

"EXISTENCIA NORMAL Y ANORMAL DEL HIERRO EN LOS VINOS ARGENTINOS

METODOS FISICOS Y QUIMICOS PARA SU EVALUACION

TESIS PRESENTADA EN LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN QUIMICA

por CARLOS FANTINI

1940

Tesis  
114



PADRINO DE TESIS

DOCTOR ANTONIO CERIOTTI

A M I S P A D R E S

Con gratitud.

# "EXISTENCIA NORMAL Y ANORMAL DEL HIERRO EN LOS VINOS ARGENTINOS"

## MÉTODOS FÍSICOS Y QUÍMICOS PARA SU EVALUACION

### I. - ANTECEDENTES RELACIONADOS CON LA PRESENCIA DE HIERRO EN LOS VINOS EN GENERAL.-

Influencia de los compuestos de hierro y transformaciones que se originan por acción de las oxidases.-

Alteraciones de los vinos debidas a las sales de hierro en sus diferentes estados.-

### II. - NORMAS ANALITICAS PARA LA EVALUACION DEL HIERRO:

- a) Métodos gravimétricos
- b) Métodos volumétricos
- c) Métodos colorimétricos clásicos
- d) Métodos fotométricos.

### III. - TABLAS DE RESULTADOS.

### IV. - CONCLUSIONES

### V. - BIBLIOGRAFIA.-

SEÑOR DECANO

SEÑORES CONSEJEROS

~~SEÑORES~~ PROFESORES

Con la presentación del trabajo que pongo a vuestra consideración, cumplo con el último requisito que el plan de estudios de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Nacional de La Plata, me exige para optar al título de Doctor en Química.-

Para su ejecución me ha honrado con su dirección científica el distinguido Profesor Dr. Antonio Ceriotti, a quien expreso mi profundo respeto y mi más íntimo reconocimiento.-

Así mismo quiero expresar mi gratitud al Dr. Carlos A. Sagastume, Director del Instituto de Investigaciones Químicas de nuestra Facultad, que autorizándome a emplear el fotómetro allí existente ha hecho posible la realización de este trabajo.-

Al Dr. Humberto Giovambattista que me dió los primeros conocimientos de fotometría, a todos los que han sido mis maestros en la Cátedra como en el Laboratorio donde he recogido mis enseñanzas, y a mis compañeros, hago presente mi más sincero agradecimiento.-

La Plata, Octubre de 1940.-

1.-

I.- ANTECEDENTES RELACIONADOS CON LA PRESENCIA DE HIERRO EN LOS

VINOS EN GENERAL.-

INFLUENCIA DE LOS COMPUESTOS DE HIERRO Y TRANSFORMACIONES

QUE SE ORIGINAN POR ACCION DE LAS OXIDASAS.-

ALTERACIONES DE LOS VINOS DEBIDAS A LAS SALES DE HIERRO EN

SUS DIFERENTES ESTADOS.-

El hierro, que es uno de los elementos constitutivos normales del protoplasma vegetal, presente siempre en las uvas, se encuentra inevitablemente en cantidades apreciables en todos los vinos (1) (2).-

En cuanto al origen de este hierro, (3) (4), que es, podríamos decir, componente esencial, hay que buscarlo en las tierras de cultivo sobre las cuales las cepas de vid se han desarrollado, pudiendo provenir ya de compuestos insolubles existentes en los suelos, ya de compuestos solubles, sobre todo por el sulfato ferroso en polvo o en solución, que se expande a veces sobre los viñedos con el objeto de preservarlos de ciertas enfermedades. Es así corriente encontrar en los vinos de cinco a diez miligramos de hierro, tenor que es considerado por los enólogos como reducido y que no presenta ningún inconveniente siendo por el contrario los vinos excelentes.-

El otro origen del hierro en los vinos, que podríamos llamar circunstancial o accidental, proviene de los contactos que sufren los mostos o aun los vinos preparados con el material de los recipientes. Estos recipientes, constituidos por partes metálicas, se encuentran entonces en contacto con estos líquidos ácidos disolvién-

dose así un suplemento apreciable de metal y resultando de esta manera un inconveniente muy serio, que afecta sensiblemente la calidad de los productos elaborados. Además en las bodegas se utiliza a menudo, cubas de cemento, las que contienen, según su origen, de doce a quince por ciento de sales de hierro; si el vino permanece mucho tiempo en contacto, se apodera poco a poco de este hierro, cargándose así de una cantidad excesiva (5).-

El efecto disolvente de los principios ácidos de los mostos y de los vinos respecto al hierro sería aun más marcado en el caso de que estos líquidos contienen anhídrido sulfuroso en proporciones acentuadas.-

En cuanto a la clase de los compuestos del vino que actúan sobre este hierro, y sus combinaciones finales, podríamos decir que es con casi todas las sales orgánicas e inorgánicas que posee y que ordinariamente el hierro se encuentra al estado de tartratos y de fosfatos ferrosos; pudiendo existir como citratos, oxalatos, lactatos, etc.-

Es de esta manera el hierro un combinado invisible, y su presencia en los vinos no entraña ninguna modificación apreciable en su gusto o en su color, pero actúa considerablemente sobre el desarrollo normal o accidental de los vinos, en particular sobre su limpiez y su oxidación por mecanismos que nosotros procuraremos de precisar más adelante. Por otra parte, a este respecto nos apresuramos a decir, existen diversas interpretaciones, pero que en definitiva todos los autores coinciden en reconocer como causa fundamental de estos trastornos el equilibrio entre sales ferrosas y féricas:

$$\text{Fe}^{ii} \rightleftharpoons \text{Fe}^{iii} \quad .-$$

El vino, como es notorio, contiene sustancias reductoras que tienden siempre a mantener las sales metálicas que encierra al estado de menor oxidación, en este caso particular al estado de sal

ferrosa, debiéndose hacer notar que análogamente sucede con el cobre. La aireación más o menos intensa, por ejemplo en ocasión de un trasiego o por transporte a los toneles de madera más o menos porosa o aun de un embotellado, se opone a esto y trata de que sean mantenidas como sales férricas. El estado del hierro en un momento dado, estado que depende de estas dos tendencias opuestas, interviene en mucho para fijar la limpidez del vino. Las sales ferrosas no originan en el vino combinaciones insolubles y en consecuencia no alteran su aspecto ni la limpidez; en cambio las sales férricas forman si su tenor excede de una cierta cifra, combinaciones insolubles que enturbian el vino y se produce un sedimento o depósito más o menos abundante. Estas combinaciones insolubles se engendran especialmente a expensas de los taninos y de los fosfatos, e intervienen también las materias colorantes propias del vino dando origen así a la formación de los tanatos férricos azules-negruzcos y fosfato férrico blanco. En presencia de estos compuestos anormales bastan solamente trazas para despremiar y descalificar los mejores vinos. Estos enturbiamientos constituyen las llamadas quebraduras o genéricamente "casse" de los vinos.-

