse ácidos volátiles, especialmente cuando la corriente de aire es intensa. Corregir determinando la acidez volátil presente en el líquido del matraz de corazón, operando de la siguiente forma: Después de la neutralización con el hidróxido sódico al valorar la acidez, añadir un cristal de ácido tartárico y llevar el contenido del matraz al aparato de determinación de la acidez volátil por destilación en corriente de vapor. Restar después del resultado anterior la parte correspondiente a los ácidos volátiles.
- Para producir la corriente de aire es posible insuflar aire por la entrada abierta bajo el embudo para el ácido orto-fosfórico en vez de hacer vacío en la parte posterior al borboteador.

4.8.2 Método Ripper

Es el método más extendido para la determinación de SO₂ libre y total como método de rutina y es considerado por la OIV como método auxiliar (OIV-MA-AS323-04B)¹⁹. En este método se valora el dióxido de azufre libre con yodo en medio ácido, controlando el punto final de la valoración con solución indicadora de almidón. El sulfuroso combinado es determinado secuencialmente después de una hidrólisis alcalina.

Material y equipos

- Matraz *erlenmeyer* de 500 mL con tapón.
- Pipetas de 5, 25 y 50 mL.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL o micropipetas de 5 y 10 mL.
- Balanza de precisión.
- Bureta graduada.
- Cuentagotas.

Reactivos

- Yodo 0,025 M (0,05 N).
- Ácido sulfúrico 10 % v/v. Añadir en un matraz aforado de 1 L y sobre unos 500 mL de agua destilada, 100 mL de ácido sulfúrico al 98 % con precaución. Enfriar y enrasar con agua destilada.
- Engrudo de almidón 5 g/L. Diluir 5 g de almidón en 500 mL de agua destilada. Llevar a ebullición agitando y mantener durante 10 minutos. Añadir 200 g de cloruro sódico. Una vez frío, enrasar con agua destilada a 1 L.
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) sal disodio.

Procedimiento

Determinación del SO₂ libre

- Añadir 50 mL de muestra si la muestra es de vino blanco y 25 mL si la muestra es de vino tinto dentro de un matraz *erlenmeyer* de 500 mL, 3 mL de ácido sulfúrico 10 % v/v, 5 mL de engrudo de almidón y 30 mg de EDTA.
- Valorar inmediatamente con yodo 0,025 M (0,05 N), hasta que la coloración azul se mantenga claramente durante 10 a 15 segundos.
- Anotar los mL gastados de yodo 0,025 M como V.

Determinación del SO₂ combinado

- Sobre el matraz donde se ha valorado el sulfuroso libre, adicionar 8 mL de hidróxido sódico 4 M, agitar una sola vez, tapar y dejar en reposo durante 5 minutos.
- Mientras se agita vigorosamente, añadir 10 mL de ácido sulfúrico de golpe.
- Valorar inmediatamente con yodo 0,025 M.
- Anotar los mL gastados de yodo 0,025 M como V'.

Determinación de interferencias

Una causa de error en los vinos tintos, especialmente en aquellos con un elevado contenido polifenólico, es el consumo de yodo por parte de dicha materia polifenólica, que provocaría un error por exceso. Para solucionar este problema se procede paralelamente del siguiente modo:

- En un matraz *erlenmeyer* de 500 mL adicionar 25 mL de muestra y 5 gotas de peróxido de hidrógeno 30 % p/v (100 volúmenes) y agitar.
- Valorar como una muestra de sulfuroso libre.
- Anotar el volumen en mL de yodo consumido como V''.

Cálculo y expresión de los resultados

Para vinos blancos usando 50 mL de muestra:

$$\begin{aligned}\text{SO}_2 \text{ libre (mg/L)} &= 32 \times V \\ \text{SO}_2 \text{ combinado (mg/L)} &= 32 \times V' \\ \text{SO}_2 \text{ total (mg/L)} &= \text{SO}_2 \text{ libre} + \text{SO}_2 \text{ combinado}\end{aligned}$$

Para vinos tintos usando 50 mL de muestra y estimación de interferencias:

$$\begin{aligned}\text{SO}_2 \text{ libre (mg/L)} &= 32 \times (V - V'') \\ \text{SO}_2 \text{ combinado (mg/L)} &= 32 \times V' \\ \text{SO}_2 \text{ total (mg/L)} &= \text{SO}_2 \text{ libre} + \text{SO}_2 \text{ combinado}\end{aligned}$$

Para vinos tintos usando 25 mL de muestra y estimación de interferencias:

$$\begin{aligned}\text{SO}_2 \text{ libre (mg/L)} &= 64 \times (V - V'') \\ \text{SO}_2 \text{ combinado (mg/L)} &= 64 \times V' \\ \text{SO}_2 \text{ total (mg/L)} &= \text{SO}_2 \text{ libre} + \text{SO}_2 \text{ combinado}\end{aligned}$$

Los valores se expresan en mg/L sin decimales después de realizar la determinación por duplicado.

Nota

- En el caso de los vinos tintos de alta intensidad colorante, además de utilizar 25 mL de muestra, se puede realizar la valoración con poca o ninguna luz ambiental e iluminando el fondo del matraz con luz amarilla, observar la transparencia del vino, que se hará opaco cuando se produzca el viraje del almidón.

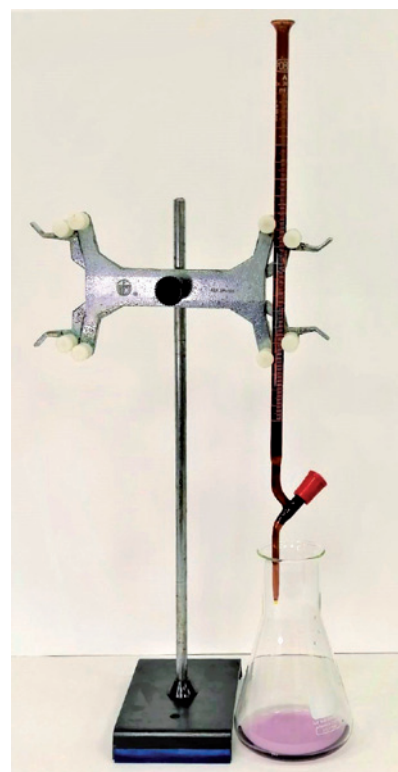


Figura 29. Valoración con yodo de anhídrido sulfuroso por el método Ripper

4.9 Ácido málico

Definición

El ácido málico es uno de los ácidos predominantes en la uva y su concentración se ve afectada por la variedad, tipo de suelo, condiciones climáticas, prácticas culturales de la vid y estado de madurez de la uva. Este se encuentra en gran cantidad en la uva verde y desaparece poco a poco en el transcurso de la maduración. Durante la fermentación alcohólica la cantidad de ácido málico disminuye de un 20 a un 30 % bajo la acción de las levaduras.

Su transformación más importante ocurre durante la fermentación maloláctica, en la que el ácido málico es completamente fermentado por bacterias lácticas que lo transforman en ácido láctico y gas carbónico. La fermentación maloláctica es promovida en los vinos tintos y en algunos vinos blancos secos.

En la mayoría de los vinos blancos secos y rosados se intenta conservar el ácido málico y evitar la fermentación maloláctica para preservar la acidez y frescura que aporta este ácido desde el punto de vista organoléptico, por lo que la fermentación maloláctica se impide sulfitando los vinos²⁰.

