

METALES EN LOS VINOS

INTRODUCCIÓN

Los metales que se encuentran en el vino pueden provenir de la uva, así como también de la maquinaria que se utilice, ya que el mosto y el vino atacan los metales.

Un alto contenido de metales en el vino puede provocar enturbiamientos ya que estos se insolubilizan quedando afectados el color o limpidez de los vinos (quiebra o casse). Según su solubilidad, los metales pueden dividirse en tres categorías:

- 1 - fácilmente solubles, como el Fe y el Zn.
- 2 - difícilmente solubles, como el Cu, Al y Pb.
- 3 - prácticamente insoluble como el Sn, Ag, acero inoxidable, aleaciones de cobre y zinc.

Estas alteraciones que se producen en los vinos a causa de los metales se dan en ciertos casos en potenciales oxidativos y en otros en reductivos.

Para evitar estos problemas se sugieren ciertos tratamientos como por ej. con el ácido cítrico, con polifosfatos, con ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), productos con los cuales los metales se combinan formando complejos y evitando así la quiebra. Otra forma de protección sería por el agregado de sustancias al estado coloidal que evitan la insolubilización del Fe y Cu como ser la goma arábiga. Una tercera forma, que es la más común, es la eliminación de los metales haciéndolos precipitar al formar compuestos insolubles con ciertas sustancias como ser el ferrocianuro de potasio, o el fitato; también se ha estudiado la eliminación de los metales por el uso de resinas de intercambio iónico.

DESMETALIZACIÓN

El exceso de metales en los vinos puede provocar alteraciones de color por lo que al existir una cantidad elevada de ellos deberán eliminarse haciéndolo precipitar formando sales insolubles con ferrocianuro de potasio ($K_4Fe(CN)_6$). El ferrocianuro de potasio es un compuesto que puede presentarse en forma anhidra, siendo su PM = 368.34 g/mol, o puede presentarse hidratado conteniendo hasta 3 moléculas de agua, variando así su peso molecular. Es de aspecto cristalino, de color amarillo, disolviéndose fácilmente en agua (22.5 g/100 mL a 20°C).

En ciertas condiciones y por acción de los ácidos minerales diluidos o de ácidos orgánicos en caliente, pueden generar ácido cianhídrico, el que es altamente venenoso siendo mortal en dosis de 60 mg.

El ferrocianuro desarrolla en el vino una acción química compleja dando como resultado la insolubilización y precipitación de los metales (Zn, Cu, Fe y Mn) en distintas proporciones. Como el Fe se encuentra en el vino bajo forma ferrosa y férrica, se combina de distinta manera según su estado de oxidación.

El ferrocianuro de potasio en medio ácido y con cierta dosis de hierro da compuestos denominados azul de Turnbull que es la sal ferrocianuro ferroso ($Fe_2[Fe(CN)_6]$) el cual no se combina en proporciones definidas, y azul de Prusia que es la sal ferrocianuro férrico ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$), y con el cobre da lugar a un compuesto insoluble de color pardo rojizo llamado rojo de Van Dyck.

Pero en el caso de la clarificación azul no interesa la cantidad de uno u otro que se formen sino que se formen compuestos insolubles que dan origen a disoluciones coloidales cuyo tamaño de partícula oscila entre 0.1-0.001 μ .

La incorporación del ferrocianuro de potasio al vino hace que se formen coloides negativos de las sales de ferrocianuro con los distintos metales, de ahí la necesidad de introducir cierta cantidad de coloide pero positivo como son los clarificantes proteicos para que ambos formen flóculos que sean más rápidos de sedimentar, fácil de filtrar y lo más hidrófobo posible para que haya las menores pérdidas por absorción. De no ser así el ferrocianuro asociado a los metales tendría que adaptarse a un medio que en parte los estabiliza con los taninos, pectinas y gomas, y cuya precipitación es muy lenta.

Se debe calcular la cantidad exacta de ferrocianuro a agregar al vino a tratar, ya que un exceso de éste puede formar ácido cianhídrico el cual es tóxico (60 mg), tratando en lo posible por lo tanto, de no eliminar totalmente los metales.

Para calcular la cantidad de ferrocianuro a agregar se tienen dos técnicas:

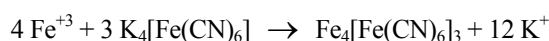
- 1- ferrómetro de Hubert.
- 2- clarificación azul.

