INSTITUTO NACIONAL
DE VITIVINICULTURA

COMPENDIO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE VINOS Y MOSTOS

"Documento técnico de determinaciones analíticas de los Productos Vitivinícolas Argentinos"

MENDOZA – ARGENTINA
2026

IF-2026-107738308-APN-INV#MEC

PRÓLOGO

El presente Compendio de Métodos de Análisis de Vinos y Mostos, elaborado por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV), constituye un documento técnico de referencia que reúne metodologías fisicoquímicas validadas y adaptadas a las exigencias y realidades de la industria vitivinícola argentina.

Su contenido se fundamenta en el compendio analítico de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) y en desarrollos metodológicos del organismo. Asimismo, se consolida en el marco de la normativa vigente, integrando tanto las determinaciones de control de rutina como las técnicas requeridas para cumplir con las especificaciones de los diversos mercados y paises de destino.

Alineado con los objetivos institucionales del INV, la actualización permanente de estas metodologías, la incorporación de innovaciones tecnológicas y la mejora continua de los procesos resultan clave para consolidar una fiscalización moderna, eficiente y basada en criterios de riesgo.

En definitiva, este compendio pone a disposición del sector un marco procedimental unificado que armoniza los criterios analíticos para garantizar la inocuidad, aptitud y calidad de los productos vitivinícolas. Con ello, el INV fortalece la transparencia de los controles oficiales, promueve el cumplimiento normativo e impulsa la competitividad y el prestigio del vino argentino en el mundo.

Índice

PRÓLOGO 1

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS 5

ESTRUCTURA DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS 6

1. MASA VOLÚMICA (MV – INV - 10001) 10

2. PH (PH – INV – 10002) 14

3. GRADO ALCOHÓLICO POR VOLUMETRÍA (ALC/VOL. – INV – 10003) 18

4. GRADO ALCOHÓLICO POR ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO CERCANO (ALC/NIR – INV – 10004) 25

5. ACIDEZ TOTAL (AT – INV – 10005) 34

6. ACIDEZ VOLATIL (AV – INV – 10006) 39

7. EXTRACTO SECO TOTAL DENSIMÉTRICO (EST – INV - 10007) 45

8. AZÚCARES REDUCTORES (AZ – INV – 10008) 53

9. DESVIACIÓN POLARIMÉTRICA (DESV POLAR/POLARIMETRÍA – INV – 10009) 59

10. ANHÍDRIDO SULFUROSO LIBRE (SO_2 LIBRE – INV – 10010) 63

11. ANHÍDRIDO SULFUROSO TOTAL (SO_2 TOTAL – INV – 10011) 67

12. SULFATOS - SEMICUANTITATIVO ($SO_4^{=}$/SC – INV – 10012) 71

13. SULFATOS POR GRAVIMETRÍA ($SO_4^{=}$/GR – INV – 10013) 76

14. CAL EXPRESADA COMO ÓXIDO DE CALCIO, CAO (CAL/GRAVIMETRÍA – INV – 10014) 81

15. FERROCIANURO (FERROCIANURO – INV – 10015) 86

16. IÓN FÉRRICO (IÓN FÉRRICO – INV – 10016) 90

17. METANOL (ME – INV – 10017) 93

18. MATERIA COLORANTE ARTIFICIAL ÁCIDA – MÉTODO ÁRATA (MATERIA COLORANTE/ARATA – INV – 10018) 106

19. CENIZAS (CE – INV - 10019) 110

20. ALCALINIDAD EN CENIZAS (AC/TR – INV – 10020) 113

21. ÍNDICE DE COLOR (IC/IR – INV – 10021) 117

22. ÁCIDO SÓRBICO (SÓRBICO – INV – 10022) 122

23. CLORUROS POR ARGENTIMETRÍA (CL^-/ARG – INV – 10023) 127

24. CLORUROS (CL^-/POTENCIOMETRÍA – INV – 10024) 131

25. FLUORUROS (F^-/POTENCIOMETRÍA – INV – 10025) 136

26. GLICERINA POR MÉTODO ENZIMÁTICO (GL/EZ – INV – 10026) 141

27. GLICERINA POR ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA (GL/IR – INV – 10027) 148

28. METALES EN VINOS POR ABSORCIÓN ATÓMICA (METALES/AA – INV – 10028) 153

29. SODIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (NA/AA-LLAMA – INV – 10029) 158

30. POTASIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (K/AA-LLAMA – INV – 10030) 162

31. CALCIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (CA/AA-LLAMA – INV – 10031) 166

32. MAGNESIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (MG/AA-LLAMA – INV – 10032) 169

33. HIERRO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (FE/AA-LLAMA – INV – 10033) 172

34. COBRE POR ABSORCIÓN ATÓMICA (CU/AA-LLAMA – INV – 10034) 175

35. ZINC POR ABSORCIÓN ATÓMICA (ZN/AA-LLAMA – INV – 10035) 178

36. METALES EN VINOS POR ICP-OES (METALES/ICP – INV – 10036) 182

37. PLOMO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (PB/AA-LLAMA – INV – 10037) 190

38. PLOMO POR AA CON HORNO DE GRAFITO (PB/AA-HG – INV – 10038) 193

39. ARSÉNICO POR ESPECTROMETRÍA DE AA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS (AS/AA- HG MANUAL – INV – 10039) 197

40. ARSÉNICO POR ESPECTROMETRÍA DE AA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS (AS/AA-HG AUT – INV – 10040) 202

41. CADMIO POR ESPECTROMETRÍA DE AA EN HORNO DE GRAFITO (CD/AA-HG – INV – 10041) 208

42. ÁCIDO CÍTRICO MÉTODO ENZIMÁTICO (CÍTRICO/EZ – INV – 10042) 213

43. DIGLUCÓSIDO DE MALVIDINA POR FLUORESCENCIA VISUAL BAJO LÁMPARA UV (MALVIDINA/UV – INV – 10043) – MÉTODO CUALITATIVO 221

44. DIGLUCÓSIDO DE MALVIDINA POR FLUOROMETRÍA (MALVIDINA/FLUORIMETRÍA – INV – 10044) 226

45. SACAROSA (SAC – INV – 10045) 230

46. PERFIL DE ANTOCIANOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN UV-VIS (ANTOCIANOS/HPLC – INV – 10046) 236

47. ÁCIDO SHIKÍMICO POR CROMATOGRAFÍA LÌQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (SHIKÍMICO/HPLC – INV – 10047) 245

48. RELACIÓN ISOTÓPICA $^{18}O/^{16}O$ DEL AGUA EN VINOS ($^{18}O/^{16}O$-IRMS – INV – 10048) 255

49. RELACIÓN ISOTÓPICA $^{13}C/^{12}C$ DEL ALCOHOL EN VINOS ($^{13}C/^{12}C$-IRMS – INV – 10049) 260

50. DETERMINACIÓN DE NATAMICINA EN VINOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ULTRA ALTA RESOLUCIÓN – ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM (NATAMICINA/UHPLC-MS/MS – INV – 10050) 269

51. DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN VINOS POR TÉCNICAS DE ENZIMO-INMUNO-ENSAYO (ELISA) (GLU/ELISA – INV – 10051) 279

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 7.1 - *Masa volúmica aparente de mezclas hidroalcohólicas a 20ºC (parte 1: Alcohol 0 a 10 % (V/V) y parte 2: 11 a 21 Alcohol % (V/V) 20 ºC*.....50

Tabla 7.2 – *Cálculo del contenido de extracto seco total*……..…..…..*51*

Tabla 7.3 – *Intercalar*……..……...…*52*

Figura 27.1 – *Procedimiento de ensayo para la determinación semicuantitativa de Sulfatos (toque)*……..……...…*73*

Tabla 17.1 – *Tabla de diluciones para ajuste a 9,0 % (V/V)*……..…..*96*

Tabla 17.2 – *Preparación de escala patrón de metanol*……*100*

Tabla 17.3 – *Concentraciones presentes en los patrones (tipo) de metanol*……....*102*

Tabla 21.1 – *Valores de referencia para la verificación del equipo con solución de CoCl2 * 6H$_2$O*……..…...*120*

Figura 44.1. *Esquema del sistema de generación de hidruros (HVG) utilizado para la determinación de arsénico por espectrometría de absorción atómica*……..*204*

Tabla 28. *Resumen de especificaciones operativas para la determinación de macroelementos, microelementos y elementos traza, mediante espectrometría de absorción atómica*……..…*212*

Tabla Nº 42.1 - *Preparación de cubetas: Blanco y Muestra*……..…..…….*217*

Tabla 46.1 *Condiciones del equipo*……..……...*241*

Tabla 46.2 *Gradiente de elución*..… ……*241*

Figura 46.1. *Separación cromatográfica de los nueve (9) antocianos en un vino tinto*..*242*

Tabla 46.3. *Identificación de antocianinas y asignación de picos cromatográficos*……...*242*

Figura 50.1 *Estructura Química de la NATAMICINA (Sinonimia piramicina)*……*271*

Tabla Nº 50.1. *Descripción de diluciones*……....*275*

Tabla Nº 50.2. *Gradiente de elución*……...*276*

Tabla Nº 50.3. *Parámetros de detección*……*276*

Figura 50.2. *Cromatograma de vino con 25 ppb de Natamicina*……..…...*277*

Figura Nº 50.3. *Ión molecular de natamicina* (m/z 666,3)……..….278

Figura Nº 50.4. *Iones de transición (hijos) de Natamicina* (productos 485,2 y 503,2)..278

ESTRUCTURA DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS

Con el fin de garantizar la reproducibilidad, trazabilidad, comparabilidad de los resultados y la claridad en su aplicación, todos los métodos analíticos incluidos en el presente compendio se presentan de forma sistemática, precisa y estandarizada, permitiendo su correcta implementación en los distintos laboratorios.

1. Título

Incluye:

- Título del método
- Código único asignado por el INV

El título identifica de manera inequívoca el analito o parámetro a determinar, la matriz (cuando corresponda) y, si resulta pertinente, la técnica analítica empleada.

2. Introducción

Podrá incluir información general sobre el método, su contexto de aplicación, importancia analítica o consideraciones técnicas relevantes.

3. Alcance

Establece de forma concisa el método de análisis y especifica el producto o matriz a la que se aplica.

Es aplicable a métodos destinados al control de productos vitivinícolas, materias primas, insumos y subproductos, incluyendo ensayos físico-químicos, químicos e instrumentales.

4. Definiciones

Describe el analito o parámetro determinado, incluyendo su significado técnico y, cuando corresponde, las unidades en que se expresa.

Podrán incorporarse definiciones de términos necesarios para la correcta interpretación del método.

5. Principio

Describe de forma sintética los fundamentos físico-químicos o instrumentales del método, indicando sus etapas esenciales, tales como:

- Preparación de la muestra
- Desarrollo de la reacción o medición
- Detección o cuantificación
- Tratamiento de datos

6. Reactivos y materiales[1]

Se enumeran todos los reactivos, soluciones y materiales utilizados, indicando sus características esenciales, tales como:

- Grado de pureza
- Concentración
- Condiciones de conservación

Se incluirán, cuando corresponda:

- Productos comerciales
- Soluciones de concentración definida
- Soluciones tituladas
- Soluciones estándar
- Materiales de referencia (preferentemente trazables)
- Soluciones de control

7. Aparatos

Se enumeran los equipos, instrumentos y materiales necesarios, indicando sus características relevantes, tales como:

- Rango de trabajo
- Sensibilidad o límite de detección
- Precisión
- Requisitos de calibración o verificación

Cuando corresponda, podrán indicarse modelos, fabricantes o especificaciones equivalentes.

[1] [1] **Nota:** Cada reactivo se identificará mediante un número correlativo y se describirá en un párrafo independiente, incluyendo su preparación cuando corresponda.

8. Muestreo (Preparación de la muestra)

Se debe indicar:

- Procedimiento de muestreo o referencia normativa
- Preparación de la muestra para el análisis

Podrán incluirse condiciones de conservación cuando sean necesarias para preservar la integridad de la muestra.

9. Procedimiento

El procedimiento constituye la sección central del método y debe describirse de manera inequívoca y concisa.

9.1. Porción de prueba

Se especifica la cantidad de muestra a analizar y el procedimiento para su obtención a partir de la muestra de laboratorio, incluyendo condiciones de pesaje o medición.

9.2. Determinación(es)

Se describe detalladamente la secuencia operativa del análisis, incluyendo:

- Volúmenes y concentraciones
- Tiempos de reacción
- Temperaturas
- Condiciones instrumentales
- Secuencia de operaciones
- Criterios de finalización

9.3. Calibración (cuando corresponda)

Se describe el procedimiento de calibración, incluyendo:

- Tipo de calibración
- Número de puntos
- Rango de trabajo
- Frecuencia
- Criterios de aceptación

10. Cálculo (Resultados)

Se indica la forma de cálculo de los resultados, incluyendo:

- Ecuaciones utilizadas
- Definición de variables y símbolos
- Unidades
- Número de cifras decimales

Cuando corresponda, se considerarán:

- Correcciones (blanco, diluciones, recuperación)
- Estimación de la incertidumbre

11. Precisión (cuando exista validación interlaboratorio)

Se deberá indicar:

- Número de laboratorios participantes
- Valor medio de concentración
- Repetibilidad y reproducibilidad
- Desviaciones estándar correspondientes
- Referencia al estudio interlaboratorio

12. Anexo (cuando corresponda)

Podrá incluir:

- Datos estadísticos
- Información complementaria derivada de ensayos interlaboratorio

13. Bibliografía

Se citan normas, métodos oficiales, resoluciones y publicaciones técnicas que respaldan el método, indicando su versión vigente.

1. MASA VOLÚMICA (MV – INV - 10001)

1.1. Título

Determinación de masa volúmica en vinos y mostos mediante densímetro digital
Código: **MV – INV - 10001**

1.2. Introducción

La masa volúmica constituye un parámetro físico fundamental para la caracterización de productos vitivinícolas, relacionado con su composición y utilizado en el control analítico.

1.3. Alcance

Este método establece la determinación de la masa volúmica en vinos, mostos y otros productos vitivinícolas mediante densimetría digital a temperatura controlada.

1.4. Definiciones

La masa volúmica (ρ), también denominada densidad, es la relación entre la masa de una muestra y el volumen que ocupa, expresada en gramos por centímetro cúbico (g/cm^3) o kilogramos por litro (kg/L), a una temperatura determinada.

La masa volúmica es una magnitud intensiva que depende únicamente de la composición del producto y no de la cantidad de materia considerada.

1.5. Principio

La masa volúmica se determina mediante un densímetro digital basado en la medición de la frecuencia de oscilación de una celda, la cual varía en función de la masa del líquido contenido.

El método comprende las siguientes etapas:

- Verificación del equipo con fluido de referencia
- Introducción de la muestra
- Estabilización térmica
- Medición de la señal
- Obtención de la masa volúmica por lectura directa

1.6. Reactivos y materiales

R1 – Agua destilada o desionizada

Utilizada como fluido de referencia y para la limpieza del equipo.

Debe cumplir con las siguientes especificaciones:

- Conductividad: 0,5 a 6 µS/cm. (µmhos/cm equivalentes)
- pH: 5,0 a 7,0
- Libre de partículas visibles
- Temperatura de uso: (20 a 25) °C

No se requieren otros reactivos.

1.7. Aparatos / Equipos

- Densímetro digital con control de temperatura
- Sistema de inyección (jeringa descartable o equivalente)

El equipo debe:

- Poseer resolución mínima de 0,0001 g/cm³
- Permitir medición a 20 °C o temperatura controlada
- Estar calibrado y verificado según procedimientos vigentes

1.8. Preparación de la muestra

Se deberá indicar:

1.8.1. *Muestreo:* realizado conforme a normativa vigente o procedimientos del INV.

1.8.2. *Preparación de la muestra:*

En vinos con dióxido de carbono (CO_2), realizar desgasificación previa.

En muestras turbias o con partículas en suspensión, filtrar mediante filtro de 0,45 µm.

La muestra deberá alcanzar la temperatura de medición antes del análisis.

1.9. Procedimiento

1.9.1. *Porción de prueba*

Introducir una cantidad suficiente de muestra para llenar completamente la celda de medición, asegurando la ausencia de burbujas de aire.

1.9.2. Determinación

Verificación del equipo:

Verificar el equipo utilizando agua destilada como fluido de referencia.

Valor de referencia:

$$\boldsymbol{\rho = 0,9982 \pm 0,0002\ g/mL\ a\ 20\ °C}$$

El valor medido deberá encontrarse dentro del rango especificado. En caso contrario, se deberá calibrar el equipo.

Medición

- Introducir la muestra lentamente en la celda.
- Evitar la formación de burbujas.
- Esperar la estabilización térmica (mínimo 1 minuto o según especificación del equipo).
- Iniciar la medición.
- Registrar el valor indicado por el equipo.

Limpieza

- Enjuagar la celda al menos dos o tres veces con agua destilada.
- Verificar la eliminación completa de restos de muestra.
- Mantener la celda llena con agua destilada hasta su próximo uso.
- Cuando se interrumpa la secuencia de análisis por cualquier intervalo de tiempo, la celda deberá enjuagarse y mantenerse llena con agua destilada.

1.9.3. Calibración (cuando corresponda)

La calibración se realizará de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los procedimientos internos del laboratorio, utilizando materiales de referencia adecuados.

1.10. Cálculo (Resultados)

El resultado se obtiene por lectura directa del equipo. El equipo realiza automáticamente la determinación de la masa volúmica.

Se expresará como masa volúmica a la temperatura de medición, en g/cm³ o kg/L, con cuatro cifras decimales.

Se deberá indicar la temperatura de medición.

Cuando corresponda, se aplicarán correcciones por temperatura según normativa vigente.

1.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2012). *Resolution OIV-OENO 437-2012: Update of the method for determining the density of wine (Method OIV-MA-AS2-01A)*. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. https://www.oiv.int/public/medias/1467/oiv-oeno-437-2012-es.pdf

International Organisation of Vine and Wine. (2012). *Method OIV-MA-AS2-01A: Density and specific gravity at 20 °C. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.* https://www.oiv.int/public/medias/2467/oiv-ma-as2-01a.pdf

2. pH (pH – INV – 10002)

2.1. Título

Determinación de pH en vinos por potenciometría.
Código: **pH – INV – 10002**

2.2. Introducción

El pH constituye un parámetro analítico fundamental en el control de productos vitivinícolas, ya que influye directamente en la estabilidad química, microbiológica y sensorial del producto. Su determinación permite evaluar condiciones de conservación, evolución y calidad tecnológica de vinos y mostos.

2.3. Alcance

El presente método establece la determinación del pH en vinos y otras matrices líquidas vitivinícolas mediante medición potenciométrica. Es aplicable al control de calidad de productos terminados, productos intermedios del proceso enológico materias primas e insumos enológico.

2.4. Definiciones

El *pH* es una magnitud que expresa la concentración de los iones hidrógeno (H+) presentes en una solución. Se define como el logaritmo negativo de la actividad de dichos iones y se expresa en unidades de pH (adimensional) con una cifra significativa.

2.5. Principio

El método se basa en la medición potenciométrica de la diferencia de potencial entre un electrodo indicador sensible a la actividad de los iones hidrógeno y un electrodo de referencia, ambos sumergidos en la muestra.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Preparación de la muestra
- Calibración del equipo con soluciones buffer
- Medición del potencial
- Lectura directa del pH
- Control de temperatura

2.6. Reactivos y materiales

R1 – Solución buffer pH 7,00
Certificada, utilizada para calibración.

R2 – Solución buffer pH 4,00
Certificada, utilizada para calibración.

R3 – Agua destilada
Utilizada para el lavado del electrodo. Debe estar libre de impurezas y para la eliminación de CO_2 se filtra o se agita

2.7. Aparato

- Peachímetro con escala en unidades de pH
  - Sensibilidad: ± 0,01 unidades de pH
  - Equipado con compensación automática o manual de temperatura
- Electrodo combinado (vidrio/referencia) adecuado para matrices líquidas. Peachímetro con escala calibrada en pH ±0,01, sensor de temperatura que corrige la lectura.
- Vaso de precipitados de capacidad adecuada

Los equipos deberán estar calibrados y verificados conforme a procedimientos vigentes.

2.8. Muestreo

2.8.1. Muestra:

La muestra se tomará directamente del envase original, evitando modificaciones en su composición.

2.8.2. Conservación:

La muestra deberá conservarse en condiciones que eviten contaminación o pérdidas de CO_2.

2.8.3. Preparación para el análisis:

- En vinos con contenido de anhídrido carbónico, eliminar el gas mediante filtración o agitación suave.

- Colocar una alícuota de muestra en un vaso de precipitados adecuado para la inmersión del electrodo.
- Ajustar la temperatura de la muestra a aproximadamente 20°C.

2.9. Procedimiento

2.9.1. Porción de prueba

Se emplea una cantidad suficiente de muestra para permitir la correcta inmersión del electrodo (aproximadamente 50 a 100 mL). Se coloca la muestra en vaso de precipitados adecuado y se filtra si contiene CO_2

2.9.2. Determinación/es

Preparación del equipo

Verificar el estado del electrodo (limpio, sin incrustaciones ni daños). Calibrar el equipo con soluciones buffer certificadas (pH 7,00 y pH 4,00) previo a la medición.

Medición:

- Lavar el electrodo con agua destilada y secar suavemente.
- Sumergir el electrodo en la muestra.
- Realizar una leve agitación para homogeneizar.
- Esperar la estabilización de la lectura.
- Registrar el valor de pH.

Entre determinaciones: Lavar el electrodo con agua destilada y secar antes de cada medición.

2.9.3. Calibración

La calibración del peachímetro se realizará utilizando al menos dos puntos (buffer pH 7,00 y pH 4,00 según manual del equipo), cubriendo el rango de trabajo esperado. Se deberá verificar:

- Pendiente del electrodo
- Estabilidad de la señal
- Aceptación según criterios del fabricante o del laboratorio

La calibración se efectuará diariamente o antes de cada serie de mediciones.

2.10. Cálculo

El valor de pH se obtiene por lectura directa del equipo.

El resultado se expresa en unidades de pH, redondeados a una cifra decimal:

- Si la segunda cifra decimal es ≥ 5, se redondea a la décima superior
- Si la segunda cifra decimal es < 5, se redondea a la décima inferior

Ejemplos:

- 4,75 → 4,8
- 4,74 → 4,7

2.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2011). *Resolution OIV-OENO 438-2011: Method OIV-MA-AS313-15. pH*. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. *https://www.oiv.int/public/medias/2363/oiv-ma-as313-15.pdf*

3. GRADO ALCOHÓLICO POR VOLUMETRÍA (ALC/Vol. – INV – 10003)

3.1. Título

Determinación de grado alcohólico volumétrico en vinos por areometría

Código: **ALC/Vol. – INV – 10003**

3.2. Introducción

La determinación del grado alcohólico volumétrico constituye uno de los parámetros fundamentales para la caracterización y control de productos vitivinícolas. Su determinación permite verificar la autenticidad, clasificación y cumplimiento de especificaciones reglamentarias de vinos y otros productos derivados.

El método por areometría se basa en la determinación de la densidad del destilado alcohólico mediante areómetros calibrados a 20 °C.

La determinación de grado alcohólico por areometría se clasifica principalmente como un método físico o, más precisamente, **físico-químico**, debido a que la cuantificación se realiza a partir de una propiedad física del destilado hidroalcohólico (densidad).

3.3. Alcance

El presente método establece la determinación del grado alcohólico volumétrico en vinos mediante destilación y medición barométrica. Es aplicable al control de vinos, vinos nuevos, vinos espumantes, vinos parcialmente acetificados y otros productos vitivinícolas en análisis de rutina (análisis sumario) y controles oficiales.

3.4. Definiciones

Grado alcohólico volumétrico: Número de litros de etanol (alcohol etílico) contenidos en 100 litros de vino, medidos a 20 °C. La unidad de expresión es: **% Vol.; % vol/vol ó °GL**

Aerometría: Método físico de determinación de densidad basado en la flotación de un areómetro en un líquido.

Alcohómetro: Areómetro calibrado específicamente para medir el contenido alcohólico volumétrico de mezclas hidroalcohólicas.

3.5. Principio

El método se basa en la separación del alcohol etílico contenido en la muestra mediante destilación y en la determinación de la densidad del destilado alcohólico utilizando areómetros graduados (alcohómetros) en porcentaje alcohólico volumétrico a 20 °C. La determinación se realiza sobre el destilado alcohólico obtenido de la muestra.

El contenido alcohólico se obtiene mediante lectura directa sobre el alcohómetro, aplicando las correcciones correspondientes por temperatura y por calibración del instrumento cuando corresponda. Temperatura ambiente 20 a 25 ºC.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Preparación de la muestra
- Neutralización
- Destilación del vino
- Ajuste de volumen del destilado
- Acondicionamiento térmico
- Determinación aerométrica
- Corrección de temperatura
- Expresión de resultados

3.6. Reactivos y materiales

3.6.1. Reactivos

R1 – Hidróxido de sodio al 20 %. Utilizado para neutralización de muestras ácidas o acetificadas.

R2 – Solución de silicona al 5 %. Antiespumante soluble en agua.

R3 – Agua destilada (Conductividad: 0,5 a 3 µmhos/cm; pH 5–7; libre de cloruros y sulfatos)

R4 – Azul de bromotimol al 0,4 %

3.6.2. Materiales

- Papel de filtro Whatman Nº 40 o equivalente
- Probetas graduadas
- Matraz aforado de 200 mL
- Pipetas volumétricas

- Recipientes para destilación
- Mangueras y tapones resistentes al calor
- Gradillas para alcohómetros

3.7. Aparatos

- Equipo de destilación compuesto por:
  - Planchas calefactoras o mecheros
  - Erlenmeyer de 1000 mL ó
  - Balón Kjeldahl de 800 mL con cuello de 20 cm de longitud y 15 mm de diámetro interior como máximo.
  - Refrigerante tipo Graham de 40 cm colocado en forma vertical.
- Areómetros (alcohómetros graduados 10–20 % V/V) Clase II, conforme OIML R44
  - Graduación en grados y décimas de grado
  - Separación mínima de escala: 1,05 mm
  - Vástago cilíndrico de sección circular ≥ 3 mm
- Termómetro calibrado
  - Rango; 0 – 30 ºC
  - División: 0,1 ºC
- Probeta cilíndrica para lectura aerométrica
  - Altura aproximada: 320 mm
  - Diámetro aproximado: 40 mm
  - Diámetro interno al menos 6 mm mayor que el diámetro del alcohómetro
- Baño de agua fría o baño de hielo
- Balanza (cuando corresponda)

Los alcohómetros deberán mantenerse limpios, secos, contrastados y verificados periódicamente.

3.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

3.8.1. Muestra

Tomar la muestra directamente del envase original, asegurando su homogeneización previa. La muestra debe conservarse en recipiente herméticamente cerrado hasta el momento del análisis.

3.8.2. Preparación de la muestra

En general, la muestra no requiere preparación particular.

Vinos nuevos o espumosos: Eliminar previamente la mayor cantidad posible de anhídrido carbónico mediante filtración sobre papel de filtro.

Vinos con elevado contenido de anhídrido sulfuroso o acetificado: Realizar una primera destilación sin neutralización. Posteriormente:

- Neutralizar el destilado utilizando hidróxido de sodio al 20 %
- Agregar 2 gotas de azul de bromotimol al 0,4 %
- Continuar la neutralización hasta obtener color celeste estable
- Realizar una segunda destilación sobre el destilado neutralizado

Prevención de espuma durante la destilación: Cuando sea necesario, agregar 5 gotas de solución de silicona al 5 %.

3.9. Procedimiento

3.9.1. Porción de prueba

Medir exactamente 200 mL de muestra utilizando matraz aforado de 200 mL
Transferir cuantitativamente al balón o Erlenmeyer de destilación.
Realizar dos enjuagues del matraz con agua destilada para arrastrar restos de muestra.
El volumen total de muestra y enjuagues depende del material que se use para la destilación:

- No deberá superar 500 mL en Erlenmeyer
- No deberá sobrepasar el ecuador del balón Kjeldahl

3.9.2. Determinación

Neutralización

- Neutralizar gota a gota con solución de hidróxido de sodio al 20 % hasta alcanzar neutralidad. La materia colorante propia del vino permitirá evidenciar el cambio de medio ácido a neutro. El cambio de color de la muestra o del indicador permitirá evidenciar el pasaje de medio ácido a neutro.
- Agregar 5 gotas de solución de silicona al 5 %.

Destilación

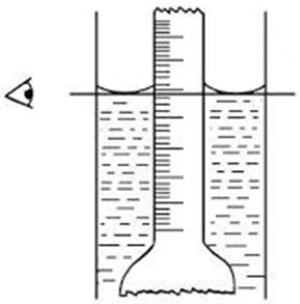
- Verificar el correcto estado de mangueras, tapones y conexiones.
- Ajustar herméticamente el sistema de destilación. Verificar que no existan restos de antiespumante o álcali en las zonas de ajuste de tapones y conexiones.
- Destilar la muestra recolectando el destilado en el mismo matraz utilizado para medir la muestra.
- Recoger al menos 160 mL de destilado (3/4 partes del volumen del matraz).
- Llevar a volumen con agua destilada a temperatura ambiente.
- Homogeneizar cuidadosamente.

Acondicionamiento térmico

- Enfriar el destilado hasta aproximadamente 18 °C utilizando baño de hielo o agua fría.
- Transferir el destilado a una probeta previamente enjuagada con el mismo destilado.
- Determinar la temperatura del líquido. Si la temperatura es inferior a 20 °C, llevar gradualmente hasta dicha temperatura evitando calentamientos bruscos que provoquen pérdida de alcohol.

Medición aerométrica

- Tomar el alcohómetro por el extremo superior del vástago.
- Transferir lentamente el líquido limpio y homogéneo a la probeta.
- Evitar formación de burbujas
- Realizar pequeños movimientos verticales (aproximadamente medio grado en ambos sentidos) para:
    - Humedecer uniformemente el vástago
    - Favorecer estabilización térmica
    - Estabilizar el menisco
- Efectuar tres mediciones progresivas.
- La lectura válida será aquella coincidente con temperatura de 20 °C.
- La lectura debe realizarse:
    - Tangencialmente
    - A nivel del menisco
    - Sobre la parte inferior del mismo



Registrar:

- Lectura del grado alcohólico y de la temperatura
- Aplicar la corrección instrumental cuando corresponda
- Fecha del análisis
- Identificación del analista

3.9.3. Calibración

Verificar periódicamente:

- Estado físico y calibración de los areómetros
- Limpieza del alcohómetro, cuerpo y vástago
- Exactitud del termómetro
- Volumen de matraces y probetas
- Hermeticidad del sistema de destilación

Los alcohómetros deberán:

- Estar contrastados
- Poseer registro de verificación vigente
- Contar con corrección instrumental identificada

La calibración deberá realizarse utilizando materiales trazables o patrones certificados cuando corresponda.

3.10. Cálculo (Resultados)

El grado alcohólico volumétrico se expresa como: **% (V/V) a 20°C con una cifra decimal.** El resultado corresponde a la lectura del alcohómetro corregida por:

- Temperatura

- Corrección instrumental del alcohómetro

Cuando la lectura se efectúe a temperatura distinta de 20°C, deberá aplicarse la corrección correspondiente utilizando tablas oficiales. La corrección instrumental aplicable a cada alcohómetro deberá obtenerse del registro vigente de verificación del instrumento.

3.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS312-01A. Alcoholic strength by volume*. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. https://www.oiv.int/node/1987/download/pdf

International Organisation of Vine and Wine. (2013). *Method OIV-MA-AS312-01A: Alcoholic strength by volume*. En *OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis* (Vol. 1, Sec. 3.1.2, pp. 1–16). OIV.

4. GRADO ALCOHÓLICO POR ESPECTROSCOPÍA IR CERCANO (ALC/NIR – INV – 10004)

4.1. Título

Determinación de grado alcohólico volumétrico en vinos por Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)

Código: **ALC/NIR – INV – 10004**

4.2. Introducción

La determinación del grado alcohólico volumétrico mediante espectroscopía de infrarrojo cercano constituye un método instrumental de rápida ejecución utilizado para el control analítico de vinos y productos vitivinícolas.

El método permite determinar el contenido de etanol mediante la medición de bandas de absorción características del infrarrojo cercano asociadas a enlaces moleculares presentes en el alcohol etílico.

La técnica presenta como principales ventajas:

- Rapidez analítica
- Ausencia de destilación
- Mínima preparación de muestra
- Alta repetibilidad
- Elevada capacidad de procesamiento de muestras

La determinación por espectroscopía infrarroja se clasifica como un método instrumental físico-químico.

4.3. Alcance

El presente método establece la determinación del grado alcohólico volumétrico en vinos mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR).

Es aplicable al análisis de vinos y productos vitivinícolas compatibles con las calibraciones validadas del equipo.

El método resulta particularmente adecuado para análisis de rutina y elevado número de muestras.

4.4. Definiciones

Grado alcohólico volumétrico: Litros de etanol (alcohol etílico) contenidos en 100 litros de vino, medidos a 20 °C.

La unidad de expresión es:

- % (V/V)
- ° GL

Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR): Técnica instrumental basada en la absorción selectiva de radiación infrarroja cercana por determinados grupos moleculares presentes en la muestra.

Calibración multivariable: Modelo matemático obtenido a partir de muestras patrón de composición conocida, utilizado para correlacionar la respuesta espectral con la concentración del analito.

4.5. Principio

El método se basa en la absorción de radiación infrarroja cercana (NIR) por el etanol presente en la muestra.

La muestra es sometida a radiación infrarroja en longitudes de onda específicas Dónde el etanol presenta bandas características de absorción. La señal espectral obtenida es comparada con modelos de calibración desarrollados a partir de vinos patrón de referencia.

La concentración de alcohol se determina automáticamente mediante regresión multivariable incorporada en el software del equipo.

El método es aplicable principalmente a macrocomponentes del vino, principalmente etanol.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Preparación de la muestra

- Estabilización del equipo
- Verificación del cero instrumental
- Verificación con solución patrón
- Medición de la muestra
- Procesamiento automático de datos
- Expresión de resultados

Ventajas: rápida, sin destilación, mínima preparación de la muestra.

4.6. Reactivos y materiales

4.6.1. Reactivos

R1 – Agua destilada

Utilizada para:

- Limpieza del sistema
- Ajuste de cero
- Enjuague de celda

R2 – Solución hidroalcohólica patrón

Características:

- Concentración entre 16,0 % (V/V) y 20,0 % (V/V)
- Valor determinado por densimetría digital
- Trazable a materiales de referencia cuando corresponda

4.6.2. Materiales

- Jeringas descartables de 3 a 10 mL
- Filtros de membrana de 0,45 µm
- Vasos de precipitado
- Material volumétrico auxiliar

4.7. Equipo

Equipo NIR de Espectroscopía Infrarroja.

Características mínimas:

- Lectura directa de alcohol en % (V/V)
- Sistema de compensación térmica
- Modelos de calibración para vinos
- Sistema automático de procesamiento espectral
- Sistema de filtración con membrana de 0,45 µm
- Termómetro calibrado (cuando corresponda)
- Computadora o sistema de adquisición de datos asociado al equipo

El equipo deberá mantenerse calibrado y verificado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

4.8.1. Muestra

Tomar la muestra directamente del envase original, evitando pérdidas de alcohol por evaporación.

La muestra deberá abrirse inmediatamente antes de efectuar la determinación.

4.8.2. Preparación de la muestra

En general, la muestra no requiere preparación particular previa.

- *Vinos con gas carbónico: Cuando la muestra presente gas carbónico (vinos* espumantes o parcialmente fermentados), deberá eliminarse previamente mediante:
    - *Descarbonatación suave, o*
    - Filtración utilizando membrana de 0,45 µm

- *Muestras veladas o turbias: Filtrar utilizando membrana de 0,45 µm* colocada entre la jeringa y el equipo.

4.8.3. Precauciones

Cuando sea necesario trasvasar la muestra a un recipiente auxiliar[2]:

- Evitar exposiciones prolongadas al aire
- Inyectar inmediatamente luego del trasvase
- Descartar el remanente utilizado

En caso de repetir la medición, utilizar nuevamente muestra proveniente del envase original.

4.9. Procedimiento

4.9.1. Porción de prueba

Tomar una cantidad suficiente de muestra para realizar:

- Enjuague del sistema
- Medición analítica
- Repeticiones cuando correspondan

La muestra deberá encontrarse homogénea y libre de burbujas.

4.9.2. Determinación

Puesta en funcionamiento del equipo

- Encender el equipo.
- Permitir estabilización térmica durante al menos 40 minutos antes de iniciar las mediciones.
- Se recomienda mantener el equipo encendido durante la semana operativa para asegurar estabilidad instrumental.

Verificación del cero instrumental

- Seleccionar en el menú el método “Vino”.

[2] **Nota**: Cuando hay que trasvasar una muestra o solución hidroalcohólica a un vaso de precipitado para efectuar una medición, se debe tener en cuenta que el alcohol se evapora rápidamente produciendo lecturas erróneas por defecto. Por lo tanto, hay que tener la precaución de que una vez que se ha trasvasado la muestra debe inyectarse inmediatamente y descartar el remanente del líquido del vaso. En caso de que sea necesario repetir la lectura, se debe sacar nuevamente la muestra del envase original y repetir esta operación.

Una vez finalizadas las lecturas de las muestras, enjuagar con agua destilada varias veces

- Inyectar agua destilada en la celda entre tres y cuatro veces para limpieza del sistema.
- En la última inyección dejar la celda completamente llena evitando formación de burbujas.
- Presionar “Start”.
- Esperar indicación de “Vino válido”.

El valor esperado deberá ser: **0,00 % (V/V) ± 0,03 % (V/V)**



Si el resultado se encuentra fuera del rango:

- Limpiar la celda
- Reemplazar el agua destilada
- Repetir el procedimiento

Si la desviación persiste, realizar ajuste de cero.

Verificación con solución patrón

- Inyectar la solución hidroalcohólica patrón luego de verificar el cero instrumental.
- Realizar la medición.
- Comparar el valor obtenido con el valor asignado de la solución patrón.

La diferencia máxima admitida será**: ± 0,03 % (V/V)**

Si el valor excede la tolerancia:

- Limpiar la celda

- Repetir la medición
- Realizar ajuste de concentración conocida cuando corresponda

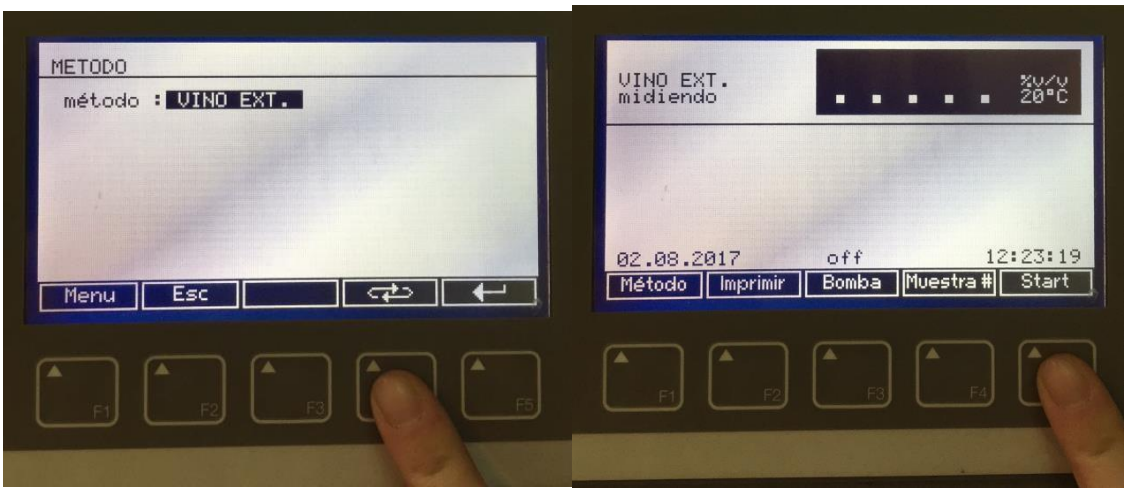
El ajuste deberá efectuarse exclusivamente con solución hidroalcohólica patrón superior a 16,0 % vol. No deberá utilizarse vino para ajustes instrumentales.

Medición de muestras

- Inyectar la muestra lentamente evitando formación de burbujas.
- Cuando el volumen disponible lo permita, realizar uno o dos enjuagues previos del sistema con la misma muestra.
- Registrar la lectura correspondiente a la última inyección.

Muestras con alto contenido de azúcar

Las muestras con concentraciones superiores a 50 g/L de azúcares deberán analizarse utilizando el método instrumental: **“Vino ext”**



Registrar el resultado obtenido.

Finalización

Una vez concluidas las determinaciones:

- Enjuagar varias veces el sistema con agua destilada.
- Verificar limpieza de la celda.
- Dejar el sistema acondicionado para futuras mediciones.

4.9.3. Calibración

El equipo deberá verificarse periódicamente mediante los siguientes ajustes instrumentales:

- Ajuste de cero con agua destilada
- Verificación con solución hidroalcohólica patrón
- Controles internos de calidad
- Verificación de estabilidad instrumental

La calibración analítica se basa en modelos multivariables desarrollados por el fabricante utilizando vinos patrón de referencia.

Los ajustes instrumentales deberán:

- Registrarse
- Ser trazables
- Cumplir los criterios internos de aceptación

4.10. Cálculo (Resultados)

El resultado del grado alcohólico volumétrico se obtiene mediante lectura directa del equipo y se expresa como: **% (V/V) a 20 °C.** El equipo entrega resultados con dos cifras decimales.

El valor informado deberá expresarse con **una cifra decimal** mediante redondeo convencional.

Ejemplos:

- 12,05 % vol → 12,1 % vol
- 12,04 % vol → 12,0 % vol

Cuando corresponda, deberá considerarse:

- Repeticiones analíticas
- Controles internos
- Resultados fuera de rango de calibración

4.11. Anexo[3]

No aplica.

4.12. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2017, 6 de septiembre). *Resolución E 193/2017: Apruébase el método "Determinación del Grado Alcohólico por Espectroscopia Infrarroja"*. Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-279181/texto

International Organisation of Vine and Wine. (2014). *Resolution OIV-OENO 518-2014: Method OIV-MA-AS312-03. Determination of alcoholic strength by volume of wine by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)* [Resolución OIV-OENO 518-2014: Método OIV-MA-AS312-03. Determinación del grado alcohólico volumétrico del vino por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. https://www.oiv.int/node/2967/download/pdf

[3] Ajuste del cero
Presionar Método (tecla izquierda)
Menú: Método VINO
→ Ajuste (tecla derecha ⇦)
→ Cero (tecla derecha ⇦)
Ajuste: Limpiar y secar, llenar célula Realmente desea ajustar?
NO **SI** (se selecciona)
Start
Ajuste 0,00 % (V/V). Esperando estabilización Atemperando. Ajuste
Ajuste memorizado (Continuar)
Ajuste de concentración conocida
Se realiza con solución hidroalcohólica Presionar Método (tecla izquierda)
Menú: Método VINO
→ Ajuste (tecla derecha ⇦)
Concentración conocida (tecla derecha ⇦)
Ajuste concentración conocida
Alcohol = % (V/V)
→ Ajuste % (V/V). Esperando estabilización
Atemperando. Ajuste
Ajuste memorizado (Continuar)
El ajuste del equipo se realiza solo con solución hidroalcohólica, preparada y controlada y cuyo valor sea superior a 16 % V. sin excepción; nunca realizar dicho ajuste con vino ni con otras soluciones.

5. ACIDEZ TOTAL (AT – INV – 10005)

5.1. Título

Determinación de acidez total
Código: **AT – INV – 10005**

5.2. Introducción

La acidez total constituye uno de los parámetros analíticos fundamentales en el control de calidad de vinos y productos vitivinícolas, debido a su influencia sobre las características organolépticas, estabilidad microbiológica y equilibrio químico del producto.

Su determinación se basa en la valoración de las funciones ácidas presentes en el vino mediante titulación con una solución alcalina valorada hasta alcanzar pH 7.

5.3. Alcance

Este método establece la determinación de la acidez total en vinos mediante titulación ácido-base con solución de hidróxido de sodio valorada. Es aplicable a vinos, mostos y productos vitivinícolas.

5.4. Definición

Acidez total: La acidez total del vino corresponde a la suma de las funciones ácidas valorables presentes en la muestra cuando ésta es llevada a pH 7 mediante adición de una solución alcalina valorada.
La acidez total se expresa generalmente en gramos por litro (g/L) de ácido tartárico.

5.5. Principio

El método se basa en la neutralización de las funciones ácidas libres presentes en la muestra mediante titulación con una solución de hidróxido de sodio 0,05 N (0,05 M).

El punto final de la valoración corresponde a pH ≈ 7,0 y se detecta visualmente utilizando azul de bromotimol como indicador ácido-base.

El método comprende las siguientes etapas:

- Descarbonatación de la muestra cuando corresponda
- Adición de indicador
- Titulación con solución alcalina valorada

- Identificación del punto final
- Cálculo de la acidez total

5.6. Reactivos y materiales

5.6.1. Reactivos

R1 – Hidróxido de sodio 0,05 N (0,05 M)

Solución valorada utilizada para la titulación.

R2 – Indicador azul de bromotimol al 4 ‰

Utilizado para la visualización del punto final de la titulación.

R3 – Solución buffer pH 7

Utilizada como referencia visual del punto final.

R4 - Agua destilada

5.6.2. Materiales

- Pipeta de doble aforo de 10 mL
- Bureta graduada incolora de 25 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Papel de filtro técnico Whatman Nº 40 o equivalente.

El material volumétrico deberá encontrarse calibrado/verificado y en condiciones adecuadas de uso.

5.7. Aparatos

No aplica.

5.8. Preparación de la muestra

5.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

5.8.2. Preparación de la muestra

Cuando la muestra contenga anhídrido carbónico, éste deberá eliminarse previamente.

Para ello:

- Filtrar la muestra utilizando papel de filtro técnico.
- Agitar posteriormente hasta completar la descarbonatación.
- Utilizar la muestra descarbonatada para la determinación analítica.

5.9. Procedimiento

5.9.1. Porción de prueba

Medir 10 mL de muestra mediante pipeta de doble aforo y transferir a un Erlenmeyer de 250 mL para su titulación.

5.9.2. Determinación(es)

Preparación del sistema

- Colocar aproximadamente 10 gotas (0,5 mL) de indicador azul de bromotimol en el Erlenmeyer.
- El indicador deberá añadirse previamente para verificar el estado de neutralidad del recipiente.

Adición de agua

- Añadir aproximadamente 30 mL de agua destilada.

Incorporación de la muestra

- Agregar los 10 mL de muestra utilizando pipeta de doble aforo.

Titulación

- Titular con solución de hidróxido de sodio 0,05 N (0,05 M) utilizando bureta graduada.
- Agregar el titulante gota a gota hasta alcanzar el punto final.

El punto final corresponde a una coloración verde azulada estable.

Referencia del punto final

Preparar una solución de referencia agregando:

- 10 mL de buffer pH 7
- 0,5 mL de indicador azul de bromotimol

La coloración obtenida se utilizará como referencia visual para la determinación.

Consideraciones para vinos tintos

En vinos tintos de elevada intensidad colorante, Dónde resulte dificultosa la visualización del punto final, podrá procederse de la siguiente manera:

- Añadir hasta 50 mL de agua destilada.
- Utilizar aproximadamente 15 gotas (0,75 mL) de indicador.

Si persiste la dificultad:

- Tomar 5 mL de muestra.
- Añadir 30 mL de agua destilada.
- Incorporar 10 gotas (0,5 mL) de indicador.
- Realizar la titulación y ajustar posteriormente el cálculo al volumen de muestra utilizado.

Registro

Registrar el volumen de hidróxido de sodio consumido y consignar el resultado en el sistema correspondiente.

5.9.3. Valoración

La solución de hidróxido de sodio deberá encontrarse previamente valorada y estandarizada conforme a procedimientos vigentes del laboratorio.

