

Tesis de Posgrado

Estudios acerca de la determinación cuali-cuantitativa de sorbitol en vinos : Contenido de sorbitol en vinos argentinos

Bianchi, Juan José

1959

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bianchi, Juan José. (1959). Estudios acerca de la determinación cuali-cuantitativa de sorbitol en vinos : Contenido de sorbitol en vinos argentinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1002_Bianchi.pdf

Cita tipo Chicago:

Bianchi, Juan José. "Estudios acerca de la determinación cuali-cuantitativa de sorbitol en vinos : Contenido de sorbitol en vinos argentinos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1959.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1002_Bianchi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

ESTUDIOS ACERCA DE LA DETERMINACION CUALI-
CUANTITATIVA DE SORBITOL EN VINOS
CONTENIDO DE SORBITOL EN VINOS ARGENTINOS

(Resumen de Tesis presentada por Juan José Bianchi)

Continuando con la investigación de métodos para la determinación de la presencia de sorbitol en vinos genuinos y su ulterior valoración se estudia en particular el procedimiento indicado por K. Taufel y K. Müller, por oxidación con metaperiodato del producto previamente aislado por cromatografía sobre papel.

Se propone la utilización del papel Whatman N°1 en remplazo del papel Schleicher y Schull 2040 a para el desarrollo de la técnica cromatográfica, método descendente, proposición ésta que reduce el tiempo de desarrollo del cromatograma a 24 horas. Se propone para el revelado de sorbitol y glucosa al reactivo de Trevelyan en remplazo del de Wolfrom y Muller que no da buenos resultados. Su límite de sensibilidad, para la hexita, es de 0,5 gammas.

En cuanto a la glucosa, sustancia que tiene un valor de Rf igual al del sorbitol, se verifica su ausencia con el reactivo constituido por difenilamina-anilina-ácido fosfórico cuyo límite de sensibilidad para dicho producto es de 6 gammas. Este ensayo debe dar resultado negativo.

Se propone el método de Rappaport, oxidación con metaperiodato y ulterior valoración iodométrica, para la determinación cuantitativa de la hexita pero utilizando volúmenes menores

REVISTA

de reactivos que en el método de Taufel y Muller y titulado con solución de tiosulfato de sodio 0,0025 N.

Con las modificaciones al método de Taufel y Muller se valen muestras que pueden contener de 0,02 a 0,3 mg de sorbitol. La aplicación del método propuesto a varios vinos genuinos no solo permite confirmar la presencia de sorbitol en los mismos sino también afirmar que su contenido es bastante mayor que el determinado por los métodos basados en la condensación con benzaldehído e sus derivados.

Los ensayos de recuperación del sorbitol agregado a un vino al cual se ha determinado previamente su contenido de dicha hexita dieron los resultados que se indican a continuación:

Muestra	Teórico	Recuperado	Error
Vino	62,0		
Vino 100 ml + 5 mg sorbitol	67,0	61,9	7,6 %
Vino 100 ml + 10 mg sorbitol	72,0	71,7	0,4 %
Vino 100 ml + 15 mg sorbitol	77,0	75,9	1,4 %
Vino 100 ml + 20 mg sorbitol	82,0	77,6	5,4 %

Los valores estan dados en mg / ml.

Para hacer estos ensayos se emplearon 0,2 ml de muestra.

Juan José Bianchi

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS
presentada por
JUAN JOSE BIANCHI
para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

1959

ESTUDIOS ACERCA DE LA DETERMINACION CUALI-
CUANTITATIVA DE SOBRIELOS EN VINOS
CONTIENEN A SOBRIOLOS Y A...

**Mi más sincero agradecimiento al DOCTOR PEDRO CATTANEO bajo
cuya supervisión se desarrolló el presente trabajo.**

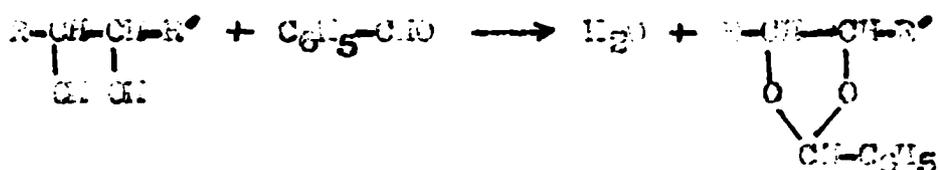
Mi reconocimiento al DOCTOR WALTER JUNG por su inestimable guía.

AL DOCTOR JUAN GARCIA FERNANDEZ por la enseñanza de las técnicas cromatográficas y colaboración con sus atinados consejos, muy agradecido.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE LA DETERMINACIÓN DE SORBITOL EN VINOS.

La determinación de sorbitol en vinos aparece en la bibliografía con el objeto de saber si se ha efectuado cortos de vino con jugos de otras frutas que no sea la uva. En efecto, las manzanas y otras frutas de la familia de las Rosáceas (peras, membrillos, ciruelas, cerezas, damascos, duraznos) contienen apreciables cantidades de sorbitol, cosa que no ocurre en los mostos de uva, que si lo contienen, es en pequeñas cantidades.

J. Werder (1) en 1929 investiga la adulteración del vino por la adición de 10% o más de vinos de otras frutas separando el sorbitol por precipitación con benzaldehído. Utiliza para ello la reacción de J. Memier, que es la siguiente:



en presencia de SO_4H_2 , a temperatura ordinaria y con burbujeo de gas carbónico para realizar la agitación de la mezcla.

Existe la posibilidad de obtener tres sustancias, el mono-, el di-, y el tribenzaldehído según se hagan reaccionar 1, 2 o 3 moléculas de aldehído sobre 1 molécula de sorbitol.

Werder obtiene el dibenzaldehído utilizando la siguiente técnica: 100 ml de vino se agita con 7 g de carbón activado y

lleva a ebullición durante 2 o 3 minutos. El filtrado se concentra hasta consistencia siruposa; una vez frío se vierte sobre este residuo 4 gotas de benzaldehído y 1 ml de SO_4H_2 1:1, se agita de vez en cuando y deja reposar 10 horas. Se agita con 100 ml de agua destilada y filtra el dibenzaldehído formado.

Un medio más seguro para identificar el sorbitol, según el mismo autor (2), es obtener, a partir del dibenzalsorbitol, el hexaacetilsorbitol de punto de fusión 98-99°C previa hidrólisis con SO_4H_2 normal y acetilando el sorbitol con una solución muy diluida de anhídrido acético. El derivado formado se precipita agregando cristalitas de hexaacetilsorbitol.

Rudolf Heid y Franz Popberger (3) observaron que para obtener un rendimiento máximo de dibenzalsorbitol debe mantenerse la temperatura a 0°C, una mínima concentración de SO_4H_2 1:1 y un exceso de benzaldehído. Por ej.: 30 mg de sorbitol, 0,65 ml de SO_4H_2 1:1 y 0,2 ml de benzaldehído (6 gotas) a 0°C rendirá 54 mg de dibenzalsorbitol. Ligeras desviaciones altera el rendimiento considerablemente.

C. Zach (4) demostró que el precipitado formado al agregar benzaldehído y SO_4H_2 a los jugos de fruta es esencialmente una mezcla de di- y tribenzalsorbitol. Estos compuestos pueden separarse rápidamente por las diferentes solubilidades en varias soluciones.