FERRÓMETRO DE HUBERT

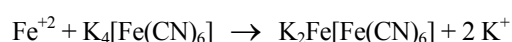
Es un tubo de vidrio que se afina en la parte inferior la cual está graduada y en la que se leerá el precipitado formado. En él se colocan 50.00 mL de vino agregando 3 o 4 gotas de ferrocianuro de potasio en solución al 10%, se agita y se deja en posición vertical durante 24 horas, al cabo de las cuales se lee el precipitado formado.

Para asegurarnos de que no quede ferrocianuro en exceso en el vino se tendrá en cuenta un margen de seguridad que se descontará de la lectura efectuada (3 mg). A dicho resultado se lo multiplica por 6, obteniendo de esta forma los mg de ferrocianuro capaces de hacer precipitar los mg de hierro que contiene el vino, teniendo en cuenta que 1 mg de Fe precipita con aproximadamente 6 mg de ferrocianuro.

La formación de ferrocianuro férrico se da según la siguiente reacción:



El ión ferroso no se combina en proporciones definidas con el ferrocianuro de potasio, sino que conforme a las condiciones del vino forma ferrocianuro ferroso o ferrocianuro de hierro (II) y potasio.



Suponiendo que todo el precipitado formado es de ferrocianuro férrico, tenemos:

$$\text{PM} (\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 422.39 \text{ g/mol}$$

$$\text{PE} (\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = \text{PM}/4 = 105.6 \text{ g/Eq}$$

$$\text{PM Fe} = 56 \text{ g/mol}$$

$$\text{PE Fe} = \text{PM}/3 = 18.67 \text{ g/Eq}$$

Entonces:

$$\begin{array}{r} 105.6 \text{ g ferrocianuro} \text{ -----} 18.67 \text{ g Fe} \\ x \qquad \qquad \qquad \text{-----} 1 \text{ g Fe} \end{array}$$

$$x = 5.65 \text{ g ferrocianuro de potasio}$$

El cálculo para la precipitación del ión ferroso exige 3.78 o 7,56 g de ferrocianuro de potasio según la sal precipitada. De los cálculos anteriores es que surge el factor de 6 que se toma para el cálculo del agregado de ferrocianuro de potasio.

Así por ejemplo si la lectura efectuada en el ferrómetro es de 8 mg (cada raya equivale a 2 mg), restando el margen de seguridad nos quedarán 5 mg de hierro que hay que eliminar. Luego multiplicando por 6 se obtiene la cantidad de ferrocianuro a agregar por litro, siendo en este ejemplo 30 mg/L.

CLARIFICACIÓN AZUL (COLAGE BLUE)

Este método consiste en determinar la cantidad de ferrocianuro a agregar a un vino para lograr la eliminación de exceso de metal en el mismo.

Por este método es imposible determinar solamente la precipitación del hierro o saber el contenido de este metal en el vino; o sea que el fin de la clarificación azul es determinar la cantidad de ferrocianuro a agregar sin determinar cuali o cuantitativamente los metales del vino. Para esto se agregan dosis crecientes de ferrocianuro determinando luego si el agregado ha sido o no excesivo.

SOLUCIONES Y REACTIVOS

- solución de ferrocianuro de potasio al 5%, exactamente pesados (debe guardarse en frasco color caramelo y al abrigo de la luz)
- solución de ferro-ferricianuro de potasio la cual se prepara pesando 5 g de ferrocianuro de potasio y 5 g de ferricianuro de potasio, llevando luego a un volumen de 100 mL de agua destilada.
- solución de alumbre férrico preparada pesando 40 g de alumbre férrico y llevando a 100 mL con agua destilada.
- HCl al 50%
- solución de tanino al 2%. que se prepara disolviendo 200 mg de tanino en agua agregando 12 mL de alcohol de 96° y completando el volumen a 100 mL con agua destilada.
- solución de gelatina al 2%. que se prepara disolviendo 200 mg de gelatina en aproximadamente 20 mL de agua y a una temperatura de unos 25°C, agregando previamente 80 mg de ác. tartárico y 12 mL de alcohol de 96°, luego se lleva el volumen a 100 mL con agua destilada.

PROCEDIMIENTO

1- Prueba preliminar.

Se toman 5 tubos de ensayo colocando 50.00 mL de vino y agregando a cada uno de los tubos dosis crecientes de ferrocianuro de potasio al 5% diluyendo la solución inicial, siendo las dosis 0.50 - 1.50 - 2.50 - 3.50 y 4.50 mL respectivamente.

