

INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGAÇÃO
AGRÁRIA

CENTRO NACIONAL
DE ESTUDOS
VITIVINÍCOLAS

DE VINEA ET VINO PORTUGALIÆ DOCUMENTA

LISBOA-PORTUGAL

SET. - 1979

VOL. 9

PESQUISA DO ÁCIDO GALACTURÓNICO E DO ÁCIDO GLUCURÓNICO EM VINHOS

POR

J. J. CARVALHO GHIRA (1)

(I. N. I. A. — Dois Portos)

INTRODUÇÃO

A determinação quantitativa dos ácidos orgânicos em vinhos, por CCF segundo o método descrito por M. BOURZEIX, J. GUITRAUD e F. CHAMPAGNOL (1970), foram detectadas algumas amostras manchas que atendendo ao Rf se supôs que eram devidas à ocorrência de algum ácido urónico.

Este facto associado à dúvida sobre quais os ácidos urónicos que existem nos vinhos levou-nos à procura dum método onde pudesse ser feita a pesquisa com rigor e conseqüentemente podermos-nos pronunciar sobre quais os ácidos urónicos encontrados nos vinhos submetidos a análise.

Na realidade ainda que vários autores (D. CHOCHAK, 1928; J. VENTRE, 1939; e H. RENTSCHLER e H. TANNER, 1955) conforme refere G. GEORGEAKOPOULOS, V. DIMOTAKI-KOURAKOU e N. LYDAKI-KRIESI (1963) tenham assinalado a presença do ácido glucurónico em vinhos, principalmente, e em teores mais

Recebido para publicação em 30/3/79.

(1) Trabalho realizado com a colaboração técnica de INÁCIA R. AUGUSTO.

elevados, nos provenientes de uva podre, J. RIBEREAU-GAYON e E. PEYNAUD (1958) pensam que os ácidos urónicos não existem senão em quantidades muito pequenas nos vinhos de Bordéus e Borgonha, enquanto V. DIMOTAKI-KOURAKOU (1964) verificou com precisão que o ácido glucurónico não existe nos vinhos, sendo o ácido galacturónico o único existente.

MATERIAL E TÉCNICA

Para a identificação dos ácidos urónicos começamos por utilizar o método de cromatografia em papel de M. GEE e R. M. McCREADY (1957), após tratamento da amostra com resina de troca iónica segundo a técnica descrita por G. GEORGEAKOPOULOS, V. DIMOTAKI-KOURAKOU e N. LYDAKI-KRIESI (1963). No entanto os resultados obtidos com esta técnica não foram satisfatórios, não se conseguindo uma separação conveniente dos ácidos. Este facto levou-nos à procura de um outro método, tendo sido ensaiado o método referido por W. ERNEST (1968) para a separação dos ácidos galacturónico, glucurónico, manurónico e gularónico e das lactonas correspondentes.

Em face dos resultados obtidos serem satisfatórios, além da vantagem de dispensar o tratamento prévio da amostra no caso dos vinhos, foi este o método que com ligeiras alterações — aumento do tempo de desenvolvimento e elevação de temperatura de revelação — foi utilizado. Para mostos, devido ao teor elevado em agúvares, que este método também revela, há necessidade de proceder a um tratamento prévio tendo sido utilizado com bons resultados o referido por G. GEORGEAKOPOULOS, V. DIMOTAKI-KOURAKOU e N. LYDAKI-KRIESI (1963).

Reagentes

Solvente: Acetona, Butanol, Tampão de fosfato (40:25:35) (v/v).

Tampão de fosfato: Na H₂ PO₄ 0,1M.

Revelador: 0,5 g de Naftorescortina Merck + 100 ml de Etanol + 10 ml de ácido fosfórico a 85 %.

Material

Câmara de desenvolvimento de cerca de 4 l de capacidade. Placas de vidro de 20 × 20 cm cobertas com 0,25 mm de uma suspensão de 25 g de sílica gel G (Merck) com 50 ml de solução tampão de fosfato. Seringa de 25 µl.