Según W. Diemar y G. Lix (5) la identificación de sorbitol por medio del punto de fusión de sus derivados mono y dibencilideno es dificultosa. El monobenzalsorbitol puro funde a 169-170°C y el dibenzalsorbitol puro a 182-184°C. Los valores diferentes dados en la literatura del punto de fusión y composición del dibenzalsorbitol son debido a las impurezas con el monoderivado. Estos derivados cristalinos, bajo ciertas condiciones, se pueden obtener de la sidra.

Los experimentos de B. E. Leyer, W. Diemar y G. Lix (6) efectuados en el año 1931 confirmaron el descubrimiento de Reif sobre la interferencia de la dextrosa y dextrinas en la condensación del sorbitol con el benzaldehído en el método de Werder. También han demostrado que las condiciones experimentales tales como la temperatura y la concentración tienen un efecto decisivo sobre el rendimiento del dibenzalsorbitol obtenido.

Se obtienen resultados máximos si se observan las siguientes condiciones: Eliminar los azúcares por fermentación y el color por calentamiento de 100 ml de vino con 3 g de carbón (carbón medicinal Merck) y filtrar. Concentrar el filtrado clarificado bajo presión reducida hasta consistencia siruposa (2,5 ml). Precipitar las dextrinas con 40 ml de metanol enfriando con hielo. Dejar reposar 2 horas a 0°C y filtrar. Agregar 0,5 ml de SO_4H_2 al 50% y 0,1 ml de benzaldehído a 20°C. Mezclar durante 15 minutos, dejar en reposo toda la noche

filtrar, lavar el dibenzalsorbitol con 100 ml de agua seguida con 10 ml de etanol al 50%, secar durante 3 horas a 65° y pesar.

Estos mismos autores (7) obtienen los siguientes resultados en el estudio de la reacción que tiene lugar en el método de Werder: 10 mg de sorbitol producen 19,7 mg de dibenzalsorbitol que corresponden a 5% de jugo de fruta agregado. Además proponen (8), para identificar el sorbitol y diferenciarlo del manitol, la preparación de los siguientes derivados del benzalsorbitol: *o*-monocloro-: P.F. 170°; *o*-tricloro- P.F. 217°; 2-nitro-5-monocloro-: P.F. 250,5°; *m*-nitro-: P.F. 180°; *m*-dinitro-: P.F. 228,5°; *m*-trinitro-: P.F. 168°; *o*-trinitro-: P.F. 181°C.

F. M. Litterscheid (9) en 1931 desarrolla un método para investigar la presencia de jugo de frutas en vino. Es el siguiente: Evaporar 100 ml de vino decolorado a 4-5 ml y tratarlo con 0,20 a 0,25 ml (6 a 8 gotas) de *o*-Cl-C₆H₅CHO en presencia de ClH (d:1,13-1,19). Agitar, dejar en reposo 6-8 horas, filtrar, lavar el residuo con agua fría y metanol y secar. El compuesto condensado obtenido tiene un punto de fusión de 175-210° (generalmente 200°). Con este método puede investigarse adiciones de un 2,5% de jugo de frutas.

Rief (10) en 1933 estudia la interferencia de la dulcina y sacarina en la identificación de sorbitol. Por acción del benzaldehído y SO₄H₂ 1:1 sobre la dulcina se produce benzaldulcina de color rojo. Como la dulcina da las mismas reac

ciones que el sorbitol, debe ser, cuando ha sido agregada al vino, eliminada antes de investigar sorbitol. Sin embargo, para ello no son necesarias precauciones especiales debido a que es adsorbida completamente por el carbón usado en la determinación de Werder.

En cuanto a la sacarina, ella actúa en forma diferente a la dulcina frente al benzaldehído y SO_4H_2 1:1 pues no se forma el compuesto correspondiente. Además su presencia no molesta en la determinación de sorbitol pues es eliminada durante la acetilación y es completamente adsorbida por el carbón.

Gh. Schatzlein y E. Sailer (11) examinaron vinos de pura uva de la cosecha de 1929 y encontraron sorbitol con cantidades pequeñas de manitol. Estos autores creen que el sorbitol proviene de las uvas más bien de que se produzca durante la fermentación.

En el año 1946, J. Deshusses (12) sostiene que la condensación de sorbitol con benzaldehído en presencia de SO_4H_2 no es cuantitativa; el rendimiento varía entre el 90 y el 95%. Un exceso de SO_4H_2 o benzaldehído disminuye el rendimiento. Además la presencia de pequeñas cantidades de glicerol provoca la condensación y grandes cantidades la retardan. El PO_4H_3 puede usarse en lugar del SO_4H_2 , mientras que el ácido láctico inhibe la condensación. Aparentemente no se puede dar un método correcto para la determinación de sorbitol en un medio

complejo. Se puede obtener un valor aproximado tomando el promedio de varias determinaciones.

C. Tarantola y M. Strada (13) admiten que el método de Litterscheid para la determinación de sorbitol en vinos da buenos resultados (se recupera 80-90% de lo adicionado artificialmente). Para una determinación precisa el reactivo precipitante, o-eloro-benzaldehido, se debe emplear en cantidad estrictamente necesaria para la condensación del sorbitol. Por ej., usando solamente 0,1 ml de reactivo y luego de filtrar repetir la precipitación. La cantidad de ClH conc. adicionado debe ser por lo menos el doble que la del vino y la temperatura debe ser baja (4-5°). Según estos autores, análisis de sidras y vino de higo dieron 4-5 g y 0,02-0,04 g de sorbitol por litro respectivamente. De 70 vinos italianos, 19 no contenían sorbitol; en otros vinos, entre 1,4 a 9,6 mg%. Llegaron a la conclusión que el máximo contenido que se debe tolerar es de 15 mg%.

En 1949, Pietro Mortara (14) aplicando el método de Litterscheid modificado por Tarantola y Strada, determina sorbitol en vinos con los siguientes resultados: de 0-1 mg% en 18 muestras; 1-3 mg en 65 muestras; 3-6 mg en 16 muestras y 6,5 mg en 1 muestra.

L. Gentilini y G. Cappelleri (15) encontraron que el sorbitol contenido en 103 vinos de Venecia varia de 0,1 a 5,7 mg%. Mientras los vinos blancos tenían un promedio de 1,1 mg% los tintos, 0,6 mg%, llegando a la conclusión de que los vi-

nos con menos de 10% mg de sorbitol no deben ser considerados falsificados con sidra.

E. Garino-Canina y P. Falchi (16) empleando el método de Litterscheid y aumentando el tiempo de reacción con el o-cloro-aldehído a 72 horas evita la interferencia de la manita. Ensayaron con vinos del Piemonte y Liguria no encontrándose en ninguno de ellos más de 10 mg% g.