Se deberá verificar periódicamente:

- Normalidad de la solución
- Estado del indicador
- Correcto funcionamiento del material volumétrico

5.10. Cálculo y expresión de los resultados

La acidez total se calcula a partir del volumen de hidróxido de sodio consumido durante la titulación.

El resultado se expresa en gramos por litro (g/L) de ácido tartárico:

$$\boldsymbol{AT}\left(\frac{\boldsymbol{g}}{\boldsymbol{L}}\text{á}\boldsymbol{cido\ tart}\text{á}\boldsymbol{rico}\right) = \boldsymbol{n}\cdot\boldsymbol{factor}$$

Dónde:

- n = mL de NaOH 0,05 N (0,05 M) consumidos en la titulación

- factor = factor de conversión correspondiente = **0,375**

Cuando se utilicen volúmenes de muestra distintos de 10 mL, el cálculo deberá ajustarse proporcionalmente.

También se puede expresar en meq/L de ácido tartárico:

$$\boldsymbol{Acidez\ Total}\left(\frac{\boldsymbol{meq}}{\boldsymbol{L}}\ \boldsymbol{de\ ácido\ tartárico}\right) = \boldsymbol{n} \cdot \mathbf{5}$$

5.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS313-01. Total acidity [Resolución OIV/OENO 377/2009: Método OIV-MA-AS313-01. Acidez total]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. *https://www.oiv.int/node/1995/download/pdf*

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1996, 22 de abril). *Resolución C. 11/1996: Reglamento General de Análisis - Anexo I, Cap. II: Métodos analíticos oficiales para vinos y mostos (Determinación de la acidez total). Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-37704/texto*

6. ACIDEZ VOLATIL (AV – INV – 10006)

6.1. Título

Determinación de acidez volátil en vinos
Código: **AV – INV – 10006**

6.2. Introducción

La acidez volátil constituye un parámetro de control fundamental en vinos, ya que refleja principalmente el contenido de ácidos volátiles de la serie acética formados durante procesos fermentativos o alteraciones microbiológicas.

Su determinación permite evaluar el estado de conservación y calidad del producto, así como detectar desviaciones asociadas a procesos de deterioro.

6.3. Alcance

Este método establece la determinación de la acidez volátil en vinos mediante destilación por arrastre de vapor y posterior valoración ácido-base. Es aplicable a vinos y productos vitivinícolas compatibles con el método.

6.4. Definiciones

Acidez volátil: La acidez volátil está constituida por los ácidos pertenecientes principalmente a la serie acética presente en el vino, tanto en estado libre como salificado.

La acidez volátil se expresa en gramos por litro (g/L) de ácido acético.

Blanco del equipo: Valor correspondiente al consumo de solución alcalina originado por el propio sistema de destilación, determinado mediante destilación de agua destilada acidificada.

Rendimiento del equipo: Relación porcentual entre la cantidad de ácido acético recuperado por destilación y la cantidad teórica presente en una solución patrón.

6.5. Principio

El método consiste en la separación de los ácidos volátiles de la muestra mediante destilación rápida por arrastre de vapor.

El ácido acético presente en el destilado se determina posteriormente por titulación con solución estándar de hidróxido de sodio utilizando fenolftaleína como indicador.

El método contempla además la corrección correspondiente al dióxido de azufre libre y combinado, determinados por valoración con yodo.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Eliminación de anhídrido carbónico
- Determinación del blanco del equipo
- Destilación por arrastre de vapor
- Titulación ácido-base del destilado
- Determinación de SO2 libre
- Determinación de SO2 combinado
- Corrección y cálculo de resultados

6.6. Reactivos y materiales

6.6.1. Reactivos

R1 – Agua destilada
R2 – Solución de iodo 0,02 N
R3 – Solución saturada de bórax
R4 – Ácido sulfúrico al 20 %
R5 – Solución de hidróxido de sodio 0,05 N
R6 – Ácido tartárico al 25 %
R7 – Solución de ácido acético 1 g/L
R8 – Solución alcohólica de fenolftaleína al 1 %
R9 – Solución de almidón
Con concentración comprendida entre 2 % y 4 %

6.6.2. Materiales:

- Pipetas doble aforo certificadas de 10 mL
- Pipetas graduadas de 10 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Bureta certificada de 25 mL color caramelo para solución de iodo 0,02 N
- Bureta certificada de 25 mL para solución de hidróxido de sodio 0,05 N
- Propipeta

6.7. Equipos

- Equipo de destilación por arrastre de vapor

El sistema de destilación deberá estar compuesto por:

- Generador de vapor
- Ampolla de destilación
- Columna rectificadora
- Refrigerante

El equipo deberá cumplir las siguientes condiciones:

- Presentar un valor máximo de anhídrido carbónico tal que, al titular el vapor generado, no se supere un consumo de 0,3 mL de hidróxido de sodio 0,05 N.
- Permitir una recuperación mínima del 97 % del ácido acético.

6.8. Preparación de la muestra

6.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

6.8.2. Muestra

La muestra deberá encontrarse exenta de anhídrido carbónico.
Cuando la muestra contenga CO_2:

- Filtrar utilizando material adecuado.
- Agitar hasta asegurar la completa eliminación del gas.

Utilizar posteriormente la muestra descarbonatada para el análisis.

6.9. Procedimiento

6.9.1. Porción de prueba

Medir 10 mL de muestra descarbonatada mediante pipeta doble aforo.

6.9.2. Determinación(es)

Obtención del blanco del equipo

- Colocar en la ampolla del equipo 10 mL de agua destilada.
- Añadir 1 mL de ácido tartárico al 25 %
- Destilar hasta obtener al menos 150 mL de destilado.

Titular el destilado con hidróxido de sodio 0,05 N agregando 3 gotas de fenolftaleína al 1 % como indicador, hasta obtener color rosa tenue persistente durante al menos 15 segundos.

El valor obtenido corresponde al blanco del equipo y deberá descontarse posteriormente del volumen N empleado en la determinación de acidez volátil.

Verificación del rendimiento del equipo

En condiciones normales de trabajo deberá recuperarse por destilación al menos el 97 % del ácido acético. El rendimiento se controla destilando una solución patrón de ácido acético de concentración conocida, por ejemplo:

- 10 mL de solución de ácido acético 1 g/L.

El rendimiento porcentual se calcula mediante la relación entre:

- El volumen de hidróxido de sodio consumido en la titulación del destilado corregido por el blanco.
- El volumen consumido en la titulación directa de la solución patrón.

En todas las titulaciones el punto final corresponde a una coloración rosa tenue persistente durante al menos 15 segundos.

$$\boldsymbol{Rendimiento} = \left(\frac{\boldsymbol{Gasto\ de\ NaOH\ en\ destilado - Gasto\ del\ blanco}}{\boldsymbol{Gasto\ de\ NaOH\ en\ titulaci\grave{o}n\ directa}}\right) \cdot \mathbf{1000}$$

Destilación de la muestra

- Colocar en la ampolla del equipo:
    - 10 mL de muestra descarbonatada.
    - 1 mL de ácido tartárico al 25 %
- Realizar la destilación por arrastre de vapor.
- Recoger aproximadamente 150 mL de destilado.

De acuerdo con el rendimiento determinado del equipo, el volumen recogido podrá aumentarse para alcanzar la recuperación requerida.

6.9.3. Titulación de la acidez del destilado

- Titular el destilado con solución de hidróxido de sodio 0,05 N.
- Agregar 3 gotas de fenolftaleína al 1 % como indicador.

El punto final corresponde a una coloración rosa tenue persistente durante al menos 15 segundos.

Registrar el volumen consumido de hidróxido de sodio, identificado como **n.**

A este valor deberá descontarse el blanco del equipo.

6.9.4. Determinación de SO2 libre

- Acidificar el destilado agregando únicamente una gota de ácido sulfúrico al 20
- Añadir entre 2 mL y 4 mL de solución de almidón.

Titular con solución de iodo 0,02 N hasta obtener coloración azul tenue persistente durante al menos 15 segundos.

Registrar el volumen consumido como **n1**.

6.9.5. Determinación de SO_2 combinado

- Alcalinizar posteriormente agregando solución saturada de bórax hasta alcanzar color rosa tenue.
- Titular rápidamente con solución de iodo 0,02 N hasta obtener coloración azul intensa persistente durante 5 segundos.

Registrar el volumen consumido como **n2.**

6.9.6. Calibración

Las soluciones de hidróxido de sodio y de iodo deberán encontrarse previamente valoradas y estandarizadas conforme a procedimientos vigentes del laboratorio.

Se deberá verificar periódicamente:

- Concentración de las soluciones valoradas
- Funcionamiento del equipo de destilación
- Rendimiento de recuperación
- Estado del material volumétrico

6.10. Cálculo (Resultados)

La acidez volátil se expresa en gramos por litro (g/L) de ácido acético.

El cálculo se realiza utilizando los valores:

n = volumen de hidróxido de sodio 0,05 N consumido

n1 = volumen de iodo 0,02 N correspondiente a SO_2 libre

n2 = volumen de iodo 0,02 N correspondiente a SO_2 combinado

El resultado final deberá corregirse considerando:

- Blanco del equipo
- Corrección por dióxido de azufre libre y combinado

$$\boldsymbol{Acidez\ Volátil\ en\ Ácido\ Acético}\ \left(\frac{\boldsymbol{g}}{\boldsymbol{L}}\right) = \left(\boldsymbol{n} - \left(\frac{\boldsymbol{n1}}{\boldsymbol{25}} + \frac{\boldsymbol{n2}}{\boldsymbol{5}}\right)\right) \cdot \boldsymbol{0,3}$$

6.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS313-02. Volatile acidity [Resolución OIV/OENO 377/2009: Método OIV-MA-AS313-02. Acidez volátil]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. https://www.oiv.int/node/1996/download/pdf

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1996, 22 de abril). *Resolución C. 11/1996: Reglamento General de Análisis - Anexo I, Cap. II: Métodos analíticos oficiales para vinos y mostos (Determinación de la acidez volátil). Argentina.gob.ar.* https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-37704/texto

7. EXTRACTO SECO TOTAL DENSIMÉTRICO (EST – INV - 10007)

7.1. Título

Determinación de extracto seco total (método densimétrico) en vinos y mostos
Código: **EST – INV – 10007**

7.2. Introducción

El extracto seco total constituye un parámetro fundamental en el control analítico de productos vitivinícolas, ya que refleja el contenido de sustancias no volátiles presentes en el vino o mosto, aportando información relevante sobre su composición y calidad.

7.3. Alcance

El presente método establece la determinación del extracto seco total en vinos, mostos y otros productos vitivinícolas mediante método densimétrico mediante método densimétrico aplicado al control oficial de productos vitivinícolas.

7.4. Definiciones

Extracto seco total: Conjunto de sustancias presentes en el vino o mosto que, bajo condiciones físicas determinadas, no se volatilizan. Dichas condiciones deben establecerse de modo que las sustancias que componen el extracto sufran la mínima alteración posible.

Extracto seco reducido: Corresponde al extracto seco total menos:

- Los azúcares totales que excedan 1 g/L
- El sulfato de potasio que exceda 1 g/L
- El manitol, si estuviera presente
- Otras sustancias eventualmente adicionadas al producto

El extracto seco total se expresa en gramos por litro (g/L).

7.5. Principio

El método se basa en la comparación entre la densidad de la muestra y la de una mezcla hidroalcohólica de igual graduación alcohólica. La diferencia entre ambas densidades permite calcular el contenido de sustancias no volátiles (extracto seco).

Esta forma de medir por densimetría la cantidad de sustancias disueltas en el vino y en el mosto refleja que la naturaleza y cantidad de estas sustancias pueden variar, por lo que para su cálculo se utilizan fórmulas estandarizadas.

La densidad del residuo sin alcohol se determina a partir de:

- La masa volúmica del vino a 20 °C, corregida por el efecto de la acidez volátil.
- La masa volúmica de la mezcla hidroalcohólica correspondiente.

El extracto seco total se expresa como la cantidad de sacarosa que, disuelta en agua hasta completar un litro, presenta la misma densidad que el residuo sin alcohol.

El método comprende las siguientes etapas:

- Determinación del grado alcohólico.
- Determinación de la masa volúmica.
- Determinación de la acidez volátil (cuando corresponda).
- Cálculo de la densidad del residuo sin alcohol.
- Conversión a extracto seco mediante tablas.

7.6. Reactivos y materiales

No se requieren reactivos específicos para la determinación del extracto seco total por método densimétrico.

Los reactivos empleados en las determinaciones previas (grado alcohólico, masa volúmica y acidez volátil) deberán cumplir con los requisitos establecidos en los métodos correspondientes.

7.7. Aparatos / Equipos

- Alcohómetro o equipo para determinación de grado alcohólico
- Probetas
- Termómetro
- Areómetro con resolución de cuatro cifras decimales o densímetro digital equivalente
- Batería de destilación
- Destilador por arrastre de vapor

Los equipos deberán estar calibrados y verificados conforme a procedimientos vigentes.

IF-2026-107738308-APN-INV#MEC

7.8. Preparación de la muestra

7.8.1. Extracción de la muestra:

La muestra se tomará directamente del envase original, el cual deberá permanecer cerrado hasta el momento del ensayo, evitando cualquier alteración de su composición.

7.8.2. Conservación:

La muestra deberá conservarse en condiciones que eviten modificaciones de su composición, especialmente pérdidas de compuestos volátiles.

7.8.3. Preparación para el análisis:

- En muestras con dióxido de carbono (vinos gasificados, frizzantes, espumosos o mostos en fermentación), eliminar el CO_2 mediante agitación, vacío o ultrasonido.
- En muestras con materia en suspensión, filtrar utilizando papel de filtro de porosidad gruesa (tipo grado 3 o equivalente).
- Dejar constancia del tratamiento aplicado.

7.9. Procedimiento

7.9.1. Porción de prueba

Se utilizarán las muestras obtenidas para las determinaciones previas, asegurando su representatividad.

7.9.2. Determinaciones previas

Se deberán realizar previamente:

- Grado alcohólico
- Masa volúmica a 20 °C
- Acidez volátil (cuando corresponda)

Corrección de la masa volúmica del vino

$$\boldsymbol{\rho v = \rho 20 - 0,0000086 \cdot a}$$

Dónde:

ρv: masa volúmica corregida

ρ20: masa volúmica a 20 °C

a: acidez volátil expresada en meq/L

Determinación de la masa volúmica de la mezcla hidroalcohólica

La masa volúmica (ρa) se obtiene a partir del grado alcohólico utilizando la **Tabla Nº 2.1**.

Cálculo de la densidad del residuo sin alcohol

$$\mathbf{dr} = \mathbf{1,0018} \cdot (\boldsymbol{\rho}\mathbf{v} - \boldsymbol{\rho}\mathbf{a}) + \mathbf{1}$$

Dónde:

1,0018: inversa de la masa volúmica del agua a 20 °C

ρv: masa volúmica del vino corregida

ρa: masa volúmica o densidad relativa de la mezcla hidroalcohólica a 20°C (20/20 °C)

El valor de dr se expresará con cuatro cifras decimales.

Determinación del extracto seco total: A partir del valor de dr:

- Se obtiene un valor base utilizando la **Tabla Nº 2.2** (primeras tres cifras decimales)
- Se obtiene un valor de corrección utilizando la **Tabla Nº 2.3** (cuarta cifra decimal)
- La suma de ambos valores corresponde al extracto seco total (g/L)

7.9.3. Consideraciones particulares

- Si dr > 1,3509, se deberá realizar una dilución 1:2 y corregir el resultado final.
- En mostos, arrope, caramelo de uva y mistela, no se aplica la corrección por acidez volátil.
- En mostos sulfitados la determinación del grado alcohólico deberá realizarse mediante doble destilación.
- En muestras con CO_2 o sólidos, realizar desgasificación y/o filtración previa, dejando constancia del procedimiento.

7.9.4. Calibración

Los equipos utilizados deberán calibrarse conforme a los procedimientos específicos de cada técnica involucrada.

7.10. Cálculo (Resultados)

El extracto seco total se expresa en gramos por litro (g/L), con dos decimales.

Los valores intermedios (ρv y dr) se expresarán con cuatro cifras decimales conforme a las reglas generales de redondeo vigentes.

El resultado final se obtiene a partir del valor de **dr**, utilizando:

- El número entero y las tres primeras cifras decimales para la **Tabla Nº 2.2**
- La cuarta cifra decimal para la **Tabla Nº 2.3**

La suma de ambos valores corresponde al contenido de extracto seco total expresado en g/L.

Tabla 7.1 - *Masa volúmica aparente de mezclas hidroalcohólicas a 20ºC (parte 1: Alcohol 0 a 10 % (V/V) y parte 2: 11 a 21 Alcohol % (V/V) 20 ºC*

Alcohol % (V/V) 20 ºC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0	0.9982	0.9967	0.9952	0.9938	0.9924	0.9911	0.9897	0.9884	0.9872	0.9859	0.9847
0.1	0.9981	0.9966	0.9951	0.9937	0.9923	0.9909	0.9896	0.9883	0.9871	0.9858	0.9846
0.2	0.9979	0.9964	0.9950	0.9935	0.9922	0.9908	0.9895	0.9882	0.9869	0.9857	0.9845
0.3	0.9978	0.9963	0.9948	0.9934	0.9920	0.9907	0.9893	0.9881	0.9868	0.9856	0.9844
0.4	0.9976	0.9961	0.9947	0.9933	0.9919	0.9905	0.9892	0.9880	0.9867	0.9854	0.9843
0.5	0.9975	0.9960	0.9945	0.9931	0.9917	0.9904	0.9891	0.9879	0.9866	0.9853	0.9842
0.6	0.9973	0.9958	0.9944	0.9930	0.9916	0.9903	0.9890	0.9878	0.9864	0.9852	0.9841
0.7	0.9972	0.9957	0.9942	0.9928	0.9915	0.9901	0.9888	0.9877	0.9863	0.9851	0.9840
0.8	0.9970	0.9955	0.9941	0.9927	0.9913	0.9900	0.9887	0.9876	0.9862	0.9850	0.9839
0.9	0.9969	0.9954	0.9940	0.9926	0.9912	0.9899	0.9886	0.9875	0.9861	0.9848	0.9838

Alcohol % (V/V) 20 ºC	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
0.0	0.9835	0.9824	0.9812	0.9801	0.9790	0.9779	0.9768	0.9757	0.9746	0.9736	0.9725
0.1	0.9834	0.9823	0.9811	0.9800	0.9789	0.9778	0.9767	0.9756	0.9745	0.9735	0.9724
0.2	0.9833	0.9821	0.9810	0.9799	0.9788	0.9777	0.9766	0.9755	0.9744	0.9733	0.9723
0.3	0.9832	0.9820	0.9809	0.9798	0.9786	0.9776	0.9765	0.9754	0.9743	0.9732	0.9722
0.4	0.9831	0.9819	0.9808	0.9796	0.9785	0.9774	0.9764	0.9753	0.9742	0.9731	0.9721
0.5	0.9830	0.9818	0.9807	0.9795	0.9784	0.9773	0.9763	0.9752	0.9741	0.9730	0.9719
0.6	0.9829	0.9817	0.9805	0.9794	0.9783	0.9772	0.9761	0.9751	0.9740	0.9729	0.9718
0.7	0.9828	0.9816	0.9804	0.9793	0.9782	0.9771	0.9760	0.9750	0.9739	0.9728	0.9717
0.8	0.9827	0.9814	0.9803	0.9792	0.9781	0.9770	0.9759	0.9749	0.9738	0.9727	0.9716
0.9	0.9826	0.9813	0.9802	0.9791	0.9780	0.9769	0.9758	0.9747	0.9737	0.9726	0.9715

Tabla 7.2 – *Cálculo del contenido de extracto seco total*

Densidad relativa con dos decimales	Tercer decimal de la densidad relativa									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Gramos por litro de extracto									
1,00	0	2,6	5,1	7,7	10,3	12,9	15,4	18	20,6	23,2
1,01	25,8	28,4	31	33,6	36,2	38,8	41,3	43,9	46,5	49,1
1,02	51,7	54,3	56,9	59,5	62,1	64,7	67,3	69,9	72,5	75,1
1,03	77,7	80,3	82,9	85,5	88,1	90,7	93,3	95,9	98,5	101,1
1,04	103,7	106,3	109	111,6	114,2	116,8	119,4	122	124,6	127,2
1,05	129,8	132,4	135	137,6	140,3	142,9	145,5	148,1	150,7	153,3
1,06	155,9	158,6	161,2	163,8	166,4	169	171,7	174,3	176,9	179,5
1,07	182,1	184,8	187,4	190	192,6	195,2	197,8	200,5	203,1	205,8
1,08	208,4	211	213,6	216,2	218,9	221,5	224,1	226,8	229,4	232
1,09	234,7	237,3	239,9	242,5	245,2	247,8	250,4	253,1	255,7	258,4
1,10	261	263,6	266,3	268,9	271,5	274,2	276,8	279,5	282,1	284,8
1,11	287,4	290	292,7	295,3	298	300,6	303,3	305,9	308,6	311,2
1,12	313,9	316,5	319,2	321,8	324,5	327,1	329,8	332,4	335,1	337,8
1,13	340,4	343	345,7	348,3	351	353,7	356,3	359	361,6	364,3
1,14	366,9	369,6	372,3	375	377,6	380,3	382,9	385,6	388,3	390,9
1,15	393,6	396,2	398,9	401,6	404,3	406,9	409,6	412,3	415	417,6
1,16	420,3	423	425,7	428,3	431	433,7	436,4	439	441,7	444,4

Tabla 7.3 – *Intercalar*

4º decimal de la densidad	Gramos de extracto/litro	4º decimal de la densidad	Gramos de extracto/litro	4º decimal de la densidad	Gramos de extracto/litro
1	0,3	4	1	7	1,8
2	0,5	5	1,3	8	2,1
3	0,8	6	1,6	9	2,3

7.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2013). *Resolución C.45/2013: Método "Determinación del extracto seco total (densimétrico) en vinos y mostos" - Oficialízase*.Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-224135/actualizacion

International Organisation of Vine and Wine. (2012). *Resolución OIV-OENO 465-2012: Determinación del extracto seco total - Revisión del método OIV-MA-AS2-03B*. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. https://www.oiv.int/public/medias/1477/oiv-oeno-465-2012-es.pdf

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Method OIV-MA-AS2-03A: Total dry matter. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.* https://www.oiv.int/node/1968/download/pdf

8. AZÚCARES REDUCTORES (AZ – INV – 10008)

8.1. Título

Determinación de azúcares reductores en vinos y mostos por titulación con licor de Fehling (Causse Bonnans)

Código: **AZ – INV – 10008**

8.2. Introducción

La determinación de azúcares reductores constituye un parámetro fundamental para la caracterización de vinos y mostos, permitiendo evaluar su composición, calidad y estado de fermentación. Este análisis resulta de especial importancia en el control enológico y en la verificación del cumplimiento de especificaciones reglamentarias.

8.3. Alcance

El presente método establece la determinación de azúcares reductores en vinos y mostos mediante titulación con solución cuproalcalina (licor de Fehling Causse Bonnans).

Es aplicable al control de vinos, mostos y productos vitivinícolas, tanto en análisis de rutina como en controles oficiales.

8.4. Definiciones

Azúcares reductores: conjunto de azúcares que poseen función aldehídica o cetónica libre, capaces de reducir soluciones cuproalcalinas.

8.5. Principio

El método se basa en la oxidación de los azúcares reductores en medio alcalino a temperatura de ebullición, mediante el cobre presente en el complejo cuprotartrato alcalino (licor de Fehling). La determinación comprende dos operaciones sucesivas: defecación y dosaje.

Durante la reacción, los azúcares reductores reducen el cobre (II) a cobre (I), provocando un cambio observable mediante un indicador redox (azul de metileno).

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Preparación de la muestra (defecación - decoloración)
- Preparación y estandarización del reactivo
- Titulación de la muestra
- Determinación del punto final
- Cálculo de resultados

8.6. Reactivos y materiales

8.6.1. Reactivos

R1 – Acetato de plomo al 25 %
R2 – Carbón activado
R3 – Solución de azúcar invertido 5 g/L
Preparación: Disolver 4,750 g de sacarosa p.a. en aproximadamente 100 mL de agua destilada, agregar 5 mL de ácido clorhídrico (δ = 1,*19 g/mL)* y mantener a 60 °C durante 1 hora. Enfriar, neutralizar exactamente con hidróxido de sodio, agregar 2 g de fenol y completar a 1.000 mL con agua destilada.
R4 – Azul de metileno al 1 %
R5 – Reactivo de Fehling Causse Bonnans
R6 – Ácido clorhídrico (δ = 1,19 g/mL)
R7 – Hidróxido de sodio
R8 – Fenol
R9 – Agua destilada

8.6.2. Materiales y Equipos

- Probeta de 100 mL /vaso de precipitado de 100 mL
- Pipeta de 5 mL
- Gradilla porta embudo.
- Embudo y papel de filtro.
- Vaso de 100 mL, o tubo de 25 x 250

- Papel de filtro.
- Bureta acodada de 25 mL graduada 1/10, incolora.
- Erlenmeyer de 250 mL
- Pipeta de doble aforo de 15 mL
- Fuente de calentamiento (anafe o placa calefactora)

8.7. Muestreo (Preparación de la muestra)

8.7.1. Muestra:

Tomar la muestra directamente del envase original previamente homogeneizado. Conservar en recipiente cerrado hasta el momento del análisis.

8.7.2. Preparación (defecación):

- Colocar 90 mL de muestra, agregar 10 mL de acetato de plomo al 25 % y hasta 1 g de carbón activado.
- Agitar y dejar reposar al menos 10 minutos.
- Filtrar y recoger el filtrado en recipiente seco (vaso precipitado o tubo), descartar.
- Si el filtrado presenta turbidez o color, repetir con mayor cantidad de carbón activado.

8.7.3. Preparación alternativa (sin acetato de plomo):

- Colocar 100 mL de vino o mosto diluido y entre 0,5 g y no más de 1 g de carbón activado (dependiendo si es vino blanco o tinto).
- Agitar y dejar decolorar al menos 10 minutos.
- Filtrar sobre papel doble y recibir el filtrado sobre un vaso de precipitado o tubo seco, descartando las dos o tres primeras gotas de filtrado.

8.8. Procedimiento

8.8.1. Porción de prueba

Se emplea un volumen de muestra defecada o decolorada ajustado a una concentración aproximada de 5 g/L de azúcares reductores.

8.8.2. Determinaciones

Preparación del reactivo Fehling Causse Bonnans:

- Tartrato doble de sodio y potasio (Sal de Seignette): 130 g
- Hidróxido de sodio: 110 g
- Sulfato de cobre cristalizado: 24 g
- Ferrocianuro de potasio: 16,8 g
- Agua destilada c.s.p. 1.000 mL

Disolver cada reactivo por separado, mezclar en el orden indicado y completar a 1.000 mL con agua destilada.

Estandarización del reactivo:

- Colocar 15 mL de licor de Fehling y 50 mL de agua en un Erlenmeyer.
- Llevar a ebullición y mantener una ebullición franca durante toda la titulación.
- Titular con solución de azúcar invertido desde bureta.
- Próximo al punto final, agregar 2 gotas de azul de metileno.
- Continuar la titulación hasta desaparición del color azul (solución amarilla límpida).

Condiciones:

- Tiempo total de titulación: 2,5–3 minutos.
- Volumen esperado: 8,2 mL de solución patrón.
- Realizar al menos dos determinaciones y promediar

Titulación de la muestra:

- Colocar en la bureta el vino o mosto previamente defecado de acuerdo a la técnica descripta anteriormente, y realizar la titulación en forma idéntica a la titulación del reactivo "FCB".
- Repetir el procedimiento de titulación en idénticas condiciones.
- Mantener las mismas condiciones de ebullición y velocidad de goteo utilizadas durante la estandarización del reactivo.

- El líquido filtrado debe tener una concentración próxima a 5 g/L, caso contrario diluir para obtener dicha concentración.

8.8.3. Calibración

La calibración del método se realiza mediante la estandarización del reactivo de Fehling utilizando solución de azúcar invertido de concentración conocida.

8.9. Cálculo y Expresión de los resultados

Los azúcares reductores se expresan en g/L y se calculan mediante la siguiente expresión:

$$\textbf{Azúcar reductor}\ \left(\frac{\mathbf{g}}{\mathbf{L}}\right) = \frac{\mathbf{45.1}}{\boldsymbol{n}} \cdot \frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{d}}$$

Dónde:
n = mL de muestra (vino o mosto decolorado o defecado) gastados en la titulación.

d = factor de dilución aplicado si la concentración de azúcar en el vino lo requiere.

45,1 = constante del método obtenida a partir del Reactivo de Fehling Causse Bonnans.

Para muestras sin acetato de plomo, se aplica la misma expresión considerando el volumen de muestra decolorada utilizado.

$$\textbf{Azúcar reductor}\ \left(\frac{\mathbf{g}}{\mathbf{L}}\right) = \frac{\mathbf{41}}{\mathbf{n}} \cdot \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{d}}$$

Dónde:
n = mL de muestra (vino o mosto decolorado o defecado) gastados en la titulación.

41= constante del método, relacionada con la cantidad de azúcar que reacciona con el reactivo utilizado (normalmente Fehling).

d = dilución aplicada al vino o mosto decolorado si la concentración de azúcar lo requiere.

Para la determinación polarimétrica sin acetato de plomo:

- No se realizará la determinación polarimétrica en los análisis por “control” para vinos secos.
- Se debe realizar la determinación de desviación polarimétrica en todas las muestras de vinos dulces naturales, edulcorados y mostos, sin acetato de plomo
- Cuando los resultados obtenidos de la desviación polarimétrica arrojen resultados fuera de los valores normales para el producto analizado, se deberá repetir la determinación por el método oficial con acetato de plomo.

8.10. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1985, 12 de noviembre). *Resolución C. 113/1985: Se adoptan como métodos oficiales de análisis para la determinación de azúcares reductores en vinos y mostos por el método Fehling-Causse-Bonnans.* Argentina.gob.ar.

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1996, 22 de abril). *Resolución C. 11/1996: Reglamento General de Análisis - Anexo I, Cap. II: Métodos analíticos oficiales para vinos y mostos (Determinación de azúcares reductores por Fehling-Causse-Bonnans). Argentina.gob.ar.* [4]

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS311-01A. Reducing substances [Resolución OIV/OENO 377/2009: Método OIV-MA-AS311-01A. Sustancias reductoras]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.* https://www.oiv.int/public/medias/2481/oiv-ma-as311-01a.pdf

[4] Para la determinación de azúcares reductores se tomó como marco normativo nacional el Reglamento General de Análisis del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, Res. C. 11/1996; Res. C. 113/1985) mediante el método cuprimétrico de Fehling-Causse-Bonnans. Asimismo, se adoptó como homólogo y referencia internacional el Método OIV-MA-AS311-01A (Resolución OIV/OENO 377/2009) de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2009), el cual comparte la misma base de reducción cuproalcalina pero efectúa la cuantificación mediante titulación yodométrica.

9. DESVIACIÓN POLARIMÉTRICA (Desv Polar/Polarimetría – INV – 10009)

9.1. Título

Determinación de la desviación polarimétrica en vinos.

Código: **Desv Polar/Polarimetría – INV – 10009**

9.2. Introducción

La observación polarimétrica constituye una determinación utilizada para evaluar la rotación óptica producida por sustancias ópticamente activas presentes en soluciones. En productos vitivinícolas, la medición se realiza sobre el líquido previamente decolorado y defecado y permite expresar la desviación del plano de la luz polarizada bajo condiciones normalizadas.

9.3. Alcance

Este método establece la determinación de la observación polarimétrica en vinos mediante medición del ángulo de rotación del plano de luz polarizada. Es aplicable a vinos previamente preparados mediante decoloración y defecación según la técnica correspondiente.

9.4. Definiciones

Polarimetría: técnica analítica que mide la rotación del plano de la luz polarizada producida por sustancias ópticamente activas presentes en una muestra.

Rotación óptica (α): ángulo de desviación del plano de la luz polarizada al atravesar una muestra que contiene sustancias ópticamente activas, medido bajo condiciones definidas de longitud de onda, temperatura y longitud del trayecto óptico.

Poder rotatorio específico (o rotación específica (α)*)*: propiedad característica de una sustancia ópticamente activa, definida como la rotación óptica observada bajo condiciones especificadas de longitud de onda y temperatura, referida a una longitud de trayecto óptico de 1 dm y a una concentración determinada.

Observación polarimétrica: valor de la rotación óptica medida mediante polarímetro en una muestra preparada según el método, expresado en grados polarimétricos bajo condiciones definidas de longitud de onda, temperatura y longitud del trayecto óptico.

9.5. Principio

La observación polarimétrica expresa la desviación que experimenta el plano de luz polarizada al atravesar un espesor de dos (2) decímetros del líquido obtenido luego de decolorar y defecar el vino.

La determinación debe realizarse utilizando luz monocromática amarilla correspondiente a la raya D del sodio (longitud de onda aproximada de 589 nm).

9.6. Reactivos y materiales

9.6.1. Reactivos

Acetato de plomo al 25 % en agua destilada.

Carbón activado.

Sulfato de sodio en solución saturada.

9.6.2. Materiales

Probeta de 50 mL.

Papel de filtro.

9.7. Aparatos

Polarímetro capaz de apreciar 0,1 (un décimo) de grado, provisto de iluminación con luz de sodio y tubo de observación de 2 dm de longitud.

Termómetro de 0 °C a 30 °C graduado en décimos de grado (0,1 °C).

9.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

9.8.1. Procedimiento de muestreo

Conforme a la normativa vigente del INV para productos vitivinícolas.

9.8.2. Preparación de la muestra

La muestra deberá encontrarse previamente decolorada, defecada y filtrada según la técnica descripta para la determinación de azúcares reductores.

9.9. Procedimiento

9.9.1. Porción de prueba

Utilizar el líquido obtenido luego de la decoloración, defecación y filtración de la muestra.

9.9.2. Determinación

Puesta a cero del aparato

La puesta a cero depende de las características del equipo utilizado. Para ello deberán seguirse las instrucciones establecidas por el fabricante en el manual de operación correspondiente.

Lectura de la muestra

Con el líquido defecado y filtrado, enjuagar previamente el tubo del polarímetro.

Llenar el tubo lentamente evitando la formación de burbujas de aire y colocarlo en el polarímetro.

Efectuar la lectura en grados y fracciones de grado, registrando el signo correspondiente.

Cuando el equipo no disponga de corrección automática de temperatura, medir previamente la temperatura de la muestra.

9.9.3. Calibración

La verificación y ajuste del polarímetro deberán realizarse conforme a las instrucciones establecidas por el fabricante del equipo.

9.10. Cálculo

La observación polarimétrica a 15 °C se calcula mediante la expresión:

$$\alpha p = \frac{d}{0,9}$$

Dónde:

αp = observación polarimétrica corregida a 15 °C

d = lectura expresada en grados y décimos de grado polarimétrico.

0,9 = factor de corrección correspondiente a la dilución introducida por el agregado de acetato de plomo durante la preparación de la muestra.

Los grados sacarimétricos se calculan mediante la expresión:

$$\alpha = \alpha p \cdot 4,615$$

Dónde:

α = grados sacarimétricos.

αp = observación polarimétrica corregida a 15 °C

Si la lectura no se realiza a 15 °C, deberá efectuarse la corrección de temperatura conforme a la técnica de determinación de p/αa.

9.11. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino. *Compendio internacional de métodos de análisis de vinos y mostos*. OIV. *https://www.oiv.int/es/standards/compendium-of-international-methods-of-wine-and-must-analysis*[5]

[5] *Nota: En el interior de este compendio digital de acceso público, la OIV clasifica los ensayos en diferentes volúmenes y fichas técnicas según los parámetros ópticos, físicos y químicos correspondientes.*

10. ANHÍDRIDO SULFUROSO LIBRE (SO_2 libre – INV – 10010)

10.1. Título

Determinación de anhídrido sulfuroso libre en vinos por titulación con yodo en medio ácido.

Código: **SO_2 libre – INV – 10010**

10.2. Introducción

El anhídrido sulfuroso libre constituye la fracción del dióxido de azufre presente en el vino que se encuentra disponible para ejercer acción antioxidante y antimicrobiana. Su determinación resulta fundamental para evaluar la estabilidad microbiológica y oxidativa del producto y verificar el cumplimiento de los requisitos de calidad enológicos.

10.3. Alcance

Este método establece la determinación del anhídrido sulfuroso libre en vinos mediante titulación química con solución de yodo en medio ácido. Se aplica a vinos blancos, rosados y tintos, así como a otros productos vitivinícolas que contengan dióxido de azufre libre.

10.4. Definiciones

Anhídrido sulfuroso libre (SO_2 libre): fracción del dióxido de azufre presente en el vino en forma disuelta, principalmente como bisulfito (HSO_3^-) y en menor proporción, como dióxido de azufre molecular (SO_2), que no ha reaccionado con otros componentes del vino y que actúa directamente en la protección frente a la oxidación y el crecimiento microbiano.

Se expresa en **$mg \cdot L^{-1}$ de SO_2**.

10.5. Principio

El método se basa en la oxidación del anhídrido sulfuroso libre presente en la muestra mediante una solución de yodo de concentración conocida, en medio ácido.

La titulación se realiza utilizando engrudo de almidón como indicador, determinándose el punto final por la aparición de una coloración azul persistente.

10.6. Reactivos y materiales

10.6.1. Reactivos

- Solución de ácido sulfúrico al 10 % (V/V)
- Solución de yodo 0,02 N.
- Engrudo de almidón al 2–4 %

10.6.2. Materiales

- Erlenmeyer de 250 mL.
- Pipeta de doble aforo de 50 mL.
- Bureta graduada de 25 mL, división 0,1 mL, color caramelo.

10.7. Aparatos

- Balanza analítica (cuando corresponda para preparación de soluciones)
- Agitador manual o mecánico
- Fuente de luz potente (opcional para vinos tintos muy coloreados)

10.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

10.8.1. Procedimiento de muestreo

Conforme a la normativa vigente del INV para productos vitivinícolas.

10.8.2. Preparación de la muestra

Homogeneizar la muestra antes del análisis evitando pérdidas de dióxido de azufre por agitación excesiva.

10.9. Procedimiento

10.9.1. Porción de prueba

Medir exactamente 50 mL de vino utilizando una pipeta de doble aforo y transferirlos a un Erlenmeyer de 250 mL.

10.9.2. Determinación

- Agregar 3 mL de solución de ácido sulfúrico al 10 %
- Incorporar 2 mL de engrudo de almidón al 2–4 %
- Titular con solución de yodo 0,02 N.
- Continuar la titulación hasta que la coloración azul, inicialmente fugaz, persista claramente durante 10 a 15 segundos.
- Registrar el volumen de solución de yodo consumido, expresado en mL

Siendo:

n = mL de solución de yodo 0,02 N gastados en la titulación.

Nota: En vinos tintos de color intenso, para facilitar la observación del punto final de la titulación, puede utilizarse un haz de luz potente dirigido perpendicularmente al Erlenmeyer. De esta manera el vino se visualiza opaco en el momento del viraje del almidón.

Alternativamente, puede realizarse una dilución 1:2 de la muestra. En tal caso, deberá considerarse el correspondiente factor de dilución en el cálculo del resultado.

10.9.3. Calibración

No aplica calibración instrumental.

La determinación se basa en el empleo de solución titulada de yodo 0,02 N.

10.10. Cálculo y expresión de los resultados

El anhídrido sulfuroso libre se calcula mediante la expresión:

$$\boldsymbol{SO2\ libre}\left(\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{l}}\right) = \mathbf{25,6} \cdot \boldsymbol{n}$$

Dónde:
N = mL de solución de yodo 0,02 N consumidos en la titulación.
Se expresa en **mg·L⁻¹**.

Si en la determinación se utiliza la mitad del volumen de vino, 25 mL en lugar de 50 mL dividir por 2 el factor para obtener el resultado.

$$\boldsymbol{SO2\ libre}\left(\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{l}}\right) = \mathbf{12,8} \cdot \boldsymbol{n}$$

El resultado se expresa en **mg·L⁻¹ de SO_2**.

10.11. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (2009). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS323-04B:R2009. Determinación de anhídrido sulfuroso libre*. OIV. https://www.oiv.int/

11. ANHÍDRIDO SULFUROSO TOTAL (SO_2 total – INV – 10011)

11.1. Título

Determinación de anhídrido sulfuroso total en vinos por titulación con yodo en medio ácido
Código: **SO_2 total – INV – 10011**

11.2. Introducción

El anhídrido sulfuroso total es un parámetro esencial en la caracterización de vinos, ya que incluye tanto el dióxido de azufre libre como el combinado. Su control es fundamental para garantizar la estabilidad microbiológica y la calidad sensorial del producto.

11.3. Alcance

Este método establece la determinación del anhídrido sulfuroso total en vinos mediante titulación química. Se aplica a vinos blancos, rosados y tintos, así como a otros productos vitivinícolas que contengan dióxido de azufre total.

11.4. Definiciones

Anhídrido sulfuroso total (SO_2 total): cantidad total de dióxido de azufre expresada en $mg \cdot L^{-1}$ presente en la muestra de vino, incluyendo la fracción libre y la fracción combinada.

11.5. Principio

El método consiste en liberar el anhídrido sulfuroso combinado mediante alcalinización con hidróxido de potasio. Posteriormente, se dosifica junto con el SO_2 libre mediante oxidación con una solución de yodo en medio ácido, utilizando engrudo de almidón como indicador del punto final de titulación.

11.6. Reactivos y materiales

11.6.1. Reactivos:

- Ácido sulfúrico 20 %
- Solución de yodo 0,02 N
- Engrudo de almidón 2–4 %

- Hidróxido de potasio 1 N

11.6.2. Materiales y equipos:

- Erlenmeyer de 250 mL con tapón
- Pipeta de doble aforo de 50 mL
- Bureta graduada de 25 mL 1/10, color caramelo
- Pipeta graduada de 25 mL y pro pipeta
- Pipetas graduadas de 10 mL

11.7. Aparatos

- Balanza analítica (cuando corresponda para preparación de soluciones)
- Agitador manual o mecánico
- Fuente de luz potente (opcional para vinos tintos muy coloreados)

11.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

- **Procedimiento de muestreo:** conforme a normativa vigente del INV.
- **Preparación de la muestra:** la muestra de vino se agita suavemente antes de la titulación. En vinos turbios o muy coloreados se puede diluir o utilizar un haz de luz potente para facilitar la observación del punto final.

11.9. Procedimiento

11.9.1. Porción de prueba

Colocar 25 mL de solución de hidróxido de potasio 1 N en un Erlenmeyer de 250 mL.

Agregar 50 mL de vino utilizando pipeta de doble aforo, colocando el extremo de ésta lo más próximo posible a la solución alcalina, y dejar escurrir el vino lentamente por las paredes del Erlenmeyer. Dejar en reposo mínimo 15 minutos.

11.9.2. Determinación(es)

1. Agregar 5 mL de ácido sulfúrico 20 % y 2 mL de engrudo de almidón 2–4 %
2. Titular inmediatamente con solución de yodo 0,02 N gota a gota sobre fondo blanco, agitando suavemente.

3. El punto final se alcanza cuando la solución vira a color azul persistente, indicando el agotamiento del SO_2 libre y combinado. La coloración final dependerá de la matriz original del vino.

Nota:

En vinos tintos de color intenso, se recomienda utilizar un haz de luz potente perpendicular al Erlenmeyer. De esta manera el vino se visualiza opaco en el momento del viraje del almidón.

Se puede recurrir a diluciones del vino al medio; en tal caso, considerar la dilución en el cálculo final.

11.9.3. Calibración

No aplica calibración instrumental; la titulación se basa en soluciones tituladas de yodo 0,02 N.

11.10. Cálculo y expresión de los resultados

El anhídrido sulfuroso total se calcula mediante la expresión:

$$\boldsymbol{SO2\ total}\left(\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{l}}\right) = \boldsymbol{25,6 \cdot n}$$

Dónde:

n = mL de solución de yodo gastados

Se expresa en **mg·L⁻¹.**

Si en la determinación se utiliza la mitad del volumen, 25 mL en lugar de 50 mL dividir por 2 el factor para obtener el resultado.

$$\boldsymbol{SO2\ total}\left(\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{l}}\right) = \boldsymbol{12,8 \cdot n}$$

11.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura [INV]. (1991, 20 de marzo). Resolución C. 227/1991: Fíjase el límite máximo de Anhídrido Sulfuroso Total para la liberación al consumo de los vinos. Metodología oficial analítica de control. Boletín Oficial de la República Argentina. *https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-23758/texto*

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (Recopilación actual). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS323-04ª (Método de referencia Tipo II - Arrastre en caliente y titulación).* OIV. *https://www.oiv.int/*

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (2009). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS323-04B:R2009. Anhídrido sulfuroso total (Método usual). OIV. https://www.oiv.int/*

Gayon, R., & Peynaud, E. (1962). *Análisis de vino. (Traducción y edición en español). Madrid. (Obra clásica de referencia instrumental vitivinícola).*

12. SULFATOS - SEMICUANTITATIVO ($SO_4^=$/SC – INV – 10012)

12.1. Título

Determinación semicuantitativa de sulfatos en vinos.

Código: **$SO_4^=$/SC – INV – 10012**

12.2. Introducción

Los sulfatos presentes en los vinos provienen tanto de la composición natural de la uva como de la incorporación de sales sulfatadas durante los procesos de elaboración y tratamiento. Debido a que concentraciones elevadas pueden afectar la calidad del producto y exceder los límites establecidos por la legislación vigente, resulta necesario controlar su contenido.

12.3. Alcance

Este método establece la determinación semicuantitativa de sulfatos en vinos mediante precipitación con cloruro de bario. Es aplicable a vinos destinados al control oficial de composición y cumplimiento de los límites reglamentarios de sulfatos.

12.4. Definiciones

Los sulfatos son sales o ésteres derivados del ácido sulfúrico presente naturalmente en el vino o incorporado durante los procesos de vinificación. La adición de sales sulfatadas puede incrementar su concentración, por lo que resulta necesario controlar su contenido debido a su incidencia negativa sobre la calidad del producto y por los límites establecidos por la normativa vigente.

A los efectos de este método, el resultado permite establecer si la concentración de sulfatos se encuentra por encima o por debajo del límite de referencia establecido por la normativa vigente.

12.5. Principio

El método se basa en la precipitación del ion sulfato mediante una solución de cloruro de bario de concentración conocida (licor gipsométrico), formando sulfato de bario insoluble.

La cantidad de reactivo agregada permite establecer, mediante una prueba comparativa de turbidez sobre el sobrenadante, si el contenido de sulfatos de la muestra es superior o inferior al límite fijado por la legislación.

12.6. Reactivos y materiales

12.6.1. Reactivos

Solución A (Licor gipsométrico).

Preparación:

- Pesar 2,804 g de cloruro de bario dihidratado ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$), grado analítico.
- Agregar 6 mL de ácido clorhídrico (densidad 1,19 g/mL).
- Llevar a 1 litro con agua bidestilada.

Solución B: cloruro de bario al 10 % (p/V).

- H_2SO_4 al 20 % (V/V)

12.6.2. Materiales

- Tubos de ensayo de 20 mL.
- Pipeta doble aforo de 10 mL.

12.7. Aparatos

Mechero o sistema de calentamiento equivalente.

12.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

La muestra deberá encontrarse homogénea y ser representativa. Si presenta turbidez, filtrar previamente mediante papel de filtro común antes de realizar el ensayo.