Importancia enológica

Las bacterias lácticas causantes de la fermentación maloláctica, son muy sensibles al anhídrido sulfuroso. Mientras no se concluya la fermentación maloláctica, el vino ha de mantenerse a niveles de SO_2 libre por debajo de 15 mg/L, y por lo tanto hay muy poco margen de protección frente a oxidaciones y contaminaciones por bacterias acéticas. De ahí el interés en su determinación, con el fin de poder realizar un seguimiento de esta fermentación y asegurar que ha llegado a su fin, es decir, que todo el ácido málico se ha transformado en ácido láctico y poder continuar con la estabilización del vino.

Métodos de análisis

Existen métodos cuantitativos de análisis del ácido málico basados en métodos enzimáticos y espectrofotometría que requieren de equipos y reactivos de coste alto para bodegas de tamaño medio. Una solución económica en estos casos es el análisis cualitativo mediante cromatografía líquida con fase estacionaria de celulosa y una solución hidroalcohólica como eluyente o fase móvil. Este es método que se propone.

Es una determinación cualitativa de fácil ejecución que permite comprobar si el vino ha sufrido o no la fermentación maloláctica.

El fundamento del método es la separación de los ácidos sobre papel y visualización mediante azul de bromofenol (indicador de pH introducido en el eluyente)²¹.

Material y equipos

- 2 placas *Petri* con tapa de distinto diámetro.
- Soporte metálico.
- Campana de cromatografía.
- Papel de cromatografía de 6 x 14 cm (Papel *Whatman* nº 1).
- Pipetas *Pasteur*.
- Lápiz.

Reactivo

- Revelador. Mezcla de 50 mL de azul de bromofenol en n-butanol (alcohol butílico) con 20 mL de ácido acético (alta pureza) al 50 %.

Procedimiento

- Preparar la placa *Petri* de mayor diámetro como base e introducir en esta la placa *Petri* menor.
- Rellenar con revelador la placa *Petri* pequeña hasta la mitad de su volumen y tapar las dos placas.
- Se toma una hoja de papel cromatográfico, se sitúa en vertical junto al soporte metálico dejando un espacio entre el papel y la mesa de unos 2 mm y se dobla la parte superior sobre el alambre horizontal del soporte metálico quedando la hoja colgando de este.
- En esta hoja se marcan con lápiz dos cruces (marcas de donde se adicionará la muestra) equidistantes entre sí y los bordes laterales, en la parte baja del papel a unos 15 mm del borde inferior, y en la parte superior junto al doblez y en la vertical de las cruces se ha de indicar a lápiz el código identificativo de la muestra.
- Apoyando el papel en horizontal en la mesa o sobre la tapadera de la placa *Petri*, se deja la mitad inferior al aire y se añaden dos o tres gotas de muestra en su cruz dejando secar al aire entre gota y gota.

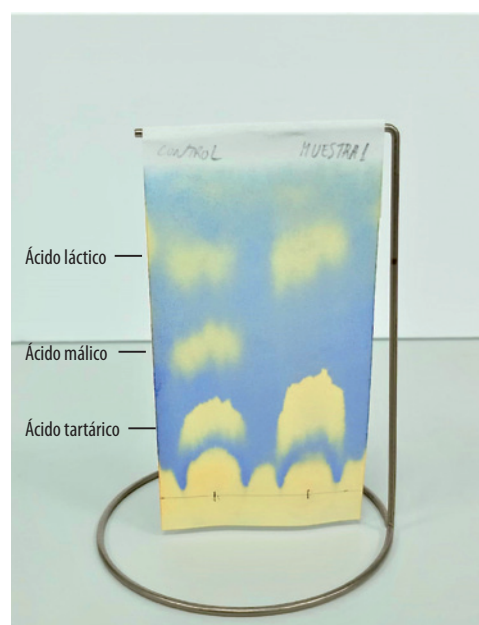


Figura 30. Cromatografía de una muestra de control con los ácidos tartárico, málico y láctico y una muestra con la fermentación maloláctica terminada

- Abrir las placas *Petri* e introducir la parte baja del papel colgado dentro del revelador dejando la base del soporte rodeando la placa *Petri* pequeña y todo dentro de la de mayor diámetro que hace de base. El papel se debe asegurar con un clip. Tapar el conjunto con la campana.
- Dejar que ascienda el líquido revelador por el papel hasta casi alcanzar la parte superior. El proceso tarda entre 90 minutos y 2 horas.
- Retirar el soporte con el papel colgado y dejar secar en un lugar aireado en ausencia de vapores ácidos. Duración entre 2 y 4 horas.
- Una vez bien seco se pueden observar manchas amarillas sobre fondo azul repartidas en la vertical a lo largo de cada muestra.
- Los ácidos del vino se separan siguiendo el orden de abajo a arriba: ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico + ácido succínico.

Cálculos y expresión de los resultados

La identificación de las manchas correspondientes a los ácidos se puede efectuar por la comparación del desplazamiento de patrones con las de los vinos (disolución de 3 g/L de ácido tartárico, 3 g/L de ácido málico y 3 g/L de ácido láctico).

Si la mancha en la franja del ácido málico es inexistente o muy difusa y se aprecia la franja correspondiente al ácido láctico, es indicativo de la ausencia o muy baja concentración de ácido málico y por lo tanto se puede dar por concluida la fermentación maloláctica.

4.10 Hierro

Definición

El hierro contenido en el vino tiene varios orígenes. La uva contiene siempre pequeñas cantidades de este metal, como máximo 3 o 4 mg/L. La tierra que transportan los recipientes de vendimia, sobre todo si llueve, también aportan pequeñas cantidades de hierro. Sin embargo, la fuente más frecuente y significativa de contaminación es el material de vinificación: tolva, sinfines, bombas, estrujadora, despalilladora, prensa, recipientes de cemento y de hierro mal inertizados, etc. Aunque cada vez es menos común por el uso del acero inoxidable.

Importancia enológica

El hierro contenido en el vino se encuentra bajo dos formas químicas: Fe^{2+} y Fe^{3+} , siendo esta última la que realmente provoca las alteraciones en los vinos. La conversión de una forma en otra viene provocada por procesos oxidativos que se desarrollan durante la elaboración (trasiegos, aireaciones, etc). Este metal actúa como catalizador de reacciones de oxidación y polimerización de compuestos fenólicos, que tienen una importancia capital en el pardeamiento de vinos blancos y finos.

Si las dosis de hierro son elevadas en los vinos, se provoca la denominada quiebra férrica, cuya manifestación depende del tipo de vino y que se caracteriza por una turbidez de distinto color que puede evolucionar hasta la formación neta del precipitado. En vinos blancos es de color blanco (fosfato férrico), en los vinos tintos de color azul-negro (Fe-taninos) y en los vinos finos de color verde-negruzco.

No hay unas cantidades fijas de hierro a partir de las que se pueda asegurar que no haya quiebra férrica, ya que influyen además de la concentración de este catión, otros parámetros como la presencia de fosfatos, taninos, y del pH del medio. Sin embargo, si las cantidades superan los 8 mg/L, al menos sería conveniente, para asegurarse, efectuar un ensayo de quiebra férrica.

Método de análisis

El análisis propuesto se fundamenta en la formación de un compuesto coloreado del catión Fe^{3+} con el anión sulfocianuro. El Fe^{2+} es oxidado con H_2O_2 a Fe^{3+} y este se combina con el sulfocianuro en medio ácido, formándose un compuesto de color rojo^{22, 15}.

Material y equipos

- Tubos de ensayo de 200 x 20 mm con tapón.
- Pipetas de 1, 10 y 15 mL.
- Matraces aforados de 25, 100 y 1000 mL.
- Cuentagotas.
- Soporte para tubos de ensayo.