G. Soris (17) reemplaza el aldehído o-cloro-benzoico por el o-nitrobenzaldehído. La técnica utilizada es la siguiente: 100 ml de vino y 4 g de carbón activado se coloca en un erlenmeyer de 250 ml a bañomaria durante $\frac{1}{2}$ hora agitando cada 10 minutos. Se filtra y lava 3 veces con 5-10 ml de agua hirviendo. Si es necesario se vuelve a filtrar. El filtrado se evapora en cápsula a bañomaria hasta consistencia siruposa evitando la caramelización. Se enfría y añade 0,3 a 0,4 g de o-nitrobenzaldehído y 5 ml de ClH conc. para disolver. Se vierte en tubo de centrifuga de 50 ml y lava con 5 ml de ClH y luego con 2 ml. Se tritura el depósito de o-nitrobenzaldehído, se tapa con tapón de caucho. Si el vino contiene sorbitol se enturbia en 5 minutos y aumenta su viscosidad. Se agita dos veces con $\frac{1}{2}$ hora de intervalo; 15 horas después se agrega agua y se agita para lavar el depósito. Se centrifuga tres veces durante 5 minutos, se lava con 5 ml de metanol y se deja en maceración el precipitado el mayor tiempo posible antes de centrifugar nuevamente tres veces.

Decantar el precipitado blanco obtenido y dejar secar al aire. Se disuelve en caliente con 5 ml de acetona, dos veces, y se vierte en una cápsula de 30 ml previamente tarada. Se deja evaporar y secar en desecador con SO_4H_2 . Se pesa el precipitado cristalino y verifica su punto de fusión: 217°C .

En 1952, Takes Takahashi, K. Kimoto y S. Minami (18), de la Universidad de Tokio emplean la propiedad oxidante del Sulfato cérico para la determinación de polialcoholes como manitol, sorbitol, inositol. El sulfato cérico es calentado con el polialcohol, se enfría a temperatura ambiente y luego el exceso de Ce^{+++} es titulado con sulfato ferroso por el método potenciométrico. De la cantidad de ión cérico se calcula la cantidad de alcohol.

D. G. Eeckhaut (19) en sus investigaciones afirma que los vinos ya sean preparados con uvas no maduras o de mostos que han estado expuestos a la acción de los metales Al, Fe, Fe galvanizado o Cu estañado, todos ellos dan resultados negativos en la prueba de Litterscheid para sorbitol. Se descarta así la posibilidad de que los vinos genuinos puedan contener sorbitol proveniente de las uvas no maduras o de la reducción de la fructosa.

El método de Litterscheid es más sensible que el de Wrdler pues da, según Eeckhaut, un precipitado del producto de condensación no menor de 30 mg con 100 ml de vino de uva conteniendo 5% de jugo de frutas. Además los vinos que contienen con

tidades no mayores de 10 g de azúcar por litro pueden ser analizadas directamente; el exceso de azúcar de los vinos dulces se debe eliminar por fermentación de la muestra, neutralizada al rojo de metilo, con levadura a 27° durante 48 horas. Como ensayo confirmatorio el sorbitol puede ser recuperado y convertido en hexaacetato (P.F. 99°) para luego identificarlo: el producto condensado precipitado (100 mg) se disuelve en 5 gotas de metanol y calienta a bañomaria en un tubo de 40 ml, bajo reflujo, durante 15 minutos con 2 ml de ClH (d: 1,19); después de enfriar agregar 2 ml de agua y extraer el líquido con dos porciones de 5 ml de éter. La capa acuosa filtrada es evaporada a sequedad en bañomaria en el tubo de 40 ml bajo presión reducida (bomba de agua). El residuo es acetilado en la forma standard y el derivado acetilado purificado y seco a 60° para determinar el punto de fusión.

Dan W. Stewart (20) en 1955 desarrolla una técnica en la que utiliza el o-clorobenzaldehído, con la que es posible investigar el agregado de un 5% de sidra en vino. Es la siguiente: Se destila el alcohol de 100 ml de vino. El resto se neutraliza exactamente y trata con 5 ml de una solución de acetato neutro de plomo al 40%. Se lleva a 100 ml, agita y filtra. El filtrado se recibe en recipiente que contiene 1 g de oxalato de potasio seco. Después de agitar bien se filtra y evapora en bañomaria hasta tener 4 ml y se pasa a una probeta de 25 ml con tapa y lleva a 6 ml con agua. Se agrega dos volúme

nes de ClH (d:1,18) agitando y 4 gotas (aprox. 0,17 g) de e-clorobenzaldehido. Después de agitar fuertemente durante 1 minuto se deja en la oscuridad y después de $\frac{1}{2}$ hora se vuelve a agitar y deja en reposo toda la noche. Se pesa un papel Whatman 42 en vaso de precipitado de 20 ml y se filtra por él la solución. El filtrado se recibe en otra probeta con tapa que contiene 4 gotas de 8-clorobenzaldehido y se agita. Se lava la primera probeta y el papel de filtro 5 veces con 2 ml de agua y se desecha el filtrado. El líquido de la segunda probeta después de reposar 6 horas en la oscuridad se filtra a través del mismo papel y lava el precipitado y probetas con un total de 50 ml de agua seguido por 50 ml de alcohol metílico. El papel con el precipitado lavado se coloca en el vaso de precipitado con 20 ml, coloca en estufa durante $\frac{1}{2}$ hora enfría y pesa.

Los resultados son los siguientes:

Vinos	Sorbitol % ml
Burdeos tinto, 100 ml	2 mg
Burdeos blanco, 100 ml	2 mg
Burdeos blanco 50 ml y tinto 50 ml	0 mg
Burdeos tinto 95 ml sidra 5 ml	12 mg
Burdeos blanco 95 ml sidra 5 ml	12 mg
Burdeos tinto 95 ml sidra 5 ml	15 mg
Burdeos blanco 95 ml sidra 5 ml	3 mg

France Mecca (21) de la Universidad de Milán elabora en 1956 un procedimiento analítico para determinar algunos caracteres químicos que permiten diferenciar mostos de uva y mostos de frutas y también a sus derivados (vines, vinagres), basados en la oxidabilidad del ácido periodico. Define así un índice de oxidabilidad periodica (mg de glucosa/litro) que para un vino genuino tiene un valor medio de 1271 y para un vino de fruta, 3370; para vinagres, 463 mientras que para los vinagres de frutas el índice tiene un valor medio de 3440.

Los fundamentos del método son los siguientes:

Los azúcares fermentescibles son eliminados por simple fermentación con levadura de cerveza.

Los ácidos orgánicos se separan por defecación con acetato básico de plomo y eliminan por filtración.

Los azúcares no fermentescibles se separan de la glicerina en cuanto, tratados con una solución de sulfato de cobre y de hidróxido de calcio forman complejos insolubles en agua separables por filtración.

Los polialcoholes se comportan de un modo análogo a los azúcares no fermentescibles por lo cual, el precipitado redisolto y titulado con ácido periodico da la cantidad de pentosas, alcoholes polivalentes y sacaridos oxidables presentes.

La técnica para determinar el índice de oxidabilidad de un vino es la siguiente:

A 25 ml de vino se agrega 50 ml de una solución de levadura de cerveza al 10% y coloca en termóstato a 30°C durante

Muestra	Grado Alcohol. % vol.	Alcohol a ferva. completa % vol.	Extracto seco	Cenizas g/litro	Indice de oxidabilidad periodica
Vino Chianti	11,2	11,8	22,5	2,5	1.200
" bardolino	11,5	12	23	2,5	1.000
" uva seca	13	13,5	30	3	1.400
" zona Cremona	10,5	11	25	2,5	1.300
" zona Mantova	10,5	10,8	25	2,5	1.200
" Pavese	11	11,2	23	2,9	1.200
" Pavese	6	12	25	2,6	1.280
Mesto Modena	-	10,5	21	2	1.500
Vino Reg. Emilia	8	9	26	3	1.500
" " 2	9	9,5	26	3	1.500
" Modena	10	10,5	25	3	1.300
" "	9,5	10	25	3	1.100
" Bergamo	11	11,5	25	3	1.300
" Moscato Alba	7,5	12	19,5	2	<u>1.100</u>
Valor medio					1.271

Muestra	Grado Alcohol. % vol.	Alcohol a feru. completa % vol.	Extracto seco g/litro	Cenizas g/litro	Indice de oxidabilidad periodico
Vino de higos	3	3,5	15	2	2.500
" de higos	2,5	3	16	2	2.340
" higos secos	0,5	3	15	2,2	2.350
Sidra(vino de peras)	vestig.	7,3	20	3	5.050
Vino de carrube	5	5,5	30	3	3.000
Sidra (vino de miel)	4	4,5	25	2,8	4.850
Vino de dátiles	vestig.	4	22	2,5	<u>3.500</u>
Valor medio					3.370

una noche.