Se agitan los tubos y se adiciona a cada uno de ellos 5 mL de solución de tanino y 5 mL de gelatina, se agitan los tubos y se esperan unos 10 minutos al cabo de los cuales se filtra, pudiendo sustituir la filtración con un centrifugado, ya que al filtrarse puede ser absorbido parte del reactivo con el papel de filtro o el algodón.

Luego de filtrado se agregan 1 mL de HCl al 50% y se separan el líquido en 2 tubos obteniendo así dos series de tubos; a una serie de tubos se le agregan 3 o 4 gotas de la solución de ferro-ferricianuro de potasio, y a la segunda serie de tubos se le agregan 3 o 4 gotas de alumbre férrico (en la figura 1 puede verse la interpretación de los resultados obtenidos). De esta forma se obtiene una cantidad aproximada de ferrocianuro de potasio necesaria para desmetalizar el vino.

No. de tubo	1	2	3	4	5
Vol. $K_4[Fe(CN)_6]$ agregado (mL)	0.5	1.5	2.5	3.5	4.5
Equivalencia (g/hL)	5	15	25	35	45

Mezclar – Filtrar o centrifugar

Dividir cada tubo en 2 nuevos tubos llamados 1a, 1b; 2a, 2b; etc.

Nuevo No.	1a	2a	3a	4a	5a
test para hierro					
3 gotas de ferro-ferricianuro de potasio					
color azul verdoso es positivo					
Ejemplo	azul verd.	azul verd.	color vino	color vino	color vino
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	metales presentes		metales ausentes		

Nuevo No.	1b	2b	3b	4b	5b
test para ferrocianuro de potasio					
3 gotas de alumbre férrico					
color azul es positivo					
Ejemplo	color vino	color vino	azul	azul	azul
	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
	ferrocianuro ausente		exceso de ferrocianuro		

Figura 1 – Método analítico

2- Prueba principal.

Esta prueba se realiza igual que la anterior, pero tomando como extremos de la escala el rango aproximado obtenido en la prueba preliminar, y haciendo la diferencia de dosis entre cada tubo de 2 décimas.

Los resultados se interpretan como en el caso anterior, determinándose ahora la dosis exacta.

Luego, al igual que cuando se trabaja con el ferrómetro de Hubert, se tendrán en cuenta un margen de seguridad que será igual a 3 g/hL, cifra que deberá restarse a la dosis obtenida en la prueba principal, para asegurarnos de esta forma que no quede exceso de ferrocianuro en el vino.

Cada mL de solución de ferrocianuro de potasio al 5%. se corresponde a 10 g/hL, dado que en las condiciones de trabajo tenemos:

$$\begin{array}{l} 1000 \text{ mL solución} \text{ ----- } 5 \text{ g ferrocianuro} \\ 1 \text{ mL solución} \text{ ----- } x \end{array}$$

$$x = 0.005 \text{ g de ferrocianuro}$$

$$\begin{array}{l} 0.005 \text{ g ferrocianuro} \text{ ----- } 50 \text{ mL vino} \\ x \text{ ----- } 1000 \text{ mL vino} \end{array}$$

$$x = 0.1 \text{ g/L} = 10 \text{ g/hL}$$

Por lo tanto la escala usada en la prueba preliminar corresponderá a un agregado de ferrocianuro de potasio de 5, 15, 25, 35 y 45 g/hL.

Por ejemplo si en la prueba principal se determina un agregado en el rango de 2.70-2.90 mL de solución, entonces la dosis de ferrocianuro será 28 g/hL, a los cuales se le debe restar la cifra de seguridad (3g ferrocianuro/hL) y nos quedará en 25 g/hL.

3- Contraprueba.

Esta prueba se hace para verificar los resultados obtenidos en la determinación de la dosis necesaria de ferrocianuro antes de iniciar el tratamiento de desmetalización, para esto se procede a un ensayo sobre un litro del vino a tratar al cual se le agrega la dosis de ferrocianuro calculada y además se agregan los clarificantes a utilizar en la desmetalización. Luego de estos agregados se agita el vino y se deja reposar durante 12 horas, al cabo de las cuales se verifica el exceso de metal o ferrocianuro en el vino, si este último diera positivo debe realizarse nuevamente el ensayo hasta que la contraprueba de un exceso de metales.

Para la contraprueba no es necesario filtrar el total del vino sino que es suficiente con unos 50 mL de filtrado.