Reactivos

- Tiocianato de potasio (sulfocianuro de potasio, KSCN) al 20 %. Tomar 20 g de sulfocianuro de potasio y enrasar hasta 100 mL con agua destilada en un matraz aforado.
- Disolución de HCl al 5 % aproximadamente. Tomar 15 mL de HCl puro comercial al 37 % y enrasar con agua destilada hasta 100 mL.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 20 volúmenes. Tomar 20 mL de H_2O_2 de 100 volúmenes (comercial, al 30 %) y enrasar hasta 100 mL con agua destilada en un matraz aforado.
- Disolución de Fe 0,1 g/L. Disolver 0,863 g de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,863 g de NH_4Cl y 10 mL de HCl al 37 %, en 100 mL aproximados de agua, y posteriormente enrasar a 1.000 mL en un matraz aforado con agua destilada.
- Éter dietílico.

Procedimiento

- A partir de la disolución de Fe preparar disoluciones de 2, 4, 8, 12, 16 y 20 mg/L. Para ello poner respectivamente 0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 mL de dicha disolución en otros tantos matraces de 25 mL y enrasar con agua destilada.
- En siete tubos de ensayo añadir 10 mL de las soluciones de Fe preparadas, 1 mL de HCl al 5 %, 1 mL de KSCN al 20 % y 5 gotas de H_2O_2 de 20 volúmenes.
- Tapar los tubos y agitar durante unos segundos. Aparecerán distintas intensidades de coloración roja dependiendo de la concentración de hierro del patrón.
- Para vinos blancos o poco coloreados, sustituir los 10 mL de patrón añadidos al tubo de ensayo por 10 mL de la muestra.
- En el caso de los vinos tintos se repite la operación, pero al final se añaden 10 mL de éter dietílico, se agita y se deja reposar unos minutos. El complejo férrico coloreado aparecerá en la fase líquida superior.

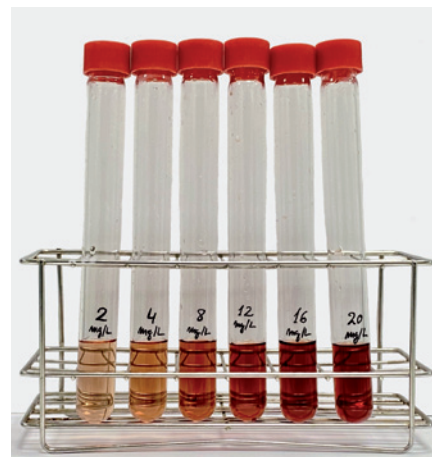


Figura 31. Disoluciones patrón para la determinación del contenido de hierro

Cálculos y expresión de los resultados

La comparación de color de las muestras ensayadas con la de las disoluciones patrón indica aproximadamente el contenido de hierro de las mismas.

Puede determinarse también la concentración de hierro total por espectrofotometría realizando una recta de calibrado. Así se obtiene un valor más exacto de la concentración de hierro.

Para ello se ha de seleccionar la longitud de onda de medida de absorbancia a 508 nm en el espectrofotómetro, y además de los patrones, se ha de preparar un blanco preparado igual que las disoluciones, con 10 mL de agua destilada, 1 mL de HCl al 5 %, 1 mL de KSCN al 20 % y 5 gotas de H_2O_2 .

Con los patrones y el blanco, se construye una recta de calibrado representando la absorbancia frente a la concentración en mg/L. Se mide la absorbancia de la muestra y con la recta de calibrado se obtiene la concentración de hierro total.

Los datos se expresan en mg/L con un decimal.

1. Pérez Juan, Pedro Manuel y Morales Ordóñez, José. (1998) *Manual básico de laboratorio de bodega*. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Dirección General de Investigación y Formación Agraria. Servicio de Publicaciones y Divulgación. Sevilla.
2. Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del CSIC. (2007). *Manual de buenas prácticas de Laboratorio*. Subdirección General de Recursos Humanos. Área de Prevención de Riesgos Laborales. Sevilla.
3. Panreac. (2005). *Manual de seguridad en laboratorios químicos*. Panreac Química S.A.
4. Ramírez, P. y González, V. (2012). *Control del proceso de maduración del viñedo en climas mediterráneos*. Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible.
5. Hidalgo Togores, José. (2011). *Tratado de Enología*. Tomo I. 2ª Ed. Revisada. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
6. Moreno, J.J. y Peinado, R.A. (2010). *Química enológica*. AMV ediciones y Mundi-Prensa. Madrid.
7. Zamora Marín, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. AMV ediciones y Mundi-Prensa. Madrid.
8. OIV. (2021). *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Vol. 1. ISBN 978-2-85038-034-1.
9. Reglamento (UE) N° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n° 922/72, (CEE) n° 234/79, (CE) n° 1037/2001 y (CE) n° 1234/2007.
10. Panreac Química, S.A. (1999). *Métodos oficiales de análisis. Productos derivados de la uva aguardientes y sidras*. Barcelona
11. Dolmar Productos S.L. (2023). *Kit análisis de NFA. Valoración de nitrógeno fácilmente asimilable. Método de Sørensen*. Haro (La Rioja).

12. Rebelein, H. (1973). *Rapid method for the determination of the alcohol, sugar, and total sulfur dioxide contents (by distillation) in wine and fruit juices and also for determining the blood alcohol*. Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel 2, 33-38.
13. Reglamento Delegado (UE) 2019/33 de la Comisión de 17 de octubre de 2018 por el que se completa el Reglamento (UE) nº 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a las solicitudes de protección de denominaciones de origen, indicaciones geográficas y términos tradicionales del sector vitivinícola, al procedimiento de oposición, a las restricciones de utilización, a las modificaciones del pliego de condiciones, a la cancelación de la protección, y al etiquetado y la presentación.
14. GAB Sistemática (2023). *Analítica S.L. Ebuliómetro. Instrucciones*. Barcelona.
15. García Cazorla, J., Xirau Vayreda, M y Azorín Romero, R. (2005). *Técnicas usuales de análisis en enología*. Panreac Química S.A. Barcelona.
16. Reglamento Delegado (UE) 2019/934 de la Comisión de 12 de marzo de 2019 por el que se completa el Reglamento (UE) nº 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las zonas vitícolas donde el grado alcohólico pueda verse incrementado, las prácticas enológicas autorizadas y las restricciones aplicables a la producción y conservación de los productos vitícolas, el porcentaje mínimo de alcohol para subproductos y la eliminación de estos, y la publicación de las fichas de la OIV.
17. García Barceló, J. (1976). *Metodología de análisis de vinos y derivados*. Ed. SEPSA. Villafranca del Penedés (Barcelona).
18. Reglamento de Ejecución (UE) 2021/1165 de la Comisión de 15 de julio de 2021 por el que se autorizan determinados productos y sustancias para su uso en la producción ecológica y se establecen sus listas.
19. OIV. (2021). *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Vol 2. I. ISBN 978-2-85038-035-8.
20. Peynaud, E. (1996). *Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino*. 3ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona.
21. GAB Sistemática (2023). *Analítica S.L. Cromatografía Malo-Láctica (CML). Instrucciones*. Barcelona.
22. García Barceló, J. (1990). *Técnicas analíticas para vinos*. GAB Sistemática Analítica S.L. Barcelona.

6

ANEXOS

ANEXO I

Corrección en caso de medición del porcentaje en masa de sacarosa a una temperatura (T) diferente de 20 °C. Es preferible que la variación de temperatura respecto a 20 °C no exceda de ± 5 °C.