12.9. Procedimiento

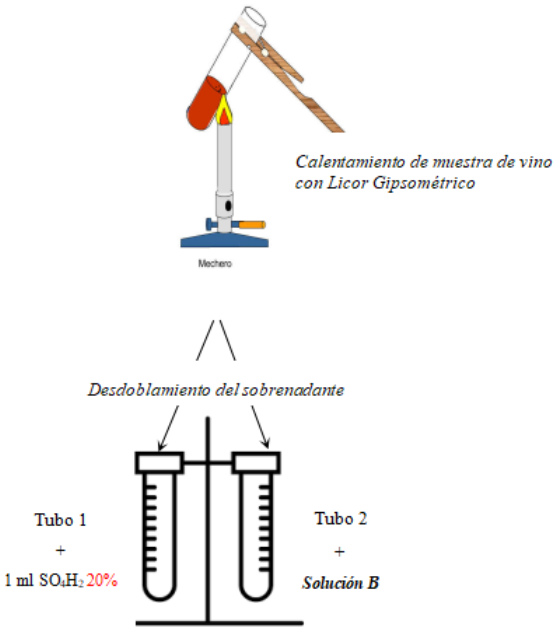
12.9.1. Porción de prueba

Tomar 10 mL de vino previamente homogeneizado.

12.9.2. Determinación

1. Colocar 10 mL de vino en un tubo de ensayo.
2. Agregar 5 mL de Solución A (licor gipsométrico).
3. Homogeneizar cuidadosamente.
4. Calentar directamente sobre llama evitando pérdidas por proyección.
5. Dejar reposar hasta la sedimentación completa del precipitado de sulfato de bario ($BaSO_4$).
6. Recuperar cuidadosamente el sobrenadante sin alterar el precipitado formado.
7. Dividir el sobrenadante en dos fracciones aproximadamente iguales utilizando dos tubos de ensayo limpios.
8. Identificar los tubos como Tubo 1 y Tubo 2.
9. Agregar al Tubo 1: 1 mL de ácido sulfúrico al 20 %
10. Agregar al Tubo 2: 1 mL de Solución B (cloruro de bario al 10 %).
11. Observar la aparición de turbidez en ambos tubos.

Figura 27.1 – *Procedimiento de ensayo para la determinación semicuantitativa de Sulfatos (Toque)*



En la imagen superior se muestra la precipitación de sulfatos mediante calentamiento de la muestra con licor gipsométrico. En la imagen inferior se representa la división del sobrenadante en dos fracciones equivalentes para la prueba comparativa de turbidez.

12.9.3. Criterio de interpretación

- Si se observa **enturbiamiento en el Tubo 1** y el Tubo 2 permanece límpido, la muestra no supera el límite de sulfatos establecido.
- Si el enturbiamiento aparece en el Tubo 2, la muestra contiene sulfatos en concentración superior al límite establecido.

12.10. Cálculo y expresión de los resultados

12.10.1. Cálculo

El método es de carácter semicuantitativo y permite establecer si el contenido de sulfatos de la muestra se encuentra por encima o por debajo del valor de referencia equivalente a 1,00 g/L de sulfato de potasio (K_2SO_4).

La cantidad de sulfatos precipitable puede expresarse como sulfato de potasio (K_2SO_4), considerando que cada 1 mL de Solución A (licor gipsométrico) agregado a 10 mL de vino precipita el equivalente a 0,20 g/L de K_2SO_4.

Dado que en el ensayo se agregan 5 mL de Solución A, la cantidad total de reactivo empleada corresponde aproximadamente a un contenido de 1,00 g/L de sulfato de potasio (K_2SO_4), que constituye el límite de referencia del método.

12.10.2. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como:

- $SO_4^{=}$ < al límite reglamentario ó
- $SO_4^{=}$ > al límite reglamentario.

Cuando corresponda, el contenido podrá expresarse como equivalente a sulfato de potasio (K_2SO_4), utilizando la relación indicada en el apartado 27.10.1.

12.10.3. Informe de ensayo

Sulfatos: Cumple / No cumple con el límite reglamentario vigente.

12.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1972). *Manual de técnicas analíticas* (pp. 61–62) INV.

13. SULFATOS POR GRAVIMETRÍA ($SO_4^=$/GR – INV – 10013)

13.1. Título

Determinación de sulfatos en vinos por gravimetría.
Código: **$SO_4^=$/GR – INV – 10013**

13.2. Introducción

Los sulfatos presentes en los vinos provienen tanto de la composición natural de la uva como de la incorporación de sales sulfatadas durante los procesos de elaboración. Dado que concentraciones elevadas pueden afectar la calidad del producto y exceder los límites establecidos por la legislación vigente, resulta necesario controlar su contenido.

13.3. Alcance

Este método establece la determinación cuantitativa de sulfatos en vinos mediante precipitación gravimétrica como sulfato de bario.

Es aplicable a vinos destinados al control oficial de composición y cumplimiento de los límites reglamentarios de sulfatos.

13.4. Definiciones

Los sulfatos son sales o ésteres derivados del ácido sulfúrico presente naturalmente en el vino o incorporado durante los procesos de vinificación.

A los efectos de este método, el contenido de sulfatos se expresa como gramos por litro de sulfato de potasio (K_2SO_4).

13.5. Principio

El método se basa en la precipitación cuantitativa del ion sulfato mediante cloruro de bario en medio ácido, formando sulfato de bario ($BaSO_4$), compuesto prácticamente insoluble.

El precipitado obtenido se separa por filtración, se calcina hasta masa constante y se determina gravimétricamente. A partir de la masa de sulfato de bario obtenida se calcula el contenido de sulfatos expresado como sulfato de potasio.

13.6. Reactivos y materiales

13.6.1. Reactivos

- Ácido clorhídrico (HCl), densidad (δ) = 1,19 g/mL dispuesto en gotero.
- Solución de cloruro de bario al 10 % (p/V).
- Agua destilada libre de sulfatos.
- Ácido nítrico concentrado.

13.6.2. Materiales

- Vasos precipitados de 250 mL.
- Varillas de vidrio.
- Pipeta graduada de 10 mL.
- Vidrio de reloj de diámetro superior al vaso de precipitados.
- Matraz aforado de 100 mL.
- Embudo de vidrio de vástago largo.
- Pinza para mufla.
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Piseta.
- Cápsula de platino.
- Papel de filtro libre para cenizas, banda azul.
- Desecador con cloruro de calcio.

13.7. Aparatos

- Horno mufla con capacidad de alcanzar 800 °C.
- Balanza analítica con resolución mínima de 0,0001 g.

13.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

La muestra deberá encontrarse homogénea y ser representativa.

Si presenta turbidez, filtrar previamente mediante papel de filtro adecuado hasta obtener una muestra límpida.

13.9. Procedimiento

13.9.1. Porción de prueba

Medir exactamente 100 mL de vino utilizando un matraz aforado.

13.9.2. Determinación

1. Transferir cuantitativamente 100 mL de vino a un vaso de precipitados de 250 mL.
2. Enjuagar el matraz aforado con pequeñas porciones de agua destilada libre de sulfatos, transfiriendo los lavados al vaso de precipitados. Asegurar que no queden restos de muestra adheridos al matraz aforado.
3. Ajustar el volumen total a un máximo de 150 mL.
4. Calentar hasta ebullición moderada evitando pérdidas por proyección.
5. Agitar suavemente con una varilla de vidrio cuando sea necesario. Enjuagar la varilla sobre el vaso de precipitados para evitar pérdidas de muestra.
6. Concentrar la muestra hasta un volumen aproximado de 50 mL.
7. Realizar esta operación bajo campana de extracción.
8. Agregar lentamente 0,3 mL de ácido clorhídrico (aproximadamente 7 gotas).
9. Mantener la ebullición durante 2 minutos.
10. Agregar gota a gota 8 mL de solución de cloruro de bario al 10 % (p/V), distribuyendo el reactivo sobre toda la superficie de la muestra.
11. Mantener el calentamiento durante 1 minuto adicional.
12. Cubrir el vaso con un vidrio de reloj.
13. Dejar enfriar y reposar hasta el día siguiente para permitir la sedimentación completa del sulfato de bario formado.
14. Filtrar utilizando papel de filtro libre de cenizas, banda azul.
15. Lavar el precipitado con agua destilada libre de sulfatos hasta eliminar completamente el exceso de ion bario.
16. Verificar la ausencia de ion bario en el filtrado agregando una gota de ácido sulfúrico al 20 %
17. La ausencia de enturbiamiento indica que el lavado es completo.

18. Repetir la comprobación durante los sucesivos lavados hasta alcanzar el punto final.
19. Tarar previamente una cápsula de platino limpia y seca.
20. Transferir cuidadosamente el papel de filtro con el precipitado a la cápsula, evitando pérdidas de material.
21. Carbonizar el papel lentamente sobre llama moderada.
22. Completar la combustión favoreciendo un adecuado acceso de aire.
23. Calcinar en mufla a 800 °C durante 15 minutos.
24. Si el residuo presenta partículas negras o indicios de carbón sin quemar, dejar enfriar.
25. Agregar dos gotas de ácido nítrico concentrado.
26. Evaporar cuidadosamente bajo campana.
27. Calcinar nuevamente a 800 °C hasta obtener un residuo completamente blanco.
28. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente.
29. Pesar la cápsula con el residuo de sulfato de bario.

13.9.3. Observaciones

Lavado del precipitado

Durante la filtración y el lavado deberán observarse las siguientes condiciones:

- Utilizar pequeñas porciones de agua de lavado.
- Permitir el escurrimiento completo entre cada lavado.
- Evitar que el nivel del líquido alcance una distancia menor de 5 mm respecto del borde superior del papel de filtro.
- El precipitado no deberá ocupar más de un tercio a la mitad de la superficie útil del papel de filtro.

13.10. Cálculo y expresión de resultados

13.10.1. Cálculo

El contenido de sulfatos se expresa como gramos por litro de sulfato de potasio (K_2SO_4) y se calcula mediante la expresión:

$$K_2SO_4\,(g/L) = p \cdot 7{,}465$$

Dónde:

p = masa de sulfato de bario ($BaSO_4$) obtenida, expresada en gramos.

7,465 = factor derivado de la relación entre los pesos moleculares del sulfato de bario y del sulfato de potasio.

13.10.2. Expresión de resultados

Los resultados se expresan en g/L de sulfato de potasio: (K_2SO_4), Informar el resultado con dos cifras decimales, salvo disposición normativa específica.

13.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2017, 13 de noviembre). *Resolución 275-E/2017: Fíjanse para los vinos, los límites máximos de contenido de cloruros y de sulfatos. Argentina.gob.ar.* https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-287281/texto

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Method OIV-MA-AS321-05A: Sulfates (gravimetry) [Método OIV-MA-AS321-05A: Sulfatos (gravimetría)]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.* https://www.oiv.int/public/medias/2408/oiv-ma-as321-05a.pdf

14. CAL expresada como óxido de calcio, CaO (Cal/Gravimetría – INV – 10014)

14.1. Título

Determinación de calcio expresado como óxido de calcio (CaO) en vinos por método gravimétrico.
Código: **Cal/Gravimetría – INV – 10014**

14.2. Introducción

La cal, expresada como óxido de calcio (CaO), puede emplearse en prácticas enológicas destinadas a la corrección de la acidez de mostos y vinos. Su determinación permite verificar el cumplimiento de los límites establecidos y controlar los tratamientos realizados durante la elaboración. La cal, en forma de óxido de calcio (CaO), es una sustancia alcalina que puede utilizarse en procesos de corrección de la acidez de los mostos y vinos.

14.3. Alcance

Este método establece la determinación de calcio expresado como óxido de calcio (CaO) en vinos mediante precipitación con oxalato de amonio y determinación gravimétrica.

Es aplicable a vinos y otros productos vitivinícolas en los que se requiera cuantificar el contenido de calcio.

14.4. Definiciones

Cal: sustancia alcalina utilizada en procesos enológicos de corrección de la acidez de mostos y vinos, cuya determinación se expresa convencionalmente como óxido de calcio (CaO). Su contenido se expresa convencionalmente como miligramos de óxido de calcio por litro ($mg \cdot L^{-1}$ de CaO).

14.5. Principio

El método se basa en la precipitación del calcio presente en la muestra como oxalato de calcio mediante adición de oxalato de amonio en medio adecuadamente ajustado.

El precipitado obtenido se filtra, calcina y transforma a sulfato de calcio mediante tratamiento con ácido sulfúrico. Finalmente, el sulfato de calcio se determina gravimétricamente y el resultado se expresa como óxido de calcio mediante la aplicación del correspondiente factor gravimétrico.

14.6. Reactivos y materiales

14.6.1. Reactivos

- Solución saturada de oxalato de amonio (o solución de oxalato de amonio al 4 %)
- Solución de amoníaco, densidad 0,910.
- Ácido acético glacial.
- Ácido sulfúrico al 20 %
- Solución diluida de oxalato de amonio (1:100).
- Agua destilada.

14.6.2. Materiales

- Papel de filtro libre de cenizas, banda negra.
- Cápsula de platino.
- Varilla de vidrio.
- Vidrio de reloj.

14.7. Aparatos

- Balanza analítica con resolución de 0,0001 g
- Mufla eléctrica con temperatura regulable hasta 800 °C
- Desecador con cloruro de calcio u otro agente desecante adecuado.
- Vaso de precipitados de 250 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Embudo de vidrio de vástago largo.
- Pipeta graduada de 10 mL
- Piseta.
- Pinzas para mufla.
- Campana de extracción.

14.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

14.8.1. Procedimiento de muestreo

Conforme a la normativa vigente del INV para productos vitivinícolas.

14.8.2. Preparación de la muestra

La muestra deberá encontrarse límpida, caso contrario, deberá filtrarse previamente.

Homogeneizar antes del análisis.

14.9. Procedimiento

14.9.1. Porción de prueba

Medir exactamente 100 mL de muestra y transferirlos a un vaso de precipitados de 250 mL.

Enjuagar cuantitativamente el matraz aforado con agua destilada y reunir los lavados en el vaso de precipitados, sin superar un volumen aproximado de 150 mL.

14.9.2. Determinación

Calentar la muestra hasta ebullición moderada evitando pérdidas por proyección. Durante el calentamiento puede agitarse suavemente con una varilla de vidrio, realizando posteriormente el enjuague de la varilla sobre el vaso de precipitados para evitar pérdidas de muestra.

Mantener la ebullición y concentrar la muestra hasta un volumen aproximado de 50 mL. La operación deberá realizarse bajo campana de extracción.

Agregar solución de amoníaco hasta alcanzar la neutralización de la muestra, evidenciada por el cambio de color característico de la matriz.

Adicionar posteriormente ácido acético glacial hasta restablecer un medio ligeramente ácido, observado por el retorno al color original de la muestra. Evitar excesos de ácido.

Sin interrumpir la ebullición, agregar 10 mL de solución de oxalato de amonio al 4 %

Finalizada la adición, retirar la fuente de calor y dejar reposar la muestra tapada con vidrio de reloj durante un mínimo de 12 horas, preferentemente de un día para otro.

Filtrar cuantitativamente el precipitado mediante papel de filtro libre de cenizas, banda negra.

Lavar el precipitado con solución diluida de oxalato de amonio (1:100) y posteriormente con agua destilada hasta eliminación completa de los reactivos solubles. La ausencia de oxalato soluble en el filtrado puede verificarse mediante ensayo con cloruro de bario en un tubo de ensayo.

Proceder a la tara de una cápsula de platino limpia y seca.

Transferir cuidadosamente el papel de filtro con el precipitado a la cápsula de platino tarada.

Secar a temperatura moderada y posteriormente carbonizar el papel de filtro.

Introducir la cápsula en una mufla a 800 °C y calcinar hasta obtener cenizas blancas exentas de residuos carbonosos, durante aproximadamente 15 minutos.

Si permanecieran residuos carbonosos, dejar enfriar, agregar aproximadamente 5 mL de agua destilada, evaporar nuevamente y repetir la calcinación.

Una vez fría la cápsula, agregar cantidad suficiente de ácido sulfúrico al 20 % para transformar el oxalato de calcio en sulfato de calcio.

Evaporar cuidadosamente bajo campana de extracción hasta la eliminación total del exceso de ácido sulfúrico, evidenciada por la desaparición de los humos blancos.

Calcinar nuevamente a 800°C durante 15 minutos.

Transferir la cápsula al desecador, dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar con una aproximación de 0,0001 g (cuatro decimales).

Nota: lavado del precipitado

Realizar los lavados utilizando pequeñas porciones de líquido, permitiendo el escurrimiento completo entre cada adición.

Evitar que el nivel del líquido alcance una distancia menor de 5 mm respecto del borde superior del papel de filtro.

El precipitado no deberá ocupar más de un tercio a la mitad de la superficie útil del papel de filtro.

14.9.3. Calibración

Verificar periódicamente la calibración de la balanza analítica y el control de temperatura de la mufla conforme a los procedimientos vigentes del laboratorio.

14.10. Cálculo y expresión de los resultados

El contenido de calcio expresado como óxido de calcio se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\boldsymbol{CaO}\left(\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{L}}\right) = (\boldsymbol{p} - \boldsymbol{t}) \cdot \mathbf{411,8}$$

Dónde:

p = peso de la cápsula más el sulfato de calcio obtenido, en gramos.
t = peso de la cápsula tarada, en gramos.
411,8 = factor gravimétrico para convertir sulfato de calcio ($CaSO_4$) a óxido de calcio (CaO), referido a la porción de ensayo utilizada.

El resultado se expresa en ***mg·L⁻¹ de CaO***.

14.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Viticultura. (29 de septiembre de 1992). *Resolución C.103/1992. Límite superior de calcio en vinos. Mendoza, Argentina.* *https://consultas.inv.gob.ar/index.php?r=resoluciones/verpdf&server_name=ResolucionesC/1992/ResolucionC103-1992.pdf*

Manual de Técnicas Analíticas. Mendoza: INV, 1972, p. 67–68.

15. FERROCIANURO (Ferrocianuro – INV – 10015)

15.1. Título

Detección de ferrocianuro en vinos mediante reacción con sales férricas.
Código: **Ferrocianuro – INV – 10015**

15.2. Introducción

El ferrocianuro ha sido utilizado en enología como agente estabilizante para la eliminación de metales, principalmente hierro y cobre, responsables de alteraciones de estabilidad y defectos visuales en los vinos (quiebras metálicas). Debido a que su presencia residual en el producto terminado no está permitida, resulta necesario verificar la ausencia de ferrocianuro soluble o precipitado mediante métodos analíticos específicos.

15.3. Alcance

Este método establece la detección cualitativa de ferrocianuro en vinos. Es aplicable a vinos blancos, rosados y tintos, así como a otros productos vitivinícolas cuando se requiera verificar la ausencia de residuos de tratamientos con ferrocianuro.

15.4. Definiciones

Ferrocianuro: compuesto complejo del hierro que puede utilizarse como agente clarificante para la eliminación de metales pesados, principalmente hierro y cobre. Su función principal es eliminar metales pesados (especialmente hierro y cobre) que pueden causar turbidez, oxidación o sabores desagradables en el vino.

Ferrocianuro férrico: precipitado azul característico que se forma por reacción entre el ion ferrocianuro y las sales férricas en medio ácido, utilizado como evidencia de la presencia de ferrocianuro.

15.5. Principio

El método se basa en la verificación de la ausencia de precipitado de ferrocianuro férrico presente en suspensión o en el sedimento de la muestra y en la detección del ion ferrocianuro mediante la adición de una sal férrica a la muestra acidificada.

La observación se realiza sobre el residuo obtenido por filtración sobre membrana o, cuando la naturaleza de la muestra dificulte la filtración, mediante centrifugación. La metodología de uso general será la filtración por membrana, cuyo resultado será válido. En caso de que por presencia de gomas, mucílagos u otras sustancias coloidales la filtración resulte dificultosa, se empleará la centrifugación como procedimiento alternativo.

La aparición de coloración o precipitado azul indica presencia de ferrocianuro.

15.6. Reactivos y materiales

15.6.1. Reactivos

- Solución de ácido clorhídrico exento de hierro (1+1)
- Solución de sulfato férrico ($(SO4)_3Fe_2$) amónico al 15 % (p/V)
- Solución lavadora compuesta por:
  - Etanol 45 % (V/V)
  - Agua destilada 45 % (V/V)
  - Ácido clorhídrico 10 % (V/V)
- Agua oxigenada de 10 volúmenes.

15.6.2. Materiales

- Membranas de nitrato de celulosa blancas de 0,45 µm de porosidad y 47 mm de diámetro.
- Tubos cónicos para centrifugación de 50 mL.

15.7. Aparatos

- Equipo de filtración apto para membranas de 47 mm de diámetro.
- Centrífuga capaz de trabajar a una velocidad mínima de 3.500 rpm
- Pipetas volumétricas de 25 mL o 50 mL
- Pipeta graduada de 5 mL
- Material de laboratorio de uso corriente.

15.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

15.8.1. Procedimiento de muestreo

Conforme a la normativa vigente del INV para productos vitivinícolas.

15.8.2. Preparación de la muestra

La muestra deberá encontrarse homogénea antes del análisis.

La preparación se realizará mediante filtración por membrana. Cuando la presencia de gomas, mucílagos u otras sustancias coloidales dificulte la filtración, podrá emplearse centrifugación como procedimiento alternativo.

15.9. Procedimiento

15.9.1. Porción de prueba

Tomar 50 mL de muestra de vino previamente filtrada o centrifugada.

15.9.2. Determinación

- *Detección de ferrocianuro en suspensión o sedimento*

Filtrar la muestra mediante membrana de nitrato de celulosa de 0,45 µm o, alternativamente, centrifugarla a una velocidad mínima de 3.500 rpm.

Examinar el residuo retenido sobre la membrana o el sedimento obtenido por centrifugación para verificar la ausencia de precipitado azul característico de ferrocianuro férrico.

- *Detección del ion ferrocianuro*

Tomar los 50 mL de vino filtrado o centrifugado proveniente del procedimiento de preparación de muestra.

Agregar 2,5 mL de solución de ácido clorhídrico (1+1) y 2 gotas de solución de sulfato férrico amoniacal al 15 %

Agitar y dejar en reposo durante 24 horas.

Transcurrido dicho período, repetir el procedimiento de filtración o centrifugación utilizado inicialmente y examinar nuevamente el residuo o sedimento obtenido.

La aparición de coloración azul o de un precipitado azul indica presencia de ferrocianuro. La ausencia de coloración o precipitado azul indica resultado negativo para ferrocianuro.

Nota: Cuando no se disponga de tubos de centrífuga de 50 mL, podrán realizarse dos ensayos independientes de 25 mL. Finalizada la centrifugación, los sedimentos obtenidos deberán reunirse para su observación.

Los tubos de centrifugación deberán ser de fondo cónico. En caso necesario, se recuperará cuidadosamente cualquier precipitado adherido a las paredes del tubo.

15.10. Expresión de resultados

El método es cualitativo.

- **Ausencia de ferrocianuro:** no se observa coloración ni precipitado azul característico.
- **Presencia de ferrocianuro:** se observa coloración o precipitado azul característico de ferrocianuro férrico.

15.11. Bibliografía

Hidalgo Togores, J. (2003). *Tratado de enología (Vol. 2). Mundi-Prensa*.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Traité d'oenologie (Tratado de Enología), Tomo II: Chimie du vin. Stabilisation et traitements. (2.ª ed., Vol. 2). Dunod. Manual de Técnicas Analíticas. Mendoza: INV.*

16. IÓN FÉRRICO (Ión férrico – INV – 10016)

16.1. Título

Detección de ferrocianuro férrico en vinos.
Código: **Ión férrico – INV – 10016**

16.2. Introducción

La presencia de partículas de ferrocianuro férrico en vinos constituye un indicador de residuos proveniente de tratamientos con ferrocianuro (clarificación azul). La detección visual de estas partículas permite verificar la correcta eliminación de los compuestos formados durante el proceso de clarificación.

16.3. Alcance

Este método establece la detección cualitativa de partículas de ferrocianuro férrico presentes en suspensión o sedimento en vinos.

Es aplicable a vinos blancos, rosados y tintos sometidos a evaluación de residuos derivados de tratamientos con ferrocianuro.

16.4. Definiciones

Ferrocianuro férrico: compuesto insoluble de color azul intenso (Azul de Prusia) formado por la reacción entre iones férricos y ferrocianuro. Su presencia en la muestra se evidencia por la aparición de partículas o depósitos de color azul característico.

16.5. Principio

El método se basa en la separación de las partículas sólidas presentes en la muestra mediante filtración por membrana o centrifugación.

Posteriormente, el residuo retenido se lava con una solución hidroalcohólica acidificada y agua oxigenada para eliminar sustancias colorantes interferentes y oxidar el ferrocianuro ferroso que pudiera estar presente. La detección se realiza mediante observación visual del residuo obtenido.

La presencia de coloración azul característica indica la existencia de partículas de ferrocianuro férrico.

16.6. Reactivos y materiales

16.6.1. Reactivos

- Solución hidroalcohólica acidificada.
- Agua oxigenada.

16.6.2. Materiales

- Membrana filtrante de 0,45 µm de porosidad.
- Tubos cónicos para centrifugación.

16.7. Aparatos

- Equipo de filtración apto para membranas de 0,45 µm
- Centrífuga capaz de operar a una velocidad mínima de 3.500 rpm
- Material de laboratorio de uso corriente.

16.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

16.8.1. Procedimiento de muestreo

Conforme a la normativa vigente del INV para productos vitivinícolas.

16.8.2. Preparación de la muestra

Homogeneizar la muestra mediante agitación suave antes del análisis.

16.9. Procedimiento

16.9.1. Porción de prueba

Tomar 50 mL de muestra de vino previamente homogeneizada.

16.9.2. Determinación

Agitar la muestra antes de realizar la separación por filtración o centrifugación. Filtrar los 50 mL de muestra a través de una membrana filtrante de 0,45 µm o, alternativamente,

centrifugar durante 15 minutos a una velocidad no inferior a 3.500 rpm. Lavar la membrana o el precipitado obtenido con solución hidroalcohólica acidificada y agua oxigenada hasta eliminar completamente las materias colorantes que puedan dificultar la apreciación visual y oxidar el eventual ferrocianuro ferroso presente. Realizar la observación visual inmediatamente después de finalizado el lavado. Examinar la membrana filtrante o el fondo del tubo de centrifugación verificando la presencia o ausencia de coloración azul característica.

16.10. Expresión de los resultados

El método es cualitativo.

- *Resultado negativo:*

La membrana filtrante o el fondo del tubo de centrifugación se encuentran completamente exentos de coloración azul característica proveniente de las partículas de ferrocianuro férrico.

- *Resultado positivo:*

Se observa coloración azul característica atribuible a partículas de ferrocianuro férrico. La intensidad de la coloración podrá variar desde azul intenso hasta celeste débil, siempre que resulte claramente perceptible.

16.11. Bibliografía

Hidalgo Togores, J. (2003). *Tratado de enología* (Vol. 2). Mundi-Prensa. (Nota: Contiene los apartados dedicados al análisis químico de los componentes minerales del vino, el control de metales pesados como el hierro y el cobre, y las metodologías analíticas aplicadas en el laboratorio enológico).

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2020). *Traité d'oenologie: Chimie du vin, stabilisation et traitements* (7.ª ed., Vol. 2). Dunod. *(Nota: En su sección de materias minerales y estabilidad físico-química, profundiza en el estado de oxidación del hierro, la diferenciación entre hierro ferroso y férrico, y los métodos analíticos de determinación para prevenir alteraciones como la quiebra férrica).*

17. METANOL (ME – INV – 10017)

17.1. Título

Determinación de metanol en vinos por reacción colorimétrica de Denigès–Villavecchia

Código: **ME – INV – 10017**

17.2. Introducción

La determinación de metanol constituye un análisis fundamental para la seguridad e inocuidad de los productos vitivinícolas, debido a la toxicidad de este compuesto cuando se encuentra en concentraciones elevadas.

El método colorimétrico de Denigès–Villavecchia permite identificar y cuantificar metanol mediante el desarrollo de una coloración violeta producida por reacción del formaldehído con el reactivo de Schiff.

La intensidad de la coloración desarrollada es proporcional a la concentración de metanol presente en la muestra y se evalúa mediante comparación visual con soluciones patrón preparadas en condiciones idénticas.

La determinación se clasifica como un método químico colorimétrico.

17.3. Alcance

El presente método establece la determinación de metanol en vinos y destilados vínicos mediante reacción colorimétrica de Denigès–Villavecchia.

Es aplicable al control de vinos y productos vitivinícolas en análisis de rutina y controles oficiales.

17.4. Definiciones

Metanol: Alcohol monohidroxilado de fórmula CH_3OH presente naturalmente en productos fermentados en pequeñas cantidades. Su concentración se determina en la muestra y se expresa en mL/L o mg/L.

Reacción colorimétrica: *Reacción química que produce una coloración cuya intensidad es proporcional a la concentración del analito.*

Escala patrón: *Serie de soluciones estándar de concentración conocida utilizadas para la comparación visual de la intensidad de color.*

17.5. Principio

El metanol presente en la muestra es oxidado mediante permanganato de potasio en medio ácido, formando formaldehído.

El formaldehído reacciona posteriormente con el reactivo de Schiff produciendo una coloración violeta cuya intensidad es proporcional a la concentración de metanol presente.

La cuantificación se realiza mediante comparación visual con una escala de soluciones patrón preparadas en condiciones idénticas.

La oxidación del metanol genera formaldehído (aldehído fórmico), mientras que otros compuestos presentes en el destilado, particularmente el acetaldehído, pueden originar coloraciones transitorias. Por ello la lectura debe efectuarse únicamente dentro del intervalo de tiempo establecido para asegurar la correcta interpretación de los resultados.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Destilación de la muestra
- Ajuste de graduación alcohólica a 9,0 % vol
- Preparación de soluciones patrón
- Oxidación del metanol
- Desarrollo de color
- Comparación colorimétrica
- Expresión de resultados

17.6. Reactivos y materiales

17.6.1. Reactivos

R1 – Reactivo de Schiff
R2 – Ácido sulfúrico al 20 %
R3 – Permanganato de potasio al 1 %
R4 – Ácido oxálico al 13 % a 20 °C

R5 – Metanol absoluto p.a.

R6 – Etanol absoluto p.a.

R7 – Etanol al 9,0 % vol

R8 – Agua destilada

Características del etanol al 9,0 % vol:

- Preparado con etanol libre de metanol
- Verificado alcohométricamente

17.6.2. Materiales

- Matraces aforados de 100 mL, 200 mL y 1 L
- Tubos de ensayo para colorimetría visual de 16 × 150 mm
- Pipetas de doble aforo de 1 mL
- Pipetas graduadas de 1 a 25 mL
- Frascos color caramelo con tapa a rosca
- Gradillas porta tubos
- Vasos de precipitado

17.7. Aparatos

- Equipo de destilación
- Alcohómetro o densímetro para verificación alcohólica
- Termómetro calibrado
- Heladera o sistema de refrigeración
- Agitador manual o vortex (cuando corresponda)
- Cronómetro

17.8. Preparación de la muestra

17.8.1. Muestra

Tomar la muestra directamente del envase original asegurando homogeneización previa. Conservar en recipiente herméticamente cerrado hasta el momento del análisis.

17.8.2. Preparación de etanol al 9,0 % vol

Previo a la determinación de metanol deberá realizarse la destilación de la muestra.
Posteriormente se determinará el grado alcohólico del destilado y se ajustará a: **9,0 % (V/V) de etanol a 20 °C.** El ajuste a 9,0 % (V/V) constituye una condición indispensable para asegurar la comparabilidad de la muestra con la escala patrón utilizada para la determinación colorimétrica.
El ajuste podrá realizarse mediante:

- Dilución
- Enriquecimiento

Dilución

Aplicable cuando el destilado presente una graduación alcohólica superior a 9,0 % (V/V)
Dónde:
n = grado alcohólico del destilado % (V/V)

V = volumen de destilado a tomar (mL)

El volumen de destilado que contiene 9 mL de alcohol etílico absoluto se calcula mediante la fórmula:

$$V = \frac{\mathbf{100 \cdot 9}}{\boldsymbol{n}}$$

Medir el volumen **V** calculado, transferirlo a un matraz aforado de 100 mL y completar a volumen con agua destilada. Homogeneizar la solución. Preparar soluciones patrón mediante diluciones de la solución madre.

Tabla 17.1 – *Tabla de diluciones para ajuste a 9,0 % (V/V)*

Grados (A)	Mililitros (A)	Grados (B)	Mililitros (B)	Grados (C)	Mililitros (C)
9,00	1,00	**11,10**	0,81	**13,20**	0,68
9,10	0,99	**11,20**	0,80	**13,30**	0,68
9,20	0,98	**11,30**	0,80	**13,40**	0,67
9,30	0,97	**11,40**	0,79	**13,50**	0,67
9,40	0,96	**11,50**	0,78	**13,60**	0,66
9,50	0,95	**11,60**	0,78	**13,70**	0,66
9,60	0,94	**11,70**	0,77	**13,80**	0,65
9,70	0,93	**11,80**	0,76	**13,90**	0,65

9,80	0,92	**11,90**	0,76	**14,00**	0,64
9,90	0,91	**12,00**	0,75	**14,10**	0,64
10,00	0,90	**12,10**	0,74	**14,20**	0,63
10,10	0,89	**12,20**	0,74	**14,30**	0,63
10,20	0,88	**12,30**	0,73	**14,40**	0,63
10,30	0,87	**12,40**	0,73	**14,50**	0,62
10,40	0,87	**12,50**	0,72	**14,60**	0,62
10,50	0,86	**12,60**	0,71	**14,70**	0,61
10,60	0,85	**12,70**	0,71	**14,80**	0,61
10,70	0,84	**12,80**	0,70	**14,90**	0,60
10,80	0,83	**12,90**	0,70	**15,00**	0,60
10,90	0,83	**13,00**	0,69	**15,10**	0,60
11,00	0,82	**13,10**	0,69	**15,20**	0,59

Nota: Relación de mililitros por grado alcohólico.

Enriquecimiento

Este procedimiento es aplicable cuando el destilado presenta una graduación alcohólica inferior a 9,0 % (V/V). En ese caso, la muestra deberá ajustarse a 9,0 % (V/V) mediante el agregado de etanol de 100 % (V/V), considerado libre de metanol para los fines del cálculo.

El cálculo se realiza mediante balance alcohólico, según la ecuación:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Ejemplo: muestra con graduación inferior a 9,0 % (V/V)

Se desea ajustar a 9,0 % (V/V) una muestra de 100 mL con una **graduación alcohólica de 5,0 % (V/V)**, manteniendo 100 mL como volumen final.

Importante: los cálculos que se presentan a continuación corresponden específicamente a una muestra con una graduación alcohólica inicial de % (V/V). En caso de que la muestra presente una graduación alcohólica inferior a 9,0 % (V/V), pero diferente de 5,0 % (V/V), se deberá aplicar el mismo procedimiento, recalculando los valores en función de la graduación alcohólica real de la muestra.

Procedimiento:

1. Cálculo del volumen de muestra que se retira y se reemplaza etanol 100 % (V/V).

Se denomina x al volumen, en mL, de muestra de 5,0 % (V/V) que se retira y reemplaza, en el cálculo, por el mismo volumen de etanol de 100 % (V/V) Se aplica la fórmula:

$$x = Vf \cdot \frac{(\mathbf{Gf} - \mathbf{Gi})}{(\boldsymbol{Ga} - \boldsymbol{Gi})}$$

Dónde:

Vf = volumen final = 100 mL

Gi = graduación inicial = 5,0 % (V/V)

Gf = graduación final deseada = 9,0 % (V/V)

Ga = graduación de alcohol agregado = 100 % (V/V)

Reemplazando:

$$x = 100 \cdot \frac{(9{,}0 - 5{,}0)]}{(100 - 5{,}0)} = \frac{400}{95} = 4{,}2105\ ml$$

Resultado:

Se deben retirar 4,21 mL de la muestra y reemplazarlos por 4,21 mL de alcohol absoluto de 100 % (V/V). Posteriormente, se deberá ajustar el volumen final a 100 mL.

Nota: Dado que las mezclas etanol-agua pueden presentar contracción de volumen, el volumen final deberá establecerse aforando a 100 mL. Por este motivo, se recomienda verificar experimentalmente la graduación alcohólica final, dado que el cálculo se basa en un balance volumétrico ideal y no contempla la contracción de volumen de la mezcla etanol-agua.

2. Efecto sobre el metanol:

Al retirar 4,21 mL de la muestra original, se retira también la misma fracción del metanol presente en ella. El alcohol absoluto agregado se considera, para este cálculo, libre de metanol.

De los 100 mL iniciales de muestra original, quedan:

$$100 - 4{,}21 = 95{,}79\ mL$$

El metanol presente en la solución enriquecida proviene únicamente de esos 95,79 mL de muestra original, ya que el alcohol absoluto agregado se considera libre de metanol.

Como el volumen final se ajusta nuevamente a 100 mL, el metanol originalmente presente en 95,79 mL de muestra queda ahora distribuido en un volumen final de 100 mL.

Esto provoca que la concentración de metanol en la solución enriquecida sea menor que la concentración de metanol que presentaba la muestra original.

El factor de corrección para una muestra de 5,0 % vol se obtiene a partir de:

$$Fc = \frac{100}{95{,}79} = \mathbf{1{,}04396}$$

3. Cálculo de la concentración original de metanol:

Si después del enriquecimiento y de la determinación colorimétrica, se obtiene una concentración medida (C medida) expresada en mL/L, la concentración correspondiente a la muestra original se calcula como:

$$Coriginal = Cmedida \cdot \left(\frac{100}{95{,}79}\right)$$

Por lo tanto:

$$\boldsymbol{Coriginal = Cmedida \cdot 1{,}04396}$$

Es decir, para una muestra que inicialmente tenía **5,0 % (V/V)** la concentración de metanol obtenida en la muestra enriquecida debe multiplicarse por **1,04396** para obtener la concentración estimada de metanol correspondiente a la muestra original.

Nota: En caso que la muestra presente una graduación alcohólica inferior a 9,0 % (V/V), tener en cuenta que se deberán hacer los cálculos anteriormente descriptos para las diferentes graduaciones, ya que las obtenidas son a modo de ejemplo para una graduación alcohólica de 5,0 % (V/V) y un alcohol absoluto de 100 % (V/V).

17.8.3. Porción de prueba

Utilizar:

- 1 mL de muestra ajustada a 9,0 % (V/V)
- 1 mL de cada solución patrón

Las determinaciones deberán realizarse en tubos de ensayos limpios e idénticos. Los tubos utilizados para muestras y patrones deberán ser de iguales dimensiones y características ópticas dado que esto afecta directamente la comparación visual.

17.8.4. Determinación

Preparación de etanol al 9,0 % (V/V)

Preparar aproximadamente 2 L utilizando etanol absoluto libre de metanol.

Para etanol de 99,5 % (V/V):

$$\boldsymbol{C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2}$$

Ejemplo:

$$\boldsymbol{2000 \cdot 9,0 = 99,5 \cdot V2}$$

V2 = 180,9 mL

- Colocar 180,9 mL de etanol de 99,5 % (V/V) en matraz de 2 L
- Completar a volumen con agua destilada
- Homogeneizar

Nota:
La solución puede presentar contracción volumétrica por formación de puentes hidrógeno entre agua y etanol, por lo que deberá verificarse y corregirse la graduación final cuando corresponda.

Preparación de solución madre de metanol

En matraz aforado de 1 L:

- Colocar 2,52 mL de metanol absoluto
- Completar a volumen con etanol al 9 % (V/V)

Homogeneizar y conservar refrigerado.

Preparación de escala patrón

Preparar soluciones patrón mediante diluciones de la solución madre utilizando etanol al 9,0 % (V/V). Trabajar preferentemente con matraces de 200 mL para mejorar la precisión. Los patrones se preparan de acuerdo a la tabla 14.3.

Tabla 17.2 – *Preparación de escala patrón de metanol*

Tipo de patrones	Solución madre de metanol	Completar con solución de etanol de 9,0 % (V/V) a 20 ºC
TIPO 0	0 mL	Llevar a 200 mL
TIPO 7	5 mL	Llevar a 200 mL
TIPO 14	10 mL	Llevar a 200 mL
TIPO 21	15 mL	Llevar a 200 mL
TIPO 28	20 mL	Llevar a 200 mL
TIPO 35	25 mL	Llevar a 200 mL
TIPO 42	30 mL	Llevar a 200 mL
TIPO 49	35 mL	Llevar a 200 mL
TIPO 56	40 mL	Llevar a 200 mL
TIPO 63	45 mL	Llevar a 200 mL

Nota: Dilución final en volumen total de 200 mL.

Conservar la escala patrón en frascos color caramelo y conservarlos en la heladera.

La escala de comparación deberá prepararse en tubos de ensayo idénticos a los utilizados para las muestras y procesarse simultáneamente siguiendo exactamente la misma secuencia analítica.

Para realizar los cálculos de contenido de Metanol presente en una muestra vínica, se utiliza la tabla 14.4:

Tabla 17.3 – *Concentraciones presentes en los patrones (tipo) de metanol*

Nº Tipo	Solución madre de metanol	Concentración real de Metanol a 9º	Concentración elegida de Metanol a 10º (*)
0	0 mL/L	0 mL/L	0
7	5 mL/L	0,053 mL/L	0,07
14	10 mL/L	0,126 mL/L	0,14
21	15 mL/L	0,189 mL/L	0,21
28	20 mL/L	0,252 mL/L	0,28
35	25 mL/L	0,315 mL/L	0,35
42	30 mL/L	0,376 mL/L	0,42
49	35 mL/L	0,441 mL/L	0,49
56	40 mL/L	0,504 mL/L	0,56
63	45 mL/L	0,567 mL/L	0,63

(*) Sólo a efectos de facilitar los cálculos finales se consideran las concentraciones de Metanol a 10 % (V/V) de Etanol a 20 ºC

Verificación de aptitud de la escala patrón

La aptitud de la escala patrón se verifica visualmente comprobando el desarrollo de un color uniforme y una progresión creciente de la intensidad colorimétrica. Si uno o más patrones presentan una coloración anormal, se debe descartar completamente la escala y preparar todos los patrones nuevamente. La vida útil aproximada de estas soluciones es de 3 meses si se mantienen refrigeradas.

Desarrollo de la reacción

Para iniciar el análisis, se seleccionan tubos de ensayo limpios y se identifican adecuadamente para muestras y soluciones patrón. El procedimiento se ejecuta de manera secuencial según el siguiente orden crítico:

1. **Oxidación inicial:** (Paso 1).

Colocar 1 mL de muestra o solución patrón en el tubo correspondiente. Agregar sucesivamente 5 mL de permanganato de potasio al 1 % y 1 mL de ácido sulfúrico al 20 %

Agitar la mezcla y dejar reposar durante 15 minutos, observando la formación del "espejo" (aparición de una coloración característica producida durante la oxidación).

2. **Decoloración:** (Paso 2)

Añadir 1 mL de ácido oxálico al 13 % y agitar continuamente hasta la completa decoloración de la solución.

3. **Acidificación:** (Paso 3).

Agregar 1 mL de ácido sulfúrico al 20 % y homogenizar mediante agitación manual.

4. **Desarrollo del color:** (Paso 4).

Finalmente, adicionar 5 mL de reactivo de Schiff. Homogenizar el tubo y transferir inmediatamente a reposo, manteniéndolo refrigerado y protegido de la luz.

Lectura colorimétrica

La comparación analítica debe realizarse a partir de las 3:00 horas contadas desde el inicio de la reacción. La evaluación debe efectuarse bajo las mismas condiciones para muestras y patrones, verificando que el patrón cero correspondiente al blanco permanezca totalmente incoloro.

La evaluación se efectúa colocando los tubos sobre un fondo blanco y observando en dirección axial al tubo, intercalando la muestra entre los dos patrones más próximos. Una vez determinada la posición, se registra el patrón inferior, el patrón superior y la concentración interpolada.

En caso de **muestras fuera de escala** (cuando la intensidad de color de la muestra supere al patrón de máxima concentración), se debe realizar una dilución adecuada utilizando etanol al 9,0 % (V/V), repetir la determinación completa y aplicar el factor de dilución correspondiente en el cálculo final.

Realizar la comparación:

- Sobre fondo blanco

- Observando en dirección axial al tubo
- Intercalando la muestra entre los patrones más próximos

Registrar:

- Patrón inferior
- Patrón superior
- Concentración interpolada

17.8.5. Calibración

La calibración del método se realiza mediante:

- Preparación de soluciones patrón de metanol
- Verificación periódica de la escala colorimétrica
- Control de estabilidad de los reactivos

Las soluciones patrón deberán:

- Identificarse correctamente
- Mantenerse refrigeradas
- Registrarse con fecha de preparación y vencimiento

La aptitud de la escala patrón deberá verificarse mediante el desarrollo completo de la reacción colorimétrica, comprobando que los patrones presenten una progresión uniforme y creciente de intensidad de color desde la menor hasta la mayor concentración. Si uno o más patrones presentan una intensidad de color anormal o fuera de secuencia, deberá descartarse la totalidad de la escala y prepararse nuevamente. Los patrones deberán conservarse en frascos color caramelo identificados con concentración, fecha de preparación y fecha de vencimiento, manteniéndose refrigerados durante todo su período de uso.

17.9. Cálculo y expresión de los resultados

La concentración de metanol se calcula mediante:

$$\boldsymbol{Metanol}\ \frac{\boldsymbol{ml}}{\boldsymbol{l}} = \boldsymbol{C} \cdot \frac{\boldsymbol{a}}{\boldsymbol{10}}$$

Dónde:

a = grado alcohólico del destilado % (V/V)

C = concentración correspondiente al patrón o valor interpolado que presenta igual intensidad de color que la muestra (mL/L)

10 = dilución de trabajo

Ejemplo: si

- C = 0,23 mL/L
- a = 12,5 % (V/V)

Entonces:

$$\boldsymbol{Metanol}\left(\frac{\boldsymbol{mL}}{\boldsymbol{L}}\right) = \mathbf{0.23} \cdot \frac{\mathbf{12.5}}{\mathbf{10}} = \mathbf{0,2875}\ \boldsymbol{mL/L}$$

Expresión de los resultados en mg/L

Para expresar el resultado en mg/L, el valor obtenido en mL/L se multiplica por **792,8**, correspondiente a la densidad del metanol.

Muestras fuera de escala

Cuando la intensidad de color de la muestra supere el patrón de mayor concentración:

- Realizar dilución adecuada con etanol al 9 % (V/V)
- Repetir la determinación
- Considerar el factor de dilución en el cálculo final

17.10. Bibliografía

Norma IRAM ISO/IEC 17025 – Requisito 5.4

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS312-03A. Methanol* [Resolución OIV/OENO 377/2009: Método OIV-MA-AS312-03A. Metanol]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. *https://www.oiv.int/public/medias/2334/oiv-ma-as311-05.pdf http*[6]

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1996, 22 de abril). *Resolución C. 11/1996: Reglamento General de Análisis - Anexo I, Cap. II: Métodos analíticos oficiales para vinos y mostos (Determinación de metanol por el método colorimétrico de Denigès-Villavecchia). Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-37704/texto*

[6] **Nota de actualización técnica:** Aunque la OIV conserva este método colorimétrico en su compendio como método alternativo/clásico, el método de referencia (*Type I*) actual de la OIV para metanol es la **cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)** bajo la norma **OIV-MA-AS312-03B** (Resolución OIV-OENO 391-2010).

18. MATERIA COLORANTE ARTIFICIAL ÁCIDA – MÉTODO ÁRATA (Materia colorante/Arata – INV – 10018)

18.1. Título

Determinación cualitativa de materia colorante artificial ácida en vinos - Método Arata.

Código: **Materia colorante/Arata – INV – 10018**

18.2. Introducción

La adición de materias colorantes artificiales en vinos constituye una práctica no autorizada, debido a que modifica artificialmente las características cromáticas propias del producto. El presente método permite detectar cualitativamente la presencia de colorantes artificiales ácidos mediante su fijación selectiva sobre fibras de lana en medio ácido.

18.3. Alcance

Este método establece la determinación cualitativa de materia colorante artificial ácida en vinos mediante fijación sobre lana en medio ácido. Es aplicable a vinos tintos y rosados destinados al control oficial de autenticidad y composición.

18.4. Definiciones

La *Materia colorante artificial ácida es el c*onjunto de sustancias colorantes sintéticas, de naturaleza ácida, añadidas intencionalmente al vino para modificar, intensificar o corregir su color, y que no provienen de la uva ni del proceso natural de vinificación.