Solução Padrão

Solução hidroalcoólica a 12 % contendo ácido galacturónico e ácido glucurónico na quantidade de 3 mE/l de cada.

Técnica

A solução a analisar, bem como a solução padrão, é depositada num volume de 10 µl em banda de 2 cm a cerca de 2 cm da extremidade inferior da placa, e seca com ar frio.

Na câmara de saturação contendo 100 ml de solvente e após uma conveniente saturação, são introduzidas as placas. Após o desenvolvimento, à temperatura ambiente, durante 18 horas, as placas são secas ao ar durante 10 minutos e a 105-110° C durante outros 10 minutos. Depois de frias são pulverizadas com o revelador ficando 5 minutos à temperatura ambiente e 15 minutos na estufa a 110° C. Ao fim de 15 minutos à temperatura ambiente os ácidos urónicos aparecem como manchas azuis perfeitamente separadas sendo o R_f do ácido galacturónico 0,16 e o do ácido glucurónico 0,22.

AMOSTRAS E RESULTADOS

A pesquisa dos ácidos glucurónico e galacturónico foi feita indistintamente em vinhos brancos e vinhos tintos das seguintes proveniências: 5 amostras de vinhos da adega do CNEV, da colheita de 1974; 20 amostras de vinhos de adegas cooperativas do Alentejo da colheita de 1974; 25 amostras de vinhos da região do Oeste, da colheita de 1973; 25 amostras de vinhos da região do Cartaxo, da colheita de 1973; e 15 amostras de vinhos da região de Pinhel da colheita de 1973.

Em todas as amostras foi detectada a presença do ácido galacturónico, que em função da intensidade de cor da mancha cromatográfica e por comparação com o padrão deduzimos variar entre vestígios e ± 3 mE/l. Pelo contrário não foi referenciada em nenhuma amostra a presença de ácido glucurónico.

Quanto à mancha que no processo de doseamento dos ácidos orgânicos fixos se supunha ser do ácido galacturónico e que foi uma das causas do presente trabalho, confirmou-se que correspondia na realidade ao citado ácido, embora tal ocorresse só nas amostras com teores mais elevados neste ácido.

CONCLUSÕES

O método utilizado pareceu-nos ser um método que apesar de bastante delicado proporciona bons resultados para determinação qualitativa dos ácidos em causa e com relativa rapidez, tendo em conta, que dispensa qualquer preparação prévia da amostra.

Em face dos resultados apresentados parece-nos ser de concluir que a probabilidade de ocorrência do ácido glucurónico em vinhos é muito pequena ou nula, contrariamente ao ácido galacturónico que foi detectado em todas as amostras submetidas a análise.

Não podemos confirmar em absoluto as conclusões a que chegou DIMOTAKI-KOUKAROU (1964), porquanto as pesquisas foram efectuadas em vinhos provenientes de uvas em que o estado sanitário relativamente à presença de *Botrytis cinerea* era desconhecido.

RESUMO

O autor ensaiou um método de CCF para a pesquisa do ácido galacturónico e do ácido glucurónico em vinhos e aplicou-o em 90 vinhos de diversas regiões do país.

O ácido glucurónico não foi detectado em nenhuma amostra, contrariamente ao ácido galacturónico que estava presente em todas.

RÉSUMÉ

L'auteur a essayé une méthode de CCM pour la recherche de l'acide galacturonique et de l'acide glycuronique des vins.

Dans la recherche de ces acides en 90 vins de quelques régions du Portugal, il n'a jamais trouvé l'acide glycuronique; par contre l'acide galacturonique était présent en tous les échantillons.

SUMMARY

The author has tested a TLC method to search the galacturonic and glycuronic acids of wine.

This method had been used with 90 wines of several regions of Portugal and the glycuronic acid was always absent; on the contrary the galacturonic acid was present at all the wines tested.