T (°C)	Porcentaje en masa de sacarosa medida (°Brix)													
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
5	-0,82	-0,87	-0,92	-0,95	-0,99									
6	-0,80	-0,82	-0,87	-0,90	-0,94									
7	-0,74	-0,78	-0,82	-0,84	-0,88									
8	-0,69	-0,73	-0,76	-0,79	-0,82									
9	-0,64	-0,67	-0,71	-0,73	-0,75									
10	-0,59	-0,62	-0,65	-0,67	-0,69	-0,71	-0,72	-0,73	-0,74	-0,75	-0,75	-0,75	-0,75	-0,75
11	-0,54	-0,57	-0,59	-0,61	-0,63	-0,64	-0,65	-0,66	-0,67	-0,68	-0,68	-0,68	-0,68	-0,67
12	-0,49	-0,51	-0,53	-0,55	-0,56	-0,57	-0,58	-0,59	-0,60	-0,60	-0,61	-0,61	-0,60	-0,60
13	-0,43	-0,45	-0,47	-0,48	-0,50	-0,51	-0,52	-0,52	-0,53	-0,53	-0,53	-0,53	-0,53	-0,53
14	-0,38	-0,39	-0,40	-0,42	-0,43	-0,44	-0,44	-0,45	-0,45	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,45
15	-0,32	-0,33	-0,34	-0,35	-0,36	-0,37	-0,37	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38
16	-0,26	-0,27	-0,28	-0,28	-0,29	-0,30	-0,30	-0,30	-0,31	-0,31	-0,31	-0,31	-0,31	-0,30
17	-0,20	-0,20	-0,21	-0,21	-0,22	-0,22	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23
18	-0,13	-0,14	-0,14	-0,14	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15
19	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08	-0,08
20	0 REFERENCIA 0													
21	+0,07	+0,07	+0,07	+0,07	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08
22	+0,14	+0,14	+0,15	+0,15	+0,15	+0,15	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,15	+0,15
23	+0,21	+0,22	+0,22	+0,23	+0,23	+0,23	+0,23	+0,24	+0,24	+0,24	+0,24	+0,23	+0,23	+0,23
24	+0,29	+0,29	+0,30	+0,30	+0,31	+0,31	+0,31	+0,32	+0,32	+0,32	+0,32	+0,31	+0,31	+0,31
25	+0,36	+0,37	+0,38	+0,38	+0,39	+0,39	+0,40	+0,40	+0,40	+0,40	+0,40	+0,39	+0,39	+0,39
26	+0,44	+0,45	+0,46	+0,46	+0,47	+0,47	+0,48	+0,48	+0,48	+0,48	+0,48	+0,47	+0,47	+0,46
27	+0,52	+0,53	+0,54	+0,55	+0,55	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,55	+0,55	+0,54
28	+0,60	+0,61	+0,62	+0,63	+0,64	+0,64	+0,64	+0,65	+0,65	+0,64	+0,64	+0,64	+0,63	+0,62
29	+0,68	+0,69	+0,70	+0,71	+0,72	+0,73	+0,73	+0,73	+0,73	+0,73	+0,72	+0,72	+0,71	+0,70
30	+0,77	+0,78	+0,79	+0,80	+0,81	+0,81	+0,81	+0,82	+0,81	+0,81	+0,81	+0,80	+0,79	+0,78
31	+0,85	+0,87	+0,88	+0,89	+0,89	+0,90	+0,90	+0,90	+0,90	+0,90	+0,89	+0,88	+0,87	+0,86
32	+0,94	+0,95	+0,96	+0,97	+0,98	+0,99	+0,99	+0,99	+0,99	+0,98	+0,97	+0,96	+0,95	+0,94
33	+1,03	+1,04	+1,05	+1,06	+1,07	+1,08	+1,08	+1,08	+1,07	+1,07	+1,06	+1,05	+1,03	+1,02

Continuación

T (°C)	Porcentaje en masa de sacarosa medida (°Brix)													
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
34	+1,12	+1,19	+1,15	+1,15	+1,16	+1,17	+1,17	+1,17	+1,16	+1,15	+1,14	+1,13	+1,12	+1,10
35	+1,22	+1,23	+1,24	+1,25	+1,25	+1,26	+1,26	+1,25	+1,25	+1,24	+1,23	+1,21	+1,20	+1,18
36	+1,31	+1,32	+1,33	+1,34	+1,35	+1,35	+1,35	+1,35	+1,34	+1,33	+1,32	+1,30	+1,28	+1,26
37	+1,41	+1,42	+1,43	+1,44	+1,44	+1,44	+1,44	+1,44	+1,43	+1,42	+1,40	+1,38	+1,36	+1,34
38	+1,51	+1,52	+1,53	+1,53	+1,54	+1,54	+1,53	+1,53	+1,52	+1,51	+1,49	+1,47	+1,45	+1,42
39	+1,61	+1,62	+1,62	+1,63	+1,63	+1,63	+1,63	+1,62	+1,61	+1,60	+1,58	+1,56	+1,53	+1,50
40	+1,71	+1,72	+1,72	+1,73	+1,73	+1,73	+1,72	+1,71	+1,70	+1,69	+1,67	+1,64	+1,62	+1,59



ANEXO II

Factor de corrección c requerido para la masa volúmica de mostos naturales o concentrados medida con hidrómetro para corregir a 20 °C.

$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1000)$. Restar si la temperatura es menor de 20 °C Sumar si la temperatura es mayor de 20 °C