Si se trata de vinos tintos y la cantidad de tanato férrico es notable se clasifican como vinos atacados de la quebradura o "casse férrica" (6); mientras que en el caso de vinos blancos, si la formación de tanato férrico es poco abundante, se dice que estos vinos "ennegrecen" ("noircissent" o "plombent" de los franceses), y por último si se comprueba la formación de fosfatos férricos se habla de quebradura o "casse fosfato férrica" o "casse blanca" (7).-

Como fácilmente se advierte, estas alteraciones o verdaderas enfermedades de los vinos son más aparentes e inconvenientes en los vinos blancos que en los tintos, ya que la aparición de un precipitado, o menos aun de un enturbiamiento es fácilmente visible en los

primeros, por lo que pierden así todo su valor y se tornan invendibles; en cambio en los vinos tintos por la intensidad misma de su color, que en los vinos argentinos particularmente es muy marcado, este enturbiamiento pasa generalmente desapercibido y solamente cuando la anomalía se traduce en un precipitado se pone en evidencia.-

En cuanto a las cantidades de hierro que originan estos perjuicios, los diferentes autores han comprobado con pequeñas diferencias para cada uno de ellos las siguientes:

a) los vinos blancos ennegrecen cuando contienen cerca de quince miligramos de hierro por litro y aun menos;

b) los vinos tintos experimentan quebraduras ("cassent") comúnmente, por ser más resistentes, cuando contienen entre quince y treinta miligramos de hierro por litro.-

Tenemos que hacer notar que no sólo la presencia de estos compuestos férricos ocasiona trastornos en el aspecto y caracteres exteriores de los vinos, sino que también se modifica apreciablement el gusto del vino, lo que tal vez sea más importante ya que adquiere por la formación de ellos un sabor estíptico que los hace intolerables al paladar.-

Estas enfermedades de naturaleza especial, han planteado en países productoras de vinos como Francia e Italia graves problemas, los que incidían seriamente en la economía y en el prestigio de sus producciones vinícolas.-

Hay que tener en cuenta que estos inconvenientes no se producen comúnmente en la fabricación del vino propiamente dicha, ya que para que aparezca en esta fase de su preparación tiene que encontrarse el hierro en cantidades muy pronunciadas, sino en el período de estacionamiento, porque es un proceso que se desarrolla por acción del tiempo y que puede aparecer aun a los dos años de su elabora-

ción, o también lo que es más corriente en ocasión de su fraccionamiento que es cuando el vino sufre una aireación más activa.-

De lo que antecede se deduce claramente que la evaluación del hierro debe practicarse apenas extraído de la cuba de fermentación y que si bien su evaluación total tiene gran importancia pues sus proporciones nos sirven de guía para apreciar las posibilidades de precipitación, en realidad interesa conocer la fracción que de ese hierro total se encuentra al estado de sal ferrosa, pues es ésta la que convirtiéndose por oxidación en sal férrica dará lugar a los fenómenos de quebradura ("casse"). Esta oxidación puede efectuarse como resultado de una aireación, como ya hemos dicho, con lo cual se consigue que el equilibrio  $Fe^{ii} \rightleftharpoons Fe^{iii}$  se desplace rápidamente hacia la derecha con gran aumento de iones  $Fe^{iii}$  sobre todo en la iniciación del proceso, para luego ir haciéndolo más lentamente hacia un cierto límite que se alcanza al cabo de algunas horas. Esta transformación es incompleta porque los elementos reductores del vino destruyen el ión férrico a medida que se va formando.-

Este tenor límite depende poco de la cantidad de oxígeno en presencia, pues desde que este elemento existe en un vino se fija sobre el hierro, y si el tenor de éste que se encuentra al estado de ión férrico es suficientemente elevado, cinco o seis miligramos por litro, se presenta el fenómeno de quebradura o "casse". Es así como se comprende que en la práctica se tengan vinos que son alterables, con diez miligramos de hierro total, y otros que no lo sean con cuarenta miligramos de hierro. Pero si bien es cierto de que no es el solo factor actuante, no puede dejar de reconocerse que es una de las causas principales. Y es así que la iniciación de la quebradura o "casse" es más elevada, a medida que el vino contiene más hierro; y se puede hacer precipitar un vino que originariamente

te no lo es, por adición de sulfato ferroso, por ejemplo; variando esta posibilidad de un vino a otro y necesitando para ello distintas cantidades de sal.-

Todos estos hechos son debidos a una propiedad interesante y que quedan muy de manifiesto por la siguiente experiencia: dejando un vino al aire y adicionándolo de una cantidad adecuada de sulfato ferroso y efectuando la evaluación por un método adecuado, determinaciones sucesivas, se encuentra primero todo el hierro agregado y luego vemos que esta cantidad va disminuyendo y termina por ser la inicial. Es decir, la proporción será igual a la que el vino poseía originariamente cuando aun no se le había agregado sal ferrosa, o un muy poco mayor sin que tenga lugar la menor precipitación y paralelamente el tenor límite en ión férrico disminuye. Por el contrario el método de evaluación total, después de calcinación, tal como el seguido con el sulfocianuro da cifras constantes. El cuadro nos aclarará el concepto (7).-

Método	Fe(CN) <sub>6</sub>				SCN	
	0 horas	5 horas	24 horas	96 horas	0 horas	96 horas
Vino natural	4	4	4	4	11	11
Vino natural más 28 mg. de Fe por litro	32	24	14	4	39	39

La observación de este cuadro nos demuestra que los componentes del vino han reducido el ión férrico y que no han actuado sobre el ión ferroso, y que a éste lo ha convertido en un ión complejo con propiedades diferentes, ya que no acusa ahora reacciones con el ferrocianuro ni con el ácido fosfórico, pero por calcinación pasa todo el hierro al estado de sal férrica y es por eso que la evaluación total con el sulfocianuro después de calcificación no varía.-

El primer método no permite evaluar nada más que el ión férrico mientras que con el segundo se determina entre otros el ión complejo que con el anterior no era evaluado.-

Otra influencia a tenerse en cuenta en la quebradura férrica es el tenor en cobre del vino, que por otra parte análogamente al hierro siempre se encuentra presente, aunque en menores proporciones. Así una adición de un miligramo de cobre por litro, hace alterable a un vino en tres días en lugar de ocho días y un vino que originalmente no es alterable lo hace si por cualquier motivo circunstancial sufre un enriquecimiento en cobre. Ejemplo: un vino que contiene cincuenta miligramos de hierro y cero miligramos de cobre no es alterable, el mismo vino con diez y ocho miligramos de hierro y diez miligramos de cobre es fuertemente quebrable o "cassant".-

Mecanismo de oxidación del hierro: En los vinos aireados o en una solución compleja análoga, existe un estado de equilibrio entre los iones ferrosos y férricos que a su vez están en equilibrio con la parte no disociada de los compuestos ferrosos (FeII) y férricos (FeIII).-

Por otra parte hay que consignar que el FeIII se encuentra casi enteramente constituido por iones complejos.-