Se agrega 5 ml de una solución de acetato básico de plomo (d:1,26-1,28), filtra y lava el precipitado. Al filtrado se agrega 5 ml de solución de carbonato de amonio al 20% para eliminar el exceso de sal de plomo. Se filtra y lava el precipitado con agua. El filtrado colocado en cápsula se lleva a sequedad en bañomaria.

Se agrega al residuo un poco de agua y 20 ml de solución de SO_4Cu al 10% y 20 ml de una suspensión de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 10%. Se deja en contacto durante 10-15 minutos y filtra con bomba de agua y lava el precipitado con aproximadamente 200 ml de agua.

El precipitado se disuelve con 20 ml de SO_4H_2 diluido y se filtra el sulfato de calcio formado recogiendo el filtrado en un matraz aforado de 100 ml y se enrasa,

Se toma 40 ml de la solución, agrega 50 ml de ácido periodico 0,1 N (12,5 g IO_4K en matraz aforado de 1.000 ml con 400 ml de agua y 25 ml de SO_4H_2 conc., disuelto previamente en bañomaria, y llevado a volumen con agua). Se deja en reposo 15-20 minutos y agrega 10-15 g de bicarbonato de sodio y 60 ml de anhídrido arsenioso 0,1 N y 10 ml de solución de TK al 30% y se deja nuevamente en contacto por 15-20 minutos y titula con I 0,1 N. Indicador, solución de almidón.

Aparte se efectúa una prueba en blanco: 8 ml de SO_4Cu al 10%, 50 ml de IO_4H 0,1 N, aproximadamente 10g de CO_3HNa 60 ml de anhídrido arsenioso 0,1 N y 10 ml de TK al 30%. Se

deja en reposo 15 minutos y titula con I 0,1 N.

La diferencia entre los ml usados primeramente y los de la prueba en blanco multiplicados por 180 expresa el índice de oxidabilidad (180 es el peso medio convencional que el autor atribuye a los polialcoholes oxidados por el ácido periódico).

En el año 1957 K. Taufel y K. Müller (22) publican un método cuali-cuantitativo para el sorbitol en el que se aplica cromatografía.

Estos autores utilizan para la determinación papel Schleicher y Schull 2040 a y desarrollan el cromatograma con butanol-acetona-agua según técnica de desarrollo múltiple (2.24 horas) y método descendente.

Para el revelado de sorbitol y azúcares emplean el reactivo de Wolfrom y Miller y para azúcares el constituido por difenilamina-anilina-ácido fosfórico.

En la técnica de Wolfrom y Miller el cromatograma desecado al aire se nebuliza con una solución acuosa de periodato de sodio al 1%. Se deja actuar 3-4 minutos y luego se nebuliza con solución reciente de MnO_4K al 10%. Aproximadamente a los 5 minutos en los lugares del azúcar y hexitas aparecen manchas de color marrón de MnO_2 . El exceso de permanganato se separa lavando con agua. El cromatograma desecado al aire se revela con el reactivo a la bencidina de la siguiente composición:

1 g de bencidina, 9 g de ácido tricloroacético, 20 ml

de ácido acético glacial y 160 ml de alcohol absoluto. Se forma manchas azules debido a la oxidación de la benecidina por el MnO_2 .

El límite de sensibilidad de esta técnica es, según Wolfram, de 0,0005 mg de sorbitol.

Para la determinación cualitativa utilizan 0,05 ml de vino y permite reconocer en cortes de vinos de uva hasta 1% de vinos de fruta, lo que permite separar las muestras sospechosas que luego pueden someterse al análisis cuantitativo.

La determinación cuantitativa la efectúan por el micro método de Rappaport, por oxidación con metaperiodato. La técnica es la siguiente:

En un erlenmeyer de 50 ml se coloca 5 ml de la solución de sorbitol (entre 0,1 a 0,5 mg de sorbitol). Se agrega 5 ml de solución de metaperiodato al 1%. y 2 ml de SO_4H_2 al 5%. La mezcla se calienta en bañomaria hirviente durante 20 minutos. Después de enfriar se neutraliza con NaOH frente a la fenolftaleína y agrega 5 ml de solución buffer (120 g de acetato de sodio en solución acuosa y 5,8 ml de SO_4H_2 conc. y se lleva la mezcla a 1000 ml) y IK. Se mezcla y titula con $S_2O_3Na_2$ 0,005 N utilizando solución de almidón como indicador.

Se efectúa además un ensayo en blanco reemplazando la solución de sorbitol por agua destilada.

Los mg de sorbitol contenidos en la muestra están dados por la fórmula: $(A-B) \cdot 0,094$, siendo A y B los ml

empleados en el blanco y la muestra respectivamente.

Taufel y Muller recuperan con esta técnica el $91,2\% \pm 3\%$ de la hexita. En el cálculo emplean el factor correspondiente: $100/91,2$.-

IDENTIFICACION DEL SORBITOL POR VIA CROMATOGRAFICA Y SU VALORACION IODOMETRICA.

K. Taufel y K. Muller (22) afirman que la identificación de sorbitol contenido en los vinos puede efectuarse mediante el desarrollo cromatográfico. A pesar de que el valor de su R_f es casi idéntico al de la glucosa, su identificación es posible por el revelado con un reactivo para los distintos azúcares como hidrotalato de anilina o difenilamina-anilina-ácido fosfórico y que no revela la presencia de sorbitol.

Por otra parte, las reacciones cromatográficas para la hexita dan resultados positivos también para la glucosa.

Estas circunstancias obligan a eliminar por fermentación los azúcares fermentescibles con el objeto de simplificar la identificación de sorbitol. Después de fermentar los azúcares no hace falta otro tratamiento previo.

La separación de sorbitol de otras hexitas como dulcita, manita e idita mediante la diferenciación cromatográfica sobre papel no es posible. Esto debe tenerse en cuenta en el examen de vino con fermentación manítica.

La presencia de manita puede ponerse en manifiesto dejando evaporar espontáneamente parte del líquido eluido del cromatograma sobre un portaobjeto. En presencia de manita se forman, visibles por observación directa, cristales en forma de agujas, mientras que en presencia de sorbitol se obtiene un residuo amorfo no cristalino.

En el presente trabajo se separa e identifica el sorbitol contenido en el vino por cromatografía teniendo en cuenta las consideraciones efectuadas por Taufel y Muller.