Temperatura en °C	Masas volúmicas (g/mL)																		
	1,05	1,06	1,07	1,08	1,09	1,1	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15	1,16	1,18	1,2	1,22	1,24	1,26	1,28	1,3
10°	2,17	2,34	2,52	2,68	2,85	2,99	3,16	3,29	3,44	3,58	3,73	3,86	4,13	4,36	4,60	4,82	5,02	5,25	5,39
11°	2,00	2,16	2,29	2,44	2,59	2,73	2,86	2,99	3,12	3,24	3,37	3,48	3,71	3,94	4,15	4,33	4,52	4,69	4,85
12°	1,81	1,95	2,08	2,21	2,34	2,47	2,58	2,70	2,82	2,92	3,03	3,14	3,35	3,55	3,72	3,9	4,07	4,23	4,37
13°	1,62	1,74	1,85	1,96	2,07	2,17	2,28	2,38	2,48	2,59	2,68	2,77	2,94	3,11	3,28	3,44	3,54	3,72	3,86
14°	1,44	1,54	1,64	1,73	1,82	1,92	2,00	2,08	2,17	2,25	2,34	2,42	2,57	2,73	2,86	2,99	3,12	3,24	3,35
15°	1,21	1,29	1,37	1,45	1,53	1,60	1,68	1,75	1,82	1,89	1,97	2,03	2,16	2,28	2,40	2,51	2,61	2,71	2,80
16°	1,00	1,06	1,12	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,54	1,60	1,65	1,75	1,84	1,94	2,02	2,09	2,17	2,23
17°	0,76	0,82	0,86	0,91	0,96	1,00	1,05	1,09	1,14	1,18	1,22	1,25	1,32	1,39	1,46	1,52	1,57	1,63	1,71
18°	0,53	0,56	0,59	0,63	0,65	0,69	0,72	0,74	0,77	0,80	0,82	0,85	0,90	0,95	0,99	1,02	1,05	1,09	1,16
19°	0,28	0,30	0,31	0,33	0,35	0,36	0,38	0,39	0,41	0,42	0,43	0,43	0,46	0,48	0,50	0,52	0,54	0,55	0,58
20°	REFERENCIA																		
21°	0,28	0,29	0,31	0,33	0,34	0,36	0,37	0,39	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48	0,51	0,54	0,56	0,57	0,59
22°	0,55	0,58	0,61	0,64	0,67	0,70	0,73	0,76	0,78	0,81	0,84	0,87	0,93	0,97	1,02	1,06	1,09	1,12	1,17
23°	0,82	0,90	0,95	0,99	1,04	1,08	1,12	1,16	1,21	1,25	1,29	1,32	1,39	1,46	1,52	1,58	1,62	1,68	1,75
24°	1,15	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,48	1,54	1,60	1,65	1,71	1,76	1,86	1,95	2,04	2,11	2,17	2,23	2,33
25°	1,44	1,52	1,59	1,67	1,74	1,81	1,88	1,95	2,02	2,09	2,16	2,22	2,34	2,45	2,55	2,64	2,74	2,81	2,87
26°	1,76	1,84	1,93	2,02	2,10	2,18	2,25	2,33	2,41	2,49	2,56	2,64	2,78	2,91	3,03	3,15	3,26	3,37	3,55
27°	2,07	2,16	2,26	2,36	2,46	2,56	2,65	2,74	2,83	2,91	3,00	3,07	3,24	3,39	3,55	3,69	3,82	3,94	4,04
28°	2,39	2,51	2,63	2,74	2,85	2,96	3,06	3,16	3,28	3,38	3,48	3,57	3,75	3,92	4,08	4,23	4,37	4,51	4,73
29°	2,74	2,86	2,97	3,09	3,22	3,34	3,46	3,57	3,69	3,80	3,90	4,00	4,20	4,39	4,58	4,74	4,90	5,05	5,31
30°	3,06	3,21	3,35	3,50	3,63	3,77	3,91	4,02	4,15	4,28	4,40	4,52	4,75	4,96	5,16	5,35	5,52	5,67	5,91

Continuación

Factor de corrección c requerido para la masa volúmica de vinos secos y vinos secos desalcoholizados medida con hidrómetro para corregir a 20 °C.

$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1000)$. Restar si la temperatura es menor de 20 °C Sumar si la temperatura es mayor de 20 °C

		Grado alcohólico (% v/v)																										
		0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			
Temperatura en °C																												
10°	1,45	1,51	1,55	1,58	1,64	1,76	1,78	1,89	1,98	2,09	2,21	2,34	2,47	2,60	2,15	2,93	3,06	3,22	3,39	3,57	3,75	3,93	4,12	4,31				
11°	1,35	1,40	1,43	1,47	1,52	1,58	1,65	1,73	183,00	1,93	2,03	2,15	2,26	2,38	2,51	2,65	2,78	2,93	3,08	3,24	3,40	3,57	3,73	3,90				
12°	1,24	1,28	1,31	1,34	1,39	1,44	1,50	1,56	1,66	1,75	1,84	1,94	2,04	2,15	2,26	2,38	2,51	2,63	2,77	2,91	3,05	3,19	3,34	3,49				
13°	1,12	1,16	1,18	1,21,	1,25	1,30	1,35	1,42	1,49	1,56	1,64	1,73	1,82	1,91	2,01	2,11	2,22	2,33	2,45	2,57	2,69	2,81	2,95	3,07				
14°	0,99	1,03	1,05	1,07	1,11	1,14	1,19	1,24	1,31	1,37	1,44	1,52	1,59	1,67	1,75	1,84	1,93	2,03	2,13	2,23	2,33	2,44	2,55	2,66				
15°	0,86	0,89	0,90	0,92	0,95	0,98	1,02	1,07	1,12	1,17	1,23	1,29	1,35	1,42	1,49	1,56	1,63	1,71	1,80	1,88	1,96	2,05	2,14	2,23				
16°	0,71	0,73	0,74	0,76	0,78	0,81	0,84	0,87	0,91	0,96	0,99	1,05	1,10	1,15	1,21	1,27	1,33	1,39	1,45	1,52	1,59	1,66	1,73	1,80				
17°	0,55	0,57	0,57	0,59	0,60	0,62	0,65	0,67	0,70	0,74	0,77	0,81	0,84	0,88	0,92	0,96	1,01	1,05	1,10	1,15	1,20	1,26	1,31	1,36				
18°	0,38	0,39	0,39	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,55	0,57	0,60	0,62	0,65	0,68	0,71	0,74	0,78	0,81	0,85	0,88	0,91				
19°	0,19	0,20	0,20	0,21	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,32	0,33	0,34	0,36	0,38	0,39	0,41	0,43	0,44	0,46				
20°	REFERENCIA																											
21°	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,31	0,32	0,34	0,35	0,36	0,38	0,39	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48				
22°	0,43	0,45	0,45	0,46	0,47	0,49	0,50	0,52	0,54	0,56	0,58	0,60	0,62	0,65	0,68	0,71	0,73	0,77	0,80	0,83	0,86	0,86	0,93	0,96				
23°	0,67	0,69	0,70	0,71	0,72	0,74	0,77	0,76	0,82	0,85	0,88	0,91	0,95	0,99	1,03	1,07	1,12	1,16	1,21	1,25	1,30	1,35	1,40	1,45				
24°	0,91	0,93	0,95	0,97	0,99	1,01	1,04	1,07	1,11	1,15	1,20	1,24	1,29	1,34	1,39	1,45	1,50	1,56	1,62	1,69	1,76	1,82	1,88	1,95				
25°	1,16	1,19	1,21	1,23	1,26	1,29	1,33	1,37	1,42	1,47	1,52	1,57	1,63	1,70	1,76	1,83	1,90	1,97	2,05	2,13	2,21	2,29	2,37	2,45				
26°	1,42	1,46	1,49	1,51	1,54	1,58	1,62	1,67	1,73	1,79	1,85	1,92	1,99	2,07	2,14	2,22	2,31	2,40	2,49	2,58	2,67	2,77	2,86	2,96				
27°	1,69	1,74	1,77	1,80	1,83	1,88	1,93	1,98	2,05	2,12	2,20	2,27	2,35	2,44	2,53	2,63	2,72	2,82	2,93	3,04	3,14	3,25	3,37	3,48				
28°	1,97	2,03	2,06	2,09	2,14	2,19	2,24	2,31	2,38	2,46	2,55	2,63	2,73	2,83	2,93	3,03	3,14	3,26	3,38	3,50	3,62	3,75	3,85	4,00				
29°	2,26	2,33	2,37	2,41	2,45	2,50	2,57	2,64	2,73	2,82	2,91	2,99	3,11	3,22	3,34	3,46	3,58	3,70	3,84	3,97	4,11	4,25	4,39	4,54				
30°	2,56	2,64	2,67	2,72	2,77	2,83	2,90	2,98	3,08	3,18	3,28	3,38	3,50	3,62	3,75	4,02	4,02	4,16	4,30	4,46	4,61	4,76	1,92	5,07				

ANEXO III

Tabla de equivalencias entre el porcentaje en masa de sacarosa a 20 °C (°Brix) determinado mediante un refractómetro graduado, el índice de refracción a 20 °C, la masa volúmica en g/mL a 20 °C, azúcares en g/L, azúcares en g/kg, sólidos solubles en °Bé a 20 °C y el grado alcohólico probable (G.A.P.) en % v/v a 20 °C.