El hecho experimental conocido, de que el Fe es relativamente estable en solución ácido y en cambio es rápidamente oxidado en solución alcalina por el oxígeno del aire, es explicado por SMYTHE (8), en un trabajo realizado en el laboratorio de MICHAELIS, de la siguiente manera: el FeII en solución ácida se encuentra fuertemente disociado; vale decir que está al estado de  $Fe^{++}$ , en cambio en solución alcalina se encuentra como  $Fe(OH)_2$  que no está disociado; el hierro a este estado es más oxidable que al estado de ión. Y puede decirse de una manera general de que si se une el hierro en un complejo poco disociado se aumenta mucho, aun en medio ácido, la ve

locidad de oxidación del hierro. SMYTHE en el citado trabajo, concluye diciendo que el FeII se oxida más fácilmente cuando no está disociado que al estado de ión y lo explica de la siguiente manera: La oxidación del hierro consiste en la pérdida de un electrón, de manera que se concede que la pérdida sea más fácil en una sustancia que precedentemente ha sido neutra que en el ión con dos cargas positivas.-

Además, esta oxidación del hierro en presencia de cuerpos que forman complejos con este metal es más rápida para una acidez determinada.-

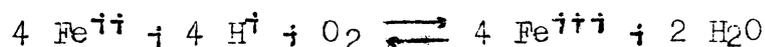
Estudiando este fenómeno por adición a soluciones n/10 de diversos ácidos, unos que llevan a pH 3 y otros a pH 4, se observa que la velocidad de oxidación para los distintos ácidos varían. El proceso ha sido efectuado por RIBEREAU-GAYON, siguiéndolo por evaluaciones con sulfocianuro, adicionando a las distintas soluciones varios miligramos de sulfato ferroso y luego oxidadas al aire por agitación enérgica y dejadas a 12°5 C. de temperatura:

	0,5 h	5 h	24 h	96 h	216 h	0,5 h	5 h	24 h	96 h	216 h
Ac. acético	0	0	1	3	4	0,25	1,5	3	6	9
" succínico	0	0	0,25	0,5	1	0	0,5	1	5	7
" láctico	0	1	2	5	7	3	7	13	20	22
" tártrico	2	12	16	22	22	9	13	19	22	22
" málico	1	4	12	14	22	10	22	22	22	22
" cítrico	4	10	22	22	22	18	22	22	22	22

De la observación de este cuadro se deduce que donde la aptitud para formar complejos con el hierro es mayor es precisamente donde la velocidad de oxidación también es mayor, y eso sucede con los ácidos tártrico, málico y cítrico que además solubilizan los compuestos de FeIII.-

RIBERAU-GAYON da a este fenómeno una explicación sencilla reduciéndola a una consecuencia de la ley de la acción de las masas.

Tomemos por ejemplo cloruro ferroso y expongámoslo al aire: se produce oxidación siguiendo la ecuación clásica:



Consideremos una solución con la concentración hidrogeniónica lo suficientemente elevada para que la solución de cloruro ferroso y cloruro férrico no sea hidrolizada, y donde los cloruros son casi totalmente disociados a las diluciones consideradas. Es decir, en otras palabras, que la concentración de iones  $\text{Fe}^{\text{ii}}$  sea igual a la concentración de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . De idéntico modo la concentración de iones de  $\text{Fe}^{\text{iii}}$  se confundirá con la de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . En tales soluciones la oxidación es débil y la relación  $\frac{\text{Fe}^{\text{III}}}{\text{Fe}^{\text{II}}}$  se confunde con la relación  $\frac{\text{Fe}^{\text{iii}}}{\text{Fe}^{\text{ii}}}$  .-

Agreguemos en estas condiciones un cuerpo que sea capaz de formar con los iones férricos combinaciones poco disociadas, vale decir un complejo. La concentración de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  total no va a ser ahora igual a la anterior, pero será siempre muy superior a la  $\text{Fe}^{\text{iii}}$ , y a medida que el hierro va entrando en el complejo la concentración de iones  $\text{Fe}^{\text{iii}}$  disminuirá con lo que la relación de equilibrio entre  $\text{Fe}^{\text{ii}} \rightleftharpoons \text{Fe}^{\text{iii}}$  se desplazará hacia la derecha. El resultado final es que la adición del cuerpo capaz de formar complejos con el hierro permite hacerse grande a la relación  $\frac{\text{Fe}^{\text{III}}}{\text{Fe}^{\text{II}}}$  vale decir a la oxidación sin que la relación  $\frac{\text{Fe}^{\text{iii}}}{\text{Fe}^{\text{ii}}}$  sea más elevada que anteriormente.-

Si suponemos que en vez de agregar un cuerpo que forme complejos con el hierro, elevamos el pH de la solución; los cloruros en tal caso tanto ferroso como férrico sufren una hidrólisis que produce hidróxido ferroso, hidróxido férrico, además de oxicloruros

que en todo caso son cuerpos complejos que se comportan análogamente a los anteriores. Y si como sabemos la hidrólisis del cloruro férrico es mucho mayor que la <sup>del</sup> cloruro ferroso nos encontramos como en el caso anterior.-

De todo lo que antecede se desprende que no es necesario considerar que el hierro no ionizado se oxida más fácilmente que el ionizado, y que por lo tanto no hay preferencia en la oxidación del hierro que está formando parte de un complejo. El problema queda entonces encuadrado dentro de la aplicación de un caso particular de la ley de la acción de las masas.-

Se ha dado también una explicación bioquímica del mecanismo de oxidación del hierro en los vinos, y BLAREZ (5) en su obra la menciona.-

Se efectuaría ésta por intermedio de una diastasa, en este caso particular una oxidasa, que por otra parte existe en los vinos, la alcohol-oxidasa del Micorcerma Aceti, microorganismo que provoca la fermentación acética (óxido-fermentación) del vino, y que transforma el alcohol etílico, primeramente en aldehído acético y luego en ácido acético.-

Sabemos por otra parte que existe en el vino un substrato reductor como queda comprobado con la observación del cuadro de la página 6, y por lo tanto se dispone de los elementos del sistema necesarios para explicarnos todo el proceso: substrato reductor, oxidasa, y transportador de oxígeno, que justamente estaría constituido por el hierro.-

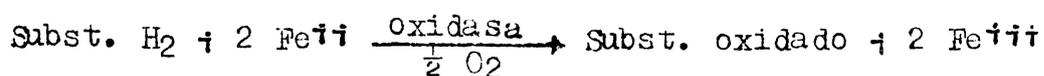
Vamos a exponer brevemente como ha surgido de la teoría clásica el papel que le corresponde al hierro en estos procesos. Según esas ideas, el oxígeno debería ser activado catalíticamente en presencia del substrato oxidable, papel que le correspondería a las peroxidasas capaces de pasar el  $O_2$  molecular a oxígeno atómico, que por o-

tra parte es el único capaz de oxidar, según lo admitido universalmente, en estas condiciones de presión y de temperatura. Pero según WIELAND, resulta difícil concebir como podrían coexistir en los tejidos las distintas enzimas y el oxígeno activo, pues es bien conocido que las enzimas son muy fácilmente destruidas "in vitro" por los agentes oxidantes.-