18.5. Principio

El método se basa en la capacidad de los colorantes artificiales ácidos presentes en el vino de fijarse sobre fibras de lana en medio ácido. Posteriormente, dichos colorantes son de sorbidos en medio alcalino y nuevamente fijados sobre lana limpia para evidenciar su presencia.

18.6. Reactivos y materiales

18.6.1. Reactivos

- Éter etílico o éter sulfúrico, grado analítico.
- Ácido clorhídrico al 10 % (V/V)

- Amoniaco concentrado.
- Agua destilada.

18.6.2. Materiales

- Lana pura blanca desengrasada con éter.
- Perlas de vidrio.
- Vasos de precipitación de 250 mL.
- Varilla de vidrio.

18.7. Aparatos

- Plancha calefactora o mechero.
- Campana de extracción de gases.

18.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

La muestra de vino no requiere preparación previa específica. Conservar la muestra en recipiente hermético, protegida de la luz y a temperatura ambiente.

18.9. Procedimiento

18.9.1. Porción de prueba

Tomar 100 mL de vino. Para incrementar la sensibilidad del ensayo podrán emplearse hasta 200 mL.

18.9.2. Determinación

1. Reducir la muestra a aproximadamente dos tercios de su volumen mediante ebullición.
2. Agregar 4 mL de ácido clorhídrico al 10 % (V/V), 0,5 g de lana desengrasada y algunas perlas de vidrio.
3. Hervir durante 5 minutos bajo campana de extracción.
4. Escurrir el líquido y lavar la lana varias veces con agua corriente.
5. Agregar 100 mL de agua destilada acidulada con 2 mL de ácido clorhídrico al 10 % (V/V) y hervir durante 5 minutos.

6. Eliminar el líquido y repetir la operación indicada en el paso 5 tantas veces como sea necesario hasta obtener agua completamente incolora, para eliminar la materia colorante natural del vino.
7. Lavar la lana con agua corriente para eliminar restos de acidez.
8. Agregar sobre la lana 50 mL de agua destilada y 10 gotas de amoniaco concentrado.
9. Hervir suavemente durante 10 minutos utilizando perlas de vidrio.
10. Transferir el líquido a otro vaso de precipitación de 250 mL.
11. Agregar 50 mL de agua destilada y hervir suavemente hasta eliminar los vapores de amoniaco (aproximadamente 5 minutos).
12. Dejar enfriar y agregar 2 mL de ácido clorhídrico al 10 % (V/V)
13. Verificar que el medio presente reacción ácida mediante papel tornasol.
14. Introducir una fibra de lana de aproximadamente 10 a 15 cm de longitud y hervir durante 5 minutos.
15. Lavar cuidadosamente la lana con agua corriente y observar la coloración obtenida.
16. Si la coloración resultara dudosa, repetir el procedimiento desde el paso 8 utilizando una lana de 6 a 8 cm de longitud. Si la coloración obtenida fuera tenue pero claramente perceptible, el resultado deberá considerarse positivo.
17. Si fuera necesario incrementar la nitidez de la coloración, repetir nuevamente el procedimiento utilizando una lana de 3 a 4 cm de longitud.
18. Si existieran interferencias o dudas en la interpretación, la operación podrá repetirse tantas veces como sea necesario hasta obtener una coloración neta.

18.9.3. Criterio de interpretación

- En vinos tintos, la presencia de materia colorante artificial ácida se evidencia por una coloración roja o rosada neta sobre la lana, aun cuando sea tenue. Este criterio se establece específicamente para vinos tintos, dado que la metodología también puede emplearse para la determinación de otros colorantes artificiales en distintas matrices, incluyendo colorantes amarillos en vinos blancos.
- En ausencia de colorantes artificiales ácidos, la lana permanece blanca luego de las sucesivas fijaciones.

18.10. Cálculo (Resultados)

El método es de carácter cualitativo.

18.10.1. Expresión de resultados

- Resultado positivo: presencia de coloración neta o claramente perceptible sobre la lana, aun cuando sea tenue.
- Resultado negativo: ausencia de coloración.

18.10.2. Informe de ensayo

- Materia colorante artificial ácida: Contiene/No contiene.

18.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2008). *Method OIV-MA-AS315-08: Examination of artificial colorants [Método OIV-MA-AS315-08: Examen de colorantes artificiales]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.* *https://www.oiv.int/es/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-5-other-organic-compounds/examination-of-artificial-colorants-%28type-iv%29*

Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. (1960). *Vinos: Método cualitativo de determinación de los colorantes orgánicos ácidos artificiales* (Norma IRAM 14508). IRAM.

19. CENIZAS (CE – INV - 10019)

19.1. Título

Determinación de cenizas en vinos y mostos
Código: **CE – INV - 10019**

19.2. Introducción

El contenido de cenizas constituye un parámetro analítico que permite evaluar la fracción mineral de los productos vitivinícolas, aporta información relevante sobre su composición y posibles tratamientos tecnológicos.

19.3. Alcance

El presente método establece la determinación del contenido de cenizas en vinos, mostos y otros productos vitivinícolas mediante incineración del extracto seco, aplicable al control de productos vitivinícolas y materias primas.

19.4. Definición

Las cenizas son el residuo mineral resultante de la incineración completa de la materia orgánica presente en el vino o mosto, bajo condiciones controladas de temperatura. Este residuo contiene la totalidad de los cationes (excepto amonio) en forma de carbonatos y otras sales minerales anhidras.

El contenido de cenizas se expresa en gramos por litro (g/L).

19.5. Principio

El método se basa en la incineración del extracto seco del vino a una temperatura comprendida entre 500 °C y 550 °C, hasta lograr la combustión completa de la materia orgánica, obteniéndose un residuo mineral constituido por las cenizas.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Preparación de la muestra
- Evaporación hasta sequedad
- Carbonización del residuo

- Incineración en mufla
- Enfriamiento en desecador
- Pesada del residuo mineral

19.6. Reactivos y materiales

19.6.1. Reactivos

R1 – Agua destilada

Utilizada para facilitar la eliminación de partículas carbonosas durante el proceso de incineración. Debe estar libre de impurezas visibles.

19.6.2. Materiales y equipos

- Cápsula de platino de fondo plano
- Baño de arena
- Horno mufla eléctrica con temperatura regulable (500 °C a 550 °C)
- Balanza analítica (sensibilidad: 0,1 mg)
- Desecador con agente desecante (cloruro de calcio o equivalente)
- Pinza metálica con punta de platino
- Pipeta de doble aforo de 20 mL

Los equipos deberán estar calibrados y verificados conforme a procedimientos vigentes.

19.7. Preparación de la muestra

19.7.1. *Muestreo:* tomar directamente del envase original, evitando alteraciones en su composición.

19.7.2. *Conservación:* mantener condiciones que eviten evaporación o contaminación.

19.8. Procedimiento

19.8.1. Porción de prueba

Medir 20 mL de muestra utilizando pipeta de doble aforo.

19.8.2. Determinaciones

- Colocar 20 mL de muestra en una cápsula de platino previamente tarada.
- Calentar el residuo sobre baño de arena hasta sequedad.
- Introducir la cápsula en horno mufla regulado a 525 °C ± 25 °C durante 15 minutos, hasta alcanzar la incineración total.
- Evaluación del residuo: Si las cenizas son blancas: retirar, enfriar en desecador y pesar.
- Si hay partículas carbonosas: agregar unas gotas de agua destilada, evaporar nuevamente a baño María y re incinerar a 525ºC; repetir hasta obtener cenizas blancas.
- Enfriar en desecador y pesar el residuo mineral.

19.8.3. Calibración

La balanza analítica deberá calibrarse conforme a los procedimientos vigentes del laboratorio.

19.9. Cálculo (Resultados)

El contenido de cenizas se expresa en gramos por litro (g/L) y se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\boldsymbol{Cenizas}\ \left(\frac{\boldsymbol{g}}{\boldsymbol{L}}\right) = (\mathbf{p} - \mathbf{t}) \cdot \mathbf{50}$$

Dónde:

p = masa de la cápsula con cenizas (g)

t = masa de la cápsula vacía (g)

V = volumen de muestra (mL) - Para este método: V = 20 mL

Nota:

En muestras con alto contenido de azúcares (vinos dulces o mostos), se recomienda tomar menor volumen de muestra para evitar proyecciones (desborde) durante la evaporación.

19.10. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS2-04. Ash. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. https://www.oiv.int/public/medias/1476/oiv-ma-as2-04.pdf

20. ALCALINIDAD EN CENIZAS (AC/TR – INV – 10020)

20.1. Título

Determinación de alcalinidad en cenizas de vinos mediante titulación por retorno
Código: **AC/TR – INV – 10020.**

20.2. Introducción

La alcalinidad de las cenizas constituye un parámetro químico relevante en el análisis de vinos, asociado al contenido de sales minerales combinadas con ácidos orgánicos. Su determinación permite evaluar la composición mineral y contribuye al control de calidad de los productos vitivinícolas.

20.3. Alcance

Este método establece la determinación de la alcalinidad de las cenizas en vinos y otros productos vitivinícolas mediante titulación ácido-base por retorno.

20.4. Definiciones

La alcalinidad de las cenizas se define como la suma de los cationes, excluyendo el amonio, combinados con los ácidos orgánicos del vino.

Se expresa como gramos de carbonato de potasio (K_2CO_3) por litro de muestra.

20.5. Principio

El método se basa en la titulación por retorno de la alcalinidad de las cenizas.

Etapas principales:

- Obtención de cenizas a partir de la muestra
- Tratamiento con un volumen conocido de ácido sulfúrico 0,10 N
- Disolución completa de las cenizas
- Titulación del exceso de ácido con hidróxido de sodio 0,10 N
- Cálculo de la alcalinidad en función del ácido consumido

20.6. Reactivos y materiales

20.6.1. Reactivos

R1 – Ácido sulfúrico 0,10 N
Solución titulada.
R2 – Hidróxido de sodio 0,10 N
Solución titulada.
R3 – Indicador anaranjado de metilo al 1%
R4 – Agua destilada libre de CO_2
Utilizada para reponer el volumen evaporado durante la ebullición.

Los reactivos deberán ser de grado analítico y las soluciones tituladas deberán estar estandarizadas.

20.6.2. Materiales y Equipos

- Baño de María
- Baño de arena
- Cápsula de platino o material inerte equivalente
- Erlenmeyer de 250 mL
- Bureta graduada
- Varilla de vidrio con extremo de goma

El material volumétrico deberá estar calibrado conforme a procedimientos vigentes.

20.7. Muestreo (Preparación de la muestra)

20.7.1. Muestreo:

Realizado conforme a normativa vigente o procedimientos del INV.

20.7.2. Preparación de la muestra:

- Las cenizas se obtienen a partir de un volumen conocido de muestra según método oficial.
- Las cenizas deben estar completamente libres de materia orgánica antes del análisis.

20.8. Procedimiento

20.8.1. Porción de prueba

Se utilizan las cenizas obtenidas a partir de 20 mL de vino, preparadas según método oficial.

20.8.2. Determinación(es)

Tratamiento de las cenizas

- Agregar 10 mL de ácido sulfúrico 0,10 N a las cenizas en la cápsula.
- Llevar a baño de María hirviente hasta disolución completa.
- Favorecer la disolución completa frotando el fondo y las paredes de la cápsula con el extremo de goma de una varilla de vidrio.

Adición de indicador

- Incorporar 2 gotas de anaranjado de metilo al 1%
- Verificar viraje a color rojo; caso contrario, agregar más ácido.

Transferencia y ebullición

- Transferir cuantitativamente a un Erlenmeyer de 250 mL.
- Llevar a ebullición durante 1 minuto.
- Reponer el volumen evaporado con agua destilada libre de CO_2.

Titulación

- Enfriar la solución.
- Titular el exceso de ácido con hidróxido de sodio 0,10 N hasta color salmón.
- Registrar el volumen consumido de hidróxido de sodio.

20.8.3. Calibración (cuando corresponda)

Las soluciones de ácido sulfúrico y de hidróxido de sodio deberán ser estandarizadas previamente frente a materiales de referencia adecuados.

Se deberán cumplir los criterios internos del laboratorio para aceptación de la concentración.

20.9. Cálculo (Resultados)

$$\boldsymbol{Alcalinidad\ total}\left(\frac{\boldsymbol{meq}}{\boldsymbol{L}}\right) = (\boldsymbol{N} - \boldsymbol{m}) \cdot \mathbf{5}$$

Dónde:

N = mL de ácido sulfúrico 0,10 N utilizados

m = mL de hidróxido de sodio 0,10 N consumidos en la titulación

Para expresar la alcalinidad de las cenizas en gramos de K_2CO_3 por litro se aplica la ecuación en función de la diferencia (N − m).

$$\boldsymbol{Alcalinidad\ como\ K2CO3}\left(\frac{\boldsymbol{g}}{\boldsymbol{L}}\right) = \mathbf{0,345} \cdot (\boldsymbol{N} - \boldsymbol{m})$$

El resultado se expresará en g/L de K_2CO_3 con dos cifras decimales. Cuando corresponda, se aplicará corrección por blanco.

20.10. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS2-05. Alkalinity of ash. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.* https://www.oiv.int/public/medias/2322/oiv-ma-as2-05.pdf

21. ÍNDICE DE COLOR (IC/IR – INV – 10021)

21.1. Título

Determinación del índice de color en vinos por espectrofotometría
Código: **IC/IR – INV – 10021.**

21.2. Introducción

El índice de color constituye un parámetro analítico utilizado para evaluar la intensidad cromática de los vinos, especialmente en vinos tintos. Su determinación permite caracterizar propiedades vinculadas a la composición fenólica y a la evolución del producto durante su elaboración y envejecimiento.

21.3. Alcance

El presente método establece la determinación del índice de color en vinos mediante medición espectrofotométrica en la región visible.

Es aplicable principalmente a vinos tintos, aunque puede utilizarse en otras matrices líquidas vitivinícolas que presenten color.

21.4. Definiciones

El índice de color (IC) es un parámetro que expresa la intensidad cromática de una muestra, determinado a partir de la absorbancia medida a longitudes de onda específicas en la región visible.

Convencionalmente, las características cromáticas de los vinos se describen mediante:

- **Intensidad colorante**, asociada a la suma de absorbancias
- **Tonalidad**, asociada a la relación entre absorbancias

Las mediciones se realizan típicamente a:

- 420 nm (tonos amarillos)
- 520 nm (tonos rojos)

- 620 nm (tonos azules)

Las sustancias responsables del color del vino son los compuestos fenólicos (polifenoles), entre los cuales se destacan los taninos y los antocianos, que influyen en el color, la astringencia y la evolución del vino.

21.5. Principio

El método se basa en la medición de la absorbancia del vino a longitudes de onda específicas en la región visible mediante espectrofotometría. Convencionalmente, las características cromáticas de los vinos tintos se definen a partir de la medición de absorbancias a 420 nm y 520 nm, utilizando cubetas de 1 mm de paso óptico. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Verificación del equipo mediante solución de control
- Ajuste del cero del instrumento
- Medición de absorbancias de la muestra
- Cálculo del índice de color

Las características cromáticas de los vinos se expresan mediante la intensidad colorante y la tonalidad, determinadas a partir de las absorbancias medidas en la región visible.

21.6. Reactivos y materiales

R1 – Solución de cloruro de cobalto hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (100 g/L)
Utilizado para la verificación del desempeño del equipo.

21.7. Aparatos

- Espectrofotómetro UV-visible
- Cubetas de vidrio o cuarzo de 1 mm de paso óptico

Los equipos deberán estar calibrados y verificados conforme a procedimientos vigentes.

21.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

21.8.1. Muestra:

La muestra se tomará directamente del envase original, evitando modificaciones en su composición.

21.8.2. Conservación:

La muestra deberá conservarse en condiciones que eviten alteraciones.

21.8.3. Preparación para el análisis:

- En general, la muestra no requiere preparación previa.
- Los vinos deberán estar completamente límpidos.
- Se consideran límpidos aquellos que transmiten uniformemente la luz al ser observados a contraluz en un recipiente limpio e incoloro.
- En caso de turbidez, filtrar la muestra mediante membrana de 0,45 µm.

21.9. Procedimiento

21.9.1. Porción de prueba

Se emplea un volumen suficiente de muestra para llenar la cubeta de medición (1 mm de paso óptico).

21.9.2. Determinaciones

Verificación de lecturas:

Transferir la muestra a la cubeta mediante pipeta, realizando entre tres y cinco enjuagues previos con la propia muestra para asegurar el total desalojo del fluido anterior. Cargar la muestra evitando la formación de burbujas.

Previo a la medición de las muestras, se ensaya la solución de cloruro de cobalto (R1), registrando las absorbancias a 420 nm y 520 nm
Los valores obtenidos deberán cumplir con los siguientes criterios de aceptación:

Tabla 21.1 – *Valores de referencia para la verificación del equipo con solución de CoCl2 * 6H_2O*

Parámetro	420 nm	520 nm	IC
Media	0,033	0,222	1698
Desviación estándar	0,004	0,009	101
CV (%)	11,533	4,059	6
Incertidumbre	0,004	0,010	111 (7%)

De cumplirse estos criterios, se procede a la medición de las muestras.

En caso contrario:

- Realizar la limpieza del equipo y de las cubetas
- Verificar la correcta posición de las cubetas
- Repetir la medición hasta cumplir los criterios

Las acciones realizadas deberán registrarse en la planilla correspondiente.

Lectura:

- Ajustar el cero del espectrofotómetro con agua destilada.
- Enjuagar la cubeta entre tres y cinco veces con la muestra a analizar.
- Cargar la muestra evitando la formación de burbujas.
- Verificar la limpidez y ausencia de manchas en las paredes externas de la cubeta.
- Medir la absorbancia a 420 nm y 520 nm

Limpieza de la cubeta:

- Luego de su uso, enjuagar varias veces con agua destilada.
- Mantener la cubeta en agua limpia hasta su próximo uso.
- Si fuera necesario, lavar con detergente no iónico y enjuagar repetidamente para eliminar residuos.

21.9.3. Calibración

El espectrofotómetro deberá calibrarse y verificarse conforme a los procedimientos vigentes del laboratorio.

21.10. Cálculo (Resultados)

El índice de color se determina a partir de los valores de absorbancia medidos a las longitudes de onda especificadas, conforme a la siguiente expresión:

$$IC = \left(\frac{A\,420 + A\,520}{\frac{A420}{A520}} \right) \cdot 1000$$

El resultado se expresa como índice de color (IC), con el número de cifras significativas definido por el laboratorio.

21.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2022). Resolution OIV-OENO 667-2022: Method OIV-MA-AS2-07B. Chromatic characteristics. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. *https://www.oiv.int/node/2912/download/pdf*

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2009). Resolución C. 31/2009: Índice de color para identificación de vinos tintos nacionales. Información Legislativa (InfoLEG). *https://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=157137*

22. ÁCIDO SÓRBICO (Sórbico – INV – 10022)

22.1. Título

Determinación de ácido sórbico en vinos
Código: **Sórbico – INV – 10022**

22.2. Introducción

El ácido sórbico y su sal de potasio son utilizados como conservantes en vinos, particularmente en vinos dulces, para prevenir fermentaciones posteriores causadas por levaduras y limitar el desarrollo de microorganismos indeseados. La determinación espectrofotométrica del ácido sórbico permite cuantificar su concentración mediante medición de absorción en la región ultravioleta del espectro.

22.3. Alcance

Este método establece la determinación de ácido sórbico en vinos mediante destilación por arrastre de vapor y determinación espectrofotométrica UV. Es aplicable a Vinos y productos vitivinícolas compatibles con el método.

22.4. Definiciones

Ácido sórbico: Ácido orgánico utilizado como conservante antimicrobiano en vinos y otros alimentos.

Absorbancia: Magnitud espectrofotométrica proporcional a la concentración del analito presente en solución. La concentración de ácido sórbico se expresa en miligramos por litro (mg/L).

22.5. Principio

El ácido sórbico presente en la muestra es separado mediante destilación por arrastre de vapor de agua. Posteriormente, el destilado es analizado espectrofotométricamente mediante medición de absorbancia en la región ultravioleta a 256 nm

La concentración de ácido sórbico se determina mediante comparación con una curva de calibración construida a partir de soluciones patrón de concentración conocida.

El método comprende las siguientes etapas:

- Destilación por arrastre de vapor
- Preparación del destilado
- Medición espectrofotométrica
- Construcción de curva de calibración
- Cálculo de concentración

22.6. Reactivos y materiales

22.6.1. Reactivos

R1 – Solución A: Utilizada para catalizar la oxidación del ácido sulfuroso por el aire.

Composición:

- Carbonato ácido de sodio: 0,5 g
- Sulfato de cobre cristalizado: 0,001 g
- Agua c.s.p.: 1.000 mL

R2 – Solución patrón de ácido sórbico 20 mg/L

La solución patrón de ácido sórbico podrá prepararse utilizando sorbato de potasio de pureza conocida.

R3 – Solución de ácido tartárico al 25 % (p/V)

22.6.2. Materiales

- Matraces aforados de 20 mL
- Matraces aforados de 200 mL
- Pipetas doble aforo de 5 mL
- Material auxiliar de laboratorio

22.7. Equipos

- Espectrofotómetro UV-visible
- Equipo de destilación por arrastre de vapor tipo Jaulmes o equivalente

El espectrofotómetro deberá encontrarse calibrado y verificado conforme a procedimientos vigentes del laboratorio.

22.8. Preparación de la muestra

22.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

22.8.2. Muestra

La muestra no requiere preparación previa.

22.9. Procedimiento

22.9.1. Porción de prueba

Utilizar:

- 10 mL de muestra de vino
- 1 mL de solución de ácido tartárico al 25 *% (p/V)*

22.9.2. Determinación(es)

Obtención del destilado

Obtener el destilado conforme al procedimiento indicado para acidez volátil.

Procedimiento:

- Colocar 10 mL de vino y 1 mL de ácido tartárico al 25 *% (p/V)* en el equipo de destilación.
- Realizar destilación por arrastre de vapor.
- Recoger aproximadamente 200 mL de destilado en matraz aforado.

Preparación de la muestra para lectura

- Tomar 5 mg/L del destilado.
- Transferir a un matraz aforado de 20 mL
- Llevar a volumen con solución A.

Medición espectrofotométrica

- Colocar la solución en cubeta de 1 cm de trayecto óptico.
- Dejar la cubeta expuesta al aire durante algunos minutos.
- Medir la absorbancia a 256 nm

La medición deberá realizarse comparando contra una solución de referencia preparada de igual forma, reemplazando:

- 5 mg/L de destilado por
- 5 mg/L de agua destilada.

22.9.3. Curva de calibración

Preparar soluciones estándar de ácido sórbico de:

- 0,5 mg/L
- 1,0 mg/L
- 3,0 mg/L
- 5,0 mg/L

Las soluciones deberán prepararse a partir de la solución patrón de 20 mg/L. Utilizar agua destilada como referencia. Preparación de soluciones patrón:

Testo (mg/L)	Vol (mL) de solución patrón 20 mg/L	Volumen final de aforo
0,5	2,5	llevar a 100 mg/L
1,0	1,0	
3,0	3,0	
5,0	5,0	

Construir la curva de calibración representando absorbancia en función de la concentración de ácido sórbico de las soluciones patrón.

22.9.4. Calibración

El espectrofotómetro deberá verificarse periódicamente conforme a procedimientos internos del laboratorio.

Se deberá controlar:

- Exactitud de longitud de onda
- Linealidad de respuesta
- Estado y limpieza de las cubetas
- Correcta preparación de las soluciones patrón
- Validez de la curva de calibración

22.10. Cálculo (Resultados)

La concentración de ácido sórbico se expresa en **miligramos por litro (mg/L).**

El resultado se obtiene a partir de la curva de calibración absorbancia-concentración.:

$$\textbf{Ácido Sórbico}\ \left(\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{L}}\right) = \mathbf{80}\ \cdot \mathbf{e}$$

Dónde:

e = concentración obtenida mediante lectura de la curva de calibración

80 = factor que surge de las dos diluciones sucesivas efectuadas durante el procedimiento analítico:

- **1:20 Primera dilución**
- **1:4 Segunda dilución**

La solución patrón de ácido sórbico se prepara a partir de sorbato de potasio.

22.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1996, 22 de abril). *Resolución C. 11/1996: Reglamento General de Análisis - Anexo I, Cap. II: Métodos analíticos oficiales para vinos y mostos (Determinación de ácido sórbico)*. Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-37704/texto

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS313-14A. Sorbic acid (spectrophotometry)* [Resolución OIV/OENO 377/2009: Método OIV-MA-AS313-14A. Ácido sórbico (espectrofotometría)]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-3-acids/sorbic-acid-%28spectrofluorimetry%29-%28type-iv%29

23. CLORUROS POR ARGENTIMETRÍA (Cl^-/ARG – INV – 10023)

23.1. Título

Determinación de cloruros en vinos por argentimetría.
Código: **Cl^-/ARG – INV – 10023**

23.2. Introducción

La determinación de cloruros en vinos constituye un ensayo químico cuantitativo utilizado para evaluar el contenido de sales cloradas presentes en el producto. Su control resulta de interés para la caracterización analítica y la verificación de la composición del vino.

23.3. Alcance

Este método establece la determinación cuantitativa de cloruros en vinos mediante valoración argentimétrica por retorno, previa mineralización de la muestra.

Es aplicable a vinos destinados al control oficial de su composición.

23.4. Definiciones

El método volumétrico para la determinación de cloruros es una técnica analítica cuantitativa. Los cloruros corresponden a las sales derivadas del ácido clorhídrico presentes en el vino.

A los efectos de este método, el contenido de cloruros se expresa en gramos por litro de cloruro de sodio (NaCl).

23.5. Principio

El método se basa en la precipitación de los cloruros presentes en la muestra mediante la adición de un exceso conocido de solución de nitrato de plata. Previamente, la muestra es sometida a una mineralización oxidativa para eliminar la materia orgánica que pudiera interferir en la determinación.

El exceso de nitrato de plata no consumido en la precipitación de los cloruros se determina por valoración de retorno con solución de tiocianato de potasio, utilizando alumbre férrico-amónico como indicador.

23.6. Reactivos y materiales

23.6.1. Reactivos

- Solución de permanganato de potasio al 6,5 % (p/V)
- Ácido nítrico puro.
- Solución de nitrato de plata 0,05 N.
- Solución de tiocianato de potasio 0,05 N.
- Solución de alumbre férrico-amónico al 15 % (p/V)
- Agua oxigenada de 100 volúmenes.
- Agua bidestilada.

23.6.2. Materiales

- Matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- Pipeta de doble aforo de 20 mL.
- Pipeta de doble aforo de 50 mL.
- Pipeta graduada de 5 mL.
- Bureta de 25 mL.

23.7. Aparatos

Equipo de calentamiento adecuado para llevar la muestra a ebullición.

23.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

La muestra se toma directamente de la botella original, la cual deberá permanecer cerrada hasta el momento del análisis.

23.9. Procedimiento

23.9.1. Porción de prueba

Tomar 10 mL de vino.

23.9.2. Determinación

1. Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL:
    - 10 mL de vino.
    - 10 mL de agua bidestilada.
    - 2,5 mL de ácido nítrico puro.
    - 10 mL de solución de nitrato de plata 0,05 N.
2. Llevar la mezcla a ebullición.
3. Agregar lentamente solución de permanganato de potasio al 6,5 % (p/V) en porciones decrecientes, finalizando gota a gota.
4. Durante la oxidación, observar el cambio de color del permanganato desde violeta hacia un precipitado pardo, el cual posteriormente se redisuelve.
5. Continuar la adición hasta obtener una solución incolora.
6. Si la solución presenta coloración amarilla residual, agregar unas gotas de agua oxigenada de 100 volúmenes hasta lograr la decoloración completa.
7. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
8. Agregar 5 mL de solución de alumbre férrico-amónico al 15 % (p/V).
9. Agregar 20 mL de éter etílico o nitrobenceno.
10. Valorar el exceso de nitrato de plata con solución de tiocianato de potasio 0,05 N.
11. El punto final de la valoración corresponde a la aparición de una coloración rosa pálida persistente.

23.9.3. Observaciones

- La adición de la solución de permanganato de potasio debe realizarse lentamente, permitiendo la redisolución completa del precipitado formado antes de efectuar una nueva adición.
- Utilizar exclusivamente agua bidestilada para la preparación de reactivos y para la ejecución del ensayo.
- Se define como sodio excedentario a la diferencia entre los miliequivalentes por litro de sodio y los miliequivalentes por litro de cloruros presentes en la muestra.

23.10. Cálculo y expresión de los resultados

23.10.1. Cálculo

El contenido de cloruros se expresa como gramos por litro de cloruro de sodio (NaCl) y se calcula mediante la expresión:

$$\boldsymbol{Cloruros}\left(\frac{\boldsymbol{g}}{\boldsymbol{L}}\ \boldsymbol{NaCl}\right) = (\mathbf{10} - \boldsymbol{n}) \cdot \mathbf{0,292}$$

Dónde:

n = volumen de solución de tiocianato de potasio 0,05 N consumido en la valoración, expresado en mL.

23.10.2. Expresión de resultados

Los resultados se expresan en **g/L de NaCl** con dos cifras decimales, salvo disposición normativa específica.

23.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2017, 13 de noviembre). *Resolución 275-E/2017: Fíjanse para los vinos, los límites máximos de contenido de cloruros y de sulfatos. Argentina.gob.ar.* https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-287281/texto

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de química analítica (9ª ed.). Cengage Learning. (Específicamente el capítulo sobre métodos de titulación de precipitación / volumetría de precipitación argentimétrica).*

24. CLORUROS (Cl^-/Potenciometría – INV – 10024)

24.1. Título

Determinación de cloruros en vinos por potenciometría
Código: **Cl^-/Potenciometría – INV – 10024**

24.2. Introducción

El contenido de cloruros en productos vitivinícolas constituye un parámetro de interés para el control de calidad, ya que niveles elevados pueden indicar adiciones indebidas o alteraciones en la composición del producto. Su determinación resulta relevante para verificar la conformidad con los límites establecidos y asegurar la autenticidad del vino.

24.3. Alcance

El presente método establece la determinación de cloruros en vinos y otras matrices líquidas vitivinícolas mediante medición potenciométrica con electrodo selectivo de iones.

Es aplicable al control de productos terminados, productos intermedios del proceso enológico, materias primas e insumos.

24.4. Definiciones

El método potenciométrico para la determinación de cloruros es una técnica analítica cuantitativa basada en la medición del potencial eléctrico (voltaje).

Los cloruros corresponden al conjunto de compuestos que contienen el ion cloruro (Cl^-) presente en solución.

El contenido de cloruros se expresa en miligramos por litro (mg/L) de Cl^-.

24.5. Principio

Los cloruros se determinan directamente en el vino por potenciometría utilizando un electrodo de ion selectivo, basándose en la medición del potencial eléctrico generado por la actividad de dichos iones en solución.

El método se basa en la determinación potenciométrica directa de los iones cloruro mediante un electrodo selectivo específico, el cual responde al potencial generado por la actividad de dichos iones en solución, en relación con un electrodo de referencia.

La cuantificación se realiza mediante la técnica de doble adición estándar, que permite determinar simultáneamente la concentración del analito y la pendiente del electrodo, minimizando los efectos de matriz.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Preparación de la muestra
- Adición de solución reguladora de fuerza iónica
- Medición del potencial
- Adiciones estándar sucesivas
- Cálculo automático de la concentración

24.6. Reactivos y materiales

R1 – Solución patrón de cloruros (100 mg/L como Cl^-)
Preparada a partir de cloruro de sodio de grado analítico o certificada.

R2 – Solución ajustadora de fuerza iónica (ISA)
Disolver 425 g de nitrato de sodio ($NaNO_3$) en agua bidestilada y enrasar a 1 L.

R3 – Agua bidestilada
Libre de impurezas, utilizada para preparación de soluciones y limpieza de materiales.

24.7. Aparatos

- Potenciómetro con capacidad de medición en mV
- Electrodo selectivo de ion cloruro
- Electrodo de referencia (cuando no esté integrado)
- Agitador magnético con placa aislante para evitar el calentamiento de la muestra por efecto del motor, equipado con barra agitadora recubierta.
- Vaso de precipitados de 250 mL
- Pipetas volumétricas (1 mL y 10 mL)
- Pipeta graduada de 15 mL

Los equipos deberán estar calibrados y verificados conforme a procedimientos vigentes.

24.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

24.8.1. Muestra:

La muestra se tomará directamente del envase original, evitando modificaciones en su composición.

24.8.2. Conservación:

La muestra deberá conservarse en condiciones que eviten contaminación o alteraciones.

24.8.3. Preparación para el análisis:

- Transferir 100 mL de muestra a un vaso de precipitados.
- Agregar 15 mL de solución ajustadora de fuerza iónica (R2).
- Homogeneizar la mezcla previo a la medición.

24.9. Procedimiento

24.9.1. Porción de prueba

Se emplean 100 mL de muestra, a los que se adicionan 15 mL de solución ajustadora de fuerza iónica.

24.9.2. Determinación(es)

Preparación del equipo:

- Verificar el estado del electrodo selectivo (limpio y en condiciones operativas).
- Acondicionar el electrodo según indicaciones del fabricante.

Medición (técnica de doble adición estándar):

- Introducir el electrodo en la muestra bajo agitación constante.
- Registrar el potencial inicial.
- Agregar 1 mL de solución patrón de cloruros (R1) y registrar el potencial.
- Agregar 10 mL adicionales de solución patrón y registrar el nuevo potencial.

- Realizar las mediciones manteniendo condiciones constantes de agitación y temperatura.

Consideraciones:

- La técnica de doble adición permite compensar efectos de matriz. La técnica permite además determinar simultáneamente la concentración de la muestra y la pendiente del electrodo, eliminando la necesidad de realizar una calibración o verificación previa de la pendiente antes de la medición.
- La relación entre concentración de estándar y muestra deberá ser adecuada (aproximadamente 100 veces mayor).
- Seguir las instrucciones específicas del equipo para el ingreso de datos, realización de las adiciones estándar, confirmaciones en pantalla y cálculo automático de resultados.

24.9.3. Calibración

La determinación se realiza mediante técnica de adición estándar, por lo que no requiere una curva de calibración externa previa.

No obstante, se deberá verificar periódicamente:

- La pendiente del electrodo
- La respuesta del sistema
- La estabilidad de la señal

De acuerdo con los criterios establecidos por el laboratorio o el fabricante.

24.10. Cálculo y expresión de los resultados

La concentración de cloruros es calculada automáticamente por el equipo a partir de los potenciales medidos durante el procedimiento de doble adición estándar.

Cuando corresponda, el resultado deberá corregirse por el factor de dilución aplicado durante la preparación de la muestra.

El resultado se expresa en miligramos por litro (mg/L) de Cl^-, con el número de cifras significativas definido por el laboratorio.

24.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Method OIV-MA-AS321-02: Chlorides* [Método OIV-MA-AS321-02: Cloruros]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. *https://share.google/qPNFr199ZSCtFVTMA*[7]

Instituto Nacional de Vitivinicultura [INV]. (2017). *Resolución 275-E/2017: Fíjanse para los vinos, los límites máximos de contenido de cloruros y de sulfatos*. Argentina.gob.ar. *https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-287281/texto*

[7] *Nota: Este método especifica la determinación directa por **potenciometría** utilizando un electrodo de Ag/AgCl y valoración con nitrato de plata).*

25. FLUORUROS (F^-/Potenciometría – INV – 10025)

25.1. Título

Determinación de fluoruros en vinos por potenciometría
Código: **F^-/Potenciometría – INV – 10025**

25.2. Introducción

El contenido de fluoruros en productos vitivinícolas constituye un parámetro de interés analítico para el control de calidad y la verificación de la composición del producto. Su determinación permite evaluar la presencia de este ion en el vino y su conformidad con los niveles esperados.

25.3. Alcance

El presente método establece la determinación de fluoruros en vinos y otras matrices líquidas vitivinícolas mediante medición potenciométrica con electrodo selectivo de iones.

Es aplicable al control de productos terminados, productos intermedios del proceso enológico, materias primas e insumos.

25.4. Definiciones

Los fluoruros corresponden a las especies químicas que contienen el ion fluoruro (F^-) en solución.

El contenido de fluoruros se expresa en miligramos por litro (mg/L) de F^-.

25.5. Principio

El método se basa en la determinación potenciométrica de los iones fluoruro mediante un electrodo selectivo con membrana sólida específica.

El potencial medido es proporcional al logaritmo de la actividad de los iones fluoruro presentes en la muestra, en relación con un electrodo de referencia, en un medio con fuerza iónica y pH controlados mediante la adición de una solución tampón.

La cuantificación se realiza mediante la técnica de doble adición estándar, adecuada para matrices complejas.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Preparación de la muestra
- Adición de solución tampón
- Medición del potencial
- Adiciones estándar sucesivas
- Cálculo de la concentración

25.6. Reactivos y materiales

R1 – Solución madre de fluoruro (1 g/L)

Utilizar una solución estándar comercial o prepararla disolviendo 2,210 g de fluoruro de sodio (NaF), previamente desecado a 105 °C durante 3 a 4 horas, en agua destilada y enrasando a 1 L. Conservar en envase plástico.

R2 – Soluciones patrón de fluoruro

Preparadas por dilución de la solución madre con agua destilada. Las soluciones con concentraciones del orden de mg/L deberán prepararse inmediatamente antes de su uso.

R3 – Solución tampón pH 5,5

Disolver 10 g de ácido ciclohexano-1,2-diaminotetraacético (CDTA) en 50 mL de agua. Agregar una solución que contenga 58 g de cloruro de sodio (NaCl) y 29,4 g de citrato trisódico en 700 mL de agua destilada.

El CDTA se disuelve mediante la adición de aproximadamente 6 mL de solución de hidróxido de sodio al 32 % (m/V)

Agregar 57 mL de ácido acético (ρ20 = 1,05 g/mL) y ajustar el pH a 5,5 con solución de hidróxido de sodio al 32 % (aproximadamente 45 mL).

Dejar enfriar y enrasar a 1 L con agua destilada.

25.7. Aparatos

- Potenciómetro con capacidad de medición en mV
- Electrodo selectivo de ion fluoruro con membrana cristalina
- Agitador magnético con placa aislante para proteger la solución del calor del motor.
- Barra agitadora (imán agitador) recubierto de material plástico.
- Vaso de precipitados de 250 mL
- Pipetas volumétricas (1 mL y 10 mL)
- Pipeta graduada de 15 mL

Los equipos deberán estar calibrados y verificados conforme a procedimientos vigentes.

25.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

25.8.1. Muestreo:

La muestra se tomará directamente del envase original, evitando modificaciones en su composición.

25.8.2. Conservación:

La muestra deberá conservarse en condiciones que eviten contaminación o alteraciones.

25.8.3. Preparación para el análisis:

- Transferir 100 mL de muestra a un vaso de precipitados.
- Agregar 10 mL de solución tampón (R3).
- Homogeneizar la mezcla antes de la medición.

25.9. Procedimiento

25.9.1. Porción de prueba

Se emplean 100 mL de muestra, a los que se adicionan 10 mL de solución tampón.

25.9.2. Determinación(es)

Consideraciones generales:

- La técnica de doble adición estándar permite determinar simultáneamente la concentración de la muestra y la pendiente del electrodo, eliminando la necesidad de calibración previa.
- Resulta especialmente adecuada para matrices de composición compleja.

Condiciones recomendadas:

- Volumen de muestra: 100 mL
- Concentración del estándar: aproximadamente 100 veces la concentración esperada en la muestra
- Primera adición: 1 mL
- Segunda adición: 10 mL

Medición:

- Introducir el electrodo en la muestra bajo agitación constante.
- Realizar las adiciones estándar según lo indicado.
- Registrar los potenciales correspondientes en cada etapa.

La técnica de doble adición deberá realizarse siguiendo el procedimiento específico del equipo, respetando la secuencia de ingreso de datos, adiciones estándar y confirmaciones en pantalla.

25.9.3. Calibración

La determinación se realiza mediante técnica de adición estándar, por lo que no requiere calibración externa previa.

No obstante, se deberá verificar periódicamente:

- La pendiente del electrodo
- La estabilidad de la señal
- El correcto funcionamiento del sistema

25.10. Cálculo y expresión de los resultados

La concentración de fluoruros se obtiene a partir de los potenciales medidos durante el procedimiento de doble adición estándar, mediante el cálculo automático del equipo.

Cuando la muestra haya sido diluida durante su preparación, el resultado deberá corregirse aplicando el factor de dilución correspondiente, a fin de expresar la concentración en la muestra original.

El resultado se expresa en miligramos por litro (mg/L) de F^-, con el número de cifras significativas definido por el laboratorio.

25.11. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV] (2004). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS321-03. Determinación del contenido de fluoruros en el vino utilizando un electrodo selectivo de iones fluoruro y un método de adición de patrón. OIV.* https://www.oiv.int/public/medias/2557/oiv-ma-as321-03.pdf

26. GLICERINA POR MÉTODO ENZIMÁTICO (GL/EZ – INV – 10026)

26.1. Título

Determinación de glicerina en vinos por método enzimático
Código: **GL/EZ – INV – 10026**

26.2. Introducción

La glicerina o glicerol es uno de los principales subproductos de la fermentación alcohólica y constituye un componente natural de los vinos. Su determinación resulta de interés analítico debido a su contribución a las características organolépticas y al control de autenticidad y calidad de productos vitivinícolas.

26.3. Alcance

Este método establece la determinación cuantitativa de la glicerina en vinos mediante método enzimático con detección espectrofotométrica. Es aplicable a vinos y otros productos vitivinícolas que contengan glicerol en concentraciones comprendidas dentro del rango de trabajo del método.

26.4. Definiciones

Glicerina (glicerol): alcohol trihidroxílico formado durante la fermentación alcohólica y cuya concentración se determina mediante el presente método. La concentración de glicerina se expresa en gramos por litro (g/L).

26.5. Principio

La determinación se basa en una secuencia de reacciones enzimáticas acopladas. La glicerolquinasa (GK) cataliza la fosforilación del glicerol a glicerol-3-fosfato en presencia de adenosina-5’-trifosfato (ATP). El adenosin-5’-difosfato (ADP) formado es reconvertido en ATP mediante fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato-quinasa (PK), produciendo piruvato. Posteriormente, el piruvato es reducido a lactato por acción del lactato-deshidrogenasa (LDH), utilizando dinucleótido reducido de nicotinamida-adenina (NADH), el cual se oxida a NAD.

Secuencia de reacciones:

1) Glicerol + ATP $\xrightarrow{GK}$ glicerol-3-fosfato + ADP

2) ADP + PEP $\xrightarrow{PK}$ ATP + piruvato

3) Piruvato + NADH + H+ $\xrightarrow{LDH}$ lactato + NAD+

La disminución de absorbancia del NADH se mide espectrofotométricamente a 340 nm, 334 nm o 365 nm y es proporcional a la concentración de glicerol presente en la muestra. La cantidad de NAD^+ formada durante la reacción es proporcional a la cantidad de glicerol presente.

El método comprende las siguientes etapas:

- Preparación y dilución de la muestra
- Preparación de reactivos y mezcla de reacción
- Desarrollo de la reacción enzimática
- Medición espectrofotométrica
- Cálculo de la concentración de glicerina

26.6. Reactivos y materiales[8]

R1 – Solución buffer (Solución de glicilglicina 0,75 M con Mg^{2+} 10^{-3} M, pH 7,4).

Preparación: Disolver 10.0 g de glicilglicina y 0.25 g de sulfato de magnesio (MgSO4.7 H2O) en aproximadamente 80 mL de agua bidestilada, adicionar 2.4 mL de solución de hidróxido de sodio 5 M para obtener pH de 7.4 y enrasar a 100 mL con agua bidestilada. Esta solución buffer puede ser conservada por 3 meses a + 4 °C.

R2 – Solución de coenzimas y sustratos (NADH 8,2.10-3 M, ATP 33.10-3 M, PEP 46.10-3 M)

[8] ***Nota:*** *Todos los reactivos están disponibles comercialmente.*

Preparación: Disolver en 6 mL de agua bidestilada:

- 42 mg de nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido disódico (NADH-Na_2)
- 120 mg de adenosina-5'-trifosfato disódico (ATP-Na_2H_2)
- 60 mg de fosfoenolpiruvato sódico
- 300 mg de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)

Esta solución buffer puede ser conservada 2 a 3 días a 4 °C.

R3 – Suspensión de piruvato-quinasa/lactato-deshidrogenasa (PK/LDH)

Concentración:

- PK: 3 mg/mL
- LDH: 1 mg/mL

Utilizar la suspensión sin diluir.

Condiciones de conservación:

- Hasta 1 año a 4 °C.

R4 – Suspensión de glicerolquinasa (GK)

Concentración:

- GK: 1 mg/mL

Condiciones de conservación:

- Hasta 1 año a 4 °C.

Materiales adicionales

- Agua bidestilada
- Cubetas de vidrio o descartables de 1 cm de paso óptico

Nota:

Todos los reactivos se encuentran disponibles comercialmente.

26.7. Aparatos

- Espectrofotómetro con capacidad de medición a 340 nm
- Alternativamente, fotómetro de espectro discontinuo apto para mediciones a 334 nm o 365 nm

- Cubetas de 1 cm de trayecto óptico
- Micropipetas con capacidad entre 0,02 mL y 2 mL
- Material volumétrico de laboratorio

El espectrofotómetro deberá encontrarse calibrado y verificado según los procedimientos vigentes del laboratorio.

26.8. Preparación de la muestra

26.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

26.8.2. Preparación de la muestra

La determinación se realiza generalmente sobre el vino, previa dilución con agua bidestilada.

La dilución deberá realizarse de manera que la concentración final de glicerol se encuentre comprendida entre **30 mg/L y 500 mg/L.**

Como orientación general, una dilución 2:100 suele resultar adecuada.

26.9. Procedimiento

26.9.1. Porción de prueba

Tomar 0,10 mL de muestra diluida para el análisis.

26.9.2. Determinación(es)

Las mediciones se realizarán a 340 nm utilizando cubetas de 1 cm de paso óptico, empleando aire como referencia.

26.9.3. Preparación de cubetas

Reactivo	Cubeta de referencia	Cubeta de muestra
Solución R1	1,00 mL	1,00 mL
Solución R2	0,10 mL	0,10 mL
Muestra	—	0,10 mL
Agua bidestilada	2,00 mL	1,90 mL
Suspensión R3	0,01 mL	0,01 mL
Mezclar y dejar reposar 5 minutos – Leer las absorbancias iniciales A1		
Suspensión R4	0,01 mL	0,01 mL

Mezclar y esperar hasta finalización de la reacción (5 a 10 minutos).

Leer las **absorbancias finales A2.**

Verificar la estabilización de la absorbancia mediante lecturas sucesivas cada 2 minutos hasta obtener valores constantes durante al menos 2 minutos.

26.9.4. Cálculo de absorbancia

Calcular:

ΔA referencia = $A_2 - A_1$
ΔA muestra = $A_2 - A_1$

La diferencia de absorbancia se obtiene mediante:

$\Delta A = \Delta A$ muestra – ΔA referencia

26.9.5. Calibración (cuando corresponda)

El espectrofotómetro deberá calibrarse y verificarse de acuerdo con los procedimientos internos del laboratorio y las recomendaciones del fabricante.

Cuando corresponda, podrán utilizarse materiales de referencia certificados o soluciones de control.

26.10. Cálculo y expresión de los resultados

La concentración de glicerina se calcula mediante:

$$C = \frac{V \cdot PM}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta A$$

Dónde:

C: concentración de glicerina (g/L)

V: volumen total del ensayo (3,12 mL)

v: volumen de muestra (0,10 mL)

PM: peso molecular del glicerol (92,1 g/mol)

d: longitud de paso óptico de la cubeta (1 cm)

ε: coeficiente de absorción molar del NADH s 340 nm

ΔA: diferencia de absorbancia

Para **mediciones a 340 nm**: ε = 6,3 L · mmol-1 · cm-1 – La ecuación se simplifica a:

$$C = 0,456 \cdot \Delta A \cdot F$$

F = factor de dilución

Para **mediciones a 334 nm** = 6,2 L · mmol-1 x · x cm-1

$$C = 0,463 \cdot A \cdot F$$

Para **mediciones a 365 nm** = 3,4 L · mmol-1 x · x cm-1

$$C = 0,845 \cdot A \cdot F$$

El resultado se expresará en **g/L de glicerina con dos cifras decimales**.