Sacarosa % m/m a 20 °C (°Brix)	Índice de refracción a 20 °C	Masa Volúmica a 20 °C (g/mL)	Azúcares (g/L)	Azúcares (g/kg)	Sólidos solubles a 20 °C (°Bé)	G.A.P. a 20 °C (% v/v)
10,0	1,34782	1,0391	82,2	79,1	5,57	4,89
10,1	1,34798	1,0395	83,3	80,1		4,95
10,2	1,34813	1,0399	84,3	81,1	5,68	5,01
10,3	1,34829	1,0403	85,4	82,1		5,08
10,4	1,34844	1,0407	86,5	83,1	5,80	5,14
10,5	1,34860	1,0411	87,5	84,1		5,20
10,6	1,34875	1,0415	88,6	85,0	5,91	5,27
10,7	1,34891	1,0419	89,6	86,0		5,32
10,8	1,34906	1,0423	90,7	87,0	6,02	5,39
10,9	1,34922	1,0427	91,8	88,0		5,46
11,0	1,34937	1,0431	92,8	89,0	6,13	5,52
11,1	1,34953	1,0436	93,9	90,0		5,58
11,2	1,34968	1,0440	95,0	91,0	6,24	5,65
11,3	1,34984	1,0444	96,0	92,0		5,71
11,4	1,34999	1,0448	97,1	92,9	6,35	5,77
11,5	1,35015	1,0452	98,2	93,9		5,84
11,6	1,35031	1,0456	99,3	94,9	6,46	5,90
11,7	1,35046	1,0460	100,3	95,9		5,96
11,8	1,35062	1,0464	101,4	96,9	6,57	6,03
11,9	1,35077	1,0468	102,5	97,9		6,09
12,0	1,35093	1,0472	103,5	98,9	6,68	6,15
12,1	1,35109	1,0477	104,6	99,9		6,22
12,2	1,35124	1,0481	105,7	100,8	6,79	6,28
12,3	1,35140	1,0485	106,8	101,8		6,35
12,4	1,35156	1,0489	107,8	102,8	6,90	6,41
12,5	1,35171	1,0493	108,9	103,8		6,47
12,6	1,35187	1,0497	110,0	104,8	7,02	6,54
12,7	1,35203	1,0501	111,1	105,8		6,60
12,8	1,35219	1,0506	112,2	106,8	7,13	6,67
12,9	1,35234	1,0510	113,2	107,8		6,73
13,0	1,35250	1,0514	114,3	108,7	7,24	6,79

Continuación

Sacarosa % m/m a 20 °C (°Brix)	Índice de refracción a 20 °C	Masa Volúmica a 20 °C (g/mL)	Azúcares (g/L)	Azúcares (g/kg)	Sólidos solubles a 20 °C (°Bé)	G.A.P. a 20 °C (% v/v)
13,1	1,35266	1,0518	115,4	109,7		6,86
13,2	1,35282	1,0522	116,5	110,7	7,35	6,92
13,3	1,35298	1,0527	117,6	111,7		6,99
13,4	1,35313	1,0531	118,7	112,7	7,46	7,05
13,5	1,35329	1,0535	119,7	113,7		7,11
13,6	1,35345	1,0539	120,8	114,7	7,57	7,18
13,7	1,35361	1,0543	121,9	115,6		7,24
13,8	1,35377	1,0548	123,0	116,6	7,68	7,31
13,9	1,35393	1,0552	124,1	117,6		7,38
14,0	1,35408	1,0556	125,2	118,6	7,79	7,44
14,1	1,35424	1,0560	126,3	119,6		7,51
14,2	1,35440	1,0564	127,4	120,6	7,90	7,57
14,3	1,35456	1,0569	128,5	121,6		7,64
14,4	1,35472	1,0573	129,6	122,5	8,01	7,70
14,5	1,35488	1,0577	130,6	123,5		7,76
14,6	1,35504	1,0581	131,7	124,5	8,12	7,83
14,7	1,35520	1,0586	132,8	125,5		7,89
14,8	1,35536	1,0590	133,9	126,5	8,23	7,96
14,9	1,35552	1,0594	135,0	127,5		8,02
15,0	1,35568	1,0598	136,1	128,4	8,34	8,09
15,1	1,35584	1,0603	137,2	129,4		8,15
15,2	1,35600	1,0607	138,3	130,4	8,45	8,22
15,3	1,35616	1,0611	139,4	131,4		8,28
15,4	1,35632	1,0616	140,5	132,4	8,56	8,35
15,5	1,35648	1,0620	141,6	133,4		8,42
15,6	1,35664	1,0624	142,7	134,3	8,67	8,48
15,7	1,35680	1,0628	143,8	135,3		8,55
15,8	1,35696	1,0633	144,9	136,3	8,78	8,61
15,9	1,35713	1,0637	146,0	137,3		8,68
16,0	1,35729	1,0641	147,1	138,3	8,89	8,74
16,1	1,35745	1,0646	148,2	139,3		8,81
16,2	1,35761	1,0650	149,3	140,2	9,00	8,87
16,3	1,35777	1,0654	150,5	141,2		8,94
16,4	1,35793	1,0659	151,6	142,2	9,11	9,01
16,5	1,35810	1,0663	152,7	143,2		9,07
16,6	1,35826	1,0667	153,8	144,2	9,22	9,14
16,7	1,35842	1,0672	154,9	145,1		9,21

Continuación

Sacarosa % m/m a 20 °C (°Brix)	Índice de refracción a 20 °C	Masa Volúmica a 20 °C (g/mL)	Azúcares (g/L)	Azúcares (g/kg)	Sólidos solubles a 20 °C (°Bé)	G.A.P. a 20 °C (% v/v)
16,8	1,35858	1,0676	156,0	146,1	9,33	9,27
16,9	1,35874	1,0680	157,1	147,1		9,34
17,0	1,35891	1,0685	158,2	148,1	9,45	9,40
17,1	1,35907	1,0689	159,3	149,1		9,47
17,2	1,35923	1,0693	160,4	150,0	9,56	9,53
17,3	1,35940	1,0698	161,6	151,0		9,60
17,4	1,35956	1,0702	162,7	152,0	9,67	9,67
17,5	1,35972	1,0707	163,8	153,0		9,73
17,6	1,35989	1,0711	164,9	154,0	9,78	9,80
17,7	1,36005	1,0715	166,0	154,9		9,87
17,8	1,36021	1,0720	167,1	155,9	9,89	9,93
17,9	1,36038	1,0724	168,3	156,9		10,00
18,0	1,36054	1,0729	169,4	157,9	10,00	10,07
18,1	1,36070	1,0733	170,5	158,9		10,13
18,2	1,36087	1,0737	171,6	159,8	10,11	10,20
18,3	1,36103	1,0742	172,7	160,8		10,26
18,4	1,36120	1,0746	173,9	161,8	10,22	10,33
18,5	1,36136	1,0751	175,0	162,8		10,40
18,6	1,36153	1,0755	176,1	163,7	10,33	10,47
18,7	1,36169	1,0760	177,2	164,7		10,53
18,8	1,36185	1,0764	178,4	165,7	10,44	10,60
18,9	1,36202	1,0768	179,5	166,7		10,67
19,0	1,36219	1,0773	180,6	167,6	10,55	10,73
19,1	1,36235	1,0777	181,7	168,6		10,80
19,2	1,36252	1,0782	182,9	169,6	10,66	10,87
19,3	1,36268	1,0786	184,0	170,6		10,94
19,4	1,36285	1,0791	185,1	171,5	10,77	11,00
19,5	1,36301	1,0795	186,2	172,5		11,07
19,6	1,36318	1,0800	187,4	173,5	10,88	11,14
19,7	1,36334	1,0804	188,5	174,5		11,20
19,8	1,36351	1,0809	189,6	175,4	10,99	11,27
19,9	1,36368	1,0813	190,8	176,4		11,34
20,0	1,36384	1,0818	191,9	177,4	11,10	11,40
20,1	1,36401	1,0822	193,0	178,4		11,47
20,2	1,36418	1,0827	194,2	179,3	11,21	11,54
20,3	1,36434	1,0831	195,3	180,3		11,61
20,4	1,36451	1,0836	196,4	181,3	11,32	11,67