Ha sido por esto necesario recurrir a hipótesis auxiliares y justamente admitiendo que en el transporte del oxígeno sobre los substratos orgánicos concurren ciertos metales pesados, el hierro sobre todo, metal notoriamente difundido en las células y bien conocido por la función de transporte que cumple por alternativas oxidaciones y reducciones de las sales ferrosas a férricas y viceversa.-

De este modo podemos imaginar fácilmente que el hierro actúa por un mecanismo de transformación alternada de FeII (reductor, fijador del oxígeno molecular) a hierro con valencia más elevada (Oxidante, cediendo oxígeno a los substratos orgánicos). Tenemos así, según WARBURG, un ciclo de los distintos grados de valencia del hierro en el cual una cantidad dada de hierro puede oxidar una cantidad grande de materia orgánica.-

El proceso podría ser esquematizado en la siguiente ecuación:



#### Procesos para evitar la alteración de los vinos.-

Para terminar nuestra primera parte del presente trabajo, vamos a referirnos a los procesos a que son sometidos los vinos para impedir que se presenten en ellos los fenómenos de quebradura que los hace descartar de la venta.-

De todos los procedimientos que se han preconizado para suprimir el inconveniente de quebradura o "casse férrica", en la cual la presencia de cantidades anormales del hierro es la causa fundamental, dos han tenido más aceptación por sus resultados y son por otra par

te los que actualmente se usan.-

El primero de ellos podríamos decir que consiste en provocar rápidamente el fenómeno que naturalmente y de una manera mucho más lenta, va a dar luego origen a la quebradura o "casse férrica". Consiste él en peroxidar el hierro de los vinos con una corriente de oxígeno muy finamente dividida en el líquido.-

El segundo es un verdadero procedimiento químico, ya que consiste en eliminar la casi totalidad del hierro precipitándolo bajo forma de compuesto insoluble.-

En nuestro país, donde los fenómenos de "casse" no han sido todavía considerados no existe al respecto ninguna legislación, no sucede así en Francia donde se contemplan estos inconvenientes existiendo en su reglamentación enológica la autorización para hacer el tratamiento de los vinos por el oxígeno (DECRETO del 19 de Agosto de 1931. Art.3).-

Este tratamiento tiene por objeto someter directamente al vino susceptible de enturbiarse a una oxidación completa del hierro, que se encuentra en un estado de insuficiente oxidación, y se finaliza el tratamiento por un trasiego, filtración y adición al vino de una débil cantidad de ácido cítrico. De esta manera se han salvado en dicho país importantes cantidades de vino, que hubieran tenido que desecharse por no haber sido corregidos con este tratamiento.-

Resultados que por el efecto de aireamiento se observa en dos muestras de vino y que comprueba la eliminación del hierro como compuesto tánico.

	Vino 1895			Vino 1891		
	natural	aireado	aireado y clarificado	natural	aireado	aireado y clarific.
Tanino	1,990	1,898	1,684	1,9986	1,74	1,70
Óxido férrico	0,03054	0,01238	0,01228	0,05107	0,01401	0,0140

Cuadro extraído de SANFINO (3).-

El segundo método, de origen alemán y recomendado por MOSLINGER, consiste en adicionar a los vinos blancos, atacados de quebra dura férrica, una cantidad adecuada y suficiente de ferrocianuro de potasio para precipitar la casi totalidad del hierro presente.-

Este procedimiento ha estado sometido a numerosas discusiones. Sus partidarios sostienen que el ferrocianuro está desprovisto de toxicidad, que es la crítica formidable que se le ha opuesto, y que en las condiciones en que es usado no puede dar lugar a la producción de ácido cianhídrico puesto que la sal se elimina totalmente en el precipitado y deja en el vino un pequeño excedente de hierro.

Por el contrario, los adversarios del método sostienen el peligro que puede acarrear para la salud pública la incorporación a una bebida de un producto tal como el ferrocianuro, que si bien está desprovisto de toxicidad por sí mismo, puede dar nacimiento a ácido cianhídrico en ciertas condiciones y con ello la adición de su stancia tóxica de primer orden.-

Como hecho curioso derivado de estas discusiones se debe señalar que precisamente en Francia donde el empleo del ferrocianuro es tá prohibido, es donde el procedimiento encuentra sus más decididos sostenedores; mientras que en Alemania donde se originó y donde se admite su utilización los químicos se muestran muy reservados respecto de su empleo (9).-

Para terminar diremos a modo de resumen de la acalorada discusión que alrededor del punto se ha suscitado, que CHELLE, profesor de química de la Facultad de Medicina y Farmacia de Bourdeaux ha pu blicado un trabajo (10) sobre el empleo del ferrocianuro como clarificante y llega a las siguientes conclusiones:

- 1º el ferrocianuro de potasio es un excelente clarificante de los vinos ferruginosos;
- 2º correctamente empleado no debe quedar la menor traza en el

vino;

3º un tratamiento bien realizado no deja en el vino ningún producto tóxico.-

Por el contrario MUSSO, (9) anteriormente citado, llega a la conclusión "que el ferrocianuro utilizado como clarificante en los vinos, puede ser nocivo en ciertas condiciones y que su empleo debe ser sometido a precauciones minuciosas".-

Se ha propuesto también el empleo del ácido fosfórico como agente precipitante por clarificación, pero en realidad el procedimiento tiene por vista sustituir el ácido tártrico, además que con la incorporación del ácido fosfórico comercial se introduce arsénico, que aquél lleva como impureza, lo que da origen a nuevos peligros o inconvenientes.-

## II.- Normas analíticas para la evaluación del hierro.

- a) Métodos gravimétricos.
- b) Métodos volumétricos.
- c) Métodos colorimétricos clásicos.
- d) Métodos fotométricos.-

En el capítulo primero, nos hemos referido al fundamento teórico de la importancia de la evaluación del hierro en los vinos. Nos toca ahora considerar, en esta segunda parte el problema químico analítico a resolver.-

Lo que importa determinar en los vinos es el estado en que se encuentra el hierro, porque dependen de éste los defectos de limpieza que puedan observarse. Es por eso que debe operarse sobre el vino, directamente, natural, sin hacerle sufrir ningún tratamiento capaz de modificar el equilibrio, siempre inestable entre las sales ferrosas y férricas.-

Vamos a precisar cuales son esos estados del hierro (11).-

1°) Si tomamos un volumen de vino y le adicionamos solución de ferrocianuro de potasio se desarrolla una coloración, que podemos compararla con la desarrollada por una escala colorimétrica, preparada con cloruro férrico más una cantidad dada de ferrocianuro de potasio. Evaluamos de esta manera los iones  $Fe^{+++}$ .-

2°) Si en las mismas condiciones anteriores le adicionamos al vino agua oxigenada, las sales ferrosas incoloras se transforman en seguida en ferrocianuro férrico azul y la intensidad de coloración final debe corresponder a la suma de sales  $Fe^{++}$  ;  $Fe^{+++}$ .-

3°) Aplicando el procedimiento en las condiciones antedichas, el método del ferrocianuro de K da frecuentemente, como lo han comprobado Ribereau-Gayón, cantidades de Fe ( $Fe^{++}$  ;  $Fe^{+++}$ ) inferiores al hierro total evaluado por el sulfocianuro, ya sea en las cenizas del vino como sobre el vino mismo adicionado de HCl y agua oxigenada.-

Es para explicar estas diferencias en las distintas evaluaciones, que los autores nombrados admiten la formación de un complejo especial férrico, que no es evaluable por el ferrocianuro de K, al que le dan el nombre de "hierro complejo" y representan por la notación  $\text{Fe}^c$ .-

Podemos entonces considerar después de las comprobaciones de estos autores que el hierro se encuentra en los vinos bajo las tres formas siguientes:

$\text{Fe}^{iii}$  = cantidad dada por el ferrocianuro de K sin adición de agua oxigenada.-

$\text{Fe}^{ii}$  = Cantidad dada por el ferrocianuro de K con adición de agua oxigenada menos cantidad dada por el ferrocianuro sin adición de agua oxigenada.-

$\text{Fe}^c$  = Cantidad dada por el ferrocianuro sin agua menos la cantidad dada por el ferrocianuro de K sin agua oxigenada.