HIERRO

Se encuentra en el vino en pequeñas cantidades, pudiendo tener dos orígenes:

1- provenir de la uva encontrándose de 2 a 5 mg/L de mosto.

2- proceder de la tierra que puede ensuciar las uvas o del material metálico de vinificación o que se utilice para su manipulación y transporte, así como también para su conservación.

En los vinos conservados fuera del contacto del aire al ser el medio reductor el hierro se encuentra como ión ferroso (Fe^{2+}), forma que es soluble en el vino aún en concentraciones elevadas. Pero en el vino que contiene oxígeno disuelto por ejemplo por una aireación, el hierro se oxida pasando a la forma férrica (Fe^{3+}) que es insoluble, capaz de precipitar con la materia colorante o con el ác. fosfórico.

Cuando precipita con materia colorante se produce lo que se llama quiebra azul, mientras que cuando precipita con el ác. fosfórico se produce la quiebra blanca. Estos dos tipos de quiebras pueden aparecer cuando el hierro se encuentra en una cantidad de 10 a 20 mg/L.

Otro factor que influye en la producción de la quiebra es el pH, considerándose un pH óptimo para la quiebra blanca entre 2.9 y 3.6, pudiéndose dar la quiebra azul a un pH más elevado (ver Figura 2).

El hierro se combina con moléculas existentes en el vino que contienen la función alcohol, así el ác. málico y cítrico forman complejos bastante estables, de donde puede considerarse al ácido cítrico un protector contra la quiebra férrica.

A continuación se presentan las constantes de formación de los complejos con diferentes ácidos, tomándose como referencia a la constante de formación del complejo con ác. tartárico.

tartárico	1
láctico	2.5
málico	4.5
cítrico	30

El complejo de ión férrico con bitartrato de potasio es el siguiente:

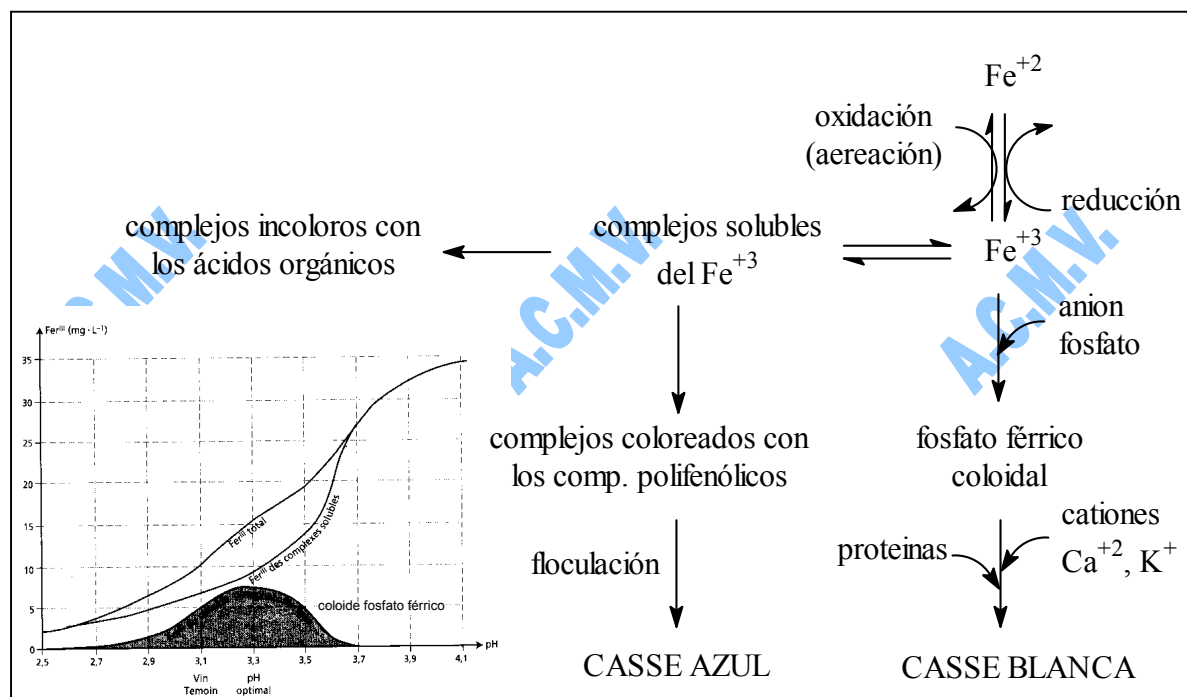
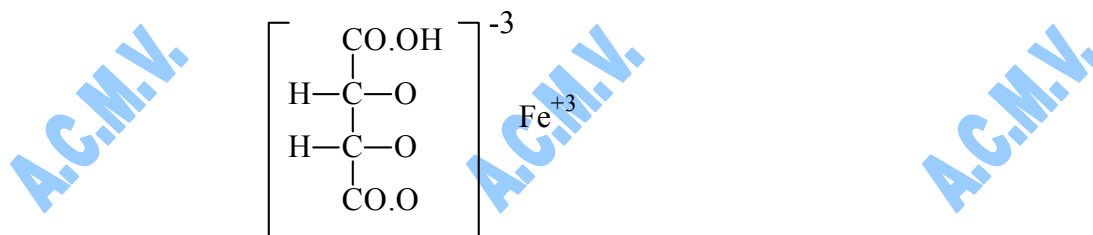