Continuación

Sacarosa % m/m a 20 °C (°Brix)	Índice de refracción a 20 °C	Masa Volúmica a 20 °C (g/mL)	Azúcares (g/L)	Azúcares (g/kg)	Sólidos solubles a 20 °C (°Bé)	G.A.P. a 20 °C (% v/v)
20,5	1,36468	1,0840	197,6	182,3		11,74
20,6	1,36484	1,0845	198,7	183,2	11,43	11,81
20,7	1,36501	1,0849	199,8	184,2		11,87
20,8	1,36518	1,0854	201,0	185,2	11,54	11,95
20,9	1,36535	1,0858	202,1	186,1		12,01
21,0	1,36551	1,0863	203,3	187,1	11,65	12,08
21,1	1,36568	1,0867	204,4	188,1		12,15
21,2	1,36585	1,0872	205,5	189,1	11,76	12,21
21,3	1,36602	1,0876	206,7	190,0		12,28
21,4	1,36619	1,0881	207,8	191,0	11,87	12,35
21,5	1,36635	1,0885	209,0	192,0		12,42
21,6	1,36652	1,0890	210,1	192,9	11,98	12,49
21,7	1,36669	1,0895	211,3	193,9		12,56
21,8	1,36686	1,0899	212,4	194,9	12,09	12,62
21,9	1,36703	1,0904	213,6	195,9		12,69
22,0	1,36720	1,0908	214,7	196,8	12,20	12,76
22,1	1,36737	1,0913	215,9	197,8		12,83
22,2	1,36754	1,0917	217,0	198,8	12,31	12,90
22,3	1,36771	1,0922	218,2	199,7		12,97
22,4	1,36787	1,0927	219,3	200,7	12,42	13,03
22,5	1,36804	1,0931	220,5	201,7		13,10
22,6	1,36821	1,0936	221,6	202,6	12,52	13,17
22,7	1,36838	1,0940	222,8	203,6		13,24
22,8	1,36855	1,0945	223,9	204,6	12,63	13,31
22,9	1,36872	1,0950	225,1	205,5		13,38
23,0	1,36889	1,0954	226,2	206,5	12,74	13,44
23,1	1,36906	1,0959	227,4	207,5		13,51
23,2	1,36924	1,0964	228,5	208,4	12,85	13,58
23,3	1,36941	1,0968	229,7	209,4		13,65
23,4	1,36958	1,0973	230,8	210,4	12,96	13,72
23,5	1,36975	1,0977	232,0	211,3		13,79
23,6	1,36992	1,0982	233,2	212,3	13,07	13,86
23,7	1,37009	1,0987	234,3	213,3		13,92
23,8	1,37026	1,0991	235,5	214,2	13,18	14,00
23,9	1,37043	1,0996	236,6	215,2		14,06
24,0	1,37060	1,1001	237,8	216,2	13,29	14,13
24,1	1,37078	1,1005	239,0	217,1		14,20

Continuación

Sacarosa % m/m a 20 °C (°Brix)	Índice de refracción a 20 °C	Masa Volúmica a 20 °C (g/mL)	Azúcares (g/L)	Azúcares (g/kg)	Sólidos solubles a 20 °C (°Bé)	G.A.P. a 20 °C (% v/v)
24,2	1,37095	1,1010	240,1	218,1	13,40	14,27
24,3	1,37112	1,1015	241,3	219,1		14,34
24,4	1,37129	1,1019	242,5	220,0	13,51	14,41
24,5	1,37146	1,1024	243,6	221,0		14,48
24,6	1,37164	1,1029	244,8	222,0	13,62	14,55
24,7	1,37181	1,1033	246,0	222,9		14,62
24,8	1,37198	1,1038	247,1	223,9	13,73	14,69
24,9	1,37216	1,1043	248,3	224,8		14,76
25,0	1,37233	1,1047	249,5	225,8	13,84	14,83
25,1	1,37250	1,1052	250,6	226,8		14,89
25,2	1,37267	1,1057	251,8	227,7	13,95	14,96
25,3	1,37285	1,1062	253,0	228,7		15,04
25,4	1,37302	1,1066	254,1	229,7	14,06	15,10
25,5	1,37319	1,1071	255,3	230,6		15,17
25,6	1,37337	1,1076	256,5	231,6	14,17	15,24
25,7	1,37354	1,1080	257,7	232,5		15,32
25,8	1,37372	1,1085	258,8	233,5	14,23	15,38
25,9	1,37389	1,1090	260,0	234,5		15,45
26,0	1,37407	1,1095	261,2	235,4	14,39	15,52
26,1	1,37424	1,1099	262,4	236,4		15,59
26,2	1,37441	1,1104	263,6	237,3	14,49	15,67
26,3	1,37459	1,1109	264,7	238,3		15,73
26,4	1,37476	1,1114	265,9	239,3	14,60	15,80
26,5	1,37494	1,1118	267,1	240,2		15,87
26,6	1,37511	1,1123	268,3	241,2	14,71	15,95
26,7	1,37529	1,1128	269,5	242,1		16,02
26,8	1,37546	1,1133	270,6	243,1	14,82	16,08
26,9	1,37564	1,1138	271,8	244,1		16,15
27,0	1,37582	1,1142	273,0	245,0	14,93	16,22
27,1	1,37599	1,1147	274,2	246,0		16,30
27,2	1,37617	1,1152	275,4	246,9	15,04	16,37
27,3	1,37634	1,1157	276,6	247,9		16,44
27,4	1,37652	1,1161	277,8	248,9	15,15	16,51
27,5	1,37670	1,1166	278,9	249,8		16,58
27,6	1,37687	1,1171	280,1	250,8	15,26	16,65
27,7	1,37705	1,1176	281,3	251,7		16,72
27,8	1,37723	1,1181	282,5	252,7	15,37	16,79

Continuación

Sacarosa % m/m a 20 °C (°Brix)	Índice de refracción a 20 °C	Masa Volúmica a 20 °C (g/mL)	Azúcares (g/L)	Azúcares (g/kg)	Sólidos solubles a 20 °C (°Bé)	G.A.P. a 20 °C (% v/v)
27,9	1,37740	1,1185	283,7	253,6		16,86
28,0	1,37758	1,1190	284,9	254,6	15,48	16,93
28,1	1,37776	1,1195	286,1	255,5		17,00
28,2	1,37793	1,1200	287,3	256,5	15,59	17,07
28,3	1,37811	1,1205	288,5	257,5		17,15
28,4	1,37829	1,1210	289,7	258,4	15,69	17,22
28,5	1,37847	1,1214	290,9	259,4		17,29
28,6	1,37864	1,1219	292,1	260,3	15,80	17,36
28,7	1,37882	1,1224	293,3	261,3		17,43
28,8	1,37900	1,1229	294,5	262,2	15,91	17,50
28,9	1,37918	1,1234	295,7	263,2		17,57
29,0	1,37936	1,1239	296,9	264,2	16,02	17,64
29,1	1,37954	1,1244	298,1	265,1		17,72
29,2	1,37972	1,1248	299,3	266,1	16,13	17,79
29,3	1,37989	1,1253	300,5	267,0		17,86
29,4	1,38007	1,1258	301,7	268,0	16,24	17,93
29,5	1,38025	1,1263	302,9	268,9		18,00
29,6	1,38043	1,1268	304,1	269,9	16,35	18,07
29,7	1,38061	1,1273	305,3	270,8		18,14
29,8	1,38079	1,1278	306,5	271,8	16,46	18,22
29,9	1,38097	1,1283	307,7	272,7		18,29
30,0	1,38115	1,1287	308,9	273,7	16,57	18,36

Anexo IV

Grado alcohólico a 20 °C. Tabla de corrección para ser aplicada al grado alcohólico aparente para corregir el efecto de la temperatura. Sumar o restar del grado alcohólico aparente (medida con un alcoholómetro normalizado) el valor indicado a continuación.