BIBLIOGRAFIA

- BOURZEIX, M.; GUITRAUD, J. et CHAMPAGNOL, F.
1970 Identification des acides organiques et evaluation de leurs teneurs individuelles dans les jus de raisin et les vins par chromatographie et photodensitometrie. *Journal of Chromatography* 50 (1): 93-91.
- DIMOTAKI-KOURAKOU, V.
1964 Absence d'acide glycuronique dans les vins. *Annales de Technologie Agricole* 13 (4): 301-308.
- ERNEST, W.
1968 Dunnschichtchromatographische trennung und bestimmung von uronsäuren und uronsäurelactonen. *Analytica Chimica Acta* 40: 161-166.
- GEE, M. et McCREADY, R. M.
1957 Paper chromatographic detection of galacturonic and glycuronic acids. *Analytical Chemistry* 29 (2): 257-258.
- GEORGEAKOPOULOS, G.; DIMOTAKI-KOURAKOU, V. et LYDAKI-KRIESI, N.
1963 La Teneur des vins en acides uroniques. *Chimika Chronika* 28: 161-168.
- RIBEREAU-GAYON, J. et PEYNAUD, J.
1958 Analyse et controle des vins. Librairie Polytechnique ch. Béranger. Paris. Liège.

O DOSEAMENTO DE SULFATOS EM VINHOS,
POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

POR

A. S. CURVELO GARCIA ⁽¹⁾

(I. N. I. A. — Dois Portos)

INTRODUÇÃO

COM base na insolubilidade do sulfato de bário (BaSO_4) em soluções aquosas e hidro-alcoólicas, facto este que constitui o princípio de grande parte dos métodos usados para o doseamento do ião $\text{SO}_4^{=}$, e por semelhança com a técnica proposta por M. D. GARRIDO, C. LLAGUNO e V. GARRIDO (1971) para o doseamento dos cloretos em vinhos, por espectrofotometria de absorção atómica (EAA), fomos estudar um método para a determinação quantitativa do teor em sulfatos dos vinhos, baseado na sua completa precipitação com um sal de bário (BaCl_2), empregue em excesso, e no posterior doseamento do ião bário (Ba^{++}) excedentário, por EAA.

O MÉTODO

Num copo de precipitação, introduz-se V_1 ml da amostra de vinho a analisar, à qual é adicionada V_2 ml da solução de BaCl_2 (com uma concentração de X_2 mE/l), em condições tais que a precipitação de BaSO_4 seja tão completa quanto possível.

Após a precipitação completa, conduz-se a solução final a um volume de $(V_1 + V_2)$ ml, com água destilada, separando-se em seguida do precipitado de Ba SO_4 , por filtração.

Finalmente, determina-se a concentração de Ba^{++} do filtrado, por EAA (C mg/l), de cujo valor se deduz o teor em sulfatos da amostra a analisar (X_1 mE/l).

⁽¹⁾ Trabalho realizado com a colaboração técnica de M. CARMO VILHENA GODINHO e A. ALMEIDA e SILVA.

Recebido para publicação em 27/6/79.

Doseamento do ião Ba⁺⁺

Nos ensaios efectuados, foi utilizado um espectrofotómetro de absorção atómica, PERKIN-ELMER, mod. 290-B, tendo-se recorrido às seguintes condições operatórias (lâmpada de cátodo oco, de Ba):

- comp. onda — 5536 Å
- fenda — 7 Å
- chama de ar/acetileno

As interferências de ionização podem ser controladas com a adição de um sal alcalino às amostras e às soluções-padrão, em concentração relativamente elevada — recorremos a uma concentração de 1500 mg/l de NaCl, a partir de uma solução aquosa de NaCl a 15 g/l, tendo-se verificado um ligeiro aumento da linearidade obtida para a relação «absorvância: conc. Ba⁺⁺».