Figura 2 – Reacciones de hierro en vinos aireados. La gráfica muestra las diferentes formas del hierro férrico a diferentes pH, luego de saturación con oxígeno de una muestra de vino y variaciones de pH. Inicialmente prácticamente no hay Fe^{3+} .

DETERMINACIÓN DE HIERRO EN LOS VINOS POR EL MÉTODO DEL SULFOCIANURO DE POTASIO

Para la determinación de hierro en vinos se utilizan principalmente métodos colorimétricos ya que con una serie de reactivos como ser el sulfocianuro de potasio forma compuestos coloreados.

La determinación se hace bajo la forma férrica pudiéndose hallar luego la forma ferrosa al determinar el hierro total por adición de agua oxigenada haciéndolo por diferencia entre el total y el férrico.

Estos métodos colorimétricos tienen en la práctica una precisión aceptable ya que el error que se comete es de 1mg/L.

Para la determinación se realiza una escala de comparación a partir de una solución madre que contiene una concentración de Fe de 1 g/L. Esta solución madre se prepara disolviendo 1.0000 g de Fe en 50 mL de HCl y agregando luego 1 mL de ác. nítrico, completando el volumen a 1000.0 mL con agua destilada. Esta solución puede prepararse igualmente pesando 8.6341 g de sal de Mohr ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ PM=482,19 g/mol).

Así se obtiene una solución de cloruro férrico ya que el ác. nítrico actúa como oxidante, no permitiendo que el hierro pase a la forma bivalente.

Luego, a partir de esta solución se podrán preparar soluciones hijas que contengan por ejemplo 3, 6, 9, 12, 15 y 18mg/L. Si el vino contiene más de 18 mg/L, deberá realizarse una dilución del vino y trabajarse con la escala realizada.

Para preparar 100.00 mL de cada una de las soluciones hijas se pondrán respectivamente 0.30 - 0.60 - 0.90 - 1.20 - 1.50 y 1.80 mL de la solución madre.

SOLUCIONES Y REACTIVOS.

- HCl al 50%
- KSCN al 50%
- agua oxigenada
- éter sulfúrico o acetato de etilo (solo en vinos tintos)

PROCEDIMIENTO



Figura 3 - Escala de coloración para la determinación de hierro.

Se colocan en tubos de ensayo 10.00 mL de cada una de las soluciones hijas y en otro tubo 10.00 mL del vino a analizar. Se agrega a cada uno de los tubos de la escala (fig. 3) y al vino 1 mL de HCl y 1 mL de KSCN, agregando a los tubos solamente de la escala 3 gotas de agua oxigenada.

Se agitan los tubos y se compara la coloración del tubo con vino, con dos tubos consecutivos de la escala. Esta operación se realiza en el comparador de Walpole, colocando detrás de los tubos con la escala, tubos con vino, y detrás del tubo con vino, uno con agua destilada. Esto es para homogeneizar los colores y realizar mejor la comparación; siendo importante también para esto trabajar con tubos de igual diámetro y grosor del vidrio.

La coloración formada al agregar el KSCN es roja debido a la formación de sulfocianuro férrico $\text{Fe}(\text{SCN})_3$.

Esta primera comparación nos permite determinar el hierro que se encontraba bajo forma férrica. Luego se hace una segunda comparación pero agregando al tubo con vino 3 gotas de agua oxigenada y agitando; de existir ión ferroso en el vino, se intensifica la coloración determinando así el Fe total y obteniendo por diferencia entre las dos comparaciones el ión ferroso.