El Fe III contenido en los vinos aireados no se encuentra al estado de sal simple, sino combinado en los complejos donde permanece más o menos disimulado a los reactivos: sobre el ferrocianuro no lo hace inmediatamente, pero conserva la propiedad de reaccionar con el tiempo; no produce combinaciones insolubles con el ácido fosfórico y casi no reacciona con el sulfocianuro, en ausencia de HCl; entendiéndose bien, que una adición de ácidos destruye estos complejos y hace aparecer la coloración correspondiente al hierro presente. Lo mismo sucede con la calcinación, suponiendo aún que el Fe II sea engarzado en los complejos; en todo caso el porcentaje de concentración de iones libres  $\frac{\text{Fe}^{iii}}{\text{Fe}^{ii}}$  es bien inferior a la relación de concentraciones totales  $\frac{\text{Fe III}}{\text{Fe II}}$  que es siempre notable para los vinos aireados.-

Los complejos formados son imperfectos, la disimulación al reactivo no es absoluta sino que está en función de la concentración

y del reactivo utilizado. El hierro no se halla combinado en estos complejos que son verdaderas micelas coloidales, o si lo está es en débil parte puesto que atraviesa las membranas dializantes.-

Nosotros hemos visto que estos hechos presentan en enología suma importancia, Sin embargo la existencia o no existencia de este hierro complejo y las consecuencias que de él se deducen no son admitidas por todos los enólogos. Dubaquié (12) y Ferré y Michel (13) han atribuido esta disimulación de los reactivos, a una acidez real insuficiente de los vinos para permitir el desarrollo perfecto de la reacción. Siendo coloreada la parte indisiciada, tanto para el ferrocianuro férrico como para el sulfocianuro férrico, ya que los iones por sí sólo son incoloros, se comprende que el pH del medio actuando sobre la menor o mayor disociación tenga mucha importancia en la intensidad de color.-

En efecto, Ferré y Michel anteriormente citados, han hecho ensayos con el ión férrico más ferrocianuro de K en soluciones sintéticas, utilizando un medio mineral a base de HCl y un medio orgánico a base de ácido tártrico. las soluciones habían sido preparadas de manera que tuvieran la misma acidez titulable (N/10) pero distinta acidez real (pH).

Con estas soluciones preparaban escalas colorimétricas testigos en las que el tenor en hierro correspondía a una concentración: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 miligramos por litro.-

Los resultados obtenidos eran los siguientes:

<u>Medios</u>	<u>pH</u>	<u>Fe en miligramos por litro</u>									
HCl n/10	1,04 (testigo)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	
ácido tártrico n/10	2,2	2	4	5	7	9	10	12	14	16	
ácido tártrico n/10	2,7 3,0	2	3	5	6	7	8	10	12	14	
más		1	3	4	5	6	7	8	9	10	
tartrato de soda	3,5	0	0	0	2	2	3	5	5	5	

----- G R A F I C O N º 1 -----

mg. Fe%



— Iones Fe<sup>+++</sup>

— Iones Fe<sup>++</sup>

pH

Si para la mejor comprensión del cuadro, se representan los resultados en una curva (gráfico 1) observamos que para la misma cantidad de hierro 18 miligramos por mil, la máxima coloración se encuentra entre el pH comprendido de 1 a 1,5. A partir de pH 2,5 decrece rápidamente y con pH 3,5 la coloración obtenida no representa más que la tercera parte del Hierro existente.-

Sin embargo Ribereau - Gayon, refuta estas conclusiones de una manera muy simple y por el siguiente razonamiento: en una solución N/10 de ácido acético, cuya acidez real y de titulación son muy semejantes a la del vino en general, el hierro produce la coloración máxima, no aumentando por adición de ácido tanto para el ferrocianuro como para el sulfocianuro. Por el contrario en una solución N/10 de ácido oxálico, que debería producir de acuerdo a lo sostenido por Ferré y Michel la coloración máxima ya que su concentración en iones H es 20 veces mayor, el hierro no da ninguna coloración y aún una adición de HCl de 10 % no basta para compensar el déficit de intensidad de color dado por el sulfocianuro.-

Se deduce entonces que las disimulaciones observadas, no pueden atribuirse a una sola cuestión de concentración de iones H y que debe atribuirse, por consiguiente, a la menor o mayor combinación que se produce entre el hierro y los distintos aniones de ácidos orgánicos e inorgánicos del vino.-

Además y en forma de confirmación estas distintas combinaciones han sido comprobadas por Genevois (14), quien demuestra que las condiciones de formación y estabilidad de los compuestos ferritartratos y ferrimalatos son tales que deben existir necesariamente en los vinos.-

En el año 1934, Casale (15) en un importante trabajo que ha sido luego continuado (16), ha dado del punto una corroboración definitiva diciendo: "mientras la mayoría de los autores sigue conside-

rando la quebradura o "casse" férrica como un fenómeno de simple oxidación sin dar ninguna importancia a la naturaleza de las sustancias que están incluídas, el conocimiento perfecto del fenómeno y de las sustancias que los determinan son condiciones indispensables para poder encajar el fenómeno mismo, en la explicación que a nosotros más nos agrada".-