Segundo «Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry», Perkin-Elmer Co. (1968), a gama de concentração óptima, para a análise do ião Ba⁺⁺, é de 5 a 100 mg/l (em solução aquosa); contudo, nas condições em que o presente trabalho foi desenvolvido, em que há que ter em conta as características do espectrofotómetro utilizado, muito em especial as referentes à sua parte óptica, já bastante afectadas pela sua prolongada utilização, tivemos que recorrer a uma concentração máxima de 400 mg/l de Ba⁺⁺, continuando contudo a verificar-se uma perfeita linearidade para a relação «absorvância: conc. Ba⁺⁺».

Por outro lado, verificou-se ser desprezável a influência que a concentração em etanol da amostra a analisar possa ter nos valores obtidos, como resultado da sua contribuição para a viscosidade do meio.

A Solução de Ba Cl₂

Considerando como desprezável a contracção de volumes eventualmente existente na adição da solução de BaCl₂ à amostra, e admitindo ainda como completa e total a precipitação dos iões SO₄⁼, temos que, arbitrando V₁ + V₂ = 100 ml, a concen-

tração dos iões Ba⁺⁺ no meio, após a precipitação de BaSO₄, é

$$C = 686,7 (V_2 X_2 - V_1 X_1) \text{ mg/l} \dots\dots\dots [1]$$

Admitindo para o teor em sulfatos da amostra a analisar (X₁) os valores extremos de 0 e 20 mE/l a que correspondem, respectivamente e de acordo com o referido anteriormente, 400 mg/l e 0mg/l para a concentração de Ba⁺⁺ na solução final (C), a expressão [1] fornece-nos o seguinte resultado:

$$V_1 = 29,1 \text{ ml}$$
$$X_2 = 8,22 \text{ mE/l}$$

Considerando este resultado, arbitramos:

- para concentração da solução de BaCl₂ 8,2 mE/l
- para volume da amostra 30 ml
- (Volume da solução de BaCl₂ — 70 ml)

Expressão final para o valor do teor em sulfatos da amostra

Tendo em conta estes valores, e com base na expressão [1], temos que o valor do teor em sulfatos da amostra (X₁), expresso em mE/l, é-nos dado pela seguinte expressão:

$$X_1 = 19,134 - 0,049 C \dots\dots\dots [2]$$

Em face da precisão da determinação de C (± 2 mg/l, com o equipamento de EAA referido), o resultado final (X₁), expresso em mE/l, deverá ser apresentado com uma decimal.

Condições a empregar na precipitação quantitativa do ião SO₄⁼

Nos métodos de doseamento dos sulfatos em vinhos que recorrem à precipitação do BaSO₄, por adição de uma solução de Ba, é essa precipitação normalmente efectuada em meio acidificado com HCl, condição esta que vem eliminar a interferência de aniões competidores do ião SO₄⁼ na formação de sais de bário insolúveis (CO₃⁼, SO₃⁼ e PO₄[≡]). Realizámos um ensaio comparativo das diversas modalidades de acidificação

do meio (adição do HCl antes da adição da solução de Ba ou recurso a uma solução de Ba já acidificada com HCl; diferentes concentrações de HCl), com base nos métodos descritos por A. GODED Y MUR (1964). De entre as modalidades estudadas, a que forneceu resultados mais precisos e exactos foi a de adição de 0,5 ml de HCl conc. à amostra a analisar.

Por outro lado, por forma a evitar a coprecipitação de aniões interferentes, e sendo o anião Cl^- o mais importante de entre eles, há que realizar a adição da solução de BaCl_2 à amostra lentamente e com agitação constante, eliminando-se assim essa acção interferente (H. WILLARD, N. FURMAN e C. BRICKER, 1963).

Finalmente, e ainda no que se refere às condições óptimas de precipitação, é de destacar o facto, referido por diversos autores, de dever a precipitação realizar-se à temperatura de ebulição, ebulição esta que se deve iniciar antes da adição da solução de BaCl_2 , devendo por outro lado o precipitado formado ser digerido durante algum tempo na solução-mãe a uma temperatura relativamente elevada.