En el caso de trabajarse con vinos tintos el color propio del vino interfiere con el color de la sal formada por lo que antes de hacer la comparación se agrega a cada uno de los tubos (de la escala y el vino) 10 mL de éter sulfúrico o de acetato de etilo, solubilizándose el $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ en éste y al ser menos denso se sitúan en la parte superior del tubo por lo que en este caso la comparación se hace arriba, siendo el acetato de etilo más eficiente en la solubilización de la sal ya que arrastra alrededor de un 90%.

COBRE

El cobre es un metal que se encuentra en los mostos y en los vinos procediendo unas pocas décimas de mg de la propia uva, siendo la mayor parte proveniente de los tratamientos anticriptogámicos.

Durante la fermentación del mosto el Cu se elimina con las levaduras y las borras en forma de sulfuros.

En cuanto al contenido de Cu de un vino nuevo es de 0.2 a 0.3 mg/L pero luego de un tiempo de conservación este contenido puede aumentar si el vino ha estado en contacto con materiales que lo contienen. En los vinos aireados, el cobre se encuentra en la forma cúprica (Cu^{+2}) y de esta forma no presenta problemas ya que es soluble en el vino. Pero fuera del contacto del aire el cobre se reduce por el SO_2 libre y si su concentración es de aproximadamente 1mg/L, precipita en forma de sulfuro enturbando el vino, llamándosele a esta alteración quiebra o casse cuprosa, porque aparece al contrario de la férrica en ausencia de oxígeno y siendo ayudada por las altas temperaturas.

DETERMINACIÓN DE COBRE EN LOS VINOS

Dentro de los métodos para determinación de Cu está el método del 2,2-diquinolilo, que es un reactivo específico para el Cu^{+1} mediante el cual se produce con el metal una sal compleja de color rosado. Este método se considera como un método colorimétrico, pasando el cobre bivalente a cobre monovalente, mediante el agregado de clorhidrato de hidroxilamina que actúa como reductor.

SOLUCIONES Y REACTIVOS.

- clorhidrato de hidroxilamina.
- acetato de sodio.
- solución de 2,2-diquinolilo, el cual se prepara disolviendo 0.2 g de 2,2-diquinolilo en 1 L de alcohol amílico (debe prepararse por lo menos 24 horas antes de ser usada pues su disolución es muy lenta).
- alcohol amílico.

PROCEDIMIENTO.

En un tubo de ensayo se colocan 5.00 mL de vino a analizar, agregando 0.5 g de clorhidrato de hidroxilamina y 0.5 g de acetato de sodio, añadiéndosele 5 mL de la solución de 2,2-diquinolilo. Se agita el tubo durante 1 minuto separándose en dos fases una coloreada y otra sin colorear, dándonos la intensidad de color la concentración de cobre (la intensidad colorante puede cuantificarse por medio de medidas espectrofotométricas a 546nm). Luego se hace una comparación con una escala que contenga distintas cantidades conocidas de cobre (fig. 4).



Figura 4 - Escala de coloración para la determinación de cobre.

Para vinos tintos puede hacerse además un ensayo en blanco colocando 5 mL de vino, el clorhidrato de hidroxilamina y el acetato de sodio y 5 mL de alcohol amílico pero sin el reactivo, esta prueba sirve ya que los vinos tintos ceden su materia colorante al alcohol amílico, lo que provoca una intensidad de color diferente, e incluso para una mejor visualización del color se puede agregar a todos los tubos una misma cantidad de alcohol amílico.

Para la realización de la escala se parte de una solución madre de cobre que contiene 10 mg/L colocando en los distintos tubos distintas cantidades de la misma como ser 0.00 - 0.25 - 0.50 - 1.00 - 1.50 - 2.00 mL, y agregando en cada uno de ellos agua destilada hasta completar los 5 mL, representándonos cada tubo por lo tanto, 0 - 0.5 - 1.0 - 2.0 - 3.0 y 4.0 mg/L (fig. 4). Se realiza el mismo procedimiento con los tubos de la escala que el que se realizó con el vino.

La solución madre se realiza pesando 0.3803 g de nitrato cúprico ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $\text{PM}=241.63$ g/mol) y se disuelven (también puede realizarse pesando 0.2512 g de sulfato de cobre anhidro), llevando el volumen a 100.00mL. Se toman 10.00 mL de esta solución llevándose a 1000.0 mL, siendo esta la solución madre.