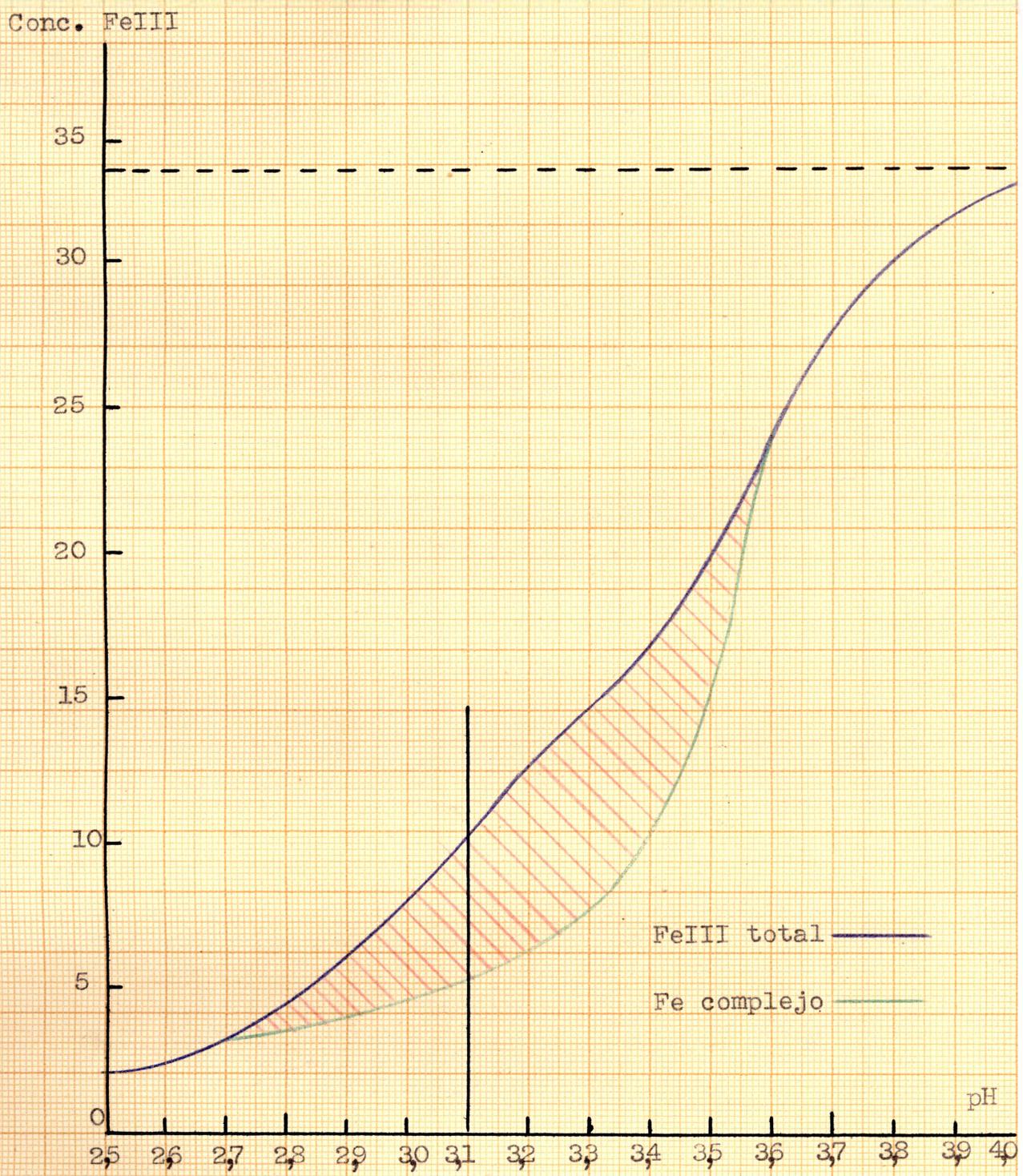
En este trabajo, el citado autor, después de 18 experiencias rigurosamente llevadas llega a las siguientes conclusiones que pueden ser hoy consideradas como las definitivas sobre el tema:

- 1°) El Fe contenido en una solución constituída por todos los ácidos del vino existe sólo en pequeña cantidad al estado salino, mientras para la mayor parte forma compuestos coloidales de hidróxido férrico que mantiene absorbido el anión de los ácidos.-
- 2°) Entre estos compuestos puede fácilmente insolubilizarse aquél que el hidróxido férrico forma con el anión fosfórico y con el tanino. El primero se insolubiliza cuando la concentración del hierro no es muy baja y el del medio tiene un valor de pH de cerca de 2,9 y las sales orgánicas tienen una baja concentración; el segundo se insolubiliza cuando el valor de pH es de cerca de 4,4 y las sales orgánicas tienen una elevada concentración.-

De todo lo anterior deducimos la conclusión de que si bien la formación de los complejos del hierro en los vinos y su disimulación a los reactivos en este estado puede considerarse hoy como in discutible, para la evaluación colorimétrica de este hierro es necesario tener en cuenta el pH del medio en que estamos trabajando, que debe tratarse de corregirlo para llevarlo a las zonas óptimas de evaluación.-

La siguiente experiencia y su representación en un gráfico (N°2) aclara convenientemente todo lo anteriormente expuesto. Un vino de

GRAFICO N° 2



pH 3,1 y que contiene originariamente 34 miligramos de hierro total, se coloca en frascos cada uno de los cuales se lleva a pH diferentes por adición de ácido sulfúrico N/1 ó de hidróxido de K N/1. El vino ha sido privado de oxígeno por vacío, tratando de pasar todo el FeIII a Fe II y luego saturado de oxígeno por agitación enérgica y dejado a 12,5 de temperatura.-

El examen de la curva nos indica claramente el fenómeno: crecimiento continuo de Fe III total y del hierro engarzado en los complejos solubles a medida que transcurre el tiempo y la oxidación progresa, englobando finalmente la totalidad del hierro.-

El segmento de recta de las ordenadas que encierra la zona del área subrayada comprendida entre los puntos de dichas ordenadas que cortan a ambas curvas I y II representa la parte del hierro total que se encuentra al estado de hierro ferroso y férrico en equilibrio entre sí, de acuerdo a la ecuación:  $Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}$  y con la parte no disociada que corresponde a esta porción de hierro total y cuya importancia en los fenómenos de quebradura o "casse" hemos considerado. Queda así más claramente definido cuales son los distintos estados del hierro que interesa determinar:  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  y  $Fe^C$ . Pasaremos ahora a ocuparnos de los métodos que se han propuesto para su determinación, haciendo primeramente un comentario sobre los gravimétricos y volumétricos, para ocuparnos luego de los colorimétricos clásicos y por fin de los fotométricos que son sobre los cuales nosotros hemos preferido trabajar por razones prácticas.-

#### a) Métodos gravimétricos.

1°) Determinación de hierro como óxido férrico: este procedimiento cuyo detalle se consigna en la obra clásica de Scott (17) y que es uno de los métodos más usados para determinar el hierro (F.P. Treadwell) no es aplicable en el presente caso de los vinos. Consi-

derando las cantidades extremadamente pequeñas de hierro en que nos vemos precisados a trabajar, los errores que se producen por inevitables defectos de técnica son proporcionalmente muy grandes. Además que con este procedimiento no es posible evaluar los distintos estados del hierro a que nos hemos referido, por lo que se le descarta como método aplicable al examen de los vinos en general.

2°) Determinación del hierro con "Cup ferrón" o aminonitrosifenilhidroxilamina o reactivo de Baudisch. (18), Podemos decir que su empleo tampoco es posible por las mismas razones apuntadas en el caso del método anterior, siendo más bien aplicable al análisis de minerales ferruginosos, o muestras que contienen hierro en proporciones elevadas, como lo expresa Benedetti (19) en su trabajo de tesis doctoral.-

b) Métodos volumétricos.