El desarrollo del cromatograma se realiza sobre papel Whatman Nº1 y utilizando una solución constituida por butanol normal, acetona y agua en la proporción 4:5:1, según método descendente y en 24 horas. Se elimina previamente la glucosa por fermentación con levadura de cerveza.

Para la identificación conjunta de sorbitol y azúcares se utiliza la técnica de Trevelyan cuyo límite inferior de sensibilidad es de 0,5 microgramos de sorbitol.

Para revelar la presencia de glucosa y otros azúcares se emplea difenilamina-anilina-ácido fosfórico, siendo el límite inferior de sensibilidad hallado de 6 microgramos de glucosa.

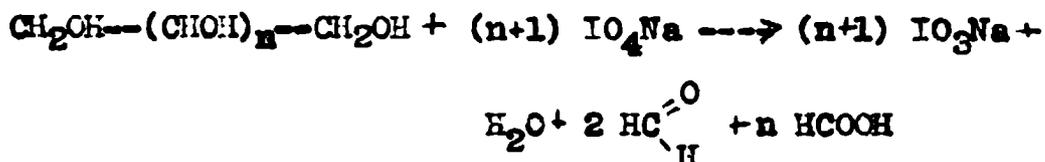
Aislado el sorbitol de los otros componentes del vino mediante el desarrollo cromatográfico sobre papel, se separa la porción del mismo que lo contiene y procede a su elución con agua destilada.

En el líquido eluido se determina cuantitativamente el sorbitol.

El procedimiento utilizado para ello es el volumétrico, oxidimétrico, mediante periodato que fué iniciado por Malaprade y ampliado especialmente por Rappaport, Reifer y Weinman para compuestos polihidroxiados, difundiéndose ampliamente y con buen resultado en la determinación cuantitativa

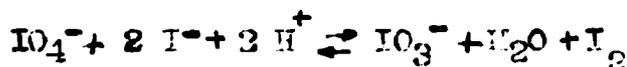
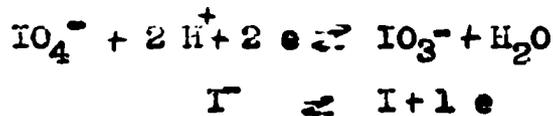
de alcoholes polivalentes.

El método de Rappaport y colaboradores para la determinación de sorbitol se basa precisamente en su oxidación con el metaperiodato de sodio según la reacción general:

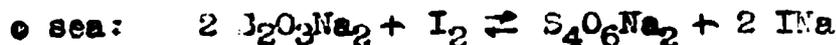
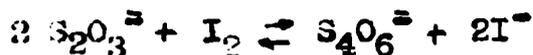
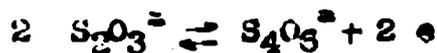


De acuerdo con esta reacción el sorbitol consume 5 moles de periodato con formación de 2 moles de aldehído formico y 4 moles de ácido formico.

Una vez oxidado el sorbitol se determina el exceso de periodato por iodometría:



Luego:



Al mismo tiempo se efectua el ensayo en blanco que consiste en una valoración iodométrica de un volumen igual de la solución de metaperiodato pero sin el agregado de la muestra que es reemplazada por agua destilada.

Por diferencia de de los volúmenes de la solución de tiosulfato empleados en este ensayo en blanco y en la muestra se conoce el volumen de periodato utilizado en la oxidación.

Los mg de sorbitol contenidos en la muestra se obtienen multiplicando dicha diferencia por 0,047. Este factor se obtiene dividiendo por dos el factor utilizado por Taufel y Muller.

PARTE EXPERIMENTAL

TECNICA PROPUESTA PARA LA DETERMINACION CUALI-CUANTITATIVA DE SORBITOL.

a) Técnica para la eliminación del azúcar fermentescible de los vinos.

En un vaso de precipitación de 250 ml se mide con pipeta 200 ml de la muestra y se evapora en bañomaria hasta la mitad de su volumen. Se lleva con agua destilada a su volumen primitivo en matras aferado y se procede a fermentar.

En un erlenmeyer de 250 ml se mezcla 150 ml de la muestra ya preparada con 8 gramos de levadura de cerveza. Se pesa y coloca en un termóstato a 30°C durante 2 horas, siempre aspirando aire a través de la mezcla. Luego se repone el agua perdida por evaporación hasta el peso inicial.

La solución así preparada y clarificada mediante filtración o centrifugación se emplea para las determinaciones cuali-cuantitativas mediante cromatografía de papel.

b) Técnica cromatográfica.

Se utiliza papel Whatman N°1 de 36 cm de largo, estando la línea de base a 9 cm del extremo de la tira de papel.

El desarrollo del cromatograma se realiza con butanol n-acetona-agua (4:5:1) según método descendente, en 24 horas y dentro de una cuba saturada con el mismo líquido de desarrollo.

El revelado del cromatograma se efectúa con el reactivo d de Trevelyan y el de la difenilamina cuyas composiciones son

las siguientes:

Líquido de revelado de Trevelyan (24) (glucosa y sorbitol):

1) Reactivo de Trevelyan

0,1 ml solución saturada de NO_3Ag en agua destilada.

Se agrega 20 ml de acetona y luego agua destilada gota a gota hasta redisolución del precipitado.

2) Solución de NaOH 0,5 N en etanol

1 ml de solución de NaOH al 40 % en 20 ml de etanol.

3) Solución de $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 0,1 N

El revelado de este reactivo se efectúa de la siguiente manera:

El cromatograma ya desarrollado y seco se impregna con el reactivo de Trevelyan colocado en una cubeta y se deja secar al aire hasta desaparición del olor a acetona. Luego se pasa por la solución alcohólica de NaOH hasta aparición de las manchas y se lava con agua corriente, se pasa a continuación por la solución de tiosulfato de sodio, se lava y deja secar.

Líquido de revelado a la difenilamina (23) (glucosa):

Solución alcohólica de anilina al 4% 5 vol.

Solución alcohólica de difenilamina al 4% .. 5 "

Acido fosfórico siruposo 1 "

Una vez pulverizado el cromatograma en sus dos caras con este reactivo, calentar en estufa a 80°C durante 10 minutos. En presencia de glucosa aparece una mancha azul que con el tiempo pasa a azul verdosa.

c) Identificación cualitativa.

La identificación cualitativa se realiza sobre dos tiras de papel Whatman N°1 de 36 cm de largo.

En una de ellas se siembra 0,01 ml de las muestras de vino antes y después de fermentar. El cromatograma correspondiente se revela con el reactivo de Trevelyan. La reacción positiva indica, en la zona correspondiente, la presencia de glucosa y o sorbitol.

En la otra tira de papel se siembra 0,1 ml de las mismas muestras. El revelado se efectúa con el reactivo de la difenilamina que da resultado positivo, si esta presente la glucosa, para la muestra sin fermentar y debe ser negativo para la fermentada.

d) Determinación cuantitativa del sorbitol.

Se hace cromatografía sobre una tira de papel Whatman N°1 de 36 cm de largo y 11,5 cm de ancho.

El volumen de la muestra, previamente fermentada, que se siembra depende de la cantidad de sorbitol presente. Dicha cantidad puede apreciarse en forma aproximada por el tamaño y colocación de la mancha en el ensayo cualitativo.

En la línea de base se aplica tres manchas: en el centro la del vino en análisis que se extiende unos 4 cm sobre dicha línea y a los costados de la misma los ensayos con sorbitol.