PLOMO

La dosificación de este metal es muy delicada, ya que las cantidades de plomo de un vino normal son muy pequeñas, del orden de 0.1 a 0.4 mg/L. Cantidades mayores de este metal pueden deberse a contaminaciones ya sea por contacto del vino con herramientas o maquinaria metálica, o provenir de la uva por contaminación ambiental (viñedos ubicados próximos a carreteras).

DOSIFICACIÓN DE PLOMO EN VINOS

Se describirá el método aceptado por la O.I.V., en el cual luego de una mineralización del vino mediante agua oxigenada, el plomo es extraído por ditiazona en solución clorofórmica a pH 9 - 9.5 en presencia de citrato de amonio, de hexametáfosfato de sodio, de cianuro de potasio y de hidroxilamina. El complejo plomo-ditiazona purificado por extracción es dosificado por colorimetría a 530 nm.

SOLUCIONES Y REACTIVOS.

- agua oxigenada de 110 vol.
- ác. sulfúrico purísimo (96%, $d=1.84$)
- ác. nítrico purísimo (65%, $d=1.40$)
- ác. clorhídrico purísimo (30%, $d=1.15$)
- amoníaco (32%, $d=0.885$)
- sol. de amoníaco 5N ($d=0.962$)
- ác. clorhídrico 5N
- ác. nítrico 1% (v/v)
- sol. de citrato de amonio 25% (p/v), la cual se prepara disolviendo 58 g de ácido cítrico en 100 mL de agua destilada, agregar amoníaco concentrado y luego amoníaco 5N, hasta reacción alcalina al tornasol. A continuación se realizan sucesivas extracciones con solución madre de ditiazona en cloroformo, hasta que el último extracto sea verde. Se acidifica con 5 mL de HCl 5N y se realizan varias extracciones con cloroformo, hasta que el último extracto sea incoloro. Completar el volumen a 250 mL con agua destilada.
- sol. de hexametáfosfato de sodio 10% (p/v), la cual se prepara disolviendo 25 g de hexametáfosfato de sodio ($\text{Na}_6(\text{PO}_3)_6$) en agua destilada, ajustar el pH de la solución a un valor de con amoníaco en presencia de azul de timol como indicador. Preceder a la extracción con la solución madre clorofórmica de ditiazona, hasta que el

- último extracto sea verde. Acidificar con HCl 5N hasta el viraje del indicador y extraer varias veces con cloroformo, hasta que el último extracto sea incoloro. Completar a 250 mL con agua destilada.
- sol. de cianuro de potasio 10% (p/v), la cual se prepara disolviendo 25 g de cianuro de potasio en 50 mL de agua destilada. Agregar una a dos gotas de solución madre de ditiazona, luego del cloroformo, y proceder a la extracción hasta la obtención de un extracto verdoso. Completar a 250 mL con agua destilada. La solución no puede usarse hasta luego de 2 horas de preparada.
 - sol. de clorhidrato de hidroxilamina la cual debe ser preparada en el momento del empleo, siendo al 20% (p/v) a partir de clorhidrato de hidroxilamina purísimo (NH_2OH , HCl) y agua destilada.
 - cloroformo puro, se toman 250 mL de cloroformo para análisis y se agitan con 25 mL de agua destilada conteniendo 1 mL de solución de cianuro de potasio 10% y alrededor de 20 gotas de amoníaco 5N. Luego de la separación de fases, lavar el cloroformo con agua destilada y filtrar.
 - sol. madre de ditiazona, se prepara una solución 0.1% de ditiazona (difencil-tiocarbazona) pura en cloroformo purificado. Filtrar. La solución debe ser conservada en refrigerador.
 - sol. de ditiazona para el empleo, introducir 6 mL de sol. madre con 9 mL de agua destilada dentro de una bola de decantación; agregar 1 mL de amoníaco 5N y agitar. Descartar la fase clorofórmica. Centrifugar la fase acuosa hasta limpidez. Esta solución debe prepararse en el momento.
 - sulfito de sodio 2%, la cual se prepara disolviendo 2 g de sulfito de sodio anhidro y llevando a 100 mL.
 - solución amoniacal de sulfito de sodio y cianuro de potasio, agregar 340 mL de amoníaco puro, 75 mL de solución 2% de sulfito de sodio, 30 mL de solución 10% de cianuro de potasio y 605 mL de agua destilada.
 - sol. de azul de timol 0.04%, 0.1 g de azul de timol se disuelve en 4.3 mL de soda 0.05N; agregar 5 mL de etanol 90%, calentar ligeramente y completar con etanol 20% a 250 mL.
 - nitrato de plomo (II) puro ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)

PROCEDIMIENTO.