El método de Margueritte para la determinación de hierro, fundado en el paso de ión ferroso a férrico, por la técnica que requiere y por las mismas razones que hemos señalado en los métodos gravimétricos es igualmente descartado para estos casos. Lo mismo puede decirse de los métodos de Zimmermann - Reinhardt ( $\text{Cl}_2\text{Sn}$ ), Penny y Schabus ( $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ ), método yodométrico de Karl - Mohr y el de K. Knecht y E. Hibbert ( $\text{Cl}_3\text{Ti}$ ).-

c) Métodos colorimétricos.-

La primera ventaja de los métodos colorimétricos es que trazas de sustancias pueden ser determinadas con suficiente exactitud por un camino simple, considerándose a los métodos gravimétricos y volumétricos como productores de errores a veces importantes con tales cantidades mínimas.-

El método colorimétrico es por ello adecuado especialmente para la determinación de micro y semimicro cantidades de sustancia. Para el análisis de macro cantidades los procedimientos gravimétricos y volumétricos son preferibles, ya que son más seguros y exactos, mienu

tras que los colorimétricos ordinarios no permiten en general alcanzar una exactitud mayor de 2%. Como día a día la construcción de los aparatos ópticos avanza en su grado de perfección, el error instrumental puede esperarse sea reducido a décimas por ciento. El análisis fotométrico logra entonces competir con el gravimétrico y con el volumétrico en lo que concierne a seguridad, sumando a lo anterior el poder tener la gran ventaja de ser más simple, económico y práctico como ahorro de tiempo (20).-

El análisis químico fotométrico que comprende en consecuencia la colorimetría, la espectrofotometría y la nefelometría (21) puede definirse como el análisis cuantitativo que está basado en la medida de las cantidades de luz absorbida por una solución coloreada (colorimetría, espectrofotometría), por una suspensión blanca (turbimetría) o por la medida de luz dispersa por una solución (nefelometría).

Desde que la densidad óptica o intensidad de color es una función de la concentración de las sustancias a ser determinadas, puede ser usada para cuidadosos análisis cuantitativos bajo condiciones controladas de medidas,-

La densidad óptica guarda usualmente una relación directa con la concentración, aún cuando sean usadas soluciones muy diluidas, en tal caso se dice que sigue o se conforma a la ley de Beer.

Si la sustancia es coloreada, la concentración en una solución puede ser determinada directamente por colorimetría o espectrofotometría; si la sustancia es incolora, puede ser a menudo transformada en un compuesto coloreado por alguna reacción química adecuada.-

En colorimetría la luz natural blanca, o el espectro continuo artificial (entre el rojo y el ultravioleta), es usada generalmente como luz fundamental y las medidas son hechas con un simple instrumento llamado colorímetro.-

En la colorimetría clásica se hace uso de la siguiente fórmula:

$$c_x = \frac{l}{l_x} c$$

en la que:

$l_x$  es el largo de la columna del desconocido

$l$  es el largo de la columna del conocido

$c$  es la concentración de la solución testigo

$c_x$  es la concentración a averiguar.-

Aún puede hacerse una escala en tubos colorimétricos con concentraciones crecientes conocidas de la substancia a determinar. Entre los tubos de esa escala se coloca la solución desconocida cuyo color ha sido desarrollado de análoga manera que los de la solución testigo y llevando todos los tubos a un mismo volumen. Es fácil de esta manera comparar a simple vista las distintas coloraciones y determinar así cual es de ellas más aproximada.-

Es precisamente en estos métodos colorimétricos, sobre los que se han basado hasta ahora las evaluaciones del hierro en los vinos.

Son en efecto ellos los métodos preferidos, desde que por las mínimas cantidades en que este metal se encuentra, cinco a treinta miligramos por litro, y teniendo en cuenta la cantidad de muestra sobre la que se opera, los que permiten practicar las evaluaciones con rapidez y aceptable exactitud como ya se ha mencionado.-

Las reacciones químicas que se aprovechan habitualmente para desarrollar compuestos coloreados del hierro y que permiten por su intensidad de color, tono y sensibilidad la comparación colorimétrica, son dos: la del ferrocianuro férrico, o sea formación del clásico azul de Prusia y la del sulfocianuro férrico, que presenta coloraciones que van variando desde el amarillo pálido al rojo sangre.

#### Método ferrocianométrico.-

En Noviembre de 1929, se publica en los Anales des Falsif. et

Fraudes un método de Rikereau-Gayón (11), que permite efectuar una evaluación colorimétrica de hierro total, basada en la coloración tomada por los vinos adicionados de ferrocianuro de K y agua oxigenada.-

El fundamento del método consiste en comparar esta coloración, desarrollada directamente en los vinos blancos, con la coloración dada por una solución de cloruro férrico de título conocido y adicionada igualmente de ferrocianuro de K.-

La escala de comparación es obtenida disolviendo un gramo de alambre de Fe purísimo en HCl, al cual se adicionan algunas gotas de ácido nítrico con el objeto de transformar todas las sales ferrosas a férricas. Una vez disuelto el hilo de hierro se completa el volumen de 1000 cm<sup>3</sup> con agua destilada. La solución así preparada se conserva por largo tiempo. A partir de esta solución, se preparan seis líquidos cuyos títulos son: 3, 6, 9, 12, 15, 18mg. de Fe por litro, proporciones que se consiguen midiendo 3, 6, 9, 12, 15, 18 cm<sup>3</sup>. de la solución madre y llevándolos a 1000cm<sup>3</sup>.-

La escala se prepara colocando 10 cm<sup>3</sup>. de líquido titulado en tubos de ensayo de igual diámetro y volumen, a los que se le agregan una gota de ferrocianuro de K en los tres primeros y dos gotas en los tres últimos; luego finalmente se les adicionan tres gotas de agua oxigenada a 12 volúmenes a todos los tubos para tener la seguridad de la completa oxidación de las sales ferrosas.-

La evaluación propiamente dicha, se efectúa tomando 10 cm<sup>3</sup>. de vino en el que se va a realizar el ensayo y vertiendo los mismos reactivos y en el mismo orden que en el caso de la preparación de la escala.-

La comparación se efectúa por examen directo a simple vista y por intercalación en los tubos de la escala colocados a la luz y en una gradilla conveniente.-

Esta escala se conserva durante algunas horas.-

Los inconvenientes de este método son los siguientes: por encima de los 18 mg. la comparación de tintes se hace difícil por la intensidad de color y además por que no es posible evaluar con él, el hierro ferroso ( $Fe^{+2}$ ) y el hierro complejo ( $Fe^C$ ) que son justamente los que la experiencia constante muestra como responsables de los fenómenos de quebradura o "cassee" férrica o quebradura o "cassee" química como las denomina A. Magistocchi en su obra sobre Enología (22).-

En el año 1930, Malvezin (23) ha publicado un método de evaluación de sales ferrosas en los vinos blancos que consiste en comparar la coloración producida por un volumen determinado de vino blanco, adicionado de ferrocianuro de K al 1% con el originado en las mismas condiciones por una solución ferrosa de título conocido.-

Como la cantidad de sales ferrosas de los vinos es muy pequeña, la escala se prepara con pequeñas cantidades de sal ferrosa, 0,001 a 0,005%.-