T (°C)		Grado alcohólico aparente (% v/v)															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
SUMAR	10º	0,82	0,84	0,87	0,91	0,96	1,01	1,08	1,16	1,25	1,35	1,47	1,60	1,74	1,89	2,06	2,24
	11º	0,78	0,79	0,82	0,86	0,90	0,95	1,01	1,08	1,16	1,25	1,36	1,47	1,60	1,73	1,88	2,03
	12º	0,72	0,74	0,76	0,79	0,83	0,88	0,93	0,99	1,07	1,15	1,24	1,34	1,44	1,56	1,69	1,82
	13º	0,66	0,67	0,69	0,72	0,76	0,80	0,84	0,90	0,96	1,03	1,11	1,19	1,28	1,38	1,49	1,61
	14º	0,59	0,60	0,62	0,64	0,67	0,71	0,74	0,79	0,85	0,91	0,97	1,04	1,12	1,20	1,29	1,39
	15º	0,51	0,52	0,53	0,55	0,58	0,61	0,64	0,68	0,73	0,77	0,83	0,89	0,95	1,02	1,09	1,16
	16º	0,42	0,43	0,44	0,46	0,48	0,50	0,53	0,56	0,60	0,63	0,67	0,72	0,77	0,82	0,88	0,94
	17º	0,33	0,33	0,34	0,35	0,37	0,39	0,41	0,43	0,46	0,48	0,51	0,55	0,59	0,62	0,67	0,71
	18º	0,23	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,29	0,31	0,33	0,35	0,37	0,40	0,42	0,45	0,48
	19º	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21	0,23	0,24
	20º	0 REFERENCIA 0															
RESTAR	21º		0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,19	0,20	0,22	0,23	0,25
	22º		0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,39	0,41	0,44	0,47	0,49
	23º		0,40	0,41	0,42	0,44	0,45	0,47	0,49	0,51	0,54	0,57	0,60	0,63	0,66	0,70	0,74
	24º		0,55	0,56	0,58	0,60	0,62	0,64	0,67	0,70	0,73	0,77	0,81	0,85	0,89	0,94	0,99
	25º		0,69	0,71	0,73	0,76	0,79	0,82	0,85	0,89	0,93	0,97	1,02	1,07	1,13	1,19	1,25
	26º		0,85	0,87	0,90	0,93	0,96	1,00	1,04	1,08	1,13	1,18	1,24	1,30	1,36	1,43	1,50
	27º			1,03	1,07	1,11	1,15	1,19	1,23	1,28	1,34	1,40	1,46	1,53	1,60	1,68	1,76
	28º			1,21	1,25	1,29	1,33	1,38	1,43	1,49	1,55	1,62	1,69	1,77	1,85	1,93	2,02
	29º			1,39	1,43	1,47	1,52	1,58	1,63	1,70	1,76	1,84	1,92	2,01	2,10	2,19	2,29
	30º			1,57	1,61	1,66	1,72	1,78	1,84	1,91	1,98	2,07	2,15	2,25	2,35	2,45	2,56

Continuación

T (°C)		Grado alcohólico aparente (% v/v)															
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
SUMAR	10°	2,24	2,43	2,61	2,80	2,98	3,16	3,33	3,48	3,61	3,73	3,83	3,91	3,98	4,03	4,08	4,11
	11°	2,03	2,20	2,36	2,52	2,68	2,83	2,98	3,12	3,24	3,34	3,43	3,50	3,57	3,62	3,66	3,69
	12°	1,82	1,96	2,10	2,24	2,38	2,51	2,64	2,76	2,87	2,96	3,04	3,10	3,16	3,21	3,25	3,27
	13°	1,61	1,73	1,84	1,96	2,08	2,20	2,31	2,41	2,50	2,58	2,65	2,71	2,76	2,80	2,83	2,85
	14°	1,39	1,49	1,58	1,68	1,78	1,88	1,97	2,06	2,13	2,20	2,26	2,31	2,36	2,39	2,42	2,44
	15°	1,16	1,24	1,32	1,40	1,48	1,56	1,64	1,71	1,77	1,83	1,88	1,92	1,96	1,98	2,01	2,03
	16°	0,94	1,00	1,06	1,12	1,19	1,25	1,31	1,36	1,41	1,46	1,50	1,53	1,56	1,58	1,60	1,62
	17°	0,71	0,75	0,80	0,84	0,89	0,94	0,98	1,02	1,05	1,09	1,12	1,14	1,17	1,18	1,20	1,21
	18°	0,48	0,51	0,53	0,56	0,59	0,62	0,65	0,68	0,70	0,72	0,74	0,76	0,78	0,79	0,80	0,81
	19°	0,24	0,25	0,27	0,28	0,30	0,31	0,33	0,34	0,35	0,36	0,37	0,38	0,39	0,40	0,41	0,41
	20°	0 REFERENCIA 0															
RESTAR	21°	0,25	0,26	0,28	0,29	0,30	0,31	0,33	0,34	0,35	0,35	0,37	0,38	0,38	0,39	0,39	0,40
	22°	0,49	0,52	0,55	0,57	0,60	0,62	0,65	0,67	0,70	0,72	0,74	0,75	0,76	0,78	0,79	0,80
	23°	0,74	0,78	0,82	0,86	0,90	0,93	0,97	1,01	1,04	1,07	1,10	1,12	1,15	1,17	1,18	1,19
	24°	0,99	1,04	1,10	1,15	1,20	1,25	1,29	1,34	1,39	1,43	1,46	1,50	1,53	1,55	1,57	1,59
	25°	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,56	1,62	1,68	1,73	1,78	1,83	1,87	1,90	1,94	1,97	1,99
	26°	1,50	1,57	1,65	1,73	1,80	1,87	1,94	2,01	2,07	2,13	2,19	2,24	2,28	2,32	2,35	2,38
	27°	1,76	1,84	1,93	2,01	2,10	2,18	2,26	2,34	2,41	2,48	2,55	2,61	2,66	2,70	2,74	2,77
	28°	2,02	2,11	2,21	2,31	2,40	2,49	2,58	2,67	2,76	2,83	2,90	2,98	3,03	3,08	3,13	3,17
	29°	2,29	2,39	2,50	2,60	2,70	2,81	2,91	3,00	3,09	3,18	3,26	3,34	3,40	3,46	3,51	3,55
	30°	2,56	2,67	2,78	2,90	3,01	3,12	3,23	3,34	3,44	3,53	3,62	3,70	3,77	3,84	3,90	3,95



Junta de Andalucía