Introducir en un matraz de Kjeldahl de 250 mL, previamente lavado con ác. nítrico fumante, 20.00 mL de vino y 10 mL de agua oxigenada. El volumen de agua oxigenada será aumentado a 20 mL en el caso de vinos dulces.

Colocar el matraz con el cuello inclinado, sobre una placa metálica provista de una abertura de 3.5 a 4 cm de diámetro.

Calentar a fuego fuerte hasta la ebullición, y luego mantenerla en forma suave hasta que el volumen remanente sea alrededor de 3 mL. Parar el calentamiento. Destruir el exceso de agua oxigenada, con el líquido aún caliente, por adición de amoníaco concentrado gota a gota hasta el inicio de la precipitación de hidróxidos metálicos. Luego que cesó la formación de burbujas gaseosas, agregar 10 mL de HCl 5N y llevar a ebullición.

Luego de enfriar, agregar 5 mL de solución de citrato de amonio y 10 mL de la sol. de hexametáfosfato de sodio. Luego agregar unas gotas de azul de timol y ajustar el pH a 9 - 9.5 con amoníaco (coloración azul verdosa). Volver a enfriar y agregar 1 mL de sol. de cianuro de potasio y 1 mL de sol. de clorhidrato de hidroxilamina.

Verter esta solución en una bola de decantación conteniendo 10 mL de cloroformo, enjuagando el recipiente con algunos mL de agua destilada. El volumen de la solución acuosa debe ser alrededor de 50 mL. Agregar 0.5 mL de la solución de ditiazona preparada para el empleo y agitar la ampolla enérgicamente durante 1 minuto. Dejar caer la fase clorofórmica en una segunda bola de decantación a la que se le agregó 1 a 2 mL de cloroformo. Introducir dentro de la primera bola de decantación 3 mL de cloroformo y 0.2 mL de solución de ditiazona preparada para el uso, agitando fuertemente durante 30 segundos. Luego que se separaron las fases, dejar caer la fase clorofórmica en la segunda bola de decantación. Este último extracto deberá ser verde. Si no es así, deberá repetirse nuevas extracciones con cloroformo y ditiazona hasta la obtención de una coloración verde en el último extracto clorofórmico.

Añadir al conjunto de los extractos clorofórmicos, 10 mL. de ácido nítrico diluido y agitar enérgicamente durante un minuto. Obtenida la separación de fases, desechar completamente la fase clorofórmica. Adicionar a la fase nítrica 30 mL de solución amoniacal de sulfito sódico y cianuro potásico, 10 mL de cloroformo exactamente medidos y 0.5 mL de solución de ditiazona preparada para usarse. Agitar enérgicamente durante un minuto.

Después de la separación de fases, dejar escurrir algunos mililitros de la fase clorofórmica y filtrar el resto del cloroformo contenido en la bola de decantación, recogiendo en la cubeta de 10 mm.

Se realiza la lectura en un espectrofotómetro trabajando a 530 nm, y utilizando un blanco en el cual la muestra de vino se reemplaza por agua bidestilada.

Construcción de la curva patrón.

Disolver 1.6000 g de nitrato de plomo (II) en algunos mililitros de agua destilada, adicionar 10 mL de ácido nítrico concentrado y completar hasta el litro con agua destilada. En un matraz aforado de 100 mL, introducir 1.00 mL de esta solución y enrasar con agua destilada. Un mililitro de esta solución contiene 10 microgramos de plomo (1ppm), y la misma puede conservarse durante un día.

Tomar 0.50 - 1.00 - 2.00 y 3.00 mL de esta solución y colocarlos en bolas de decantación, adicionar ácido nítrico diluido hasta obtener cada vez un volumen de 10 mL. Adicionar a continuación 30 mL de la solución amoniacal de

sulfito sódico y de cianuro potásico, después 10 mL de cloroformo exactamente medidos y 0.5 mL de ditiazona preparada para usarla. Para el resto de la operaciones seguir las indicaciones anteriores. La medida de la absorbancia se efectuará en la cubeta de 10 mm de espesor en relación con un ensayo en blanco con los reactivos. Como se agregan 10 mL de cloroformo y se parten de 20 mL de vino, estamos concentrando al doble, por lo tanto los puntos de la escala patrón corresponden a 0.25 - 0.50 - 1.00 y 1.50 ppm.