Nota:

Cuando se utilice autoanalizador, la muestra podrá analizarse sin dilución previa. Los reactivos y ecuaciones de cálculo permanecen sin modificaciones.

26.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1996, 22 de abril). *Resolución C. 11/1996: Reglamento General de Análisis - Anexo I, Cap. II: Métodos analíticos oficiales para*

vinos y mostos (Determinación enzimática de glicerol). Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-37704/texto

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS312-05. Enzymatic determination of glycerol* [Resolución OIV/OENO 377/2009: Método OIV-MA-AS312-05. Determinación enzimática del glicerol]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. https://www.oiv.int/public/medias/2495/oiv-ma-as312-05.pdf

Boehringer Mannheim. (1989). *Methods of enzymatic and chemical analysis: Technical documentation* [Métodos de análisis enzimático y químico: Documentación técnica]. Boehringer Mannheim GmbH.

Instituto Argentino de Normalización y Certificación. (2018). *IRAM-ISO/IEC 17025:2018. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración* (Requisito 7.2: Selección, verificación y validación de métodos). IRAM.[9]

[9] En cumplimiento del requisito 7.2 sobre Selección, verificación y validación de métodos de la norma IRAM-ISO/IEC 17025 (IRAM, 2018), la determinación de glicerol se fundamenta en la metodología descrita en las guías técnicas de Boehringer Mannheim (1989) y R-Biopharm AG (2020), alineada con los protocolos oficiales del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, 1996) y de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2009).

27. GLICERINA POR ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA (GL/IR – INV – 10027)

27.1. Título

Determinación de glicerina en vinos por espectroscopía infrarroja.

Código: **GL/IR – INV – 10027**

27.2. Introducción

La glicerina o glicerol es uno de los alcoholes superiores (principales subproductos de la fermentación alcohólica), constituye un componente natural de los vinos. Su determinación mediante **espectroscopía infrarroja** permite realizar análisis rápidos y simultáneos utilizando técnicas instrumentales automatizadas ampliamente aplicadas en laboratorios enológicos.

27.3. Alcance

Este método establece la determinación cuantitativa de glicerina en vinos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) o espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR), utilizando modelos de calibración quimiométricos.

Es aplicable a vinos y otros productos vitivinícolas compatibles con los rangos y condiciones de calibración del equipo utilizado.

27.4. Definiciones

La glicerina o glicerol es un alcohol trihidroxílico formado naturalmente durante la fermentación alcohólica por acción de las levaduras sobre los azúcares.

La concentración de glicerina se expresa en gramos por litro (g/L).

La *espectroscopía infrarroja* es una técnica instrumental basada en la absorción de radiación infrarroja por las moléculas, permitiendo identificar y cuantificar compuestos mediante el análisis de sus espectros característicos.

27.5. Principio

La glicerina presenta bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro electromagnético.

La determinación se realiza mediante espectroscopía FT-IR o NIR, combinada con modelos de calibración quimiométricos previamente desarrollados a partir de muestras de referencia. La espectroscopía NIR permite cuantificar la glicerina combinando espectroscopía con quimiometría.

El método comprende las siguientes etapas:

- Verificación del desempeño instrumental
- Medición del espectro de referencia (background)
- Medición de muestras patrón
- Medición del espectro de la muestra
- Procesamiento quimiométrico de datos
- Obtención de la concentración de glicerina

27.6. Reactivos y materiales

R1 – Agua destilada

Utilizada para limpieza y enjuague de la celda o accesorio de medición.

Debe encontrarse libre de partículas visibles.

R2 – Patrones de glicerol en matriz vino modelo

Utilizados para calibración, verificación y control del desempeño analítico.

Los materiales de referencia deberán poseer valores conocidos y trazables cuando corresponda.

27.7. Aparatos

- Espectrómetro FT-IR con accesorio ATR o célula de transmisión
- Alternativamente, analizadores específicos NIR/FTIR para vinos
- Software de adquisición y procesamiento de datos integrado al analizador

- Jeringas para carga de muestra
- Vasos de precipitados
- Material auxiliar de limpieza

El equipo deberá:

- Encontrarse calibrado y verificado según procedimientos vigentes
- Poseer modelos quimiométricos validados para determinación de glicerina
- Cumplir las condiciones de estabilidad térmica especificadas por el fabricante

27.8. Preparación de la muestra

27.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

27.8.2. Preparación de la muestra

En general, la muestra no requiere preparación previa.

Cuando la muestra presente partículas en suspensión o turbidez excesiva, podrá realizarse filtración previa.

La muestra deberá alcanzar la temperatura de trabajo recomendada por el fabricante del equipo antes de la medición.

27.9. Procedimiento

27.9.1. Porción de prueba

Tomar una cantidad suficiente de muestra para completar adecuadamente la celda o accesorio de medición del equipo.

27.9.2. Determinación(es)

Verificación del equipo

- Encender el equipo y el software de adquisición.

- Verificar el estado operativo y los ensayos de performance del instrumento.
- Asegurar la estabilización térmica del sistema antes de iniciar las mediciones.

Limpieza del sistema

- Limpiar la celda o cristal ATR utilizando paño suave no abrasivo.
- Enjuagar con agua destilada al menos dos o tres veces.
- Introducir los líquidos lentamente para evitar formación de burbujas.

Medición de Background

- Realizar la medición del espectro de referencia (Background).
- Repetir la operación 3 – 4 veces hasta obtener estabilidad instrumental, según criterios internos del laboratorio o especificaciones del fabricante.

Verificación con muestra patrón

- Analizar una muestra patrón o material de control antes de procesar las muestras analíticas.
- Verificar que los resultados obtenidos se encuentren dentro de los criterios de aceptación establecidos.
- Determinaciones preferentemente por duplicado.

Medición de muestras

- Introducir la muestra en el sistema de medición.
- Realizar las determinaciones preferentemente por duplicado.
- Entre muestras, enjuagar adecuadamente la celda con agua destilada y, cuando corresponda, con una pequeña alícuota de la muestra siguiente para minimizar efectos de arrastre.

Registro de datos

- Guardar espectros y resultados en la base de datos correspondiente.

27.9.3. Calibración (cuando corresponda)

La calibración se realizará utilizando patrones de glicerol en matriz vino modelo y modelos quimiométricos validados.

Se deberá indicar:

- Tipo de modelo de calibración empleado
- Rango de trabajo
- Número de muestras utilizadas en la calibración
- Frecuencia de verificación
- Criterios de aceptación y desempeño

Los modelos deberán verificarse periódicamente conforme a los procedimientos internos del laboratorio.

27.10. Cálculo (Resultados)

La concentración de glicerina es obtenida automáticamente por el software del equipo mediante procesamiento quimiométrico de los espectros infrarrojos registrados. El resultado se expresa en gramos por litro (g/L), con dos cifras decimales.

Cuando corresponda, se aplicarán correcciones o verificaciones mediante materiales de control.

27.11. Bibliografía

Métodos oficiales OIV aplicables a espectroscopía infrarroja en vinos

Norma IRAM ISO/IEC 17025, requisito 7.2

Manuales técnicos de espectroscopía FT-IR y NIR aplicados a análisis enológico

Documentación técnica del fabricante del equipo utilizado

International Organisation of Vine and Wine. (2014). *Resolution OIV-OENO 518-2014: Method OIV-MA-AS312-03. Determination of alcoholic strength by volume of wine, total dry matter, glycerol and major organic acids using mid-infrared spectroscopy (FTIR) [Resolución OIV-OENO 518-2014: Método OIV-MA-AS312-03. Determinación del grado alcohólico volumétrico del vino, extracto seco total, glicerol y principales ácidos orgánicos por espectroscopía infrarroja media (FTIR)]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.* https://www.oiv.int/public/medias/2463/oiv-ma-as312-03.pdf

28. METALES EN VINOS POR ABSORCIÓN ATÓMICA (Metales/AA – INV – 10028)

28.1. Título

Determinación de metales en vinos (mayoritarios y minoritarios) por espectrometría de absorción atómica.

Código: **Metales/AA – INV – 10028**

28.2. Introducción

La espectrometría de absorción atómica (AA) es una técnica instrumental utilizada para cuantificar metales en matrices líquidas mediante la medición de la absorción de radiación electromagnética por átomos en estado gaseoso. Esta técnica permite la determinación de elementos macro y micro presentes en el vino, con elevada sensibilidad y especificidad.

28.3. Alcance

Este método establece la determinación de elementos minerales en vinos mediante espectrometría de absorción atómica. La determinación de metales se realiza por atomización de la muestra en llama aire-acetileno (u óxido nitroso para Ca) a sus longitudes de onda características.

Es aplicable a la determinación de macroelementos (Na, K, Ca y Mg), microelementos (Fe, Cu y Zn) y elementos traza o contaminantes (Pb, Cd y As) en vinos tranquilos y espumosos, así como en insumos vitivinícolas líquidos.

28.4. Definiciones

Elemento mayoritario (macroelemento): Metal presente en concentraciones relativamente altas en el vino.

Elemento minoritario (microelemento): Metal presente en concentraciones bajas, habitualmente en trazas.

Blanco analítico: Solución utilizada para poner a cero el instrumento y corregir absorbancia de la matriz.

Patrón o estándar: Solución de concentración conocida utilizada para la calibración.

Elemento traza: Elemento presente en concentraciones muy bajas, generalmente inferiores a 1 mg/L, cuya determinación puede requerir técnicas de mayor sensibilidad, como la atomización electrotérmica en horno de grafito.

Atomización electrotérmica: Técnica de absorción atómica que utiliza un horno de grafito para generar átomos libres mediante calentamiento programado.

Horno de grafito: sistema de atomización electrotérmica utilizado en espectrometría de absorción atómica para la determinación de elementos en niveles de trazas.

28.5. Principio

La muestra diluida se atomiza mediante llama de acetileno-aire u horno de grafito (según el elemento a determinar). Los átomos libres absorben radiación a longitudes de onda características del elemento. La intensidad de absorción se mide y se relaciona con la concentración del metal mediante una curva de calibración. Se puede incorporar un tampón de ionización (como cloruro de cesio) para estabilizar elementos susceptibles a ionización (ej. Na, K).

En la determinación por absorción atómica se hace pasar un haz de luz de longitud de onda específica, correspondiente a una transición electrónica característica del elemento de interés, a través de la muestra atomizada. Los átomos del elemento en estado fundamental absorben parte de esa radiación y la disminución de intensidad es medida por el detector. La absorbancia obtenida es directamente proporcional a la concentración del elemento presente en la muestra, de acuerdo con la Ley de Beer-Lambert.

La atomización puede realizarse mediante llama, horno de grafito o sistemas de generación de hidruros, según el elemento a determinar y el nivel de concentración esperado.

28.6. Reactivos y materiales

Reactivos

- Agua bidestilada o desionizada con resistividad ≥18 MΩ·cm.
- Soluciones patrón de los elementos a determinar, de calidad analítica o certificada.
- Ácido nítrico concentrado >65 % (p/p) para estabilización y digestión.
- Cloruro de cesio para tampón de ionización (cuando corresponda).

Materiales

- Matraz aforado Clase A (10–1000 mL).
- Pipetas y micropipetas calibradas (200 µL – 10 mL).
- Material de vidrio y plástico resistente a ácidos, acondicionado con HNO_3 al 10 % (V/V) y enjuagado con agua desmineralizada.

28.7. Aparatos

- Espectrofotómetro de absorción atómica (flama u horno de grafito).
- Fuentes de luz específica para cada metal (lámparas de cátodo hueco).
- Balanzas analíticas (precisión ± 0,1 mg).
- Sistema de aspiración nebulizador o inyección en horno de grafito.

28.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

28.8.1. Determinación por llama

Tomar la alícuota correspondiente y efectuar la dilución indicada en el procedimiento específico de cada elemento o analito.

28.8.2. Determinación por horno de grafito

Preparar la muestra según el procedimiento específico del elemento, pudiendo requerirse dilución, digestión ácida o mineralización previa.

Aclaración técnica

- **Macro**: AA llama directo
- **Micro**: AA llama con o sin mineralización previa de la muestra (cenizas)

- **Trazas**: GFAAS o HG/HVG (HG-AAS = estándar internacional (OIV) - HVG = variante operativa simplificada)

28.9. Procedimiento

28.9.1. *Porción de prueba*

- Utilizar las soluciones preparadas según 33.8. Los metales traza pueden determinarse por digestión húmeda o calcinación únicamente cuando se requiera reducción de interferencias matriciales

28.9.2. Determinación

- Encender el espectrofotómetro y calibrar con blanco de agua desmineralizada.
- Preparar la curva de calibración utilizando soluciones patrón con concentraciones conocidas.
- Ajustar condiciones instrumentales (longitud de onda, corriente de lámpara, flujo de gas, potencia de llama o programa de horno) según el metal.
- Medir absorbancia o absorbancia integrada de cada muestra, según el sistema de atomización empleado.

28.9.3. Calibración

- Realizar curva de calibración con 4–5 puntos, abarcando el rango esperado en la muestra.
- Incorporar tampón de ionización si se analiza Na o K.
- Verificar la linealidad y exactitud con material de referencia certificado.

28.10. Cálculo y expresión de los resultados

28.10.1. Cálculo

$$C = \frac{Cm \cdot V}{Vm}$$

Dónde:

- C = concentración del analito en la muestra (mg/L)

- Cm = concentración determinada en la solución diluida (mg/L)
- V = volumen final de dilución (mL)
- Vm = volumen de muestra utilizado para la dilución (mL)

28.10.2. Expresión de resultados

Expresar en mg/L para cada metal determinado.

28.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura [INV]. (2018). *Resolución de fiscalización de límites analíticos y metales pesados en vinos y mostos en el marco de la Ley General de Vinos N° 14.878*. Ministerio de Producción y Trabajo, Argentina. https://consultas.inv.gob.ar/resoluciones/RESOL-2018-2-APN-INV-MPYT.pdf

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (Recopilación actual). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-03A. Sodio*. OIV. https://www.oiv.int/

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (Recopilación actual). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Métodos de la Sección 3.2.2 (Cationes y metales por Espectrometría de Absorción Atómica)*. OIV. https://www.oiv.int/es/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-2-non-organic-compounds/section-3-2-2-cations

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3. ª ed.). Wiley-VCH.

29. SODIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (Na/AA-LLAMA – INV – 10029)

29.1. Título

Determinación de sodio en vinos por espectrometría de absorción atómica con llama.
Código: Na/AA-llama – INV – 10029

29.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de sodio en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización en llama aire-acetileno. Los resultados se expresan en mg/L de sodio.

29.3. Principio

La determinación se basa en la absorción de la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco de sodio por los átomos de sodio presentes en la muestra, previamente atomizados en una llama aire-acetileno. La absorbancia medida a 589 nm es proporcional a la concentración de sodio presente en la muestra. Para minimizar los efectos de ionización se recomienda utilizar cloruro o nitrato de cesio como tampón de ionización.

29.4. Reactivos y materiales específicos

29.4.1. Reactivos

Solución patrón de sodio 1000 mg/L certificada.

Alternativamente, preparar una solución madre de 1000 mg/L de sodio disolviendo 2,5423 g de cloruro de sodio previamente secado y completando a 1000 mL con agua desionizada.

Solución de cloruro de cesio o nitrato de cesio como tampón de ionización.

29.4.2. Soluciones de calibración

Preparar soluciones patrón de sodio de:

- 0,25 mg/L
- 0,50 mg/L

- 1,00 mg/L
- 2,00 mg/L

Las soluciones deberán contener la misma concentración del tampón de ionización que las muestras.[10]

29.4.3. Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: 589,0 nm
- Tipo de llama: aire-acetileno
- Corrector de fondo: según equipo
- Tampón de ionización: CsCl o $CsNO_3$

29.5. Procedimiento

29.5.1. Porción de prueba

Se recomienda una dilución inicial 1:100 con agua desionizada.

29.5.2. Determinación

1. Encender el espectrofotómetro de absorción atómica y estabilizar las condiciones operativas.
2. Instalar la lámpara de cátodo hueco de sodio.
3. Ajustar la longitud de onda a 589,0 nm
4. Optimizar las condiciones de la llama aire-acetileno para obtener la máxima sensibilidad.
5. Aspirar el blanco analítico y ajustar el cero instrumental.
6. Medir las soluciones de calibración y construir la curva absorbancia-concentración.
7. Medir las muestras realizando al menos tres lecturas independientes.

[10] **Nota:** Debido a que la concentración de potasio en vino es normalmente superior a la de sodio (aproximadamente 10 veces), puede producirse interferencia de matriz. Para minimizar este efecto, se recomienda adicionar potasio a los patrones de calibración en concentraciones equivalentes a las presentes en las muestras, utilizando para ello una solución patrón de potasio adecuado.

8. Verificar periódicamente la estabilidad de la calibración mediante una solución de control.

29.5.3. Calibración

La curva de calibración deberá prepararse con un mínimo de cuatro niveles de concentración.

El coeficiente de determinación (R^2) deberá ser igual o superior a 0,995.

29.6. Cálculo y expresión de resultados

La concentración de sodio en la muestra se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:
C = concentración de sodio en la muestra (mg/L)
Cm = concentración obtenida de la curva de calibración (mg/L)
Fd = factor de dilución aplicado

Expresar el resultado en **mg/L de sodio**.

Sodio excedente

Cuando corresponda, el sodio excedente se calcula mediante:

$$\boldsymbol{A = B - C}$$

Dónde:
A = sodio excedente (meq/L)
B = sodio total (meq/L)
C = cloruros (meq/L)

Para expresar el resultado en mg/L, se considerará que el meq del Na^+ es de 23 mg.

1 meq/L de Na^+ = 23 mg/L

29.7. Observaciones

- Utilizar material previamente descontaminado con ácido nítrico al 10 % (V/V) o ácido clorhídrico diluido y enjuagado abundantemente con agua desionizada.
- Emplear agua desionizada o bidestilada de calidad analítica para el enjuague del material, la preparación de soluciones patrón y todas las diluciones requeridas durante el procedimiento.
- Utilizar patrones certificados o materiales de referencia trazables.
- Verificar periódicamente la ausencia de interferencias de ionización y de matriz.

29.8. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura [INV]. (2018). *Resolución de fiscalización de límites analíticos y metales pesados en vinos y mostos en el marco de la Ley General de Vinos N° 14.878*. Ministerio de Producción y Trabajo, Argentina. *https://consultas.inv.gob.ar/resoluciones/RESOL-2018-2-APN-INV-MPYT.pdf*

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (**2021).** *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-03A. Sodio (AAS).* OIV *https://www.oiv.int/public/medias/8530/eng-compendiumvol1.pdf*

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (Recopilación actual). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Métodos de la Sección 3.2.2 (Cationes y metales por Espectrometría de Absorción Atómica)*. OIV. *https://www.oiv.int/es/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-2-non-organic-compounds/section-3-2-2-cations*

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

30. POTASIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (K/AA-LLAMA – INV – 10030)

30.1. Título

Determinación de potasio en vinos por espectrometría de absorción atómica con llama.
Código: **K/AA-llama – INV – 10030**

30.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de potasio en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización en llama aire-acetileno. Es aplicable a vinos tranquilos y espumosos. Los resultados se expresan en mg/L de potasio.

30.3. Principio

La determinación se basa en la absorción de la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco de potasio por átomos de potasio presentes en la muestra, previamente atomizados en una llama aire-acetileno. La absorbancia se mide a 769,9 nm, longitud de onda característica del potasio, y es proporcional a su concentración en la muestra, según la ley de Beer-Lambert. Para reducir interferencias por ionización, se recomienda el uso de un tampón espectral a base de cloruro de cesio.

30.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos[11]

Solución patrón certificada de potasio 1000 mg/L. Alternativamente, preparar solución madre disolviendo:

- 1,9066 g de cloruro de potasio (KCl), o
- 4,813 g de tartrato ácido de potasio y aforar a 1000 mL con agua desionizada.

[11] ***Nota de reactivos***
El material de vidrio debe lavarse previamente con solución de ácido clorhídrico diluido y enjuagarse exhaustivamente con agua bidestilada. Toda preparación de soluciones y diluciones debe realizarse exclusivamente con agua bidestilada o desionizada.

Soluciones de calibración de potasio:

- 5 mg/L
- 10 mg/L
- 15 mg/L
- 20 mg/L

Agua bidestilada o desionizada (≥18 MΩ·cm).

Tampón de ionización: cloruro de cesio o equivalente.

Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: 769,9 nm
- Tipo de llama: aire-acetileno
- Corrector de fondo: según equipo
- Tampón de ionización: **CsC**l o equivalente

30.5. Procedimiento

Porción de prueba

Realizar una dilución apropiada de la muestra de forma que la concentración de potasio quede comprendida dentro del rango de calibración.

Determinación

1. Encender el espectrofotómetro de absorción atómica y estabilizar el sistema.
2. Instalar la lámpara de cátodo hueco de potasio.
3. Ajustar la longitud de onda a 769,9 nm
4. Optimizar la llama aire-acetileno para máxima sensibilidad.
5. Ajustar el cero instrumental utilizando agua bidestilada como blanco.
6. Medir las soluciones patrón y construir la curva de calibración concentración vs. absorbancia.
7. Medir las muestras realizando al menos tres lecturas independientes.
8. Verificar periódicamente la estabilidad del sistema mediante solución de control.

Calibración

- Preparar al menos cuatro puntos de calibración en el rango 5–20 mg/L.
- Verificar linealidad de la curva con coeficiente de determinación aceptable ($R^2 \geq 0{,}995$).
- Incorporar tampón de ionización en estándares y muestras cuando corresponda.

30.6. Cálculo y expresión de resultados

La concentración de potasio en la muestra se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:

C = concentración de potasio en la muestra (mg/L)

Cm = concentración obtenida de la curva de calibración (mg/L)

Fd = factor de dilución aplicado (Se debe indicar explícitamente el factor de dilución utilizado).

Los resultados se expresan en **mg/L de potasio**.

30.7. Observaciones

- Ajustar las condiciones de la llama para optimizar la sensibilidad del potasio.
- Utilizar patrones certificados o materiales de referencia trazables.
- Controlar interferencias por ionización mediante el uso de cesio cuando corresponda.
- Mantener condiciones constantes de aspiración y estabilidad de llama durante toda la secuencia analítica.
- Emplear agua bidestilada o desionizada de calidad analítica para el enjuague del material, la preparación de soluciones patrón y todas las diluciones efectuadas durante el procedimiento.

30.8. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura [INV]. (1981, 12 de agosto). *Resolución N° 582/81: Normas analíticas para la determinación de potasio y sodio mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica y métodos fotométricos (Anexo correspondiente a Cationes)*. Boletín Oficial de la República Argentina.

https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-582-1981-314326/texto

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (Recopilación actual). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-02A. (Determinación de potasio y otros cationes por Espectrometría de Absorción Atómica)*. OIV. https://www.oiv.int/es/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-2-non-organic-compounds/section-3-2-2-cations - https://www.oiv.int/

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

31. CALCIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (Ca/AA-LLAMA – INV – 10031)

31.1. Título

Determinación de calcio en vinos por absorción atómica con llama.
Código: **Ca/AA-llama – INV – 10031**

31.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de calcio en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización en llama. Es aplicable a vinos tranquilos y espumosos. Los resultados se expresan en mg/L de calcio.

31.3. Principio

La determinación se basa en la absorción de la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco de calcio previamente atomizado en una llama.
La absorbancia se mide a 422,7 nm**,** longitud de onda característica del calcio, y es proporcional a su concentración en la muestra, según la ley de Beer-Lambert.
La atomización se realiza preferentemente mediante llama óxido nitroso-acetileno. Alternativamente, puede utilizarse llama aire-acetileno, incorporando una sal de lantano para minimizar interferencias químicas.

31.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos

Solución patrón certificada de calcio 1000 mg/L.
Alternativamente, preparar una solución madre disolviendo 2,5 g de carbonato de calcio en una cantidad suficiente de ácido clorhídrico al 10 % y aforar a 1000 mL con agua bidestilada o desionizada.

Soluciones de calibración de calcio:

- 1,0 mg/L
- 2,0 mg/L
- 3,0 mg/L

Agua bidestilada o desionizada (≥18 MΩ·cm).
Solución de lantano, cuando se utilice llama aire-acetileno.

Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: 422,7 nm
- Tipo de llama: óxido nitroso-acetileno (preferente)
- Llama alternativa: aire-acetileno con adición de lantano
- Corrector de fondo: según equipo

31.5. Procedimiento

Porción de prueba
Realizar una dilución inicial 1:100 desionizada o las diluciones adicionales necesarias para que la concentración de calcio se encuentre dentro del rango de calibración.

Determinación

- Encender el espectrofotómetro de absorción atómica y estabilizar el sistema.
- Instalar la lámpara de cátodo hueco de calcio.
- Ajustar la longitud de onda a 422,7 nm
- Optimizar las condiciones de la llama para obtener la máxima sensibilidad.
- Ajustar el cero instrumental utilizando agua bidestilada o desionizada como blanco.
- Medir las soluciones patrón y construir la curva de calibración concentración-absorbancia.
- Medir las muestras realizando al menos tres lecturas independientes.
- Verificar periódicamente la estabilidad del sistema mediante una solución de control.

Calibración

- Preparar al menos tres puntos de calibración en el rango de 1,0 a 3,0 mg/L.
- Verificar la linealidad de la curva mediante un coeficiente de determinación aceptable ($R^2 \geq 0,995$).
- Cuando se utilice lantano como modificador químico, incorporarlo tanto a las soluciones patrón como a las muestras en igual concentración.

31.6. Cálculo y expresión de resultados

La concentración de calcio en la muestra se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:

C = concentración de calcio en la muestra (mg/L)

Cm = concentración obtenida de la curva de calibración (mg/L)

Fd = factor de dilución aplicado (Se debe indicar explícitamente el factor de dilución utilizado).

Los resultados se expresan en **mg/L de calcio**.

31.7. Observaciones

- Ajustar las condiciones de la llama para optimizar la sensibilidad del calcio.
- Utilizar patrones certificados o materiales de referencia trazables.
- Cuando se utilice llama aire-acetileno, adicionar una sal de lantano a muestras y patrones para minimizar interferencias químicas.
- Mantener condiciones constantes de aspiración y estabilidad de llama durante toda la secuencia analítica.
- Emplear agua bidestilada o desionizada de calidad analítica para el enjuague del material, la preparación de soluciones patrón y todas las diluciones efectuadas durante el procedimiento.

31.8. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (Recopilación actual). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-04. Calcio*. OIV. https://www.oiv.int/

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

32. MAGNESIO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (Mg/AA-LLAMA – INV – 10032)

32.1. Título

Determinación de magnesio en vinos por espectrometría de absorción atómica con llama.

Código: **Mg/AA-llama – INV – 10032**

32.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de magnesio en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización en llama aire-acetileno.

Es aplicable a vinos tranquilos y espumosos. Los resultados se expresan en mg/L de magnesio.

32.3. Principio

La determinación se basa en la absorción de la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco de magnesio por átomos de magnesio presentes en la muestra, previamente atomizados en una llama aire-acetileno.

La absorbancia se mide a 285 nm, longitud de onda característica del magnesio, y es proporcional a su concentración en la muestra, según la ley de Beer-Lambert.

32.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos

Solución patrón certificada de magnesio 1000 mg/L

Alternativamente, preparar una solución madre disolviendo 8,3646 g de cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) y aforando a 1000 mL con agua bidestilada o desionizada.

Soluciones de calibración de magnesio:

- 0,50 mg/L
- 1,00 mg/L
- 2,00 mg/L

Agua bidestilada o desionizada (≥18 MΩ·cm).

Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: **285 nm**
- Tipo de llama: aire-acetileno
- Corrector de fondo: según equipo

32.5. Procedimiento

Porción de prueba

Realizar una **dilución inicial 1:100** o las diluciones adicionales necesarias para que la concentración de magnesio se encuentre dentro del rango de calibración.

Determinación

- Encender el espectrofotómetro de absorción atómica y estabilizar el sistema.
- Instalar la lámpara de cátodo hueco de **magnesio**.
- Ajustar la longitud de onda a **285 nm**
- Optimizar la llama **aire-acetileno** para obtener la máxima sensibilidad.
- Ajustar el **cero instrumental** utilizando **agua bidestilada o desionizada** como blanco.
- Medir las soluciones patrón y construir la curva de calibración concentración-absorbancia.
- Medir las muestras realizando al menos tres lecturas independientes.
- Verificar periódicamente la estabilidad del sistema mediante una solución de control.

Calibración

- Preparar al menos tres puntos de calibración en el rango de 0,50 a 2,00 mg/L.
- Verificar la linealidad de la curva mediante un coeficiente de determinación aceptable ($R^2 \geq 0,995$).
- Si una muestra presenta una concentración superior al rango de calibración, efectuar una dilución adicional y repetir la determinación.

32.6. Cálculo y expresión de resultados

La concentración de magnesio en la muestra se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:

C = concentración de magnesio en la muestra (mg/L)

Cm = concentración obtenida de la curva de calibración (mg/L)

Fd = factor de dilución aplicado (Se debe indicar explícitamente el factor de dilución utilizado).

Los resultados se expresan en mg/L de magnesio.

32.7. Observaciones

- Ajustar las condiciones de la llama para optimizar la sensibilidad del magnesio.
- Utilizar patrones certificados o materiales de referencia trazables.
- Mantener condiciones constantes de aspiración y estabilidad de llama durante toda la secuencia analítica.
- Cuando la absorbancia de la muestra exceda el rango de calibración, efectuar una dilución apropiada y repetir la determinación.
- Emplear agua bidestilada o desionizada de calidad analítica para el enjuague del material, la preparación de soluciones patrón y todas las diluciones efectuadas durante el procedimiento.

32.8. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (Recopilación actual). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-07. Magnesio*. OIV. https://www.oiv.int/

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

33. HIERRO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (Fe/AA-LLAMA – INV – 10033)

33.1. Título

Determinación de hierro en vinos por espectrometría de absorción atómica con llama.
Código: **Fe/AA-llama – INV – 10033**

33.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de hierro en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización en llama aire-acetileno. Es aplicable a vinos tranquilos y espumosos. Los resultados se expresan en mg/L de hierro.

33.3. Principio

La determinación se basa en la absorción de la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco de hierro por átomos de hierro presentes en la muestra, previamente atomizados en una llama aire-acetileno. La absorbancia se mide a 248,3 nm, longitud de onda característica del hierro, y es proporcional a su concentración en la muestra, según la ley de Beer-Lambert. La determinación puede realizarse sobre muestras previamente mineralizadas o, cuando las características de la muestra lo permitan, mediante dilución adecuada y eliminación previa del alcohol.

33.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos

Solución patrón certificada de hierro 1000 mg/L.

Alternativamente, preparar una solución madre disolviendo 8,6341 g de sulfato férrico amoniacal dodecahidratado [$FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$] en agua bidestilada ligeramente acidificada con ácido clorhídrico 1 mol/L y aforar a 1000 mL con agua bidestilada o desionizada.

Soluciones de calibración de hierro:

- 0,5 mg/L
- 1,0 mg/L
- 2,0 mg/L
- 3,0 mg/L

- 5,0 mg/L

Solución de ácido clorhídrico 1 mol/L. El ácido clorhídrico utilizado deberá ser de calidad analítica reconocida (p.a. o equivalente).
Agua bidestilada o desionizada (≥18 MΩ·cm).

Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: 248,3 nm
- Tipo de llama: aire-acetileno
- Corrector de fondo: según equipo

33.5. Procedimiento

Porción de prueba

Mineralizar una alícuota de 10 mL de muestra según el método oficial de cenizas. Retomar las cenizas obtenidas con 10 mL de ácido clorhídrico 1 mol/L y homogeneizar. Alternativamente, cuando se demuestre la equivalencia analítica del procedimiento, podrá efectuarse una dilución adecuada de la muestra con eliminación previa del alcohol y realizarse la determinación directa.

Determinación

- Encender el espectrofotómetro de absorción atómica y estabilizar el sistema.
- Instalar la lámpara de cátodo hueco de hierro.
- Ajustar la longitud de onda a 248,3 nm
- Optimizar la llama aire-acetileno para obtener la máxima sensibilidad.
- Ajustar el cero instrumental utilizando agua bidestilada o desionizada como blanco.
- Medir las soluciones patrón y construir la curva de calibración concentración-absorbancia.
- Medir las muestras realizando al menos tres lecturas independientes.
- Verificar periódicamente la estabilidad del sistema mediante una solución de control.
- Calibración
- Preparar al menos cinco puntos de calibración en el rango de 0,5 a 5,0 mg/L.

- Verificar la linealidad de la curva mediante un coeficiente de determinación aceptable ($R^2 \geq 0{,}995$).
- Verificar periódicamente la exactitud mediante materiales de referencia o soluciones de control independientes.

33.6. Cálculo y expresión de resultados

La concentración de hierro en la muestra se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:

C = concentración de hierro en la muestra (mg/L)

Cm = concentración obtenida de la curva de calibración (mg/L)

Fd = factor de dilución aplicado cuando corresponda (Se debe indicar explícitamente el factor de dilución utilizado).

Los resultados se expresan en mg/L de hierro.

33.7. Observaciones

- Ajustar las condiciones de la llama para optimizar la sensibilidad del hierro.
- Utilizar patrones certificados o materiales de referencia trazables.
- Todo el material empleado deberá descontaminarse previamente mediante lavado ácido y posterior enjuague con agua desionizada.
- Mantener condiciones constantes de aspiración y estabilidad de llama durante toda la secuencia analítica.
- Emplear agua bidestilada o desionizada de calidad analítica para el enjuague del material, la preparación de soluciones patrón y todas las diluciones efectuadas durante el procedimiento.

33.8. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (Recopilación actual). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-05A. Iron*. OIV. https://www.oiv.int/

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

34. COBRE POR ABSORCIÓN ATÓMICA (Cu/AA-LLAMA – INV – 10034)

34.1. Título

Determinación de cobre en vinos por espectrometría de absorción atómica con llama.
Código: **Cu/AA-llama – INV – 10034**

34.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de cobre en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización en llama aire-acetileno. Es aplicable a vinos tranquilos y espumosos. Los resultados se expresan en mg/L de cobre.

34.3. Principio

La determinación se basa en la absorción de la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco de cobre por átomos de cobre presentes en la muestra, previamente atomizados en una llama aire-acetileno. La absorbancia se mide a 324,8 nm, longitud de onda característica del cobre, y es proporcional a su concentración en la muestra según la ley de Beer-Lambert.

Se puede realizar sobre muestras previamente mineralizadas (cenizas) o directamente mediante dilución, según las características de la muestra y la exactitud requerida.

34.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos

- Solución patrón certificada de cobre 1000 mg/L.
- Alternativamente, preparar una solución madre disolviendo 1 g de cobre de calidad certificada en 50 mL de ácido nítrico 6 N y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.
- Soluciones de calibración de cobre: 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mg/L.
- Solución de ácido clorhídrico 1 N (1 M) de calidad reconocida.
- Agua bidestilada o desionizada (≥18 MΩ·cm).

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica.
- Cápsula de platino de fondo plano (si se usa mineralización).
- Baño de María, horno - mufla, pinzas metálicas con punta de platino (para mineralización).
- Matraz aforado 100 mL.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL doble aforo.

Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: 324,8 nm
- Tipo de llama: aire-acetileno
- Corrector de fondo: según equipo

34.5. Procedimiento

Porción de prueba

- Cuando se emplea mineralización, retomar las cenizas correspondientes a 10 mL de muestra con 5 mL de ácido clorhídrico 1 N y homogeneizar.
- Cuando se emplea determinación directa, realizar la dilución necesaria para que la concentración de cobre quede comprendido dentro del rango de calibración.

Determinación

- Encender el espectrofotómetro y estabilizar el sistema.
- Instalar la lámpara de cátodo hueco de cobre.
- Ajustar la longitud de onda a 324,8 nm
- Optimizar la llama aire-acetileno para máxima sensibilidad.
- Ajustar el cero instrumental utilizando agua bidestilada como blanco.
- Medir las soluciones patrón y construir la curva de calibración concentración vs. absorbancia.
- Medir las muestras realizando al menos tres lecturas independientes.
- Verificar periódicamente la estabilidad del sistema mediante una solución de control.

Calibración

- Preparar al menos cuatro puntos de calibración en el rango 0,5–2,0 mg/L.
- Verificar linealidad de la curva con coeficiente de determinación $R^2 \geq 0{,}995$.

34.6. Cálculo y expresión de resultados

La concentración de cobre en la muestra se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:

C = concentración de cobre en la muestra (mg/L)

Cm = concentración obtenida de la curva de calibración (mg/L)

Fd = factor de dilución aplicado cuando corresponda (tener en cuenta concentraciones dobles o ajustes por mineralización, cuando corresponda)

Los resultados se expresan en **mg/L de cobre**.

34.7. Observaciones

- Adecuar las características de la llama para lograr la máxima sensibilidad.
- Utilizar patrones certificados o materiales de referencia trazables.
- Todo el material empleado deberá descontaminarse previamente mediante lavado ácido y enjuague con agua desionizada.
- Mantener condiciones constantes de aspiración y estabilidad de llama durante toda la secuencia analítica.
- Emplear agua bidestilada o desionizada de calidad analítica para el enjuague del material, la preparación de soluciones patrón y todas las diluciones efectuadas durante el procedimiento.

34.8. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (Recopilación actual). Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-06A. Copper. OIV. *https://www.oiv.int/*

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

35. ZINC POR ABSORCIÓN ATÓMICA (Zn/AA-LLAMA – INV – 10035)

35.1. Título

Determinación de zinc en vinos por espectrometría de absorción atómica con llama.
Código: **Zn/AA-llama – INV – 10035**

35.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de zinc en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización en llama aire-acetileno. Es aplicable a vinos tranquilos y espumosos. Los resultados se expresan en mg/L de zinc.

35.3. Principio

La determinación se basa en la absorción de la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco de zinc por átomos de zinc presentes en la muestra, previamente atomizados en una llama aire-acetileno. La absorbancia se mide a 213,9 nm, longitud de onda característica del zinc, y es proporcional a su concentración en la muestra según la ley de Beer-Lambert.

La determinación puede realizarse sobre muestras previamente mineralizadas a cenizas o directamente mediante dilución, según las características de la muestra y la exactitud requerida.

35.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos
Solución patrón certificada de zinc 1000 mg/L.
Alternativamente, preparar una solución madre disolviendo 4,3975 g de sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) en agua bidestilada y aforando a 1000 mL.
Soluciones de calibración de zinc:

- 0,5 mg/L
- 1,0 mg/L
- 1,5 mg/L
- 2,0 mg/L

Solución de ácido clorhídrico 1 mol/L de calidad analítica reconocida.
Agua bidestilada o des ionizada (≥18 MΩ·cm).

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica.
- Cápsula de platino de fondo plano (si se emplea mineralización).
- Baño de María.
- Baño de arena.
- Horno a mufla.
- Pinza metálica con punta de platino.
- Matraz aforado de 100 mL.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL de doble aforo.

Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: 213,9 nm
- Tipo de llama: aire-acetileno
- Corrector de fondo: según equipo

35.5. Procedimiento

Porción de prueba

Cuando se emplea mineralización, retomar las cenizas correspondientes a 10 mL de muestra, obtenidas según el método oficial de cenizas, con 10 mL de ácido clorhídrico 1 mol/L y homogeneizar.

Alternativamente, cuando se demuestre la equivalencia analítica del procedimiento, podrá efectuarse una dilución adecuada de la muestra y realizarse la determinación directa.

Determinación

- Encender el espectrofotómetro de absorción atómica y estabilizar el sistema.
- Instalar la lámpara de cátodo hueco de zinc.
- Ajustar la longitud de onda a 213,9 nm

- Optimizar la llama aire-acetileno para obtener la máxima sensibilidad.
- Ajustar el cero instrumental utilizando agua bidestilada o desionizada como blanco.
- Medir las soluciones patrón y construir la curva de calibración concentración-absorbancia.
- Medir las muestras realizando al menos tres lecturas independientes.
- Verificar periódicamente la estabilidad del sistema mediante una solución de control.

Calibración

- Preparar al menos cuatro puntos de calibración en el rango de 0,5 a 2,0 mg/L.
- Verificar la linealidad de la curva mediante un coeficiente de determinación aceptable ($R^2 \geq 0{,}995$).
- Verificar periódicamente la exactitud mediante materiales de referencia o soluciones de control independientes.

35.6. Cálculo y expresión de resultados

La concentración de zinc en la muestra se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:
C = concentración de zinc en la muestra (mg/L)
Cm = concentración obtenida de la curva de calibración (mg/L)
Fd = factor de dilución aplicado, cuando corresponda.

Los resultados se expresan en **mg/L de zinc**.

35.7. Observaciones

- Ajustar las condiciones de la llama para optimizar la sensibilidad del zinc.
- Utilizar patrones certificados o materiales de referencia trazables.
- Todo el material empleado deberá descontaminarse previamente mediante lavado ácido y posterior enjuague con agua desionizada.
- Mantener condiciones constantes de aspiración y estabilidad de llama durante toda la secuencia analítica.

- Emplear agua bidestilada o desionizada de calidad analítica para el enjuague del material, la preparación de soluciones patrón y todas las diluciones efectuadas durante el procedimiento.

35.8. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. *(Recopilación actual). Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-08. Zinc. OIV.* https://www.oiv.int/

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

36. METALES EN VINOS POR ICP-OES (Metales/ICP – INV – 10036)

36.1. Título

Determinación de metales en vinos (mayoritarios y minoritarios) por espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Excitación en plasma de argón acoplado inductivamente para cuantificación multielemental simultánea de macro y microelementos con patrón interno (Sc 335,372 nm o Cs 697,327 nm).

Código: **Metales/ICP – INV – 10036**

36.2. Introducción

La espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) es una técnica instrumental multielemental que permite la determinación simultánea de elementos minerales presentes en el vino en concentraciones mayoritarias y minoritarias.

El plasma utilizado está constituido por argón ionizado. Cuando los elementos presentes en la muestra son introducidos en el plasma, sus átomos e iones se excitan y posteriormente emiten radiación electromagnética a longitudes de onda características de cada elemento. La intensidad de la emisión producida es proporcional a la concentración del elemento presente en la muestra.

36.3. Alcance

Este método establece la determinación de elementos minerales en vinos mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).

Es aplicable a la determinación de macroelementos, tales como sodio, potasio, calcio y magnesio, así como de microelementos, entre ellos hierro, cobre y zinc.

36.4. Definiciones

36.4.1. Plasma de acoplamiento inductivo

Gas ionizado de argón generado mediante un campo electromagnético de radiofrecuencia, utilizado como fuente de excitación y emisión atómica.

36.4.2. Macroelementos

Elementos minerales presentes en concentraciones relativamente elevadas en el vino, tales como **sodio**, **potasio**, **calcio** y **magnesio**.

36.4.3. Microelementos

Elementos minerales presentes en concentraciones menores, tales como **hierro**, **cobre** y **zinc.**

36.4.4. Patrón interno

Elemento añadido en concentración conocida a patrones y muestras para corregir variaciones instrumentales y minimizar interferencias no espectrales.

36.5. Principio

La muestra diluida es introducida en un plasma de argón generado por acoplamiento inductivo. En el plasma, los elementos presentes se atomizan y excitan. Al retornar a estados energéticos inferiores, emiten radiación a longitudes de onda características.

La intensidad de emisión medida para cada longitud de onda es proporcional a la concentración del elemento correspondiente y se cuantifica mediante comparación con curvas de calibración obtenidas a partir de soluciones patrón.

Análisis simultáneo de macro y microelementos

Para la determinación simultánea de macro y microelementos, las muestras se diluyen 1:5.

Las soluciones de calibración contienen etanol al 2,5 % y ácido nítrico al 1 %, con el fin de reproducir los efectos de matriz asociados al contenido alcohólico y favorecer la estabilidad de las soluciones.

Como patrones internos pueden emplearse:

Escandio (Sc) 335,372 nm a 5 mg/L.

Cesio (Cs) 697,327 nm al 1 % como nitrato de cesio ($CsNO_3$).

También pueden utilizarse otros patrones internos adecuadamente seleccionados, como itrio: $Y_{371,029}$ nm, para optimizar el método.

El nitrato de cesio actúa simultáneamente como patrón interno y tampón de ionización, estabilizando los equilibrios de ionización de otros elementos. El cloruro de cesio (CsCl) también puede utilizarse con esta finalidad.

Los patrones internos y el tampón de ionización se preparan conjuntamente y se incorporan a la muestra mediante una tercera vía de la bomba peristáltica, obteniéndose una mezcla homogénea antes de la nebulización.

Análisis exclusivo de macroelementos

Cuando se analizan únicamente macroelementos, las muestras pueden diluirse 1:50.

En este caso se adiciona ácido nítrico al 1 % a muestras y patrones para estabilizar las soluciones.

Debido al elevado factor de dilución, los efectos de matriz se consideran despreciables, por lo que no resulta necesario utilizar patrones internos ni adicionar etanol a las soluciones de calibración.

36.6. Reactivos y materiales

36.6.1. Reactivos

Salvo indicación contraria, utilizar reactivos de calidad analítica reconocida.

- Agua desmineralizada ultrapura con resistividad superior a 18 MΩ, conforme a la Norma ISO 3696.
- Soluciones patrón certificadas monoelementales de los elementos a determinar, con concentraciones de 1 000 mg/L o 10 000 mg/L.
- Solución patrón certificada del patrón interno seleccionado.
- Material de referencia certificado (vino) o muestra procedente de programas de intercomparación para control interno de calidad.
- Ácido nítrico para análisis de trazas, concentración superior al 60 % (CAS 7697-37-2).

- Etanol para análisis de trazas, concentración superior al 95,0 % (V/V) (CAS 64-17-5).
- Solución de ácido nítrico al 1 %

- *Preparación de la solución de ácido nítrico al 1 %:* Agregar 10 mL de ácido nítrico concentrado a un matraz aforado de 1000 mL y completar volumen con agua desmineralizada.

36.6.2. Materiales

- Micropipetas calibradas para volúmenes comprendidos entre 200 µl y 5 mL.
- Pipetas graduadas Clase A para volúmenes entre 1,5 y 10 mL.
- Matraces aforados Clase A.

Acondicionamiento del material

Todo el material que entre en contacto con las muestras deberá permanecer al menos 12 horas en una solución de ácido nítrico al 10 % y posteriormente enjuagarse varias veces con agua desmineralizada.

36.7. Aparatos

- Espectrómetro ICP-OES equipado con plasma de argón acoplado inductivamente y sistema dispersivo apto para las longitudes de onda de análisis.
- Sistema de observación axial, radial o dual.
- Detector secuencial o simultáneo tipo PM, CCD, CID o SCCD.

Notas:

- Se recomienda utilizar espectrometría multielemental simultánea cuando se empleen patrones internos.
- Podrán utilizarse sistemas alternativos de introducción de muestra que mejoren la sensibilidad y robustez del método, tales como inyección de flujo continuo o desolvatación por microondas.
- Para evaluar la robustez instrumental se recomienda calcular la relación de intensidades Mg 279,800 / Mg 285,213, siendo la primera una línea iónica y la segunda una línea atómica.

36.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

36.8.1. Determinación simultánea de macro y microelementos (dilución 1:5)

1. Introducir 10 mL de muestra en un matraz aforado de 50 mL.
2. Agregar 0,5 mL de ácido nítrico concentrado.
3. Completar a volumen con agua desmineralizada.
4. Homogeneizar.

Las muestras de vino espumoso deberán desgasificarse previamente, por ejemplo mediante baño ultrasónico durante al menos 10 minutos.

En muestras con elevado contenido de azúcares podrá realizarse una digestión por microondas en medio nítrico para eliminar la materia orgánica. Si fuera necesario aplicar mayores diluciones, deberá ajustarse proporcionalmente el contenido de etanol en las soluciones patrón.