Desarrollado el cromatograma se corta la zona correspon-

diente al sorbitol contenido en el vino determinada por comparación con los ensayos de sorbitol previamente separados y revelados con el reactivo de Trevelyan. El cromatograma se corta a 1 cm por encima y por debajo de la mancha.

La elución se realiza en pequeños tubos de aproximadamente 5 ml de capacidad en donde se coloca el trozo de papel. Se agrega 2 ml de agua destilada y calienta en bañomaria durante 15 minutos. Al mismo tiempo se hace la elución en blanco utilizando un trozo de papel Whatman del mismo tamaño que el de la muestra,

El líquido eluido se pasa a un erlenmeyer de 50 ml y se lava el tubo tres veces con 1 ml de agua destilada caliente.

Sobre el eluido se determina el sorbitol cuantitativamente por el método de Rappaport.

Micrométodo de Rappaport.

Reactivos

- 1) Aproximadamente 1 gramo de IO_4K cristalizado se disuelve en 800 ml de agua calentando a bañomaria si es necesario, Una vez disuelto se deja enfriar y coloca en matras aforado de 1.000 ml y enrasa con agua destilada.
- 2) SO_4H_2 al 5 %: 2,9 ml de SO_4H_2 conc. (d 1,34) se diluye con agua destilada hasta 100 ml.
- 3) Solución buffer: 120 g de acetato de sodio se disuelve en agua, se agrega con cuidado 5,8 ml de SO_4H_2 conc. y se lle

va la solución a 1.000 ml.

- 4) IK purísimo.
- 5) Solución de almidón al 0,25 %.
- 6) Solución de $S_2O_3Na_2$ 0,0025 N.

Técnica.

En un erlenmeyer de 50 ml se coloca 5 ml de solución de sorbitol (entre 0,02 a 0,3 mg de sorbitol). Se agrega 2,5 ml de solución de metaperiodato y 1,5 ml de SO_4H_2 al 5 %. La mezcla se calienta a bañomaria hirviendo durante 20 minutos. Después de enfriar se neutraliza con NaOH normal frente a la fenolftaleína (1 gota) y agrega 3,5 ml de la solución buffer $\frac{1}{2}$ IK. Se titula con solución de tiosulfato de sodio 0,0025 N.

Cálculo:

$$\text{mg de sorbitol} = (A-B) \cdot 0,0047$$

Siendo

A: ml $S_2O_3Na_2$ 0,0025 N empleados en el blanco.
 B: ml " " " " la muestra.

La fermentación se debe efectuar con levadura fresca, del día.

Cromatogramas para la identificación cualitativa.

Cromatograma 1.- Cromatograma de sidra antes y después de fermentar.

Cantidad de sidra empleada: 10 lambdas.

Líquido de revelado: Reactivo de Trevelyan.

Nº en el punto de partida:

1. Sidra sin fermentar.
2. Sidra fermentada.
3. Glucosa y levulosa.

Cromatograma 2.- Cromatograma de vino antes y después de fermentar.

Cantidad de vino empleada: 10 lambdas.

Líquido de revelado: Reactivo de Trevelyan.

Nº en el punto de partida:

1. Vino sin fermentar.
2. Vino fermentado.
3. Glucosa y levulosa.

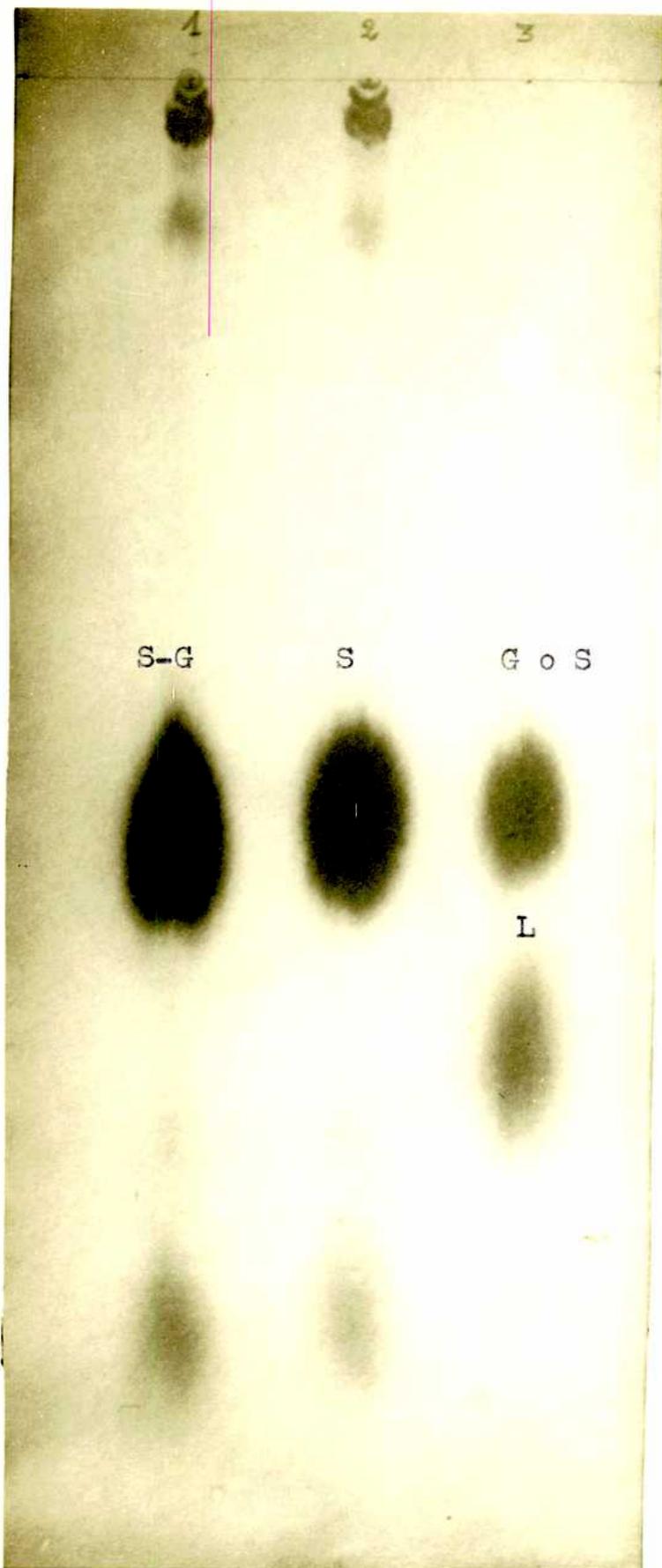
Cromatograma 3.- Cromatograma de vino mezclado en distintas proporciones con sidra.

Cantidad de vino empleada: 10 lambdas.

Líquido de revelado: Reactivo de Trevelyan.