Influências da presença de SO_2 na amostra

Com o objectivo de verificar a influência dessa presença nos resultados obtidos, foi efectuado um ensaio em que a um determinado vinho se adicionou quantidades crescentes de SO_2 ; nas amostras obtidas, foram determinados os teores em SO_4^{2-} (pelo método em estudo) e em SO_2 livre e total (método de Ripper), determinações essas realizadas imediatamente a seguir à adição de SO_2 e cerca de um mês depois. No Quadro I, são apresentados os valores obtidos.

A análise dos valores obtidos indica-nos dever ser a influência do SO_2 combinado muito mais importante que a do SO_2 livre, parecendo pois que poderá o método ser aplicável a vinhos com teores de SO_2 combinado não muito elevados, sem uma prévia eliminação do SO_2 , sobretudo atendendo às características do método em estudo (relativamente expedito e com uma precisão não muito elevada); contudo, parece dever ser necessário o recurso à operação de prévia eliminação do SO_2 , caso se procure aumentar a precisão do método, embora à custa da rapidez de análise.

QUADRO I

Influência da presença de SO_2 (livre e combinado) na amostra

Amostra	Determ. imediatamente após a adição de SO_2			Determ. 1 mês depois da adição de SO_2		
	SO_2 livre (mg/l)	SO_2 Comb. (mg/l)	SO_4^{2-} (mE/l)	SO_2 livre (mg/l)	SO_2 Comb. (mg/l)	SO_4^{2-} (mE/l)
1	6	13	8.5	6	13	8.4
2	32	6	8.5	6	26	8.6
3	64	6	8.6	19	39	9.2
4	122	22	8.6	26	73	9.2
5	186	25	8.6	112	82	9.5

Preparação da solução final a analisar

Em virtude do precipitado de BaSO_4 se apresentar sob a forma de cristais muito pequenos (~ 5 micra), para a sua separação da solução final a analisar deverá recorrer-se a uma filtração com papel de elevado índice de retenção (Whatman 42 ou Schleicher & Schüll 589 t. azul, por exemplo).

PRECISÃO E EXACTIDÃO DO MÉTODO

Por forma a avaliar a precisão e a exactidão do método estudado, foi efectuada a determinação do teor em sulfatos em 10 vinhos diferentes por recurso ao método de referência proposto pelo O. I. V. (Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins, O. I. V., Paris, 1978) e ao método em estudo (5 repetições). Os resultados obtidos estão indicados no Quadro II, onde são igualmente referidos, para cada amostra e para o caso das determinações por EAA, o valor médio e o coeficiente de variação dos valores obtidos.

QUADRO II

Teor em $\text{SO}_4=$ (mE/l) de diversas amostras de vinho por recurso ao método de referência do O. I. V. e ao método por EAA

Amostra	Método refer. O. I. V.	Método EAA						
		Ensaio (repetição)					Valor médio	Coef. variação (%)
		1	2	3	4	5		
1	6.4	6.1	6.3	6.4	6.2	6.3	6.3	1.82
2	4.5	4.4	4.5	4.4	4.6	4.5	4.5	1.87
3	6.1	6.0	6.2	6.1	6.1	6.0	6.1	1.38
4	6.8	6.7	6.6	6.9	6.8	6.7	6.7	1.69
5	8.8	8.7	8.6	8.7	9.0	8.8	8.8	1.73
6	2.9	2.8	2.7	2.9	2.8	2.7	2.8	3.00
7	6.5	6.4	6.5	6.6	6.3	6.4	6.4	1.77
8	10.8	10.7	10.9	10.8	10.7	10.8	10.8	0.78
9	6.4	6.3	6.4	6.4	6.2	6.3	6.3	1.32
10	9.6	9.5	9.6	9.5	9.7	9.7	9.6	1.04

CONCLUSÕES

O método apresentado é relativamente rápido e expedito, evidenciando contudo uma precisão e uma exactidão não muito acentuadas, embora suficientes para determinadas aplicações em que o interesse na rapidez do método se sobreponha à necessidade de uma precisão e de uma exactidão acentuadas, as quais contudo parecem susceptíveis de ser melhoradas por recurso nomeadamente a outras condições; de entre elas, destaca-se as relacionadas com a gama de concentrações óptima para a análise espectrofotométrica do ião Ba^{++} e o recurso a uma prévia eliminação do SO_2 da amostra (operação cuja realização só terá sentido se a análise do ião Ba^{++} se efectuar de um modo mais preciso do que aquele a que tivemos de recorrer).