Nota: dependiendo de la robustez del equipo, podrá emplearse una dilución 1:2 para mejorar la sensibilidad respecto de los elementos traza, ajustando adecuadamente la curva de calibración, el contenido de etanol y los parámetros instrumentales.

36.8.2. Determinación exclusiva de macroelementos (dilución 1:50)

1. Introducir 1 mL de muestra en un matraz aforado de 50 mL.
2. Agregar 0,5 mL de ácido nítrico concentrado.
3. Completar a volumen con agua desmineralizada.
4. Homogeneizar.

36.9. Procedimiento

36.9.1. Porción de prueba

Utilizar las muestras preparadas según lo indicado en el apartado 32.8.

36.9.2. Determinación

Parámetros experimentales orientativos

Los siguientes parámetros corresponden a condiciones instrumentales que permitieron alcanzar las especificaciones de repetibilidad y reproducibilidad del método. Podrán ajustarse en función del equipo utilizado.

- Potencia: 1,3 kW.
- Flujo de gas de plasma: 15 L/min
- Flujo de gas auxiliar: 1,5 L/min
- Presión de nebulización: 200 kPa.
- Tiempo de estabilización: 20 s
- Tiempo de lectura por réplica: 5 s
- Velocidad de bomba peristáltica: 15 rpm
- Tiempo de aclarado: 30 s
- Diámetro interno del tubo de patrón interno: 0,51 mm
- Diámetro interno del tubo de muestra: 0,8 mm

Secuencia analítica

1. Poner en funcionamiento el equipo.
2. Mantener el plasma encendido y la bomba en funcionamiento.
3. Limpiar el sistema con ácido nítrico al 1 % durante al menos 20 minutos.
4. Analizar un blanco analítico.
5. Analizar las soluciones patrón en orden creciente de concentración.
6. Analizar una muestra de referencia para verificar la validez de la calibración.
7. Analizar nuevamente un blanco para comprobar la ausencia de efecto memoria.
8. Analizar las muestras.
9. Incorporar un control de calidad cada 10 muestras y al final de la secuencia analítica. Se recomienda establecer una carta de control o documento equivalente a partir de los resultados obtenidos para la muestra de referencia, con el fin de definir criterios de aceptación y las acciones correctivas a aplicar ante posibles derivas analíticas.
10. Registrar los resultados obtenidos para el seguimiento del desempeño analítico y la detección de posibles derivas instrumentales.

11. Realizar un mínimo de tres lecturas independientes para cada elemento determinado.

36.9.3. Calibración

Preparar curvas de calibración utilizando soluciones patrón adecuadas al rango de concentración esperado para cada elemento.

Las curvas deberán prepararse en una matriz equivalente a la utilizada para las muestras, incorporando ácido nítrico y etanol cuando corresponda.

36.10. Cálculo y expresión de los resultados

36.10.1. Cálculo

La concentración del elemento en la muestra de vino se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\boldsymbol{C} = \frac{(\boldsymbol{Cm} \cdot \boldsymbol{V})}{\boldsymbol{Vm}}$$

Dónde:

C = concentración del elemento en la muestra de vino (mg/L).

Cm = concentración del elemento determinada en la solución diluida (mg/L).

V = volumen final de dilución (mL)

Vm = volumen de muestra utilizado para la dilución (mL).

Para este método:

- V = 50 mL.
- Vm = 10 mL (dilución 1:5) o 1 mL (dilución 1:50).

36.10.2. Expresión de resultados

Los resultados se expresan en mg/L para cada analito analizado.

36.11. Precisión

Las características de precisión del método, incluyendo repetibilidad y reproducibilidad, dependen de la configuración instrumental empleada, las condiciones operativas del laboratorio y los parámetros establecidos durante la validación interna del método.

36.12. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (2013). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-13. Determinación de elementos minerales en el vino mediante ICP-AES (Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente)*. OIV. https://www.oiv.int/public/medias/2575/oiv-ma-as322-13-en.pdf

Instituto Nacional de Vitivinicultura [INV]. (2018). *Resolución de fiscalización de límites analíticos y metales pesados en vinos y mostos en el marco de la Ley General de Vinos N° 14.878*. Ministerio de Producción y Trabajo, Argentina. https://consultas.inv.gob.ar/resoluciones/RESOL-2018-2-APN-INV-MPYT.pdf

37. PLOMO POR ABSORCIÓN ATÓMICA (Pb/AA-LLAMA – INV – 10037)

37.1. Título

Determinación de plomo en vinos por espectrometría de absorción atómica con llama.
Código: **Pb/AA-llama – INV – 10037**

37.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de plomo en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización en llama aire-acetileno. Es aplicable a vinos tranquilos y espumosos previamente sometidos a mineralización. Los resultados se expresan en mg/L de plomo.

37.3. Principio

La determinación se basa en la absorción de la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco de plomo por los átomos de plomo presentes en la muestra, previamente atomizados en una llama aire-acetileno. La absorbancia se mide a 283,3 nm, longitud de onda característica del plomo, y es proporcional a su concentración en la muestra, según la ley de Beer-Lambert.

37.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos
Solución patrón certificada de plomo 1000 mg/L.
Alternativamente, preparar una solución madre de 1000 mg/L disolviendo 1,600 g de nitrato de plomo [$Pb(NO_3)_2$] en solución de ácido nítrico al 1 % (V/V) y aforando a 1000 mL con agua des ionizada.
Soluciones de calibración de plomo:

- 1,0 mg/L
- 2,0 mg/L
- 3,0 mg/L
- 5,0 mg/L

Con las soluciones de calibración se construirá la curva de calibración concentración-absorbancia para la cuantificación del plomo.

Ácido clorhídrico 1 N de calidad analítica.

Agua bidestilada o des ionizada (≥18 MΩ·cm).

Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: **283,3 nm**
- Tipo de llama: aire-acetileno
- Corrector de fondo: según equipo

37.5. Procedimiento

Porción de prueba

Utilizar la solución obtenida a partir de las cenizas correspondientes a 20 mL de muestra, preparadas según el método oficial de cenizas. Retomar las cenizas con 1 mL de ácido clorhídrico 1 N y homogeneizar antes de la determinación.

Determinación

- Encender el espectrofotómetro de absorción atómica y estabilizar el sistema.
- Instalar la lámpara de cátodo hueco de plomo.
- Ajustar la longitud de onda a 283,3 nm
- Optimizar la llama aire-acetileno para máxima sensibilidad.
- Ajustar el cero instrumental utilizando agua bidestilada como blanco.
- Medir las soluciones patrón y construir la curva de calibración concentración versus absorbancia.
- Medir las muestras realizando al menos tres lecturas independientes.
- Verificar periódicamente la estabilidad del sistema mediante una solución de control.

Calibración

- Preparar al menos cuatro puntos de calibración en el rango 1,0–5,0 mg/L.
- Verificar la linealidad de la curva con coeficiente de determinación aceptable ($R^2 \geq 0,995$).

- Analizar periódicamente una solución de control para verificar la estabilidad de la calibración.

37.6. Cálculo y expresión de resultados

La concentración de plomo en la muestra se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:

C = concentración de plomo en la muestra (mg/L)

Cm = concentración obtenida de la curva de calibración (mg/L)

Fd = factor de concentración aplicado durante la preparación de la muestra.
Para este procedimiento: Fc = 20

Los resultados se expresan en mg/L de plomo.

37.7. Observaciones

- Utilizar material previamente descontaminado con ácido nítrico diluido o detergente no iónico y enjuagado abundantemente con agua desionizada.
- Emplear reactivos de elevada pureza para minimizar contaminaciones.
- Ajustar las condiciones de la llama para obtener la máxima sensibilidad.
- Utilizar patrones certificados o materiales de referencia trazables.
- Debido a las bajas concentraciones normalmente presentes en vinos, puede resultar más adecuado utilizar espectrometría de absorción atómica con horno de grafito cuando se requieran límites de detección inferiores.
- Emplear agua bidestilada o desionizada de calidad analítica para el enjuague del material, la preparación de soluciones patrón y todas las diluciones realizadas durante el procedimiento.

37.8. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. *(Recopilación actual). Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-05A. Plomo. OIV.* https://www.oiv.int/

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

38. PLOMO POR AA CON HORNO DE GRAFITO (Pb/AA-HG – INV – 10038)

38.1. Título

Determinación de plomo en vinos por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.
Código: **Pb/AA-HG – INV – 10038**

38.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de plomo en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electro térmica en horno de grafito. Es aplicable a vinos tranquilos y espumosos, permitiendo la determinación de plomo a niveles de trazas. Los resultados se expresan en mg/L de plomo.

38.3. Principio

La determinación se basa en la absorción de la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco de plomo previamente atomizado en un horno de grafito. La muestra se diluye con ácido fosfórico, que actúa como modificador de matriz. La absorbancia se mide a 217 nm y es proporcional a la concentración de plomo presente en la muestra, según la ley de Beer-Lambert.

38.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos

Todos los reactivos deberán ser de calidad analítica reconocida y estar exentos de plomo.
Agua bidestilada o de pureza equivalente.
Ácido fosfórico al 85 %
Solución de ácido fosfórico.
Preparar diluyendo 8 mL de ácido fosfórico al 85 % y aforando a 100 mL con agua bidestilada.
Ácido nítrico concentrado.
Solución patrón certificada de plomo 1000 mg/L.

Alternativamente, preparar una solución madre de 1000 mg/L disolviendo 1,600 g de nitrato de plomo [Pb $(NO_3)_2$] en ácido nítrico al 1 % (V/V) y aforando a 1000 mL con agua bidestilada. Conservar la solución madre en un matraz de vidrio borosilicatado con tapón esmerilado.

Soluciones de calibración de plomo:

- 0,025 mg/L
- 0,050 mg/L
- 0,100 mg/L
- 0,150 mg/L

Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: **217 nm**
- Corrector de fondo: obligatorio
- Atomización: horno de grafito
- Gas de protección: nitrógeno o gas especificado por el fabricante del equipo

38.5. Procedimiento

Porción de prueba

Diluir la muestra de vino con solución de ácido fosfórico en una proporción de 1:2 o 1:3, según la concentración esperada de plomo.

Registrar el factor de dilución aplicado.

Determinación

- Encender el espectrofotómetro y estabilizar el sistema.
- Instalar la lámpara de cátodo hueco de plomo.
- Ajustar la longitud de onda a 217 nm
- Ajustar el cero instrumental utilizando agua bidestilada.
- Inyectar las soluciones patrón y las muestras utilizando micropipeta automática. Inyectar un volumen de 5 µL de cada solución patrón y de cada muestra en el horno de grafito.

- Realizar un mínimo de tres determinaciones independientes para cada solución patrón y muestra.
- Registrar las absorbancias y calcular el valor medio.

Programa orientativo del horno

- Secado: 100 °C durante 30 s
- Mineralización: 900 °C durante 20 s
- Atomización: 2250 °C durante 2–3 s
- Flujo de gas: 6 L/min

Al finalizar la secuencia analítica se recomienda realizar una etapa de limpieza del tubo de grafito a **2700 °C**.

Calibración

- Preparar al menos cuatro puntos de calibración entre 0,025 y 0,150 mg/L.
- Construir la curva absorbancia-concentración.
- Verificar la linealidad de la curva mediante un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0{,}995$.
- Analizar periódicamente una solución de control para verificar la estabilidad de la calibración.

38.6. Cálculo y expresión de resultados

La concentración de plomo en la solución analizada se obtiene a partir de la curva de calibración construida con las soluciones patrón, utilizando el valor medio de absorbancia obtenido para la muestra. La concentración de plomo en la muestra se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:
C = concentración de plomo en la muestra (mg/L)
Cm = concentración obtenida de la curva de calibración (mg/L)
Fd = factor de dilución aplicado a la muestra

Los resultados se expresan en **mg/L de plomo**.

38.7. Observaciones

- Todo el material deberá descontaminarse previamente mediante lavado con ácido nítrico caliente (70–80 °C) y posterior enjuague con agua bidestilada.
- Utilizar material libre de plomo para evitar contaminaciones.
- Emplear patrones certificados o materiales de referencia trazables.
- Verificar periódicamente la integridad del tubo de grafito y el correcto funcionamiento del sistema de corrección de fondo.
- Este procedimiento presenta límites de detección significativamente inferiores a los obtenidos mediante absorción atómica con llama y constituye el método recomendado para la determinación de plomo a niveles de trazas.

38.8. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. *(Recopilación actual). Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-12. Criterios para los métodos de cuantificación de plomo en el vino (Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito). OIV*. https://www.oiv.int/

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

39. ARSÉNICO POR ESPECTROMETRÍA DE AA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS (As/AA- HG MANUAL – INV – 10039)

39.1. Título

Determinación de arsénico en vinos por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros.

Código**: As/AA-HG manual – INV10039**

39.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de arsénico en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros, después de la mineralización sulfo-nítrica de la muestra. Es aplicable a vinos tranquilos y espumosos. Los resultados se expresan en mg/L de arsénico.

39.3. Principio

Después de la mineralización sulfo-nítrica, reducción del arsénico V a arsénico III con yoduro de potasio en medio clorhídrico, el arsénico es transformado en arsina o arsenamina (H_3As) por acción del borohidruro de sodio ($NaBH_4$). La arsina formada es arrastrada por una corriente de nitrógeno, disociada a alta temperatura y determinada cuantitativamente por espectrometría de absorción atómica. La absorbancia medida a 193,7 nm es proporcional a la concentración de arsénico presente en la muestra.

39.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos

Todos los reactivos deben ser de pureza analítica reconocida y, en particular, estar exentos de arsénico.

- Agua bidestilada obtenida en destilador de vidrio borosilicatado o agua de pureza equivalente.
- Ácido sulfúrico (δ20 = 1,84 g/mL), exento de arsénico.
- Ácido nítrico (δ20 = 1,38 g/mL), exento de arsénico.

- Ácido clorhídrico (δ20 = 1,19 g/mL), exento de arsénico.
- Solución de yoduro de potasio al 10 % (p/V)
- Solución de borohidruro de sodio al 2,5 % (p/V), obtenida por disolución de 2,5 g de borohidruro de sodio en 100 mL de solución de hidróxido de sodio al 4 % (p/V). Esta solución debe prepararse en el momento de su utilización.
- Solución patrón certificada de arsénico 1000 mg/L.
- Alternativamente, preparar una solución madre de 1000 mg/L disolviendo 1,320 g de trióxido de arsénico (As_2O_3) en un volumen mínimo de solución de hidróxido de sodio al 20 % (p/V), acidificando con ácido clorhídrico diluido al medio (V/V) y aforando a 1000 mL con agua.
- Soluciones de calibración de arsénico:
    - 1 mg/L
    - 2 mg/L
    - 3 mg/L
    - 4 mg/L
    - 5 mg/L

Materiales y equipos

- Balón tipo Kjeldahl de vidrio borosilicatado.
- Espectrofotómetro de absorción atómica equipado con lámpara de cátodo hueco de arsénico.
- Generador de hidruros.
- Corrector de absorción no específica.
- Registrador multipotenciométrico o sistema de adquisición de datos.
- Frasco reactor para generación de hidruros.
- Agitador magnético.
- Célula de cuarzo calentada a 900 °C.
- Sistema de suministro de nitrógeno.
- El generador de hidruros consta de un frasco reactor unido por un tubo a un sistema de generación de nitrógeno (gas de barrido, caudal = 11 L/min) y por un segundo tubo a una célula de cuarzo que puede ser llevada a una temperatura de 900 °C. El frasco reactor dispone además de una abertura para la introducción del reactivo borohidruro.

Parámetros instrumentales

- Longitud de onda: **193,7 nm**
- Temperatura de atomización en célula de cuarzo: 900 °C.
- Gas de barrido: nitrógeno.
- Caudal de nitrógeno: 11 L/min.

39.5. Procedimiento

Porción de prueba

Tomar 20 mL de vino para realizar la mineralización sulfo-nítrica.

Preparación de la muestra

- Mineralización; Colocar 20 mL de vino en el balón de Kjeldahl, llevar a ebullición y concentrar el volumen aproximadamente a la mitad para eliminar el alcohol.
- Dejar enfriar.
- Agregar 5 mL de ácido sulfúrico y, lentamente, 5 mL de ácido nítrico.
- Llevar a ebullición y, cuando el líquido tienda a tornarse marrón, agregar ácido nítrico gota a gota en cantidad suficiente para aclarar el medio manteniendo una ebullición suave.
- Proseguir el calentamiento hasta la decoloración del medio y la aparición de humos blancos de trióxido de azufre.
- Dejar enfriar, agregar 10 mL de agua destilada, llevar nuevamente a ebullición y mantener hasta la eliminación de vapores nitrosos y la condensación de vapores de trióxido de azufre.
- Dejar enfriar y repetir una segunda vez la misma operación.
- Diluir el residuo sulfúrico con algunos mililitros de agua destilada, transferir cuantitativamente la solución a un matraz aforado de 40 mL, agregar las aguas de enjuague, dejar enfriar y completar a volumen con agua destilada.

Determinación

Preparación de la solución a analizar

- Colocar 10 mL de la solución de mineralización en el frasco reactor del generador de hidruros.
- Agregar 10 mL de ácido clorhídrico y 1,5 mL de solución de yoduro de potasio.
- Conectar el agitador magnético y la corriente de nitrógeno (11 L/min).
- Después de 10 segundos de contacto agregar 5 mL de solución de borohidruro de sodio.
- La arsina generada es arrastrada inmediatamente por la corriente de nitrógeno hacia la célula de cuarzo mantenida a 900 °C, Dónde se produce la atomización del arsénico.

Medición

- Seleccionar la longitud de onda de **193,7 nm**
- Ajustar el cero instrumental utilizando agua bidestilada.
- Realizar las determinaciones por duplicado para muestras y patrones.
- Registrar las absorbancias obtenidas y calcular el valor medio.
- Registrar las absorbancias correspondientes a las soluciones patrón y a la solución de la muestra analizada.

Calibración

- A partir de la solución de referencia de arsénico preparar mediante diluciones sucesivas soluciones patrón con concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L de arsénico.
- Colocar sucesivamente 10 mL de cada solución patrón en el frasco reactor y tratarlas de la misma forma que las muestras.
- Construir la curva de calibración representando absorbancia en función de concentración.
- Verificar la linealidad de la respuesta analítica.

39.6. Cálculo y expresión de resultados

Trazar la curva de las variaciones de absorbancia en función de las concentraciones de arsénico de las soluciones patrón.

La respuesta es lineal dentro del rango de trabajo.

Llevar sobre la recta de calibración el valor promedio de absorbancia de la muestra y obtener la concentración C de arsénico.

Los resultados se expresan en **mg/L de arsénico**.

Cuando corresponda, el resultado final deberá corregirse aplicando el factor de dilución utilizado durante la preparación de la muestra.

39.7. Observaciones

- Todos los reactivos utilizados deberán estar exentos de arsénico.
- Preparar la solución de borohidruro de sodio inmediatamente antes de su utilización.
- Mantener constante el caudal de nitrógeno durante toda la determinación.
- Utilizar material de vidrio cuidadosamente descontaminado para evitar contaminaciones.
- Verificar periódicamente el correcto funcionamiento del generador de hidruros y de la célula de cuarzo.
- Realizar las determinaciones por duplicado.

39.8. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (2009). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS323-01B. Arsénico (Espectrometría de absorción atómica sin llama). OIV.* https://www.oiv.int/public/medias/2577/oiv-ma-as323-01b.pdf

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3.ª ed.). Wiley-VCH.

40. ARSÉNICO POR ESPECTROMETRÍA DE AA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS (As/AA-HG AUT – INV – 10040)

40.1. Título

Determinación de arsénico en vinos por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros automatizada.
Código: **As/AA-HG aut – INV – 10032**

40.2. Alcance

Este procedimiento establece la determinación de arsénico total en vinos mediante espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros y sistema de inyección automatizada. Es aplicable a vinos blancos, tintos, espumosos y vinos especiales, previa eliminación de alcohol y acondicionamiento de la muestra. Los resultados se expresan en µg/L de arsénico en vino.

40.3. Principio

Después de la evaporación del alcohol etílico y la reducción del arsénico pentavalente As (V) a arsénico trivalente As (III) mediante yoduro de potasio en medio ácido clorhídrico, el arsénico es transformado en arsina (AsH_3) por reacción con borohidruro de sodio en un sistema de **generación de hidruros**. La arsina generada (gas) es transportada por un gas inerte (argón o nitrógeno) hacia una celda de cuarzo calentada, Dónde se produce su disociación y atomización. La célula de cuarzo se encuentra ubicada sobre el sistema de calentamiento del atomizador, permitiendo la disociación del hidruro y la atomización del arsénico antes de la medición de la absorción. La absorción atómica se mide a 193,7 nm y es proporcional a la concentración de arsénico presente en la muestra.

40.4. Reactivos y materiales específicos

Reactivos

- Agua desmineralizada ultra pura
- Ácido nítrico 65 % ultra puro
- Ácido clorhídrico concentrado.

- Solución de ácido clorhídrico al 10 % (V/V)
- Yoduro de potasio (KI).
- Solución KI al 10 % (m/V)
- Borohidruro de sodio ($NaBH_4$)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Solución reductora $NaBH_4$ 0,6 % en NaOH 0,5 % (m/V) (preparar al momento de su uso)
- Cloruro de calcio ($CaCl_2$) utilizado como desecante
- Solución madre de arsénico 1 g/L (As_2O_5 en medio adecuado) Puede prepararse disolviendo 1,5339 g de pentóxido de arsénico en agua desmineralizada, ajustar a 1 L.

Alternativamente puede utilizarse una solución patrón certificada. La solución madre puede prepararse disolviendo 1,5339 g de pentóxido de arsénico (As_2O_5) y aforando a 1 L con agua desmineralizada.

Soluciones de calibración

Preparar una solución intermedia de 10 mg/L transfiriendo 1 mL de la solución madre de arsénico 1 g/L a un matraz aforado de 100 mL, agregando aproximadamente 1 % de ácido nítrico y completando a volumen con agua desmineralizada.

Preparar una solución intermedia de 100 µg/L transfiriendo 1 mL de la solución de 10 mg/L a un matraz aforado de 100 mL y completar a volumen con agua desmineralizada.

A partir de la solución de arsénico de 100 µg/L preparar soluciones de calibración de 0, 5, 10 y 25 µg/L.

Para ello transferir respectivamente 0, 5, 10 y 25 mL de la solución de 100 µg/L a matraces aforados de 100 mL.

Agregar a cada matraz:

- 10 mL de solución de KI al 10 %
- 10 mL de ácido clorhídrico concentrado

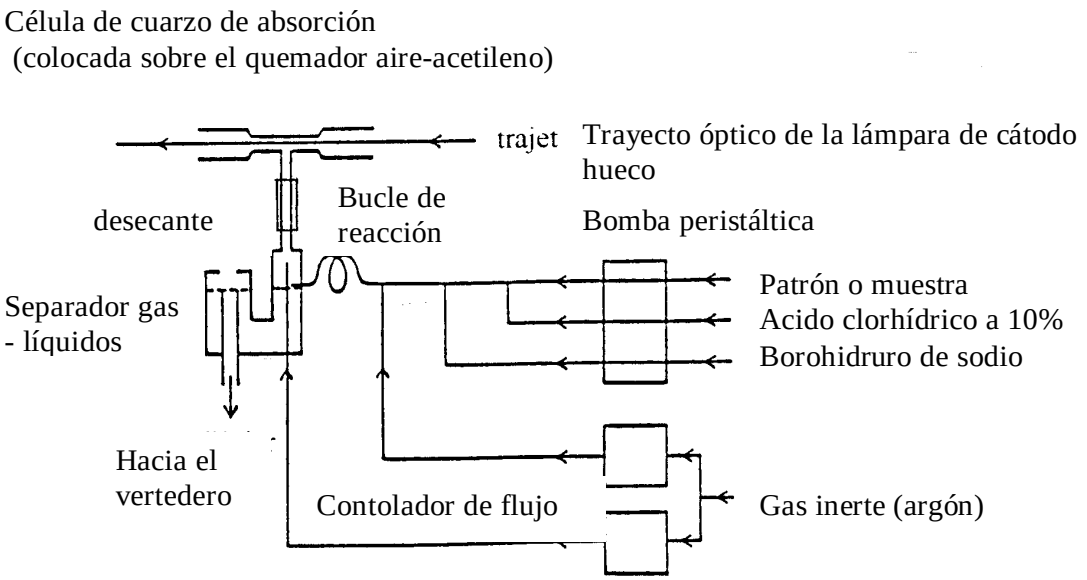
Dejar en reposo durante 1 hora y completar a volumen con agua desmineralizada.

Las soluciones patrón deberán presentar la misma composición química que las muestras analizadas.

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica
- Lámpara de cátodo hueco de arsénico
- Sistema de generación de hidruros automático (HVG).
- Separador gas-líquido o sistema equivalente para la generación y transporte del hidruro hacia la célula de absorción.
- Celda de absorción de hidruros de cuarzo calentada sobre quemador
- Sistema de suministro de gas inerte (argón)
- Corrector de fondo por lámpara de deuterio o equivalente
- Bomba peristáltica
- Matraces aforados Clase A (50 y 100 mL)
- Pipetas Clase A (1 – 5 - 10- y 25 mL)
- Baño de agua a 100 °C
- Filtros sin cenizas
- Corrector de fondo (deuterio o equivalente)

Figura 44.1. *Esquema del sistema de generación de hidruros (HVG) utilizado para la determinación de arsénico por espectrometría de absorción atómica.*



Parámetros instrumentales orientativos

- Longitud de onda: **193,7 nm**
- Ancho de rendija: 1,0 nm
- Corriente de lámpara: 7 mA.
- Corrección de fondo: lámpara de deuterio o equivalente.
- Gas de arrastre: argón.

40.5. Preparación de la muestra

1. Tomar 25 mL de vino.
2. Evaporar en baño de agua a 100 °C hasta reducir volumen. La evaporación deberá realizarse hasta la eliminación del alcohol etílico presente en la muestra.
3. Transferir a matraz aforado de 50 mL.
4. Agregar 5 mL de KI 10 % y 5 mL de HCl concentrado.
5. Dejar en reposo 1 hora para asegurar reducción cuantitativa de As (V) → As (III).
6. Completar a volumen con agua desmineralizada.
7. Filtrar sobre filtro sin cenizas.
8. Preparar un blanco analítico en paralelo utilizando los mismos reactivos.

40.6. Procedimiento

Determinación

1. Encender y estabilizar el espectrofotómetro y el sistema de generación de hidruros.
2. Ajustar la longitud de onda a 193,7 nm Medir la absorbancia durante aproximadamente 10 s
3. Analizar el blanco analítico.
4. Introducir sucesivamente las soluciones patrón para construir la curva de calibración.
5. La bomba peristáltica aspirará simultáneamente:
    - solución patrón o muestra
    - ácido clorhídrico al 10 %
    - solución reductora de $NaBH_4$
6. Se genera arsina (AsH_3) en el reactor de hidruros.
7. Transportar la arsina mediante gas inerte hacia la celda de cuarzo calentada.

8. Medir la absorbancia durante aproximadamente 10 segundos.
9. Realizar al menos dos determinaciones independientes por muestra.

Calibración

- Construir la curva de calibración inyectando los estándares patrón de 0, 5, 10 y 25 µg/L.
- Construir curva de absorbancia en función de la concentración de arsénico.
- Verificar la linealidad de la respuesta instrumental. Cuando el equipo disponga de software de adquisición y procesamiento automático, la curva de calibración podrá ser establecida mediante el programa instrumental correspondiente.

40.7. Cálculo y expresión de resultados

El equipo proporciona la concentración de arsénico en µg/L correspondiente a la solución analizada mediante interpolación en la curva de calibración.

La concentración de arsénico en el vino se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:

C = concentración de arsénico en la muestra (µg/L)

Cm = concentración medida obtenida de la curva de calibración (µg/L)

Fd = factor de dilución total aplicada a la muestra. En las condiciones del método, la preparación de muestra implica habitualmente un factor de dilución Fd = 2.

Los resultados se expresan en **(µg/L) de arsénico**.

40.8. Control de calidad

- Analizar un blanco analítico en cada serie.
- Incorporar una muestra de control interno cada cinco muestras analizadas. Como alternativa, podrá analizarse una muestra de control después de la curva de calibración, una muestra durante la mitad de la secuencia analítica y una muestra al finalizar la serie de determinaciones.
- Verificar el desempeño del sistema al inicio, mitad y final de la secuencia analítica.

- Aceptar los resultados cuando el valor obtenido para el material de control se encuentre dentro de ±2 desviaciones estándar respecto del valor asignado.
- Utilizar preferentemente materiales de referencia certificados o vinos de referencia apropiados (blanco, tinto, dulce)

40.9. Observaciones

- Todos los reactivos empleados deberán estar libres de contaminación por arsénico.
- El KI debe asegurar reducción completa As (V) → As (III). La reducción de As (V) a As (III) es indispensable para lograr una generación cuantitativa de hidruros.
- El sistema HVG debe ser estable en caudal de gas y flujo de Borohidruro;
- Preparar diariamente la solución de Borohidruro de sodio.
- Mantener constante los caudales de gas y las condiciones de generación de hidruros durante toda la serie analítica.
- Evitar contaminación proveniente del material de vidrio o de los reactivos ácidos.

40.10. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (2002). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Resolución OENO 14/2002. Determinación de arsénico en el vino por generación de hidruros y espectrometría de absorción atómica*. OIV. https://www.oiv.int/

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3.ª ed.). Wiley-VCH.

41. CADMIO POR ESPECTROMETRÍA DE AA EN HORNO DE GRAFITO (Cd/AA-HG – INV – 10041)

41.1. Título

Determinación de cadmio en vinos por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito.
Código: **Cd/AA-HG – INV – 10041**

41.2. Alcance

Este método permite la determinación de cadmio en vinos mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Es aplicable a vinos tintos, blancos y espumosos, con resultados expresados en µg/L de cadmio en el vino. La determinación se realiza directamente sobre la muestra de vino previamente diluida con solución de ácido fosfórico, sin mineralización previa.

41.3. Principio

El cadmio presente en la muestra se atomiza directamente en un horno de grafito. El espectrofotómetro mide la absorbancia de los átomos de cadmio a 228,8 nm La absorbancia obtenida se correlaciona con la concentración de cadmio en la muestra mediante una curva de calibración construida con soluciones patrón conocidas. El cadmio presente en la muestra es determinado directamente por espectrometría de absorción atómica con atomización electro térmica en horno de grafito, sin utilización de llama.

41.4. Materiales y equipos

- Espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito
- Lámpara de cadmio de cátodo hueco
- Corrector de absorción no específica
- Registrador multipotenciométrico
- Micropipetas de 5 mL con puntas desechables
- Material de vidrio lavable con ácido nítrico concentrado y enjuagado con agua bidestilada

Todo el material de vidrio deberá lavarse previamente con ácido nítrico concentrado caliente (70–80 °C) y enjuagarse posteriormente con agua bidestilada.

La micropipeta deberá utilizar puntas desechables aptas para mediciones por espectrometría de absorción atómica.

41.5. Reactivos

- Agua bidestilada de alta pureza
- Ácido fosfórico 85 % y solución diluida al 8 % para dilución de la muestra. Solución de ácido fosfórico obtenida por dilución de 8 mL de ácido fosfórico al 85 % y aforo a 100 mL con agua bidestilada.
- Sulfato de cadmio $CdSO_4 \cdot 8H_2O$
- EDTA 0,02 M
- Solución buffer pH 9: Disolver 5,4 g cloruro de amonio en agua en un matraz de 100 mL, agregar 35 mL de hidróxido de amonio al 25 % (V/V) y completar a volumen con agua
- Negro Eriochrome T 1 % (m/m) en NaCl. La concentración del sulfato de cadmio utilizado para preparar la solución patrón deberá verificarse mediante titulación con EDTA. Para ello, pesar exactamente 102,6 mg de sulfato de cadmio, disolver con agua bidestilada, agregar 5 mL de solución buffer pH 9 y aproximadamente 20 mg de Negro Eriochrome T. Titular con EDTA hasta viraje del indicador al azul. El volumen de EDTA consumido deberá ser aproximadamente 20 mL.
- Solución patrón de cadmio 1 g/L (preparada disolviendo 2,2820 g de $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ en 1 L de agua bidestilada)
- Soluciones patrón para calibración: 2,5; 5; 10; 15 µg/L

Nota: Todos los reactivos deben estar exentos de cadmio.

41.6. Preparación de la muestra

Diluir el vino a 1:2 con solución de ácido fosfórico diluido.

Preparar las soluciones de calibración. A partir de la solución patrón de cadmio de 1g/L preparar por diluciones sucesivas con agua bidestilada las soluciones patrón que contengan respectivamente 2,5; 5; 10 y 15 µg/L de cadmio.

41.7. Procedimiento

Horno de grafito (programa sugerido)

Etapa	Temperatura	Tiempo
Secado	100 °C	30 s
Mineralización	900 °C	20 s
Atomización	2250 °C	2–3 s

- Flujo de nitrógeno: 6 L/min
- Purga final: 2700 °C

Medida

1. Ajustar el cero del espectrofotómetro con agua bidestilada.
2. Inyectar en el horno previamente programado, mediante micropipeta, tres veces 5 mL de cada solución patrón y de la muestra a analizar. Registrar las absorbancias obtenidas y calcular el valor medio correspondiente a las tres inyecciones.
3. Registrar las absorbancias y calcular la media de las tres inyecciones.
4. Seleccionar la longitud de onda de 228,8 nm y ajustar el cero de absorbancia utilizando agua bidestilada.

41.8. Cálculo y expresión de resultados

1. Construir la curva absorbancia vs concentración de cadmio de las soluciones patrón.
2. Determinar la absorbancia media de la muestra y proyectarla sobre la curva.
3. Calcular la concentración de cadmio en la muestra (µg/L):

El equipo proporciona la concentración de cadmio en µg/L correspondiente a la solución analizada mediante interpolación en la curva de calibración.

La concentración de cadmio en el vino se calcula mediante:

$$C = Cm \cdot Fd$$

Dónde:
C = concentración de cadmio en la muestra (µg/L)
Cm = concentración medida obtenida de la curva de calibración (µg/L)
Fd = factor de dilución total aplicada a la muestra.

La variación de absorbancia en función de la concentración de cadmio presenta comportamiento lineal dentro del rango de trabajo.
El factor de dilución aplicado corresponde a la dilución efectuada durante la preparación de la muestra.

Los resultados se expresan en (µg/L) de cadmio.

41.9. Control de calidad

- Verificar linealidad de la curva y reproducibilidad de inyecciones triplicadas.
- Utilizar patrones de reconocida calidad.
- Registrar todos los controles y desviaciones.

41.10. Bibliografía

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (2009). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos: Método OIV-MA-AS322-10. Cadmio (Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito)*. OIV. https://www.oiv.int/

Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry* (3ª ed.). Wiley-VCH.

Tabla 28. *Resumen de especificaciones operativas para la determinación de macroelementos, microelementos y elementos traza, mediante espectrometría de absorción atómica*

Metal	Tipo	Técnica	Preparación de muestra	Tratamiento previo	Longitud de onda (nm)	Principales interferencias	Observaciones
Na	Macroelemento	AA llama (aire-acetileno)	Dilución 1:100	Acidificación leve con HNO3	589	Ionización (K, matriz)	Requiere Cs (tampón de ionización)
K	Macroelemento	AA llama (aire-acetileno)	Dilución (ajuste rango)	Acidificación leve con HNO3	769.9	Ionización	Menor interferencia que Na
Ca	Macroelemento	AA llama (óxido nitroso-acetileno o aire-acetileno + La)	Dilución 1:100 o mayor	Posible adición de La (lantano)	422.7	Interferencias químicas/fosfatos	Alternativa llama aire si no hay N2O
Mg	Macroelemento	AA llama (aire-acetileno)	Dilución ≥1:100	Acidificación leve	Hasta 285	Interferencias de matriz	Puede saturar fácilmente → diluir más
Fe	Microelemento	AA llama (aire-acetileno)	Cenizas (mineralización previa) o dil directa	Oxidación / digestión parcial	248.3	Efecto matriz / complejación	A veces requiere calcinación
Cu	Microelemento	AA llama (aire-acetileno)	Cenizas (o directo según método)	Digestión opcional con HNO3	324.8	Interferencias de matriz	Alta sensibilidad en vino
Zn	Microelemento	AA llama (aire-acetileno)	Cenizas o directo	Acidificación HCl	Hasta 213.9	Interferencias espectrales	Baja concentración típica
Pb	Traza	AA llama (aire-acetileno)	Cenizas (20 mL)	Retoma con HCl 1N	283.3	Interferencias de matriz	Mayor dilución efectiva (x20)
Pb (alternativo)	Traza	GFAAS (horno de grafito)	Dilución 1/2 a 1/3	Acidificación con H3PO4	217 (según método)	Efecto memoria / fondo	Ultra traza (mayor sensibilidad)
As	Traza	HG-AAS (generación de hidruros)	Mineralización sulfo-nítrica	Reducción As(V) → As(III)	193.7	Interferencias químicas	Hidruros + NaBH4

42. ÁCIDO CÍTRICO MÉTODO ENZIMÁTICO (Cítrico/EZ – INV – 10042)

42.1. Título

Determinación de ácido cítrico por método enzimático
Código: **Cítrico/EZ – INV – 10042**

42.2. Introducción

El ácido cítrico presente en el vino actúa como acidificante, aporta frescura y características sensoriales asociadas al sabor cítrico. Asimismo, cumple una función estabilizante, particularmente en la prevención de la quebradura férrica mediante formación de complejos con el hierro.

La determinación enzimática del ácido cítrico permite realizar mediciones específicas y sensibles mediante seguimiento espectrofotométrico de la oxidación del NADH.

42.3. Alcance

Este método establece la determinación cuantitativa de ácido cítrico en vinos mediante método enzimático espectrofotométrico. Es aplicable a vinos y productos de origen vínico compatibles con el método.

42.4. Definiciones

Ácido cítrico: Ácido orgánico tricarboxílico presente naturalmente en vinos y otros productos vitivinícolas.

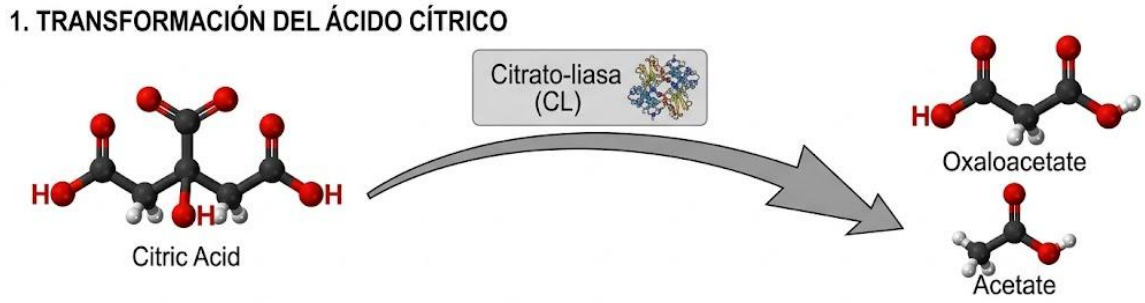
NADH: Dinucleótido reducido de nicotinamida-adenina utilizado como coenzima en las reacciones enzimáticas del método.

ΔA: Diferencia de absorbancia medida antes y después de la reacción enzimática, proporcional a la concentración de ácido cítrico presente en la muestra.

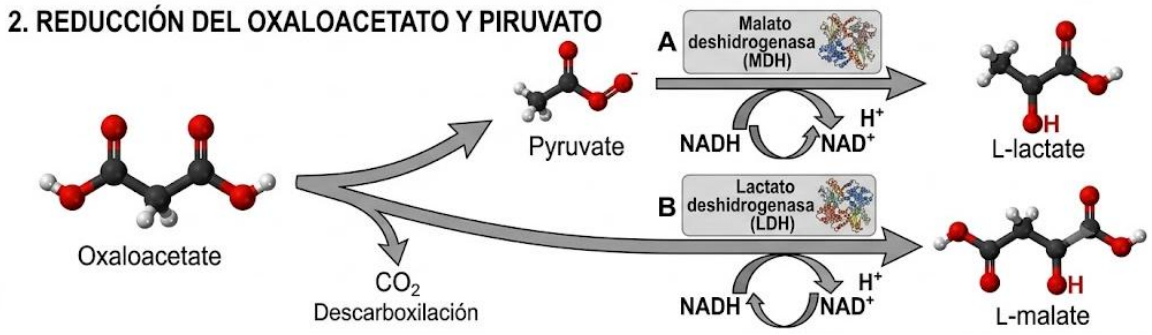
La concentración de ácido cítrico se expresa en miligramos por litro (mg/L).

42.5. Principio

El ácido cítrico es transformado en oxaloacetato y acetato en una reacción catalizada por **citrato-liasa (CL)**.



Posteriormente, en presencia de **malato deshidrogenasa (MDH)** y **lactato deshidrogenasa (LDH)**, el oxaloacetato y el piruvato derivado de su descarboxilación son reducidos a L-malato y L-lactato mediante oxidación simultánea del NADH a NAD^+.



La disminución de absorbancia del NADH a 340 nm, debida a su oxidación a NAD+, es proporcional a la cantidad de ácido cítrico presente en la muestra. El método comprende las siguientes etapas:

- Preparación de reactivos
- Preparación y acondicionamiento de la muestra
- Reacción enzimática
- Medición espectrofotométrica
- Cálculo de diferencias de absorbancia
- Cálculo de concentración de ácido cítrico

42.6. Reactivos y materiales

R1 – Buffer pH 7,8

Composición: Glicilglicina 0,51 M; Zn^{2+} 0,6 • 10^{-3} M
Preparación:

- Disolver 7,13 g de glicilglicina en aproximadamente 70 mL de agua bidestilada.
- Ajustar a pH 7,8 con aproximadamente 13 mL de hidróxido de sodio 5 M.
- Añadir 10 mL de solución de cloruro de zinc (80 mg $ZnCl_2$/100 mL).
- Llevar a 100 mL con agua bidestilada.

Conservación: Estable durante 4 semanas a +4°C.

R2 – Solución de NADH aproximadamente 6 · 10^{-3} M

Preparación: Disolver 30 mg de NADH y 60 mg de NaHCO3 en 6 mL de agua bidestilada.

Conservación: Estable durante 4 semanas a +4°C.

R3 – Solución MDH/LDH (aprox. 6 · 10^{-3} M)

Composición:

- 0,5 g MDH/mL
- 2,5 mg LDH/mL

Preparación:

- Mezclar:
  - 0,1 mL MDH (5 g MDH/mL)
  - 0,4 mL solución de sulfato de amonio 3,2 M
  - 0,5 mL LDH (5 mg/mL)

Conservación: Estable durante un año a +4°C.

R4 – Solución de citrato-liasa (CL)

Preparación: Disolver 168 mg de liofilizado en 1 mL de agua helada.
Conservación: Estable durante una semana a +4°C; Estable durante 4 semanas congelada.

Antes del uso: verificar la actividad enzimática.

R5 – Polivinilpolipirrolidona (PVPP)

Utilizada para tratamiento de vinos tintos ricos en compuestos fenólicos. Deberá cumplir las especificaciones del Codex Enológico Internacional.[12]

42.7. Equipos

- Espectrofotómetro apto para mediciones a 340 nm
- Alternativamente, fotómetro de espectro discontinuo apto para 334 nm o 365 nm
- Cubetas de vidrio/cuarzo o cubetas descartables de 1 cm de trayecto óptico
- Micro pipetas para volúmenes comprendidos entre 0,02 mL y 2 mL
- Erlenmeyer: matraz cónico de 50 mL
- Material de seguridad de laboratorio

El equipo deberá encontrarse calibrado y verificado conforme a procedimientos vigentes del laboratorio.

42.8. Preparación de la muestra

42.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

42.8.2. Preparación de la muestra

La determinación puede realizarse directamente sobre el vino sin decoloración previa ni dilución, siempre que el contenido de ácido cítrico sea < 400 mg/L. Para concentración > 400 mg/L, diluir hasta 20 – 400 mg/L. La cantidad de citrato presente en la porción de prueba deberá encontrarse entre 5 µg y 80 µg de citrato.

42.8.3. Tratamiento de vinos tintos ricos en compuestos fenólicos

Cuando la muestra presente elevada concentración de compuestos fenólicos:

- Suspender aproximadamente 0,2 g de PVPP en agua.

[12] *Nota;* Todos los reactivos necesarios para este ensayo se encuentran disponibles comercialmente mediante kits enzimáticos específicos para determinación de ácido cítrico.

- Dejar reposar durante 15 minutos.
- Filtrar utilizando papel de filtro.

Posteriormente:

- Colocar 10 mL de vino en un matraz de 50 mL.
- Agregar PVPP húmedo tomado del filtro con espátula.
- Agitar durante 2 a 3 minutos.
- Filtrar antes del análisis.

42.9. Procedimiento

42.9.1. Porción de prueba

Utilizar 0,20 mL de muestra preparada para la determinación.

42.9.2. Determinación(es)

Ajuste del equipo

- Ajustar el espectrofotómetro a 340 nm
- Utilizar cubetas de 1 cm de trayecto óptico.
- Ajustar absorbancia cero respecto al aire (sin cubeta en el trayecto óptico).

Preparación de cubetas: en las cubetas, introducir:

Tabla Nº 42.1 - *Preparación de cubetas: Blanco y Muestra*

Reactivo	Cubeta de referencia	Cubeta de muestra
Solución 3.a	1,00 mL	1,00 mL
Solución 3.b	0,10 mL	0,10 mL
Muestra	—	0,20 mL
Agua bidestilada	2,00 mL	1,80 mL
Suspensión 3.c	0,02 mL	0,02 mL
Mezclar y dejar resposar 5 minutos aproximadamente – Leer las absorbancias de las soluciones blanco (A1) y muestra (A1). Luego agregar:		
Solución 3.d	0,02 mL	0,02 mL
Mezclar; esperar a que finalice la reacción (aproximadamente 5 minutos) y leer las absorbancias de las soluciones blanco (A2) y muestra (A2).		

Síntesis:

Primera lectura

- Mezclar el contenido de las cubetas.
- Esperar aproximadamente 5 minutos.
- Medir las absorbancias del blanco y de la muestra.

Registrar:

- A1 blanco
- A1 muestra

Inicio de reacción enzimática

- Agregar solución 3.d a ambas cubetas.
- Mezclar adecuadamente.

Segunda lectura

- Esperar aproximadamente 5 minutos o hasta finalización de la reacción.
- Medir nuevamente las absorbancias.

Registrar:

- A2 blanco
- A2 muestra

42.9.3. Cálculo de diferencias de absorbancia

Determinar:

- ΔAB = diferencia de absorbancia del blanco
- ΔAM = diferencia de absorbancia de la muestra

Calcular:

ΔAB = A1 blanco − A2 blanco

ΔAM = A1 muestra − A2 muestra

$$\Delta A = \Delta AM - \Delta AB$$

Nota El tiempo requerido para la acción enzimática puede variar según el lote de enzimas utilizado. Se recomienda verificar experimentalmente dicho tiempo para cada lote.

42.9.4. Calibración

El espectrofotómetro deberá verificarse periódicamente conforme a los procedimientos internos del laboratorio.