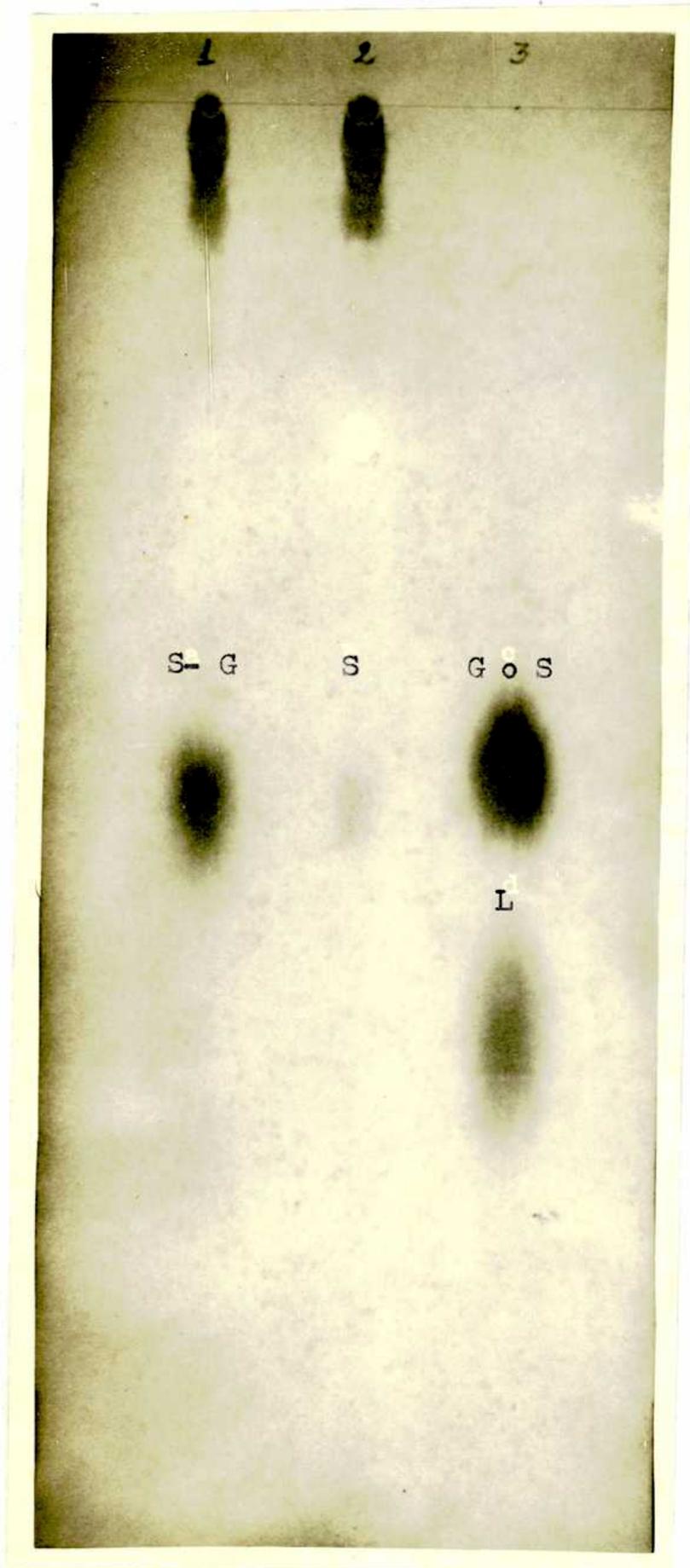
Nº en el punto de partida:

1. Sidra fermentada.
2. Vino fermentado.
3. Vino fermentado 5 % de sidra.
4. Vino fermentado 10 % de sidra.



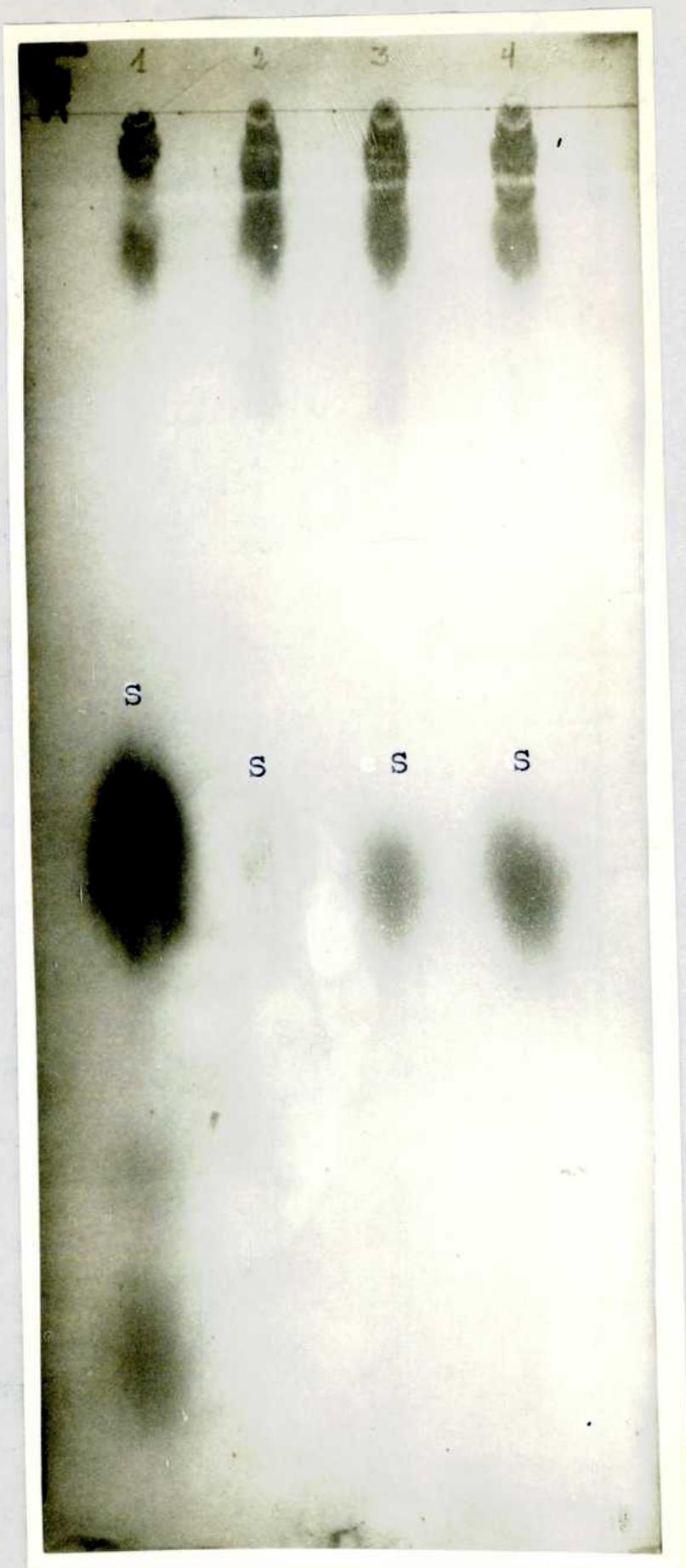
Cromatograma 1

S: sorbitol
G: glucosa
L: levulosa



Cromatograma 2

S: sorbitol
G: glucosa
L: levulosa



Cromatograma 3

S : sorbitol

Ejemplo de determinación cuantitativa de sorbitol.

Muestra	Fosulfato 0,0025 N ml	Promedio ml	Sorbitol mg 5 ml
Blanco	8,20		
"	8,20	8,20	
0,2 ml	7,15		
"	7,20	7,17	<u>24,20</u>
Blanco	8,20		
"	8,20	8,20	
0,2 ml	7,25		
"	7,15	7,20	<u>23,80</u>

Porcentaje de sorbitol en un vino tinto.-

Ejemplo de determinación cuantitativa de sorbitol.