RESUMO

O autor apresenta um método de doseamento de sulfatos em vinhos, baseado na sua completa precipitação com um sal de bário (BaCl_2), empregue em excesso, e no posterior doseamento do ião Ba^{++} excedentário, por espectrofotometria de absorção atómica; são nomeadamente estudadas a concentração e volume da solução de BaCl_2 a empregar, as condições óptimas para a precipitação quantitativa do anião $\text{SO}_4=$ e a influência da presença de SO_2 na amostra.

Trata-se de um método rápido e expedito, com uma precisão e uma exactidão não muito acentuadas, embora susceptíveis de ser melhoradas por recurso a outras condições operatórias.

RÉSUMÉ

L'auteur présente une méthode de dosage des sulfates des vins, basée à sa complète précipitation avec un sel de baryum (BaCl_2), à l'excès, et au postérieur dosage de l'ion Ba^{++} restant, par spectrophotométrie d'absorption atomique; notamment, il a étudiée la concentration et le volume de la solution de BaCl_2 , les mieux conditions pour la précipitation quantitative de l'anion $\text{SO}_4=$ et l'influence de la présence de SO_2 dans l'échantillon.

C'est une méthode rapide et expéditive, avec une précision et une exactitude pas trop élevées, mais susceptibles d'être améliorées à l'aide d'autres conditions opératoires.

SUMMARY

The author present a study about the quantitative analysis of wine's sulphates, based on their total precipitation with a barium's salt (BaCl_2), in excess, and on evaluation of the ion Ba^{++} not precipitated, by atomic absorption spectrophotometry; namely, it was studied the concentration and the volume of the solution BaCl_2 , the best conditions for the quantitative precipitation of the anion $\text{SO}_4=$ and the influence of SO_2 from the sample.

It's a rapid and expeditious method, with an accuracy not elevated, but able to better with others conditions.

BIBLIOGRAFIA

ANÓNIMO

1968 Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry. Perkin-Elmer Corp., USA.

1978 Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins. O. I. V., Paris.

GARRIDO, M.; LLAGUNO, C. e GARRIDO, J.

1971 The Determination of Chloride in Wine by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Am. J. Enol. Vitic.*, 22 (1): 44-46.

GODED Y MUR, A.

1964 Técnicas Modernas Aplicadas al Analisis de los Vinos. Ed. Dossat S. A., 1.ª ed., Madrid.

WILLARD, H., FURMAN, N. e BRICKER, C.

1963 Analisis Químico Quantitativo. Ed. Marin S. A., Barcelona.

DE VINEA ET VINO PORTUGALIÆ DOCUMENTA

Abrev.: *Vin. Port. Doc.*

TRABALHOS PUBLICADOS:

VOLUME IX

Série II — ENOLOGIA

- 1 . *Belchior, A. P., Climaco, P. e Franco, J. M. Soares* — Emprego da cromatografia em coluna de Gel de «Sephadex LH 20» na caracterização de aguardentes vnicas envelhecidas.
- 2 . *Garcia, A. S. Curvelo e Ghira, J. J. Carvalho* — Uma causa da presença de ferro em vinhos brancos. A incorporação de terra no mosto.
- 3 . *Garcia, A. S. Curvelo e Ghira, J. J. Carvalho* — O ferro em vinhos brancos. Influência da defecação dos mostos.
- 4 . *Ghira, J. J. Carvalho* — Pesquisa do ácido galacturónico e do ácido glucurónico em vinhos.