Se deberá controlar:

- Exactitud de longitud de onda
- Linealidad
- Estado óptico de cubetas
- Actividad de reactivos enzimáticos
- Correcto funcionamiento del sistema de medición

42.10. Cálculo (Resultados)

La concentración de ácido cítrico se calcula mediante:

$$\boldsymbol{C = \frac{V \cdot PM}{\varepsilon \cdot \delta \cdot v} \cdot \Delta A}$$

Dónde:
C = concentración de ácido cítrico (ng/L)
V = volumen final de ensayo (3,14 mL)
v = volumen de muestra (0,2 mL)
PM = masa molecular del ácido cítrico anhidro (192,1 g/mol)
δ = trayectoria óptica de la cubeta (1 cm)
ε = coeficiente de absorción molar del NADH
Considerando: **ε** = 6,3 $mmol^{-1} \cdot 1 \cdot cm^{-1}$
ΔA: diferencia de absorbancia

La concentración de ácido cítrico se expresa en miligramos por litro (mg/L, sin decimales).
Para **medición a 340 nm** la ecuación simplificada es:

$$\boldsymbol{C = 479 \cdot \Delta A \cdot F}$$

Mediciones alternativas

A **334 nm**

$$\mathbf{C} = \mathbf{488} \cdot \mathbf{\Delta A} \cdot \mathbf{F}$$

A **365 nm**

$$\mathbf{C} = \mathbf{887} \cdot \mathbf{\Delta A} \cdot \mathbf{F}$$

Corrección por dilución: Cuando la muestra haya sido diluida durante la preparación, el resultado deberá multiplicarse por el correspondiente factor de dilución **F**.

42.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 377/2009: Method OIV-MA-AS313-09. Citric acid (Enzymatic method) [Resolución OIV/OENO 377/2009: Método OIV-MA-AS313-09. Ácido cítrico (Método enzimático)]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.* https://www.oiv.int/public/medias/2505/oiv-ma-as313-09.pdf

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1996, 22 de abril). *Resolución C. 11/1996: Reglamento General de Análisis - Anexo I, Cap. II: Métodos analíticos oficiales para vinos y mostos (Determinación enzimática de ácido cítrico)*. Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-37704/texto

Boehringer Mannheim. (1989). *Methods of enzymatic and chemical analysis: Technical documentation* [Métodos de análisis enzimático y químico: Documentación técnica]. Boehringer Mannheim GmbH.[13]

[13] La determinación cuantitativa de ácido cítrico en vinos mediante la secuencia de reacciones enzimáticas con citrato-liasa (CL), malato-deshidrogenasa (MDH) y lactato-deshidrogenasa (LDH) se fundamenta en las especificaciones descritas en las guías operativas de Boehringer Mannheim (1989). Esta metodología se encuentra estandarizada internacionalmente bajo el Método OIV-MA-AS313-09 de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2009) y aprobada a nivel nacional por el Instituto Nacional de Vitivinicultura dentro del Reglamento General de Análisis (INV, 1996).

43. DIGLUCÓSIDO DE MALVIDINA POR FLUORESCENCIA VISUAL BAJO LÁMPARA UV (Malvidina/UV – INV – 10043) – Método cualitativo

43.1. Título

Determinación cualitativa de diglucósido de malvidina en vinos por fluorescencia visual bajo lámpara UV.

Código: **Malvidina/UV – INV – 10043**

43.2. Introducción

La determinación del diglucósido de malvidina constituye un método práctico para diferenciar vinos tintos elaborados con *Vitis vinifera* de aquellos obtenidos a partir de vides híbridas. La presencia de diglucósido de malvidina se asocia principalmente a variedades híbridas[14], el uso de estas variedades en la elaboración de vinos se encuentra restringido debido a la menor calidad enológica de los productos obtenidos.

43.3. Alcance

Este método establece la ***determinación cualitativa*** del diglucósido de malvidina en vinos tintos y rosados mediante reacción química con observación de *fluorescencia bajo luz ultravioleta*. El método permite detectar la presencia/ausencia de diglucósido de malvidina y establecer, cuando corresponda, la necesidad de realizar una determinación cuantitativa posterior.

43.4. Definiciones

El *diglucósido de malvidina* es un compuesto antociánico característico de ciertas variedades híbridas de vid. La presencia de fluorescencia verde en las condiciones establecidas por el método indica la posible presencia del compuesto en la muestra analizada.

43.5. Principio

[14] A diferencia de las variedades tradicionales como Malbec, Cabernet Sauvignon o Chardonnay—que pertenecen exclusivamente a la especie euroasiática ***Vitis vinifera***—, las **variedades híbridos** combinan genes de *Vitis vinifera* con los de **especies americanas** (como *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* o *Vitis berlandieri*) o, en casos más modernos, especies asiáticas (como *Vitis amurensis*).

El diglucósido de malvidina es oxidado con ácido nitroso y transformado en una sustancia que presenta fluorescencia verde en medio amoniacal bajo luz ultravioleta. La intensidad de fluorescencia observada se compara con la de un vino testigo que contiene 15 mg/L de diglucósido de malvidina. Los vinos que no presentan fluorescencia, o cuya fluorescencia es claramente inferior a la del vino testigo, se consideran carentes de diglucósido de malvidina.

43.6. Reactivos y materiales

43.6.1. Reactivos

R1 – Solución de etanal

R2 – Paraldehído cristalizable

- 10 mL de paraldehído cristalizable.
- 100 mL de alcohol etílico 96,0 % (V/V)

R3 – Ácido clorhídrico 1 N

R4 – Solución de nitrito sódico 10 g/L

R5 – Alcohol etílico 96,0 % (V/V) con 5 % de amoníaco puro

R6 – Vino testigo con 15 mg/L de diglucósido de malvidina

43.6.2. Materiales

- Tubos de ensayo.
- Papel de filtro.
- Embudos.
- Varilla de vidrio.

43.7. Equipo

Lámpara UV de mesada o cabina de visualización de luz ultravioleta de 365 nm

43.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

43.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

43.8.2. Preparación de la muestra

La muestra no requiere preparación previa específica.

43.9. Procedimiento

43.9.1. Porción de prueba

Tomar 10 mL de vino para la preparación inicial del ensayo.

43.9.2. Determinación(es)

Tratamiento inicial

En un tubo de ensayo colocar:

- 10 mL de vino.
- 1,5 mL de solución de etanal.

Esperar 20 minutos.

Desarrollo de la reacción

En un tubo de ensayo de 20 mL de capacidad colocar:

- 1 mL de vino tratado con etanal.
- 1 gota de ácido clorhídrico 1 N.
- 1 mL de solución de nitrito sódico.

Agitar y dejar reposar entre 2 y 5 minutos.

Agregar: 10 mL de solución de amoníaco al 5 % en alcohol.

Ensayo testigo

Tratar en las mismas condiciones 10 mL del vino testigo que contiene 15 mg/L de diglucósido de malvidina. Agitar y dejar reposar durante 10 minutos.

Filtrar.

Observación de fluorescencia

Observar comparativamente la fluorescencia verde bajo luz ultravioleta de 365 nm correspondiente:

- A la muestra analizada.
- Al vino testigo.

Vinos rosados

Para vinos rosados se podrá aumentar la sensibilidad utilizando:

- 5 mL de vino tratado con etanal.
- 0,2 mL de ácido clorhídrico 1 N.
- 1 mL de solución de nitrito sódico.
- 5,8 mL de alcohol amoniacal.

Simultáneamente se deberá operar con el vino testigo.

43.9.3. Interpretación

Los vinos que no presenten fluorescencia, o cuya fluorescencia sea claramente inferior a la del vino testigo, se consideran carentes de diglucósido de malvidina.

En los casos en que la fluorescencia sea ligeramente inferior, igual o superior a la del vino testigo, deberá efectuarse una determinación cuantitativa.

43.9.4. Calibración (cuando corresponda)

La comparación visual deberá realizarse utilizando un vino testigo con concentración conocida de 15 mg/L de diglucósido de malvidina.

El vino testigo deberá analizarse simultáneamente con las muestras y bajo las mismas condiciones experimentales.

43.10. Expresión de resultados

El resultado se informa mediante comparación visual de la fluorescencia observada respecto del vino testigo.

Ausencia de fluorescencia o fluorescencia claramente inferior a la del vino testigo: muestra considerada carente de diglucósido de malvidina.

Fluorescencia ligeramente inferior, igual o superior a la del vino testigo: se deberá efectuar una determinación cuantitativa complementaria.

Cuando se realice la determinación cuantitativa posterior, los resultados se expresarán en miligramos por litro (mg/L) de diglucósido de malvidina.

43.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Method OIV-MA-AS315-03: Malvidin diglucoside* [Método OIV-MA-AS315-03: Diglucósido de malvidina]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. *https://www.oiv.int/es/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-5-other-organic-compounds/malvidin-diglucoside-%28type-iv%29*

44. DIGLUCÓSIDO DE MALVIDINA POR FLUOROMETRÍA (Malvidina/Fluorimetría – INV – 10044)

44.1. Título

Determinación cuantitativa de diglucósido de malvidina en vinos por fluorimetría.

Código: **Malvidina/Fluorimetría – INV – 10044**

44.2. Introducción

La determinación fluorimétrica del diglucósido de malvidina permite **cuantificar** este compuesto presente en vinos elaborados a partir de determinadas variedades híbridas de vid. El método se basa en la medición instrumental de la fluorescencia desarrollada por el compuesto formado durante la reacción química específica.

44.3. Alcance

Este método establece la determinación cuantitativa del diglucósido de malvidina en vinos tintos y rosados mediante fluorimetría. El método es aplicable a vinos previamente tratados según el procedimiento establecido para la determinación cualitativa.

44.4. Definiciones

El diglucósido de malvidina es un compuesto antociánico característico de determinadas variedades híbridas de vid. La fluorescencia desarrollada por el compuesto derivado de la reacción permite realizar su determinación cuantitativa mediante comparación con una solución patrón de sulfato de quinina.

44.5. Principio

La intensidad de fluorescencia del compuesto formado se mide comparándola con una solución valorada de sulfato de quinina cuya fluorescencia ha sido previamente calibrada respecto del diglucósido de malvidina puro. El anhídrido sulfuroso libre, que atenúa la fluorescencia, debe combinarse previamente mediante tratamiento con exceso de etanal.

44.6. Reactivos

Utilizar los reactivos indicados en la determinación cualitativa.

R1 – Solución de sulfato de quinina 2 mg/L

Preparación:

- Disolver 10 mg de sulfato de quinina puro en 100 mL de ácido sulfúrico 0,1 N (0,05 M).
- Tomar 20 mL de esta solución y diluir hasta 1 litro con solución de ácido sulfúrico 0,1 N (0,05 M).

44.7. Aparatos

- Fluorímetro.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor.

El equipo deberá operar con:

- Longitud de onda de excitación: 365 nm
- Longitud de onda de emisión fluorescente: 490 nm

44.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

44.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

44.8.2. Preparación de la muestra

La muestra deberá tratarse previamente según el procedimiento descrito para la determinación cualitativa de diglucósido de malvidina.

44.9. Procedimiento

44.9.1. Porción de prueba

La toma del vino tratado con etanal deberá ser de:

- 1 mL para vinos tintos.
- 1 mL para vinos rosados.

44.9.2. Determinación(es)

Proceder con el vino, siguiendo el método descrito en "Determinación cualitativa", la toma de muestra del vino tratado con etanal, debe ser siempre (vinos tintos o rosados) de 1 mL.

Colocar la solución de sulfato de quinina de 2 mg/L en la cubeta de cuarzo del fluorímetro.

Calibrar el fluorímetro a desviación total (transmisión 100 por 100), ajustando:

- La anchura de banda.
- La sensibilidad del equipo.

Reemplazar luego la cubeta patrón por la cubeta que contiene la muestra de vino tratada.

Registrar el valor leído, identificado como:

- T = intensidad de fluorescencia observada.

44.9.3. Calibración (cuando corresponda)

Colocar la solución patrón de sulfato de quinina de 2 mg/L en la cubeta del fluorímetro y ajustar el equipo a desviación total (transmisión 100 %), actuando sobre la anchura de banda o sobre la sensibilidad del instrumento, según corresponda.

La verificación deberá realizarse antes de cada serie de determinaciones.

44.10. Cálculo y expresión de los resultados

44.10.1. Cálculo

Una intensidad de fluorescencia igual a 1 corresponde, para un vino exento de dióxido sulfuroso libre (SO_2) y en las condiciones establecidas por el método, excluyendo el tratamiento con etanal, a 0,426 mg/L de diglucósido de malvidina.

Los vinos tintos y rosados que no contienen diglucósido de malvidina pueden presentar una fluorescencia residual correspondiente a un valor de T del orden del 6 %

La concentración de diglucósido de malvidina se calcula mediante:

Diglucósido de malvidina (mg/L):

$$(\boldsymbol{T-6})\cdot\mathbf{0,426}\cdot\frac{\mathbf{11,5}}{\mathbf{10}}=(\boldsymbol{T-6})\cdot\mathbf{0,49}$$

Dónde:

T = intensidad de fluorescencia observada.

44.10.2. Expresión de resultados

Los resultados se expresan en miligramos por litro (mg/L) de diglucósido de malvidina, redondeados según los criterios establecidos por el laboratorio.

44.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Method OIV-MA-AS315-03: Malvidin diglucoside* [Método OIV-MA-AS315-03: Diglucósido de malvidina]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. *https://www.oiv.int/es/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-5-other-organic-compounds/malvidin-diglucoside-%28type-iv%29*

45. SACAROSA (SAC – INV – 10045)

45.1. Título

Determinación de sacarosa en vinos y mostos por hidrólisis ácida y titulación con licor de Fehling

Código: **SAC – INV – 10045**

45.2. Introducción

La determinación de sacarosa constituye un parámetro de interés analítico en vinos, mostos y productos vitivinícolas. Permite evaluar la composición de azúcares y detectar la presencia de azúcares adicionados o remanentes.

El método se basa en la hidrólisis ácida de la sacarosa y posterior determinación de los azúcares reductores generados.

45.3. Alcance

El presente método establece la determinación de sacarosa en vinos y mostos mediante hidrólisis ácida controlada y posterior cuantificación de azúcares reductores por titulación con licor de Fehling Causse Bonnans.

Es aplicable al control de vinos, mostos y productos vitivinícolas, tanto en análisis de rutina como en controles oficiales.

45.4. Definiciones

Sacarosa: disacárido constituido por glucosa y fructosa, susceptible de hidrólisis ácida para generar azúcares reductores. La unidad de expresión es g/L.

Azúcares reductores totales: concentración de azúcares reductores determinada luego de la hidrólisis de la sacarosa presente en la muestra.

45.5. Principio

El método se basa en la hidrólisis de la sacarosa presente en la muestra mediante la acción del ácido clorhídrico concentrado a temperatura controlada de 60 °C, utilizando baño María.

La hidrólisis produce glucosa y fructosa, las cuales son posteriormente cuantificadas mediante titulación con licor de Fehling.

La determinación de azúcares reductores se fundamenta en la capacidad reductora de los azúcares sobre los iones cúpricos presentes en el reactivo cuproalcalino, produciendo la reducción de cobre (II) a cobre (I) en medio alcalino.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Determinación de azúcares reductores sin inversión
- Hidrólisis ácida de la sacarosa
- Neutralización y corrección por dilución
- Determinación de azúcares reductores totales
- Cálculo de sacarosa

45.6. Reactivos y materiales

45.6.1. Reactivos

R1 – Ácido clorhídrico concentrado
R2 – Hidróxido de sodio al 20 %
R3 – Acetato de plomo al 25 %
R4 – Carbón activado
R5 – Solución de azul de metileno al 1 %
R6 – Reactivo Fehling Causse Bonnans

45.6.2. Materiales

- Dos probetas de 100 mL
- Probeta de 100 mL o vaso de precipitados de 100 mL
- Dos embudos
- Dos vasos de precipitados de 100 mL o dos tubos de 25 × 250 mm
- Papel de filtro para azúcares 58 × 58, poro medio
- Bureta acodada de 25 mL graduada 0,1 mL, incolora

- Erlenmeyer de 250 mL
- Pipeta de doble aforo de 15 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Propipeta

45.7. Aparatos

- Baño María termostatizado
- Potenciómetro

45.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

45.8.1. Muestra

La muestra debe encontrarse a temperatura ambiente antes del análisis. Tomar directamente del envase original y homogeneizar previamente si fuese necesario.

45.8.2. Conservación

Conservar en recipiente herméticamente cerrado hasta el momento del análisis.

45.9. Procedimiento

45.9.1. Porción de prueba

Este procedimiento se divide en dos partes**:**
A) Determinación de azúcares reductores sin inversión.
B) Determinación de azúcares reductores totales luego de la inversión ácida de la sacarosa

Se emplean alícuotas de 90 mL de muestra para la determinación de azúcares reductores antes y después de la hidrólisis ácida.

45.9.2. Determinación de azúcares reductores sin inversión

- Tomar una alícuota de la muestra de vino o mosto.
- Realizar la defecación agregando 10 mL de acetato de plomo y carbón activado a 90 mL de muestra.
- Filtrar hasta obtener una solución límpida e incolora.
- Determinar los azúcares reductores mediante titulación con licor de Fehling.

- Registrar la lectura polarimétrica de la muestra sin invertir, cuando corresponda.

45.9.3. Determinación de azúcares reductores totales (con inversión ácida)

Preparación para hidrólisis

- Medir el pH utilizando un potenciómetro y registrar el valor obtenido.
- Colocar 90 mL de muestra en una probeta de 100 mL.
- Agregar 3 mL de ácido clorhídrico concentrado utilizando pipeta graduada con propipeta.
- Homogeneizar cuidadosamente.

Hidrólisis (inversión)

- Llevar la probeta a baño María termostatizado a 60 °C durante 15 minutos.
- Retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Transferir cuantitativamente el contenido a un vaso de precipitados de 200 mL sin lavar la probeta.
- Ajustar el pH al valor original utilizando solución de hidróxido de sodio, agregando lentamente bajo agitación continua y controlando con potenciómetro.

Corrección por dilución

- Transferir nuevamente el líquido neutralizado a la probeta y medir el volumen final.
- Calcular el porcentaje de dilución generado durante el procedimiento.
- Este porcentaje de dilución deberá considerarse tanto para el cálculo de azúcares reductores totales como para la interpretación de las lecturas polarimétricas.

Ejemplo:

Volumen inicial: 90 mL
Volumen final: 95 mL

Dilución: 5 mL → 5,6 % de error en menos.

La corrección por dilución deberá considerarse en el cálculo final de azúcares reductores totales y en la interpretación de las lecturas polarimétricas.

Defecación de la muestra invertida

- Tomar 90 mL de la muestra invertida.
- Agregar 10 mL de acetato de plomo y carbón activado.
- Filtrar o centrifugar hasta obtener una solución clara.

45.9.4. Determinación de azúcares reductores totales

- Realizar el dosaje mediante titulación con licor de Fehling.
- Aplicar la corrección por dilución al resultado obtenido.

Lectura polarimétrica

- Realizar la medición polarimétrica de la muestra invertida (azúcares totales) cuando corresponda.
- Comparar con la lectura obtenida antes de la inversión.

45.9.5. Calibración

La calibración del método se realiza mediante la estandarización del reactivo de Fehling utilizando solución patrón de azúcar invertido de concentración conocida.

45.10. Cálculo y expresión de los resultados

La sacarosa se calcula mediante las siguientes expresiones:

$$\mathbf{P0 = P1 - P2}$$

Dónde:

- P1 = concentración de azúcares reductores después de la hidrólisis
- P2 = concentración de azúcares reductores antes de la hidrólisis
- P0 = porción de azúcares reductores invertidos

La concentración de sacarosa se calcula mediante:

$$\mathbf{S = 0,95 \cdot P0}$$

Dónde:

S = sacarosa expresada en g/L

0,95 = factor de conversión de glucosa-fructosa en sacarosa. El factor surge de la relación entre el peso molecular de la sacarosa (342,30 g/mol) y el peso molecular correspondiente a los monosacáridos generados por hidrólisis.

1 mol de sacarosa →2 mol de glucosa-fructuosa

El factor surge de la relación entre el peso molecular de la sacarosa y el peso molecular correspondiente a los monosacáridos generados por hidrólisis:

$$\frac{\text{M (sacarosa)}}{2 \cdot \text{M } (hexosa)} = \frac{342{,}30\ g/mol}{2 \cdot 180 \cdot 16\ g/mol} \approx \mathbf{0,95}$$

(Nota que el resultado **0,95** no lleva ninguna unidad porque las unidades de g/mol se cancelan mutuamente).

45.11. Bibliografía

Ley General de Vinos N° 14.878/59.
I.N.V. - R/D.N.Q. May. De 1.938.
I.N.V. Manual de Técnicas Analíticas. Mendoza: I.N.V., 1.972, pp. 21–24.

46. PERFIL DE ANTOCIANOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN UV-VIS (Antocianos/HPLC – INV – 10046)

46.1. Título

Determinación del perfil de antocianos en vinos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR/HPLC) con detección UV-VIS con arreglo de diodos.

Código: **Antocianos/HPLC – INV – 10046**

46.2. Introducción

Los antocianos o antocianinas son pigmentos hidrosolubles presentes principalmente en el hollejo de las uvas tintas y responsables de la coloración de los vinos tintos y rosados. La determinación del perfil de antocianos mediante cromatografía líquida de alta resolución permite caracterizar la composición fenólica de los vinos y constituye una herramienta útil para estudios de autenticidad varietal y control analítico.

46.3. Alcance

Este método establece la determinación del perfil relativo de antocianos en vinos tintos y rosados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR/HPLC) con detección UV-VIS con arreglo de diodos. Las antocianinas se encuentran principalmente en las vacuolas de las células vegetales y, en las uvas tintas, se localizan mayoritariamente en el hollejo.

La separación cromatográfica se realiza mediante columna de fase reversa y elución en gradiente.

46.4. Definiciones

Las antocianinas son pigmentos fenólicos hidrosolubles presentes en tejidos vegetales y responsables de tonalidades rojas, violáceas y azuladas.

En vinos tintos y rosados, los principales antocianos corresponden a derivados monoglucosídicos y acilados de:

- Delfinidina
- Cianidina

- Petunidina
- Peonidina
- Malvidina

El método permite determinar la composición relativa de NUEVE (9) antocianos característicos.

46.5. Principio

Se realiza el análisis directo del vino por cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna de fase reversa y una elución en gradiente compuesta por agua, ácido fórmico y acetonitrilo.

La detección se efectúa a 518 nm mediante detector UV-VIS con arreglo de diodos.

Como resultado, se obtiene la separación de:

- CINCO (5) antocianos no acilados principales (picos 1 a 5 de la Figura 1).
- CUATRO (4) antocianos acilados principales (picos 6 a 9 de la Figura 1).

El método comprende las siguientes etapas:

- Filtración de la muestra.
- Separación cromatográfica.
- Detección UV-VIS.
- Integración de áreas cromatográficas.
- Cálculo de áreas relativas porcentuales.

46.6. Reactivos y materiales

46.6.1. Reactivos

R1 – Ácido fórmico (p.a. 85 %) (CAS 64-18-6)
R2 – Agua tridestilada o calidad superior
R3 – Acetonitrilo, pureza HPLC
R4 – Solvente fase móvil A
Agua/ácido fórmico/acetonitrilo 87:10:3 (V/V/V)

R5 – Solvente fase móvil B

Agua/ácido fórmico/acetonitrilo 40:10:50 (V/V/V)

R6 - Vino de Referencia.

46.6.2. Materiales

- Filtro de Nylon de poro de 0,22 µm x 47 mm de diámetro.
- Probetas de 1000 mL (2).
- Probeta de 50 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Probeta de 500 mL.
- Jeringas descartables de volumen variable.
- Filtros de jeringa de 0,45 µm de nylon o polyvinylidene fluoride (PVDF).
- Frascos de cierre hermético tipo Genna o equivalente.
- Viales de vidrio de 1,5 mL con septa pre-ranurada o equivalente.
- Papel de filtro técnico: velocidad de filtración media-rápida – densidad 60 a 65 g/m².
- Sistema de filtración al vacío Millipore o equivalente.

46.7. Equipos

46.7.1. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (CLAR/HPLC) compuesto por:

- Sistema de bomba a gradiente.
- Detector UV-VIS con arreglo de diodos.
- Rulo (loop) de inyección automática de 100 µl.
- Calefactor u horno que permita calentar una columna a 40 °C.
- Sistema de integración de datos.
- Sistema de desgasificación de solventes (opcional).

46.7.2. Sistema de columnas analíticas

Columna de fase reversa

- Material de la fase estacionaria: esférico ODS.
- Tamaño de poro: 100 Å.
- Largo: 250 mm.
- Diámetro: 4,60 mm.

- Diámetro de partículas: 5 µm.

Pre-columna de fase reversa

- Largo: 4 mm.
- Diámetro interno: 3 mm.
- Material: ODS.

Nota: Las marcas y modelos de las columnas pueden reemplazarse siempre que cumplan con las características dimensionales indicadas.

46.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

46.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

46.8.2. Preparación de la muestra

La muestra de vino tranquilo homogeneizada se toma con jeringas descartables; posteriormente se coloca un filtro de membrana de 0,45 µm.

Las dos primeras porciones de filtrado se utilizan para enjuagar el vial y se descartan. La tercera porción se utiliza para la determinación.

Previo al llenado del vial, éste deberá identificarse con el número de ingreso de muestra asignado.

46.9. Procedimiento

46.9.1. Porción de prueba

Colocar una cantidad suficiente de muestra filtrada en viales aptos para el sistema de autoinyección del equipo (CLAR/HPLC).

46.9.2. Determinación(es)

Condiciones del equipo

Se procede a la colocación de la/s muestra/s en el autoinyector del cromatógrafo (CLAR/HPLC) con los siguientes parámetros de operación:

Tabla 46.1 *Condiciones del equipo*

Parámetro	Condición
Volumen de inyección	20 µl
Flujo	0,8 mL/min
Calentamiento de la columna	40 °C
Tiempo de análisis	45 minutos
Longitud de onda de detección	518 nm

Tabla 46.2 *Gradiente de elución*

Tiempo (min)	Solvente A % (v/v)	Solvente B % (v/v)
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

Separación cromatográfica de antocianinas

La Figura 1 muestra un cromatograma correspondiente a la separación de los NUEVE (9) antocianos característicos determinados mediante este método.

Figura 46.1. *Separación cromatográfica de los nueve (9) antocianos en un vino tinto*

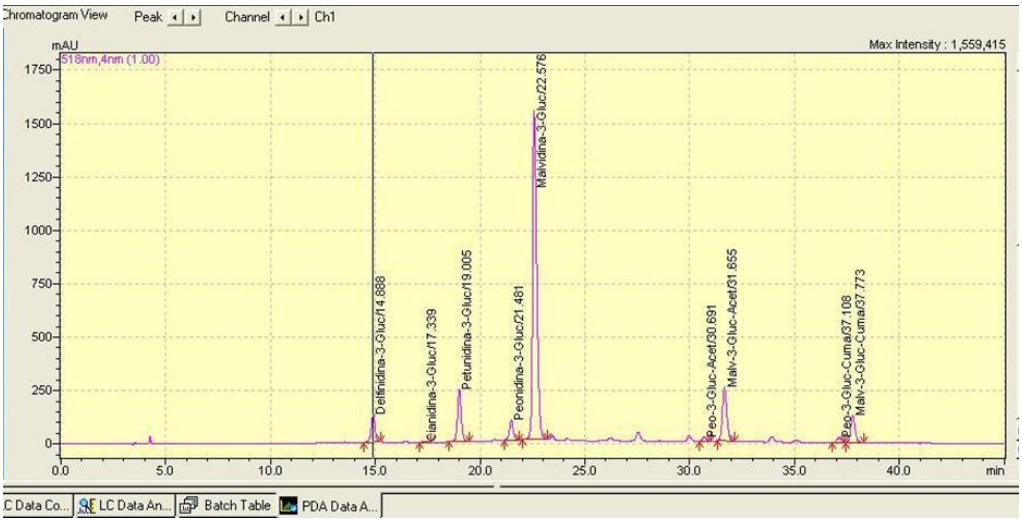


Tabla 46.3. *Identificación de antocianinas y asignación de picos cromatográficos*

Grupo	***Antocianinas***	***Pico N°***
Grupo 1: "antocianos-3-monoglucósidos"	Delfinidina-3-glucósido	1
	Cianidina-3-glucósido	2
	Petunidina-3-glucósido	3
	Peonidina-3-glucósido	4
	Malvidina-3-glucósido	5
Grupo 2: "antocianos-3-monoglucósidos acilados"	Peonidina-3-acetilo glucósido	6
	Malvidina-3-acetilo glucósido	7
Grupo 3: "antocianos-3-monoglucósidos cumarilados"	Peonidina-3-cumarilado glucósido	8
	Malvidina-3-cumarilado glucósido	9

Funcionamiento de los sistemas cromatográficos

a) La **respuesta del sistema cromatográfico** se evalúa a través del control de la eficacia de la columna, verificando el cumplimiento de los siguientes parámetros:

- El **número de platos teóricos (N)** calculado con respecto a la Malvidina-3-glucósido no debe ser menor a 20000.

- La **resolución (R)** entre Peonidina-3-glucósido cumarilado y Malvidina-3-glucósido cumarilado debe ser mayor o igual a 1,5.

Caso contrario, se recomienda reacondicionar la columna y verificar su funcionamiento realizando nuevamente la actividad de control, teniendo como última instancia el cambio de una nueva columna.

b) Además, para verificar la adecuación del sistema cromatográfico respecto a la identificación de cada antociano, se inyecta un vino de referencia cuyos tiempos de retención se comparan con las desviaciones estándares obtenidas de la validación, y se toma como parámetro para asegurar la identidad de cada pico.

Análisis

Las inyecciones para la determinación del Perfil de Antocianos se realizan en el orden que se indica a continuación:

1. Estabilización

2. Muestras a analizar

3. Método de Apagado

Secuencia de inyección

Estabilización

Se deja circular fase móvil durante 45 min empleando el mismo método con el que se analizarán las muestras (mismas condiciones). De esta manera se busca que la línea base del cromatograma sea limpia y no presenta arrastre de otros analitos que hayan quedado atrapados en el sistema, previo a la inyección de muestras.

Vino de Referencia

Inmediatamente después de la estabilización de la línea base

Muestra a analizar

Luego de la inyección del vino de referencia, se agrega la secuencia completa de muestras de vino a analizar.

46.9.3. Calibración (cuando corresponda)

La verificación del sistema cromatográfico deberá realizarse conforme a los procedimientos internos de aseguramiento de la calidad del laboratorio.

Se deberán controlar:

- Respuesta del detector.
- Resolución cromatográfica.
- Estabilidad de línea base.
- Reproducibilidad de tiempos de retención.

46.10. Cálculo (Resultados)

46.10.1. Procesamiento de datos

Una vez concluido el análisis de una muestra, se obtiene el dato del área bajo la curva que tiene cada uno de los picos de antocianos presentes en dicha muestra.

En función de ello, el software que acompaña el equipo permite hacer un cálculo automático del área relativa que le corresponde a cada pico en función del área total (suma de áreas de estos 9 picos). Los datos se obtienen una vez finalizada la corrida cromatográfica y pueden visualizarse en la tabla de picos (“Peak Table”) del software de adquisición e integración. Informar el área porcentual permite al cliente una fácil interpretación de los resultados.

46.10.2. Expresión de resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de área relativa (%) de cada antocianina respecto del área total de antocianos determinados. La expresión de los resultados como porcentaje de área relativa facilita la interpretación comparativa del perfil de antocianos de la muestra analizada.

46.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2006, 23 de octubre). *Resolución C. 23/2006: Oficialízase el método analítico "Determinación por HPLC de nueve antocianos principales en vinos tintos y rosados"*. Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-121424/texto

International Organisation of Vine and Wine. (2003). *Resolution OIV/OENO 22/2003: Method OIV-MA-AS313-11. HPLC-determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine* [R **International Organisation of Vine and Wine. (2003).** *Resolution OIV/OENO 22/2003: Method OIV-MA-AS313-11. HPLC-determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine* [Resolución OIV/OENO 22/2003: Método OIV-MA-AS313-11. Determinación por HPLC de nueve antocianos principales en vinos tintos y rosados]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. https://www.oiv.int/node/3696/download/pdf

International Organization for Standardization. (1994). *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility* (ISO Standard No. 5725-2:1994).

Eder, R., Wendelin, S., y Barna, J. (1990). Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. *Mitt. Klosterneuburg*, *40*, 68-75.

Holbach, B., Marx, R., y Ackermann, M. (1997). Bestimmung der Anthocyanzus ammensetzung van Rotwein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). *Lebensmittelchemie*, *51*, 78-80.

Marx, R., Holbach, B., y Otteneder, H. (s. f.). *Determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC* (OIV, F.V. N.° 11042713/100200).

Mattivi, F., Scienza, A., Failla, O., Vika, P., Anzani, R., Redesco, G., Gianazza, E., y Righetti, P. (1990). Vitis vinifera – a chemotaxonomic approach: Anthocyanins in the skin. *Vitis (Special Issue)*, 119-133.

Otteneder, H., Marx, R., y Olschimke, D. (2001). *Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC* (OIV F.V. N.° 1130).

Roggero, I. P., Larice, I. L., Rocheville-Divorne, C., Archier, P., y Caen, V. (1998). Composition anthocyanique des cépages. *Revue Française d'Oenologie*, *112*, 41-48.

47. ÁCIDO SHIKÍMICO POR CROMATOGRAFÍA LÌQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (Shikímico/HPLC – INV – 10047)

47.1. Título

Determinación de ácido shikímico en vinos por cromatografía líquida deB alta resolución (CLAR/HPLC) con detección UV

Código: **Shikímico/HPLC – INV – 10047**

47.2. Introducción

El ácido shikímico (ácido 3, 4,5-trihidroxiciclohex-1-eno-1-carboxílico) es biosintetizado a partir del ácido químico por deshidratación y constituye un precursor fundamental de fenilalanina, tirosina, triptófano y diversos alcaloides vegetales.

Es un ácido carboxílico minoritario presente naturalmente en distintas frutas y productos vegetales.

El presente método permite la determinación cuantitativa de ácido shikímico en vinos tintos y rosados mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección UV.

47.3. Alcance

Este método establece la determinación y cuantificación de ácido shikímico en vinos tintos y rosados mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR/HPLC) con detección UV.

El método es aplicable en un rango de concentración comprendido entre: 5 mg/L y 100 mg/L.

47.4. Definiciones

Ácido shikímico

Ácido orgánico naturalmente presente en productos vegetales y vinos, precursor metabólico de aminoácidos aromáticos.

CLAR/HPLC

Técnica instrumental de separación cromatográfica basada en la interacción diferencial de los analitos con una fase estacionaria y una fase móvil líquida.

Detector UV

Sistema de detección espectrofotométrica basado en absorción de radiación ultravioleta. La concentración de ácido shikímico se expresa en miligramos por litro (mg/L).

47.5. Principio

El ácido shikímico se determina directamente, sin preparación química previa de la muestra, mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando un sistema de columnas.

En una primera etapa se realiza una separación preliminar de los ácidos orgánicos presentes en el vino sobre una columna de fase reversa tipo ODS.

Posteriormente, la separación continúa en una columna intercambiadora de cationes calentada a 65 °C.

Como fase móvil se utiliza solución de ácido sulfúrico 0,02 N, obteniéndose adecuada resolución del ácido shikímico sin interferencias significativas de la matriz del vino.

Debido a la doble ligadura presente en el ciclohexeno, el ácido shikímico presenta máxima absorción a 210 nm, permitiendo su detección mediante detector UV.

El método comprende las siguientes etapas:

- Preparación de soluciones estándar
- Preparación de fase móvil
- Filtración de muestras
- Separación cromatográfica
- Detección UV
- Construcción de curva de calibración
- Cuantificación por calibración externa

47.6. Reactivos y materiales

47.6.1. Reactivos

R1 – Ácido shikímico

CAS 138-59-0. Pureza: ≥ 99,0 %

El patrón sólido de ácido shikímico deberá conservarse en lugar fresco, seco y ventilado, en envase herméticamente cerrado, conforme a las recomendaciones del fabricante.

R2 – Ácido sulfúrico (H_2SO_4)

Pureza: 98,0 % (g/g) - Calidad P.A.

R3 – Agua tridestilada o calidad superior

R4 – Etanol absoluto

Pureza: ≥ 95 % (V/V)

47.6.2. Materiales

- Matraz aforado de 2000 mL
- Matraz aforado de 1000 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 50 mL
- Pipeta doble aforo de 20 mL
- Pipeta doble aforo de 10 mL
- Pipeta doble aforo de 25 mL
- Pipeta graduada de 5 mL Propipeta
- Filtro de nylon de 0,22 µm × 47 mm
- Jeringas descartables de volumen variable
- Filtros de jeringa de 0,45 µm de nylon o PVDF
- Frasco de cierre hermético tipo Genna o equivalente
- Viales de vidrio de 1,5 mL con septa pre-ranurada
- Papel de filtro técnico de velocidad media-rápida
- Sistema de filtración al vacío Millipore o equivalente

47.7. Equipamiento

- Balanza analítica
- Heladera con rango entre 1 °C y 15 °C

47.7.1. Cromatógrafo líquido de alta resolución (CLAR/HPLC) – El sistema debe incluir:

- Detector UV-VIS con arreglo de diodos
- Loop de inyección automática de 100 µL
- Sistema de bombas con flujo programable y constante
- Horno o calefactor de columna capaz de alcanzar 65 °C
- Sistema de integración de datos

47.7.2. Sistema de columnas analíticas

Columna de fase reversa

- Marca: Phenomenex
- Modelo: Luna 5 µ
- Fase estacionaria: ODS esférico
- Tamaño de poro: 100 Å
- Largo: 250 mm
- Diámetro interno: 4,60 mm
- Tamaño de partícula: 5 µm

Pre-columna de fase reversa

Carcasa:

- Marca: Phenomenex
- Modelo: SecurityGuard / Guard Cartridge Kit

Cartucho:

- Marca: Phenomenex
- Largo: 4 mm
- Diámetro interno: 3 mm
- Material: ODS

Columna intercambiadora de cationes

- Marca: Phenomenex

- Modelo: Rezex Organic Acid H+
- Largo: 300 mm
- Diámetro interno: 7,80 mm

Pre-columna intercambiadora de cationes

- Marca: Phenomenex
- Modelo: Rezex Organic Acid H+
- Largo: 50 mm
- Diámetro interno: 7,80 mm

Nota; Las marcas y modelos podrán reemplazarse por equivalentes que cumplan las características dimensionales indicadas.

47.8. Preparación de la muestra

47.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

47.8.2. Preparación de soluciones

Solución hidroalcohólica al 12,0 % (V/V)

- Medir 31,25 mL de etanol al 96,0 % (V/V)
- Llevar a volumen en probeta de 250 mL con agua tridestilada.

Cuando se utilice etanol de distinta graduación, recalcular el volumen mediante:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Solución primaria estándar de ácido shikímico 100 mg/L

- Pesar 10 mg de ácido shikímico.
- Transferir cuantitativamente a matraz aforado de 100 mL
- Llevar a volumen con solución hidroalcohólica al 12,0 % (V/V)
- Agitar.

Conservar refrigerada e identificada con:

- Contenido
- Concentración
- Fecha de preparación
- Analistas responsables

47.8.3. Preparación de estándares

Estándar 5 mg/L

- Tomar 2,5 mL de solución primaria.
- Llevar a 50 mL con solución hidroalcohólica al 12,0 % (V/V)

Estándar 25 mg/L

- Tomar 12,5 mL de solución primaria.
- Llevar a 50 mL con solución hidroalcohólica al 12,0 % (V/V)

Estándar 50 mg/L

- Tomar 25 mL de solución primaria.
- Llevar a 50 mL con solución hidroalcohólica al 12,0 % (V/V)

Estándar 100 mg/L

Transferir la solución primaria a un recipiente adecuado para su utilización como estándar de calibración.

Todos los estándares deberán conservarse refrigerados e identificados.

47.8.4. Preparación de soluciones

Solución de ácido sulfúrico 1 N

- Colocar aproximadamente 250 mL de agua tridestilada en matraz aforado de 1000 mL.
- Agregar 27,2 mL de ácido sulfúrico 98 %
- Llevar a volumen con agua tridestilada.

Solución de elución H_2SO_2 0,02 N

- Colocar aproximadamente 250 mL de agua tridestilada en matraz aforado de 1000 mL.
- Agregar 20 mL de solución H_2SO_2 1 N.
- Llevar a volumen con agua tridestilada.
- Filtrar mediante filtro de nylon de 0,22 µm.

Conservar refrigerada.

Si se utiliza luego de dos días de preparada, re-filtrar antes de usar.

47.8.5. Preparación de muestras de vino

La determinación se realiza directamente sobre la muestra filtrada, sin derivatización ni tratamiento químico previo.

Vinos tranquilos

- Homogeneizar la muestra.
- Filtrar utilizando jeringa descartable y filtro de membrana de 0,45 µm.
- Descartar las dos primeras porciones de filtrado.
- Utilizar la tercera porción para análisis.
- Identificar previamente el vial.

Vinos con anhídrido carbónico

En vinos espumantes, gasificados o frizantes:

- Desgasificar previamente mediante filtración con papel de filtro.
- Posteriormente realizar filtración de membrana de igual manera que para vinos tranquilos.

47.9. Procedimiento

47.9.1. Porción de prueba

Utilizar la muestra filtrada directamente en el sistema de inyección cromatográfica.

47.9.2. Determinación(es)

Condiciones cromatográficas

- Volumen de inyección: 5 µL
- Flujo: 0,6 mL/min
- Temperatura de columna intercambiadora: 65 °C
- Tiempo mínimo de estabilización inicial: 30 min
- Longitud de onda de detección: 210 nm

Verificación del sistema cromatográfico

La respuesta del sistema cromatográfico deberá verificarse diariamente antes del análisis de muestras y periódicamente según lo establecido en los procedimientos de Aseguramiento de la Calidad.

Detector

- Verificación de linealidad
- Verificación de respuesta

Columnas

- Verificación de resolución

Secuencia de análisis

1. Inyección de estándares
2. Inyección de muestras
3. Equilibración del sistema con fase móvil entre muestras

Luego de cada muestra:

- Mantener circulación de fase móvil durante 30 min sin inyección.

Curva de calibración

Inyectar estándares de:

- 5 mg/L
- 25 mg/L
- 50 mg/L

- 100 mg/L

Construir curva de calibración externa mediante:

- Área de pico versus concentración

El ajuste se realizará por mínimos cuadrados.

El coeficiente de determinación deberá cumplir: **$R^2 \geq 0{,}998$**

Cálculo de concentración

La concentración podrá calcularse automáticamente mediante software HPLC o manualmente utilizando:

$$\boldsymbol{X = (y - b)/a}$$

Dónde:
x = concentración de ácido shikímico (mg/L)
y = área del pico de la muestra
a = pendiente de la curva
b = ordenada al origen

47.9.3. Calibración

La calibración se realiza mediante método de calibración externa utilizando soluciones patrón certificadas.

Se deberá verificar:

- Linealidad
- Resolución cromatográfica
- Respuesta instrumental
- Estabilidad de la curva

47.10. Cálculo (Resultados)

El contenido de ácido shikímico se expresa en: mg/L

El método es aplicable en el rango: 5 mg/L a 100 mg/L

Los resultados deberán expresarse con **dos cifras decimales**

47.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2004). *Resolution OIV/OENO 33/2004: Method OIV-MA-AS313-17. Determination of shikimic acid in wine by HPLC and UV-detection* [Resolución OIV/OENO 33/2004: Método OIV-MA-AS313-17. Determinación de ácido shikímico en vino por HPLC y detección UV]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. https://www.oiv.int/node/2013/download/pdf

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2014, 24 de octubre). *Resolución C. 34/2014: Oficialízase el Método de "Determinación de Ácido Shikímico en Vinos por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento y Detección UV" y su validación*. Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-237307/texto

Wallrauch, S. (1999). *Comparison of HPLC, GC and GC-MS – Determination of shikimic acid in wine* [Comparación de HPLC, GC y GC-MS – Determinación de ácido shikímico en vino]. *Flüssiges Obst*, 66(3), 107–113.[15]

[15] La determinación de ácido shikímico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV a 210\text nm fue evaluada previamente por Wallrauch (1999) y presentada en la 44. ª Sesión de la Subcomisión de Métodos de Análisis (SCMA) de la OIV en marzo de 2004 (FV 1193). Este estudio interlaboratorio dio origen a la adopción oficial del Método OIV-MA-AS313-17 mediante la Resolución OIV/OENO 33/2004 (OIV, 2004). En la Argentina, este método fue incorporado a la normativa de fiscalización oficial del Instituto Nacional de Vitivinicultura a través de la Resolución C. 34/2014.

48. RELACIÓN ISOTÓPICA $^{18}O/^{16}O$ DEL AGUA EN VINOS ($^{18}O/^{16}O$-IRMS – INV – 10048)

48.1. Título

Determinación de la relación isotópica $^{18}O/^{16}O$ del agua en vinos por espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS)

Código: **$^{18}O/^{16}O$-IRMS – INV – 10048**

48.2. Introducción

La composición isotópica del agua en vinos constituye un parámetro relevante para el control de calidad y autenticidad del producto. La determinación de la relación $^{18}O/^{16}O$ permite detectar posibles adulteraciones, como la dilución con agua, y asegura que la procedencia del agua utilizada se corresponde con la región de origen del vino.

48.3. Alcance

El presente método establece la determinación de la relación isotópica $^{18}O/^{16}O$ del agua contenida en vinos y mostos mediante espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS) después del equilibrio isotópico con CO_2. Es aplicable al control de vinos terminados.

48.4. Definiciones

Relación isotópica $^{18}O/^{16}O$: Cociente entre el número de isótopos 18 y 16 del oxígeno de una muestra concreta.

$\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$: Escala relativa usada para expresar la relación isotópica de oxígeno 18 y oxígeno 16 de una muestra concreta. Se calcula con la fórmula siguiente:

$$\boldsymbol{\delta 18OV - SMOW} = \left(\frac{\left(\frac{\mathbf{180}}{\mathbf{160}}\right)\mathbf{muestra} - \left(\frac{\mathbf{180}}{\mathbf{160}}\right)\mathbf{standard}}{\left(\frac{\mathbf{180}}{\mathbf{160}}\right)\mathbf{standard}} \right) \cdot \mathbf{1000}\ (‰)$$

El patrón V-SMOW se toma como referencia para la escala relativa δ. Desviación isotópica expresada en ‰ respecto al estándar internacional V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water). *En este método el valor de $\delta^{18}O$ se obtiene por interpolación y normalización respecto de estándares secundarios de agua y vino previamente calibrados contra V-SMOW, GISP y SLAP*.

BCR Oficina Comunitaria de Referencia

OIEA Organismo Internacional de la Energía Atómica, con sede en Viena (Austria)

IMMR Instituto de Medidas y Materiales de Referencia

IRMS Espectrometría de masas para relaciones de isótopos (Isotope Ratio Mass Spectrometry)

m/z Relación entre masa y carga

NIST Instituto Estadounidense de Patrones y Tecnología (National Institute of Standards & *Technology)*

RM Material de referencia

48.5. Principio

La técnica que se describe a continuación está basada en el equilibrio isotópico que se establece en el agua presente en muestras de vino o mosto mediante un patrón de CO_2, según la siguiente reacción de intercambio isotópico:

$$C^{16}O_2 + H_2\,{}^{18}O \longleftrightarrow C^{16}O^{18}O + H_2\,{}^{16}O$$

Alcanzando el equilibrio el CO_2 de la fase gaseosa se analiza mediante IRMS para determinar el $\delta^{18}O/^{16}O$. La relación isotópica ($^{18}O/^{16}O$) se determina a partir del CO_2 que resulta de la reacción.

El delta isotópico ($\delta^{18}O/^{16}O$) se determina por interpolación respecto de estándares secundarios de agua y vino previamente calibrados contra estándares internacionales.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- Equilibrio isotópico con CO_2

- Transferencia del CO_2 al IRMS mediante flujo continuo
- Medición de intensidades de m/z = 44, 45 y 46
- Cálculo de $\delta^{18}O/^{16}O$ corregido por las contribuciones de $^{12}C^{17}O^{17}O$ y $^{13}C^{17}O^{16}O$

48.6. Reactivos y materiales

R1 – V-SMOW, RM8535: Vienna Standard Mean Ocean Water ($^{18}O/^{16}O$ = 0,0020052)
R2 – GISP, RM8536: Greenland Ice Sheet Precipitation
R3 – SLAP, RM 8537: Standard Light Antarctic Precipitation
R4 – Estándar secundario de agua calibrado contra R1, R2 y R3
R5 – Estándar secundario de vino calibrado contra R1, R2 y R3

Los estándares secundarios de agua y vino se preparan a partir de materiales homogéneos y se calibran frente a V-SMOW, GISP y SLAP. Una vez asignado su valor isotópico, se fraccionan en recipientes identificados y se conservan refrigerados.