Muestra	Tiosulfato 0,0025 N ml	Promedio ml	Sorbitol mg % ml
Blanco	8,15		
"	8,50		
"	8,30	8,32	
0,2 ml	7,30		
"	7,20	7,25	<u>95,14</u>
Blanco	8,50		
"	8,60		
"	8,50	8,53	
0,1 ml	8,15		
	7,35	8,00	<u>94,91</u>

Porcentaje de sorbitol en un vino clareta.-

**RESULTADOS OBTENIDOS APLICANDO EL METODO CROMATOGRAFICO-
IODOMETRICO PROPUESTO.**

Muestra	Sorbitol mg % ml
Vino Clarete	24,7
Vino Clarete (*)	25,0
Vino Tinto (*)	23,8
Vino Tinto al descube (*):	
Vino de gota	23,0
Vino de prensa	24,9
Vino Tinto (*) + 5 % de sidra	47,9
Vino Tinto (*) + 10 % de sidra	62,5
Vino Tinto	62,0
Vino Tinto 100 ml + 5 mg sorbitol	61,9
Vino Tinto 100 ml + 10 mg sorbitol	71,7
Vino Tinto 100 ml + 15 mg sorbitol	75,9
Vino Tinto 100 ml + 20,mg sorbitol	77,6
Sidra	220,7
Sidra	399,5
Solución de sorbitol 20 mg %	
1ra. determinación	20,4
2da. determinación	19,5

(*) Vino elaborado en la Facultad de Agronomía y Veterinaria.

CONCLUSIONES

- 1.- Continuando con la investigación de métodos para la determinación de la presencia de sorbitol en vinos genuinos y su valoración ulterior se estudia en particular el procedimiento indicado por K. Taufel y K. Muller, por oxidación con metaperiodato del producto previamente aislado por cromatografía sobre papel.
- 2.- Se propone la utilización del papel Whatman N°1 en reemplazo del papel Schleicher y Schull 2040 a para el desarrollo de la técnica cromatográfica, método descendente, proposición ésta que reduce el tiempo de desarrollo del cromatograma a 24 horas.
- 3.- Se propone para el revelado de sorbitol y glucosa al reactivo de Trevelyan en reemplazo del de Kolff y Muller que no da buenos resultados. Su límite de sensibilidad, para la hexita, es de 0,5 gammas.
- 4.- En cuanto a la glucosa, sustancia que tiene un valor de R_f igual al del sorbitol, se verifica su ausencia con el reactivo constituido por difenilamina-anilina-ácido fosfórico cuyo límite de sensibilidad para dicho producto es de 6 gammas. Este ensayo debe dar resultado negativo.
- 5.- Se propone el método de Rappaport, oxidación con metaperiodato y ulterior valoración iodométrica, para la determinación cuantitativa de la hexita pero utilizando volúmenes

menores de reactivos que en el método de Taufel y Muller y titulando con solución de tiosulfato de sodio 0,0025 N.

- 6.- Con las modificaciones propuestas al método de Taufel y Muller se valora muestras que pueden contener de 0,02 a 0,3 mg de sorbitol.
- 7.- La aplicación del método propuesto a varios vinos genuinos no solo permite confirmar la presencia de sorbitol en los mismos sino también afirmar que su contenido es bastante mayor que el determinado por los métodos basados en la condensación con benzaldehído o sus derivados.
- 8.- Los ensayos de recuperación del sorbitol agregado a un vino al cual se ha determinado previamente su contenido de dicha hexita dieron los resultados que se indican a continuación:

Muestra	Teórico	Recuperado	Error
Vino	62,0		
Vino 100 ml + 5 mg sorbitol	67,0	61,9	7,6 %
Vino 100 ml + 10 mg sorbitol	72,0	71,7	0,4 %
Vino 100 ml + 15 mg sorbitol	77,0	75,2	1,4 %
Vino 100 ml + 20 mg sorbitol	82,0	77,6	5,4 %

Los valores están dados en mg % ml.

Para hacer estos ensayos se emplearon 0,2 ml de muestra.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Werder, J. - Mitt. Lebensm. Hyg. 1929, 20, 7-14.-
- (2) Werder, J. - Mitt. Lebensm. Hyg. 1930, 21, 121-3
- (3) Haid, R., Popberger F. - Expt. Sta Klosterneuburg,
Denkschrift 1930, 90, 3.-
- (4) Zach, C. - Mitt. Lebensm. Hyg. 1930, 21, 123-30.-
- (5) Diemar, W., Lix, G. - Z. Untersuch Lebensmitt 1930, 60,
304-10.-
- (6) Elever, B., Diemar, W., Lix, G. - Z. Untersuch Lebensm.
1931, 62, 297-303.-
- (7) Elever, B., Diemar, W., Lix, G. - Z. Untersuch Lebensm.
1932, 64, 337-48.-
- (8) Elever, B., Diemar, W., Lix, G. - Z. Untersuch Lebensm.
1933, 65, 37-41.-
- (9) Litterscheid, F. H. - Z. Untersuch. Lebensm. 1931, 62,
653-7.-
- (10) Reif, G. - Z. Untersuch Lebensm. 1933, 66, 408-12.-
- (11) Schätzlein, Ch., Sailer, E. - Z. Untersuch Lebensmitt
1935, 70, 484-8.-
- (12) Desbusses, J. - Mitt. Lebensm Hyg. 1946, 37, 396-407.-
- (13) Tarantola, C., Strada, M. - Riv. Vitic. e Enol. 1948,
1, 284-90, 323-3.-
- (14) Mortara, P. - Riv. Vitic. e Enol. 1949, 2, 301-5.-

- (15) Gentilini, L., Cappelleri, G. - Ann. Spec. Agrar. (Roma)
1950, 4, 1069-76.-
- (16) Garino-Canine, E., Falchi, P. - Ann. Spec. Agrar. (Roma)
1951, 5, 1121-38.-
- (17) Seria, G. - Annales des falsifications 1951, 44, 425.-
- (18) Takashi, T., Kinoto, K., Minami, S. - J. Chem. Soc.
Japan, Ind. Chem. Sect. 1952, 55, 115-16.-
- (19) Beckhart, R. G. - Fermentatic 1952, pag. 155-62.-
- (20) Stewart, D. W. - J. Sci. Food Agric. 1955, pag. 387.-
- (21) Mecca, E. - La Chimica e l' Industria 1956, 33, 1020.-
- (22) Saffel, K., Muller, K. - Zeitschrift fur Lebensmittel-
Untersuchung und Forschung
1957, 106, 123-23.-
- (23) Buchan, J. L., Seyage, R. - The Analyst 1952, 77, 401-5.-
- (24) Travelyan, M. F., Procter, D. E., Harrison, J. S.
(Distiller Co., Ltd. Epsom, Surrey, Engl.)
Nature 1950, 166, 444-5.-

LIBROS CONSULTADOS

Lederer, E., Lederer, H. - Chromatography
Cramer, Friedrich. - Cromatografia sobre papel.
Feigl, F. - Qualitative Analysis by Spot Test.

[Handwritten signature]

Giuseppe Bianchi

INDICE

Revisión Bibliográfica	pag. 1
Identificación de sorbitol por vía cromato- gráfica y su valoración iodométrica	" 18
Técnica propuesta para la determinación cuali-cuantitativa de sorbitol	" 22
Resultados obtenidos	" 33
Conclusiones	" 34
Bibliografía	" 36