R6 – Mezcla de 0,3% de CO_2 en helio (He) certificada.
R8 – Helio carrier, pureza ≥ 99,9 %

48.7. Equipos

- Espectrómetro de masas de relación isotópica (IRMS).
- Sistema de flujo continuo para transferencia de CO_2
- Recipientes con septa para equilibrio de gases.
- Sistema de control de temperatura del IRMS
- El IRMS deberá presentar una precisión interna ≤ 0,06 ‰, definida como la diferencia entre mediciones repetidas de una misma muestra de CO_2.

48.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

48.8.1. Muestra:

Tomar directamente el vino del envase original, evitando alteraciones.

48.8.2. Conservación:

Mantener en condiciones que impidan contaminación o cambios isotópicos.

48.8.3. Preparación:

- Para vinos con CO_2 disuelto (espumantes, gasificados, frizzantes o turbios), desgasificar mediante agitación magnética durante ≥25 minutos.
- Transferir 0,3–0,5 mL de muestra mediante micropipeta a los recipientes del equipo previamente lavados y completamente secos.

48.9. Procedimiento

48.9.1. Porción de prueba

Se emplean 0,3–0,5 mL de muestra de vino o mosto.

48.9.2. Determinación (es)

- Colocar los recipientes con estándares y muestras en la gradilla del equipo según el software.
- Iniciar el proceso automático de FlushFill para equilibrar isotópicamente el CO_2 con el agua de la muestra durante ≥18 h a temperatura controlada.
- Linealización del equipo: Se hacen pruebas de linealidad entre mV44 contra $\delta^{13}C$ y mV44 vs $\delta^{18}O$ para comprobar el estado del IRMS.
- Lectura: Transferir el CO_2 resultante del equilibrio al IRMS y obtener las intensidades de m/z = 44, 45 y 46.
- Se obtienen inicialmente cuatro gráficas de estabilidad interna y posteriormente diez lecturas correspondientes al CO_2 resultante del equilibrio isotópico.
- Cálculo automático del $\delta^{18}O/^{16}O$, aplicando corrección por $^{12}C^{17}O^{16}O$ y $^{12}C^{17}O^{17}O$.

- Verificación de lecturas mediante planilla diaria (FR-03-PO-INV-DRIAV); registrando promedios, desviaciones estándar y valores máximos y mínimos. Aplicar Test de Grubbs para valores atípicos si corresponde. Podrán descartarse hasta tres lecturas por muestra cuando sean identificadas como valores atípicos según el Test de Grubbs.
  - Aceptación del batch: Diferencia entre estándares iniciales y finales ≤ reproducibilidad del método.

48.9.3. Calibración

No aplica.

48.10. Cálculo (Resultados)

- El $\delta^{18}O/^{16}O$ se expresa en ‰ normalizado contra V-SMOW.
- Si la muestra fue diluida, aplicar el factor de corrección correspondiente.
- Expresar resultados con dos cifras decimales.

La normalización del $\delta^{18}O/^{16}O$ se realiza utilizando los estándares secundarios de agua y vino vinculado a la escala internacional V-SMOW mediante la correspondiente planilla de cálculo del laboratorio.

48.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2009). *Resolution OIV/OENO 353/2009: Method OIV-MA-AS2-12. Method for $^{18}O/^{16}O$ isotope ratio determination of water in wines and must*. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. *https://www.oiv.int/public/medias/2479/oiv-ma-as2-12.pdf*

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2014, 17 de febrero). *Resolución C. 2/2014: Oficialízase el método de determinación de la relación isotópica $^{18}O/^{16}O$ del agua contenida en los vinos*. Argentina.gob.ar. *https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-227144/texto*

49. RELACIÓN ISOTÓPICA $^{13}C/^{12}C$ DEL ALCOHOL EN VINOS ($^{13}C/^{12}C$-IRMS – INV – 10049)

49.1. Título

Determinación de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ del alcohol en vinos mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas

Código: **$^{13}C/^{12}C$-IRMS – INV – 10049**

49.2. Introducción

La determinación de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ del etanol presente en vinos y productos derivados de la uva constituye una herramienta analítica de gran utilidad para la evaluación de autenticidad y detección de adulteraciones por incorporación de azúcares exógenos. Esta metodología se basa en que existe una diferencia significativa en el contenido de ^{13}C entre los azúcares de plantas que provienen de los diferentes ciclos fotosintéticos: el tipo C3 (ciclo de Calvin) y el tipo C4 (Hatch-Slack). La mayoría de las plantas, tales como las vides y la remolacha azucarera, pertenecen al grupo C3 mientras que la caña de azúcar y el maíz pertenecen al grupo C4.

Dado que los contenidos de ^{13}C del azúcar y del correspondiente etanol obtenido por fermentación están estrechamente correlacionados, el etanol resultante es una prueba confiable del origen botánico del azúcar original. De este modo, las diferencias naturales en la composición isotópica del carbono permiten identificar la procedencia de los azúcares fermentados. La medición del contenido de ^{13}C del etanol posibilita, entonces, la detección y cuantificación de azúcar proveniente de plantas C4 (como la iso-glucosa del maíz o el azúcar de caña) añadida a los productos de la uva (mostos, vinos, etc.). Asimismo, si esta información del ^{13}C se combina con la obtenida mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de Fraccionamiento Isotópico Natural Específico (SNIF-NMR), también es posible cuantificar la incorporación de mezclas complejas de azúcares de plantas tanto C3 como C4 en el vino.

49.3. Alcance

Este método establece la determinación de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ del etanol extraído de vinos y productos derivados de la uva mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS).

Es aplicable a:

- Vinos
- Mostos fermentados
- Mostos concentrados fermentados
- Mostos concentrados rectificados fermentados
- Otros productos vitivinícolas compatibles con el método

El método se utiliza principalmente para la detección y evaluación de la incorporación de azúcares provenientes de plantas con metabolismo fotosintético C4.

49.4. Definiciones

Relación isotópica $^{13}C/^{12}C$: Relación entre la abundancia de los isótopos estables carbono 13 y carbono 12 presentes en una muestra.

$\delta\ ^{13}C‰$: Desviación isotópica relativa expresada en partes por mil (‰) respecto del estándar internacional Viena Pee Dee Belemnite (V-PDB).

La expresión se calcula según:

$$\boldsymbol{\delta\ 13C}\ ‰ = \left[\left(\frac{\boldsymbol{R\ muestra}}{\boldsymbol{R\ referencia}}\right) - \mathbf{1}\right] \cdot \mathbf{1000}$$

Dónde:

- R muestra = relación $^{13}C/^{12}C$ de la muestra
- R referencia = relación $^{13}C/^{12}C$ del estándar internacional V-PDB

Plantas C3 y C4

Clasificación de plantas según su mecanismo fotosintético:

- Las plantas C3 (vid, remolacha) presentan valores isotópicos más negativos.
- Las plantas C4 (caña de azúcar, maíz) presentan enriquecimiento relativo en **^{13}C**.

49.5. Principio

El método se basa en la diferencia natural de composición isotópica de carbono entre azúcares provenientes de plantas C3 y C4.

El etanol obtenido por fermentación conserva la firma isotópica del azúcar original. Luego de extraer el etanol de la muestra por destilación sin fraccionamiento isotópico, éste se combustiona cuantitativamente para producir dióxido de carbono (CO_2).

El CO_2 generado es introducido en un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS), Dónde se determinan simultáneamente las intensidades correspondientes a las masas:

- m/z 44 ($^{12}C^{16}O^{16}O$)
- m/z = 45 ($^{13}C^{16}O^{16}O$ y $^{12}C^{17}O^{16}O$)
- m/z = 46 ($^{12}C^{16}O^{18}O$, $^{12}C^{17}O^{17}O$ y $^{13}C^{17}O^{16}O$)

Las contribuciones de $^{13}C^{17}O^{16}O$ y $^{12}C^{17}O_2$ pueden despreciarse debido a su muy baja abundancia natural.

La relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ se calcula a partir de dichas señales, aplicando la corrección correspondiente por la contribución isotópica del oxígeno (corrección de Craig).

Los resultados se expresan como δ ^{13}C ‰ respecto del estándar internacional V-PDB.

El método comprende las siguientes etapas:

- Extracción del etanol
- Combustión cuantitativa
- Generación y purificación de CO_2
- Medición isotópica por IRMS
- Corrección instrumental
- Normalización isotópica
- Cálculo y expresión de resultados

49.6. Reactivos y materiales

49.6.1. Reactivos

R1 – Materiales de referencia isotópicos: V-PDB (Vienna Pee Dee Belemnite), BCR-656, BCR-660 o materiales equivalentes certificados.

R2 – Estándar secundario de alcohol de caña: Utilizado como estándar de trabajo y control analítico.

R3 – Estándar secundario de alcohol vínico: Utilizado como estándar de trabajo y control analítico.

Los estándares secundarios deberán calibrarse respecto de materiales certificados internacionales.

El valor de $\delta\ ^{13}C$ asignado a los estándares secundarios de alcohol de caña y alcohol vínico deberá determinarse mediante análisis frente a materiales de referencia certificados internacionales.

R4 – Helio: Gas carrier de pureza mínima 99,999 %

R5 – Oxígeno: Utilizado para la combustión cuantitativa de la muestra.

R6 – Reactivo oxidante: Por ejemplo: Óxido de cobre para microanálisis

R7 – Desecante: Utilizado para eliminación del agua producida durante la combustión. Puede no ser necesario si hay criotrampa o NafionTM.

Podrán emplearse:

Anhidrona para microanálisis

Criotrampas

Sistemas selectivos tipo Nafion TM

49.6.2. Conservación de estándares

Los estándares secundarios deberán fraccionarse en recipientes adecuadamente identificados y conservarse refrigerados.

49.7. Equipo

- Espectrómetro de masas para relaciones isotópicas (IRMS)
- Sistema de combustión acoplado al IRMS
- Sistema de introducción de muestra
- Reactor de combustión
- Sistema de deshidratación del gas
- Recipientes con septa compatibles con el sistema
- Sistema de destilación sin fraccionamiento isotópico
- Manto calefactor
- Sistema de control de temperatura
- Electroválvula
- Columnas tipo Cadiot o equivalentes

El IRMS deberá:

- Permitir medición simultánea de m/z 44, 45 y 46
- Poseer precisión interna igual o mejor a 0,06 ‰
- Realizar automáticamente la corrección isotópica correspondiente
- Encontrarse calibrado y verificado según procedimientos vigentes

Podrán utilizarse sistemas:

- EA-IRMS
- FLASH-IRMS

  u otros equivalentes técnicamente validados.

49.8. Preparación de la muestra

49.8.1. Muestreo

El muestreo deberá realizarse conforme a normativa vigente o procedimientos establecidos por el INV.

49.8.2. Preparación de la muestra

Vinos

El etanol deberá extraerse mediante destilación utilizando sistemas que eviten fraccionamiento isotópico.

La destilación deberá realizarse bajo condiciones controladas de temperatura y recuperación, respetando los límites de pérdida establecidos para el sistema utilizado.

Mostos y productos concentrados

Los azúcares deberán fermentarse previamente a etanol según procedimientos validados antes de efectuar la determinación isotópica.

Consideraciones generales

Todas las etapas de preparación deberán realizarse evitando pérdidas de etanol por evaporación, dado que ello modifica significativamente la composición isotópica de la muestra. La pérdida de etanol por evaporación puede producir cambios importantes en la composición isotópica del material remanente, observándose enriquecimientos de hasta 6 ‰ cuando se evapora aproximadamente el 40 % de la muestra.

49.9. Procedimiento

49.9.1. Porción de prueba

Tomar una alícuota apropiada del destilado alcohólico obtenido, compatible con los requerimientos operativos del sistema de combustión e introducción al IRMS.

49.9.2. Determinación(es)

Verificación de linealidad

Verificar el correcto funcionamiento instrumental mediante controles de linealidad de respuesta. Solo se continuará con las determinaciones cuando se cumplan los criterios de aceptación establecidos.

Si los datos son lineales, se procede a la combustión y lectura de los estándares y muestras respectivamente.

Combustión

Introducir la muestra en el sistema de combustión para convertir cuantitativamente el etanol en dióxido de carbono y agua.

Eliminar posteriormente el agua producida mediante el sistema desecante correspondiente.

Medición isotópica

Introducir el CO2 purificado en el IRMS y registrar las intensidades correspondientes a:

- m/z 44
- m/z 45
- m/z 46

El sistema efectuará automáticamente las correcciones isotópicas necesarias.

Control analítico

Analizar estándares de trabajo al inicio y final de cada serie analítica.

El lote analítico será aceptado cuando la diferencia entre las mediciones iniciales y finales de los estándares se encuentre dentro de los límites de reproducibilidad establecidos durante la validación del método.

Corrección instrumental

Corregir los valores de $\delta\ ^{13}C$ de las muestras mediante interpolación lineal entre las mediciones de estándares de trabajo realizadas al inicio y final de la serie analítica. Esta corrección permite compensar pequeñas dispersiones instrumentales observadas durante la medición, utilizando como referencia la diferencia entre el valor asignado al estándar de trabajo y el valor efectivamente medido.

Normalización

Normalizar los resultados respecto de la escala internacional V-PDB utilizando los registros y planillas de cálculo correspondientes.

49.9.3. Calibración

La calibración isotópica se realizará utilizando materiales de referencia certificados y estándares secundarios previamente caracterizados.

Se deberá especificar:

- Tipo de calibración utilizada
- Frecuencia de calibración
- Criterios de aceptación
- Procedimientos de verificación intermedia
- Trazabilidad metrológica de los estándares empleados

49.10. Cálculo (Resultados)

La relación isotópica se expresa como δ ^{13}C ‰ respecto del estándar V-PDB.

El cálculo se realiza según:

$$\boldsymbol{\delta\, 13C}\ ‰ = \left[\left(\frac{\boldsymbol{R\ muestra}}{\boldsymbol{R\ V-PDB}}\right) - \mathbf{1}\right] \cdot \mathbf{1000}$$

Dónde:

- R muestra = relación ^{13}C/^{12}C de la muestra
- R V-PDB = relación ^{13}C/^{12}C del estándar internacional

Los resultados deberán expresarse en ‰ (por mil), indicando el número de cifras decimales definidos por los criterios del laboratorio o del método validado.

Los resultados se expresan en δ‰ normalizado contra el $\delta_{V\text{-}PDB}$.

Cuando corresponda, deberán aplicarse:

- Correcciones instrumentales
- Correcciones de deriva
- Normalización isotópica

49.11. Bibliografía

International Organisation of Vine and Wine. (2017). *Resolution OIV-OENO 479-2017: Method OIV-MA-AS312-06. Determination of the isotopic ratio $^{13}C/^{12}C$ of wine ethanol or ethanol obtained from the fermentation of musts, concentrated musts or grape sugar by isotope ratio mass spectrometry (IRMS). Resolución OIV-OENO 479-2017: Método OIV-MA-AS312-06. Determinación de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ del etanol en vino o del etanol obtenido por fermentación de mostos, mostos concentrados o azúcar de uva mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS)]. OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.* https://www.oiv.int/public/medias/2496/oiv-ma-as312-06.pdf https://www.oiv.int/public/medias/5407/oiv-oeno-479-2017-es.pdf[16]

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2000, 15 de mayo). *Resolución C. 20/2000: Método oficial para la determinación de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ del etanol en vinos y mostos por Espectrometría de Masas de Relación Isotópica (IRMS). Argentina.gob.ar.* https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-63372/texto

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2006, 28 de junio). *Resolución C. 20/2006: Incorpórense los métodos de análisis isotópicos (IRMS y SNIF-NMR) para el control del origen e genuinidad de vinos y mostos. Argentina.gob.ar.* https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-117565/texto

[16] La determinación de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ del etanol para verificar el origen botánico y detectar adiciones ilícitas de azúcares fue establecida inicialmente en la Resolución OIV-OENO 17/2001 y posteriormente actualizada por la OIV mediante la Resolución OIV-OENO 479-2017 (Método OIV-MA-AS312-06). En el ámbito nacional, la fiscalización por espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS) se encuentra reglamentada por el Instituto Nacional de Vitivinicultura bajo la Resolución C. 20/2006 (INV, 2006).

50. DETERMINACIÓN DE NATAMICINA EN VINOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ULTRA ALTA RESOLUCIÓN – ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM (Natamicina/UHPLC-MS/MS – INV – 10050)

50.1. Título

Determinación de natamicina en vinos por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS)

Código: **Natamicina/UHPLC-MS/MS – INV – 10050**

50.2. Introducción

La natamicina (piramicina) es un antibiótico antifúngico producido por *Streptomyces natalensis*, utilizado como conservante en aplicaciones alimenticias específicas, principalmente en superficies de quesos y embutidos.

a) Información farmacológica y ATC

- Uso médico tópico (piel y mucosas)
- Códigos ATC:
  - A01AB10
  - A07AA03
  - D01AA02
  - G01AA02
  - S01AA10

b) Clasificación como aditivo alimentario UE E236

c) Uso tecnológico en alimentos (quesos/embutidos:

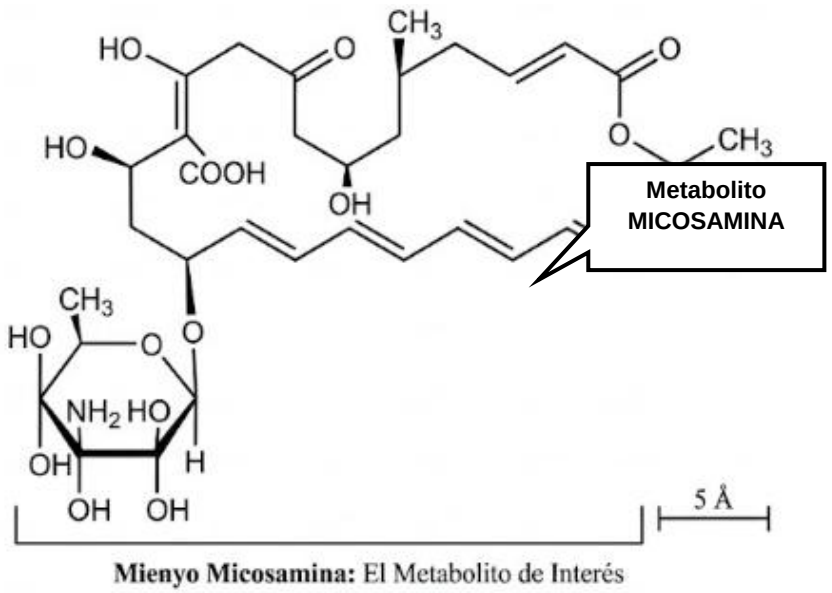
En el tratamiento de cáscaras en los quesos y en la cubierta de embutidos para evitar la presencia de hongos

d) Consideración regulatoria:

Su uso directo en alimentos está prohibido, por lo que su detección en vinos constituye un indicador de incumplimiento normativo.

e) Estructura química de la natamicina (sinonimia piramicina)

Figura 50.1 *Estructura Química de la NATAMICINA (Sinonimia piramicina)*



Mienyo Micosamina: El Metabolito de Interés

50.3. Alcance

El presente método es aplicable a la determinación de natamicina en vinos blancos, rosados y tintos mediante cromatografía líquida ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC–MS/MS), esta determinación permite su identificación y cuantificación. Se usa en el control de vinos terminados en el marco de la detección de residuos de antibióticos antifúngicos prohibidos o no autorizados. Por regla general la adición de antibióticos en los alimentos está terminantemente prohibida

50.4. Definiciones

Natamicina: antibiótico macrólido antifúngico producido por *Streptomyces natalensis* también conocido como piramicina.

Micosamina: metabolito derivado de antibióticos tales como la natamicina, detectable por HPLC MS/MS; utilizado como marcador analítico indirecto de presencia o degradación del compuesto original. Con su cuantificación es posible calcular la concentración inicial de antibiótico agregado.

UHPLC–MS/MS: técnica analítica que combina separación cromatográfica de ultra alta resolución con detección mediante espectrometría de masas en tándem.

50.5. Principio

El método se basa en la separación cromatográfica de la natamicina mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) en fase reversa con una columna C18, seguida de su detección por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) mediante ionización por electro spray.

Este procedimiento permite determinar la presencia de natamicina en vinos basándose en la identificación del ion precursor de masa molecular **m/z 666,3**. La identificación se confirma y la cuantificación se realiza mediante las transiciones a sus iones producto (hijos): **m/z 485,2** para la confirmación y **m/z 503,2** para la cuantificación.

El procedimiento comprende:

- Preparación de la muestra
- Extracción y filtración
- Separación cromatográfica UHPLC
- Detección MS/MS
- Cuantificación mediante calibración externa

El método fue validado sobre base estadística, asegurando repetibilidad y confiabilidad de los resultados. El método presenta un límite de detección de 5 $\mu g \cdot L^{-1}$**.**

50.6. Reactivos y materiales

50.6.1. Reactivos

- Natamicina estándar (Sigma P9703-25 mg o equivalente.)
- Acetonitrilo grado HPLCm, z.B. gradiente Fisher A 996-4 CAS 75-05-8 o equivalente.

- Metanol f.d. grado HPLC, z.B. pro análisis filtrado por 0,2 micrones Fisher A 454-4 CAS 67-56-1 o equivalente.
- Agua ultrapura filtrada (0,2–0,5 µm) (Agua W 7-4 filtrada por 0,5 micrones CAS 7732-18-5 o equivalente).
- Ácido fórmico 85 % - 100 %, z.B. P.A. Merck Art. Nr: 1.11670 o equivalente.
- Vinos blancos, rosados o tintos libres de natamicina (matriz blanco)

50.6.2. Materiales

- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 50 mL
- Pipeta de doble aforo de 25 mL
- Pipeta de doble aforo de 10 mL
- Pipeta de doble aforo de 5 mL
- Pipeta de doble aforo de 1 mL
- Propipeta.
- Sistema de Filtración al vacío Millipore o equivalente.
- Filtro de Nylon de poro de 0,22 µm x 47 mm de diámetro marca: Microclar Y02047WPH o equivalente.
- Membrana de nitrocelulosa blanca 0,45 µm x 47 mm Gamafil N04-047 o equivalente.
- Probeta de 1000 mL graduada.
- Frasco Genna de 1000 mL o equivalente.
- Jeringa de volumen variable.
- Filtro de jeringa para soluciones hidroalcohólicas (membrana 0,45 µm) Pall preferred (PVDF) 13 mm PG-4457 o equivalente.

50.7. Equipos

- Cromatógrafo UHPLC-MS/MS equipado con ionización electro spray marca Waters o equivalente.
- Pre columna.
- Columna: Acquity UPLC® BECH C18 1.7 µm; 2.1 x 50 mm
- Sistema de filtración al vacío
- Balanza de precisión ± 0,01 mg

- Vial UPLC de 1,8 mL 12x32 Gls Srw Cap VI w/Bnd pre-slt septa o equivalente.
- Ultrasonido COLE – PALMER.
- Centrífuga (cuando corresponda)
- Sistema de inyección automática (auto sampler)

50.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

La muestra de vino se toma directamente del envase original, manteniéndose cerrado el envase hasta el momento del análisis para evitar pérdidas de compuestos volátiles o contaminación. Se filtra mediante filtro de jeringa de 0,45 µm y se transfiere a vial. El vial se coloca en el rack y luego en el autosampler para su inyección automática directa en el sistema UHPLC–MS/MS.

50.9. Procedimiento

50.9.1. Porción de prueba

Se utiliza una alícuota de vino filtrado de aproximadamente **10 µL** por inyección. Si la concentración supera el rango de calibración (>50 $\mu g \cdot L^{-1}$), se diluirá hasta que el valor ingrese dentro de la curva de calibración.

50.9.2. Determinación(es)

Preparación de soluciones estándar

- **Solución primaria de natamicina** (madre): **100 $mg \cdot L^{-1}$** en metanol (Pesar 10 mg de sustancia estándar, transferir a matraz de 100 mL y enrasar con metanol.
- **Solución secundaria de natamicina** de **5 $mg \cdot L^{-1}$** en metanol (Tomar 5 mL de la solución primaria, transferir a matraz de 100 mL y enrasar con metanol)
- **Soluciones estándar de calibración** de natamicina preparadas en matriz vino libre de natamicina (5 µg/L; 10 µg/L; 25 µg/L y 50 µg/L).

Tabla Nº 50.1. *Descripción de diluciones.*

Solución a diluir	Dilución	Concentración de la solución estándar
100 mg/L	5 mL / 100 mL	5 µg/L
5 mg/L	1 mL / 100 mL	50 µg/L
50 µg/L	25 mL / 50 mL	25 µg/L
50 µg/L	10 mL / 50 mL	10 µg/L
10 µg/L	25 mL / 50 mL	5 µg/L

Filtrar las soluciones estándar de calibración en vino antes de la inyección a través de un filtro de jeringa.

Preparación de fase móvil

- **Eluyente A (Fase A):** Agua + 0,1 % de Ácido Fórmico.

  Medir aproximadamente 1000 mL de agua en probeta graduada. Agregar 1 mL de ácido fórmico y enrasar con agua. Homogeneizar y filtrar con filtro de nylon y sistema de filtración. Envasar en frasco Genna.

- **Eluyente B:** Acetonitrilo + 0,1 % de Ácido Fórmico.

  Medir aproximadamente 1000 mL de acetonitrilo en probeta graduada. Agregar 1 mL de ácido fórmico y enrasar con acetonitrilo. Homogeneizar y filtrar con filtro de nylon y sistema de filtración. Envasar en frasco Genna.

- Filtrar ambas fases antes de uso.

Condiciones cromatográficas - Establecer los parámetros de trabajo:

- Caudal: 0,3 mL·min^{-1}
- Temperatura columna: 30 °C
- Temperatura de la muestra: 15ºC
- Volumen de inyección: 10 µL
- Loop de inyección: 10 µL
- Tiempo de retención: 4,3 min

Tabla Nº 50.2. *Gradiente de elución*

Tiempo (min)	% Eluyente A	% Eluyente B
0	90	10
10	40	60
15	40	60
16	90	10
20	90	10

Tabla Nº 50.3. *Parámetros de detección*

Transición de Masas	Tiempo de retención Dwell (min)	Voltaje de Cono	Energía de Colisión
666,3>485,2	0,078	14	12
666,3>503,2	0,078	14	11

Nota 1: Tanto el equipamiento como las condiciones operativas se describen a modo de ejemplo.

Condiciones MS/MS

- Ion precursor: m/z 666,3
- Transiciones:

666,3 → 485,2 (confirmación)
666,3 → 503,2 (cuantificación)

- Ionización: ESI
- Modo: positivo
- Dwell time: 0,078 min

50.9.3. Calibración

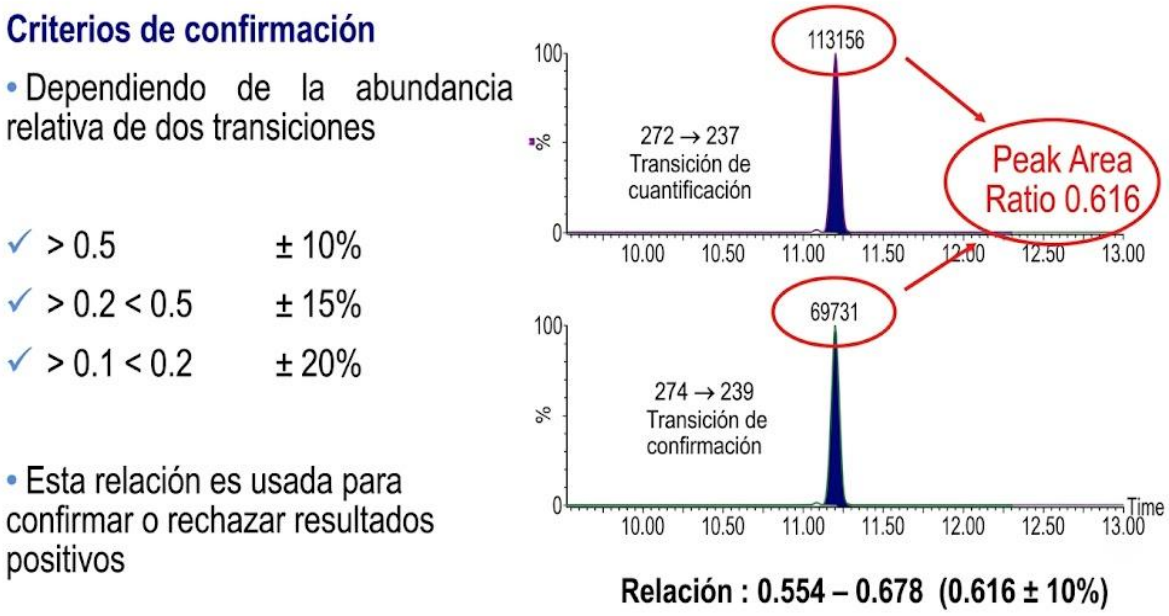
Se realiza calibración externa mediante al menos cuatro niveles de concentración en matriz vino libre de analito, cubriendo el rango de trabajo del método. La curva de calibración se construye mediante regresión lineal de la respuesta del ion de cuantificación.

Lectura de Cromatograma[17]

Se comparan entre la transición de distintas concentraciones. Con la siguiente relación de iones:

- comparación de transiciones
- verificación de co-elución
- confirmación por relación de iones

Figura 50.2. *Cromatograma de vino con 25 ppb de Natamicina*



[17] *Nota 1:* Tanto el equipamiento como las condiciones operativas se describen a modo de ejemplo.

Nota 2: En caso que la muestra contenga más de 50 $g.L^{-1}$ se diluirá hasta que el valor ingrese dentro de la curva de calibración.

Figura Nº 50.3. *Ión molecular de natamicina* **(m/z 666,3)**

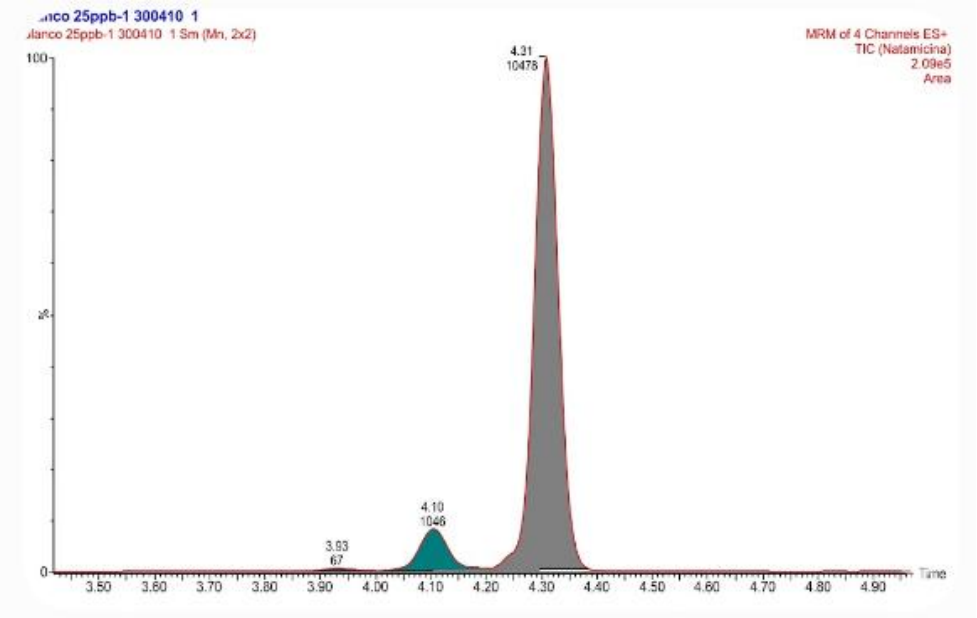
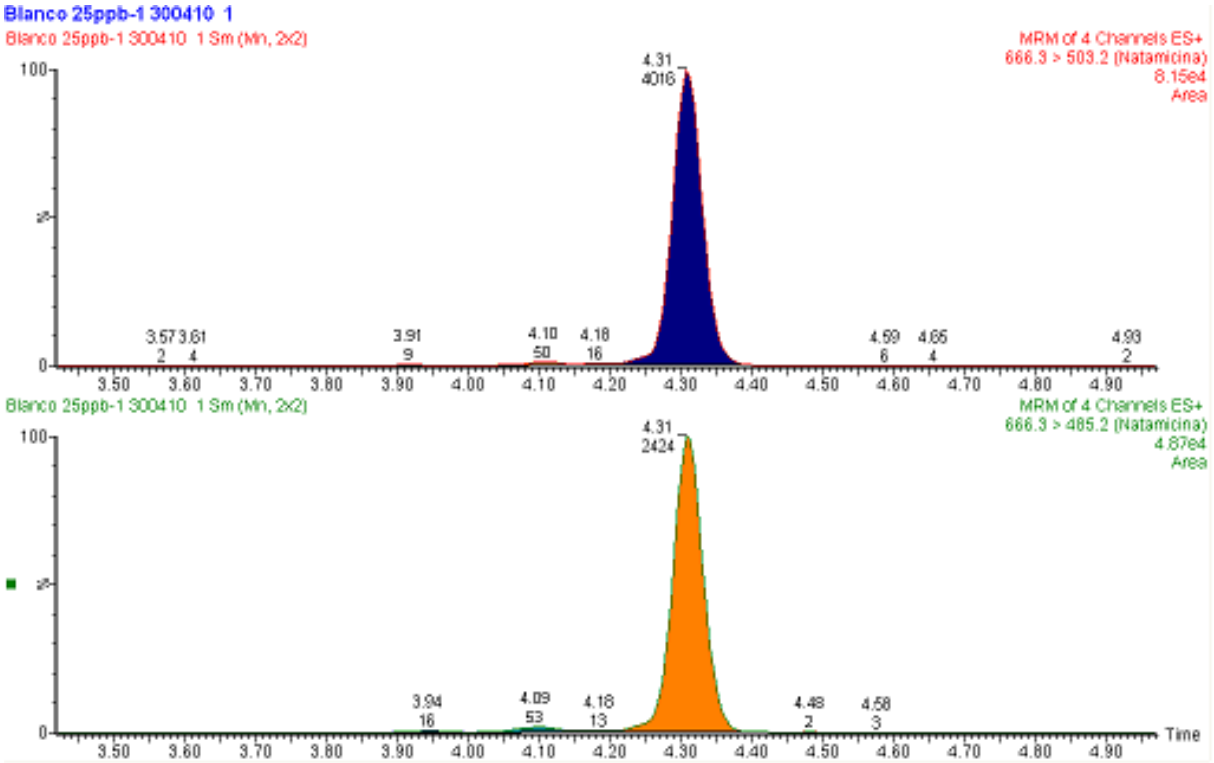


Figura Nº 50.4. *Iones de transición (hijos) de Natamicina* **(productos 485,2 y 503,2)**



50.10. Cálculo (Resultados)

La concentración de natamicina se calcula a partir de la curva de calibración externa.

Los resultados se expresan en **µg·L⁻¹**, con una cifra significativa definido. El ión de confirmación es la transición (ión hijo) **666,3** → **485,2**. El ión de cuantificación es la transición (ión hijo) **666,3** → **503,2**. Cuando corresponde, se aplican factores de dilución.

50.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura [INV]. (2010, 31 de mayo). *Resolución C. 19/2010: Oficialízase el método "Determinación de natamicina en el vino por cromatografía líquida de ultra alta resolución masa/masa"*. Boletín Oficial de la República Argentina. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-168041/texto

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (2012). *Resolución OIV-OENO 461-2012: Métodos para la determinación de natamicina en el vino*. OIV. https://www.oiv.int/public/medias/1476/oiv-oeno-461-2012-es.pdf

Abuin, S., Codony, R., & Compañó, R. (2006). Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1114*(1), 73-81.

Felrich, K. (1990). *Detección instrumental de antibióticos en alimentos*. AOAC.

Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV]. (2003). *Compendium of international methods of wine and must analysis: Anexo B. Resolución OENO 6/99*. OIV.

Perez, S., & Barceló, D. (2007). Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 494–514.

Wang, J. (2008). Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. *Mass Spectrometry Reviews*, *28*(1), 50–92.

51. DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN VINOS POR TÉCNICAS DE ENZIMO-INMUNO-ENSAYO (ELISA) (GLU/ELISA – INV – 10051)

51.1. Título

Determinación de gluten en vinos por técnicas de enzimo-inmuno-ensayo (ELISA).
Código: **GLU/ELISA – INV – 10051**

51.2. Introducción

La determinación de gluten en vinos resulta necesaria para verificar el cumplimiento de los requisitos establecidos para productos destinados a personas con enfermedad celíaca y otras condiciones relacionadas con la intolerancia al gluten. El presente método permite la cuantificación de fracciones de gliadina provenientes de trigo y de las prolaminas correspondientes de cebada y centeno mediante un ensayo inmuno-enzimático competitivo basado en anticuerpos monoclonales R5.

51.3. Alcance

Este método establece la determinación cuantitativa de gliadina y su expresión como gluten en vinos mediante la técnica de enzimo-inmuno-ensayo competitivo (ELISA).

Es aplicable a vinos destinados al control oficial de productos aptos para consumo por personas que requieren dietas libres de gluten.

51.4. Definiciones

El gluten es un conjunto de proteínas de reserva presentes en cereales como trigo, cebada y centeno. Está constituido principalmente por prolaminas y glutelinas.

A los efectos de este método, la determinación se realiza mediante la cuantificación de gliadina y de las prolaminas equivalentes presentes en cebada y centeno, expresando el resultado como contenido de gluten.

51.5. Principio

El método se basa en un enzimo-inmuno-ensayo competitivo (ELISA) fundamentado en una reacción específica **antígeno-anticuerpo**.

Las celdas de la microplaca se encuentran recubiertas con gliadina como antígeno. A cada pocillo se adicionan simultáneamente los estándares de gliadina calibrados frente a un péptido específico, las muestras previamente preparadas y los anticuerpos monoclonales R5 anti-gliadina conjugados con peroxidasa.

Durante la incubación, los anticuerpos marcados se unen tanto a la gliadina inmovilizada en las celdas como a los péptidos de las prolaminas presentes en la solución de la muestra, estableciéndose una competencia por los sitios de unión y formándose complejos antígeno-anticuerpo.

Finalizada la incubación, se realiza una etapa de lavado para eliminar el conjugado enzimático que permanece libre en solución, reteniéndose únicamente el conjugado unido al antígeno fijado en el pocillo. Posteriormente se adiciona el sistema sustrato/cromógeno y se incuba. La enzima peroxidasa asociada al conjugado unida cataliza la formación de un producto de color azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (Stop).

La absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm Debido al carácter competitivo del ensayo, la intensidad de la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración de gliadina y de las prolaminas correspondientes presentes en la muestra.

51.6. Reactivos y materiales

51.6.1. Reactivos

El material de los estándares suministrados con el kit RIDASCREEN® Gliadin Competitive fue calibrado por el Prolamin Working Group (PWG), con sede en Bélgica.

Kit de inmunoensayo para análisis cuantitativo de gliadina y prolaminas correspondientes, RIDASCREEN® Gliadin Competitive, R-Biopharm, Art. Nº R7021, o equivalente validado para vinos.

Agua bidestilada.

Etanol absoluto, grado analítico.

Gelatina de pescado (Fish Gelatin), Sigma, Order Nº G-7765, o equivalente.

Patrones y materiales de referencia certificados.

Los materiales de referencia y estándares deberán indicar:

- Concentración o pureza certificada.
- Fecha de preparación.
- Fecha de vencimiento.
- Trazabilidad metrológica cuando corresponda.

51.6.2. Materiales

- Frascos de vidrio con tapa rosca de 10 mL y 50 mL.
- Espátulas.
- Probetas de 25 mL y 100 mL.
- Pipetas graduadas de 5 mL y 10 mL.
- Micropipetas automáticas de:
    - 2–20 µl.
    - 20–200 µl.
    - 100–1000 µl.
- Film autoadherente.
- Vasos de precipitados de 100 mL y 250 mL.
- Gradillas para tubos.
- Tubos tipo Safe-Lock de 1,5 mL o equivalentes.

51.7. Aparatos - Equipos

- Lector de microplacas ELISA con lectura a 450 nm
- Agitador tipo vortex.
- Balanza analítica.
- Heladera con rango de trabajo entre 4 y 8 °C.
- Freezer con rango de trabajo entre –15 y –20 °C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL con capacidad de alcanzar 25.000 g.
- Homogeneizador.
- Baño termostatizado con sistema de agitación horizontal.

51.8. Muestreo (Preparación de la muestra)

Las muestras de vino deben conservarse a temperatura ambiente hasta su análisis. Con el fin de evitar contaminaciones por trazas de cereales, se deberán adoptar las siguientes precauciones:

- Utilizar guantes durante toda la preparación.
- Limpiar superficies, recipientes y equipos con etanol al 60 %
- Realizar la preparación de muestras en un área separada del laboratorio Dónde se ejecuta el ensayo ELISA.

Extracción de la muestra

1. Mezclar 1 mL de vino con 9 mL de etanol al 60 % (V/V)
2. En vinos tintos con elevado contenido de polifenoles y taninos, adicionar solución de gelatina de pescado o leche descremada libre de T.A.C. según corresponda.
3. Agitar durante 30 minutos utilizando vortex.
4. Agitar posteriormente mediante rotación durante 10 minutos.
5. Centrifugar durante 10 minutos a una fuerza mínima de 25.000 g a temperatura ambiente.
6. Diluir el sobrenadante 1:50 (1+49) utilizando buffer diluyente de muestras.
7. Utilizar 50 µl de la solución obtenida para cada pocillo durante el ensayo.

51.9. Procedimiento

51.9.1. Porción de prueba

Utilizar 50 µl del extracto diluido preparado según el apartado 28.8 para cada determinación.

Realizar todas las determinaciones por duplicado.

51.9.2. Determinación

Preparación de reactivos

1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
2. Preparar únicamente el volumen de reactivos necesario para el ensayo.

3. Evitar que las celdas se sequen durante el procedimiento. La reproducibilidad del ensayo depende en gran medida de la correcta ejecución de los lavados de las celdas. Deberán seguirse cuidadosamente las recomendaciones establecidas por el fabricante del kit para esta etapa.
4. Mantener la temperatura de trabajo entre 20 y 25 °C.
5. Proteger la microplaca de la luz directa durante las incubaciones.
6. Preparar el conjugado mediante dilución 1:11 (1+10) con agua bidestilada.

Ejemplo:

- 200 µl de conjugado concentrado.
- 2 mL de agua bidestilada.

7. Preparar el buffer de lavado mediante dilución 1:10 (1+9) con agua bidestilada.

Ejemplo:

- 100 mL de buffer concentrado.
- 900 mL de agua bidestilada.

Antes de la dilución, disolver completamente los cristales eventualmente formados mediante calentamiento a 37 °C. El buffer de lavado diluido es estable durante cuatro semanas conservado entre 2 y 8 °C.

8. Preparar el buffer diluyente de muestras mediante dilución 1:5 (1+4) con agua bidestilada.

Ejemplo:

- 7 mL de buffer concentrado.
- 28 mL de agua bidestilada.

El volumen preparado según este ejemplo resulta suficiente para la dilución de aproximadamente diez muestras.

Incubación

1. Colocar en el soporte el número necesario de celdas para estándares, muestras y duplicados.
2. Registrar la distribución de muestras y estándares.
3. Agregar 50 µl de cada estándar o muestra preparada en las celdas correspondientes.
4. Adicionar 50 µl del conjugado diluido a cada pocillo.
5. Mezclar suavemente.
6. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
7. Vaciar completamente las celdas.
8. Realizar tres lavados sucesivos con buffer de lavado.
9. Eliminar completamente el líquido residual después de cada lavado invirtiendo la placa y golpeándola suavemente sobre papel absorbente.
10. Agregar 100 µl de solución sustrato/cromógeno a cada pocillo.
11. Mezclar suavemente.
12. Incubar durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (20–25 °C).
13. Agregar 100 µl de solución de parada (Stop).
14. Mezclar suavemente.
15. Dejar reaccionar durante 10 minutos.
16. Leer la absorbancia a 450 nm dentro de los 10 minutos posteriores a la adición de la solución Stop.

51.9.3. Calibración

La calibración se realiza utilizando los estándares suministrados con el kit comercial. La curva de calibración se construye representando la absorbancia frente a la concentración de gliadina de los estándares en escala semilogarítmica. Los criterios de aceptación de la curva deberán ajustarse a las especificaciones establecidas por el fabricante del kit utilizado.

51.10. Cálculo y expresión de resultados

51.10.1. Cálculo

Los valores de absorbancia obtenidos para los estándares y las muestras se representan en función de la concentración de gliadina mediante una curva de calibración semilogarítmica, construida según las especificaciones del kit utilizado.

La concentración de gliadina de cada muestra se determina por interpolación en la curva de calibración y se corrige aplicando el factor de dilución total del método (500).

La concentración de gliadina se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\boldsymbol{Gliadina\ \left(\frac{ng}{kg}\right) = Concentración\ obtenida\ de\ la\ curva\ (ng/mL)\ \cdot 500}$$

Dado que la gliadina representa aproximadamente el 50 % del gluten total y que el anticuerpo monoclonal R5 detecta tanto gliadina de **trigo** como las prolaminas equivalentes de **cebada y centeno**, el contenido de gluten se estima mediante:

$$\mathbf{Gluten\ \left(\frac{mg}{kg}\right) = Gliadina\ \left(\frac{mg}{kg}\right)\ \cdot 2}$$

Ejemplo

Para una concentración obtenida de 50 ng/mL de gliadina:

- Gliadina = 50 · 500 = 25.000 ng/kg
- Gliadina = 25 mg/kg
- Gluten = 25 · 2 = 50 mg/kg

51.10.2. Expresión de resultados

Los resultados se expresan como: **Gluten: XX mg/kg**

Cuando corresponda, podrá indicarse adicionalmente la concentración de gliadina obtenida.

51.10.3. Informe de ensayo

Contenido de gluten: _____ mg/kg.

Indicar, cuando corresponda, si el producto cumple o no con los requisitos regulatorios aplicables para alimentos libres de gluten.

51.11. Bibliografía

Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2018, 20 de febrero). *Resolución 26/2018: Oficialízase el método "Determinación de gluten en vinos por enzimo inmunoensayo competitivo (ELISA)"*. Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/norma-307102/texto

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (2017). *Disposición Nº 1834/2017: Instructivo para el otorgamiento de altas y bajas en el listado integrado de alimentos libres de gluten*. ANMAT. https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposici%C3%B3n-1834-2017-273523

American Association of Cereal Chemists International. (2015). *Approved methods of analysis* (11th ed.). Method 2015.05: *Determination of gluten in fermented and hydrolyzed foods by competitive ELISA*. AACC International.

Codex Alimentarius Commission. (2008). *Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten* (CXS 118-1979). Food and Agriculture Organization / World Health Organization. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B118-1979%252FCXS_118e.pdf

Ministerio de Salud de la Nación. (s. f.). ***Código Alimentario Argentino. Capítulo XVII:*** *Alimentos de régimen o dietéticos*. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigo-alimentario-argentino

R-Biopharm AG. (s. f.). *RIDASCREEN® Gliadin Competitive: Manual de instrucciones para el ensayo cuantitativo de gliadinas y gluten* (Ref. R7021). R-Biopharm.

República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Año de la Grandeza Argentina

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número: IF-2026-107738308-APN-INV#MEC

MENDOZA, MENDOZA
Jueves 5 de Noviembre de 2026

Referencia: Expediente: EX-2026-106999722- -APN-DD#INV- RESOLUCIÓN COMPENDIO DE MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE VINOS Y MOSTOS.

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 287 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2026.11.05 11:06:08 -03:00

Carlos Raul Tizio Mayer
Presidente
Instituto Nacional de Vitivinicultura
Ministerio de Economía

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2026.11.05 11:06:09 -03:00