El color azul tomado por el vino (azul de Turnbull) es generalmente más intenso que el de la escala; se lleva entonces a identidad por agregado de un volumen de agua destilada al vino bien medido: el volumen necesario para obtener la identidad de tinte es el coeficiente que permite calcular la proporción de hierro ferroso del vino analizado.-

Tendríamos así dos métodos, que por su aplicación conjunta en una misma muestra, nos darían las cantidades de sales ferrosas y férricas que contiene.-

Un método similar al de Ribereau-Gayón aparece en el año 1930, cuyo autor Hanak (24) sostiene por su parte que el hierro total de los vinos es mejor determinarlo en las cenizas de los vinos oscuros; aunque puede ser determinado directamente en los vinos blancos. Pa-

ra la determinación en las cenizas suavemente incineradas del residuo de los vinos, se disuelven éstas en HCl y determina el Fe en el filtrado por los usuales métodos colorimétricos. Para el método directo, indica tratar 25 cm<sup>3</sup>. de muestra por 0,7 de 1,5 cm<sup>3</sup>. de solución de ferrocianuro de K al 0,5%, adicionar una gota de Cl<sub>3</sub>Fe y una pequeña acidez mineral.-

En el año 1953, Ferré y Michel, en un trabajo anteriormente citado (13) vuelven a ocuparse del método ferrocianométrico y lo aplican ahora a la evaluación colorimétrica de sales ferrosas y férricas en los vinos blancos, comparando la coloración azul inicial tomada por el vino adicionado de ferrocianuro de K (Fe<sup>iii</sup>) y la coloración final obtenida después de adicionar ferrocianuro de K más agua oxigenada (Fe<sup>ii</sup> + Fe<sup>iii</sup>).-

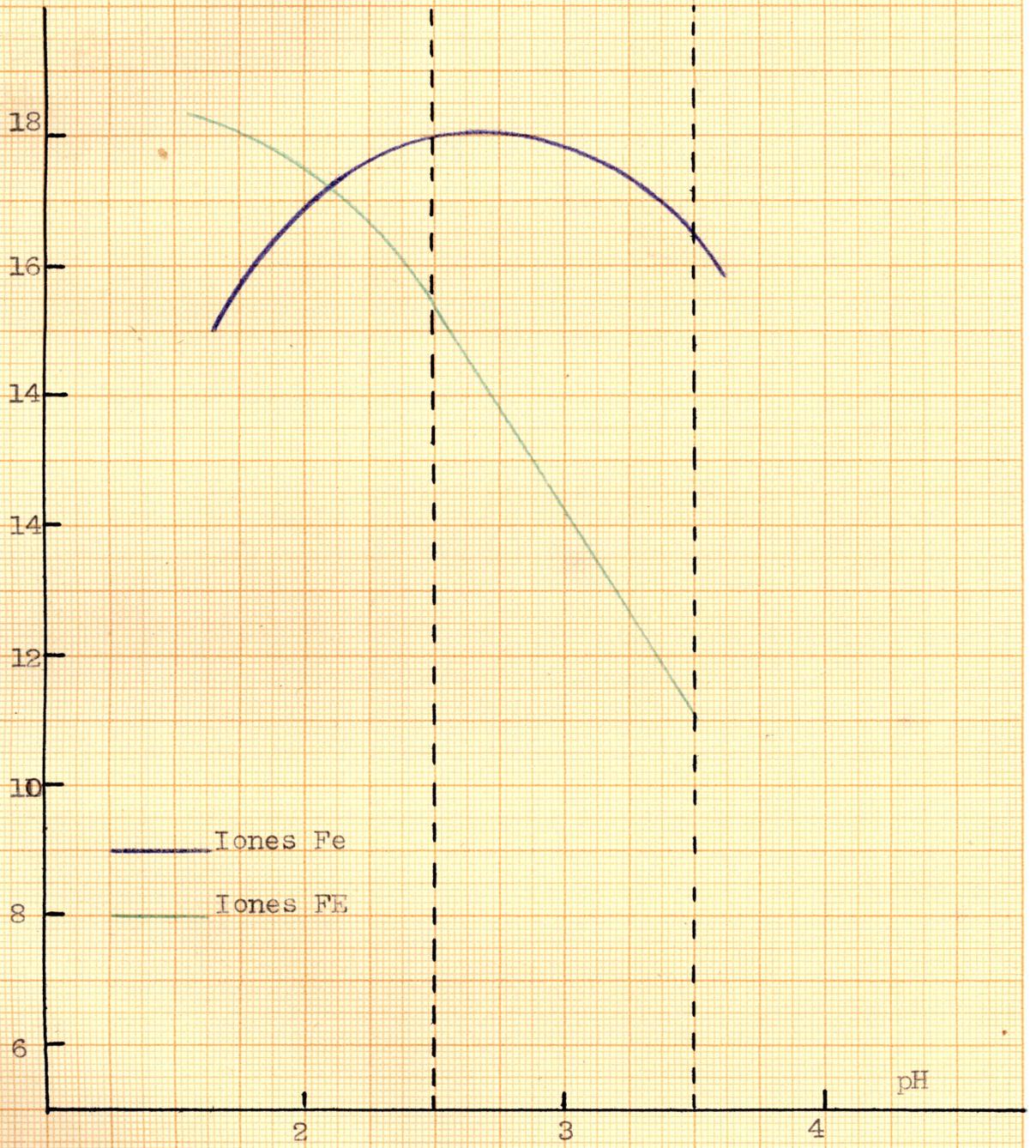
Para que estas dos reacciones sean cuantitativas, es necesario que con una cantidad determinada de Fe la intensidad colorante de ferrocianuro férrico sea la misma, en el medio mineral de la escala y en el medio orgánico del complejo constituido por el vino. La experiencia ha demostrado a este respecto que bajo la influencia de diversos factores, la coloración del ferrocianuro férrico está más o menos enmascarada.-

Estas influencias son debidas sobre todo, al pH, como ya lo hemos hecho resaltar en el gráfico 1, el cual influye tanto en la evaluación de las sales férricas como en la de las sales ferrosas, pero son sobre todo los iones férricos los que ofrecen las más grandes influencias.-

En el siguiente cuadro y en el gráfico N° 3 se resumen todas estas influencias:

GRAFICO Nº 3

mg. Fe ‰



		<u>Fe en mg. por litro</u>		
		<u>pH</u>	<u>Fe</u>	<u>Fe</u>
Vino adicionado de HONa correspond.	$\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ cm}^3 \text{ N}\% \\ 20 \text{ " " } \\ 10 \text{ " " } \end{array} \right.$	3,7	7	16
		3,4	10	17
		3,1	11	18
Vino natural		2,9	12	18
Vino adicionado de HCl correspond.	$\left\{ \begin{array}{l} 25 \text{ cm}^3 \text{ N}\% \\ 50 \text{ " " } \end{array} \right.$	2,3	16	17
		1,7	18	16

La técnica empleada por estos autores, Ferré y Michel, es similar a la de Ribereau-Gayon. Este método ferrocianométrico ofrece la desventaja de que los tintes que se obtienen son muy oscuros y cuando se trata de evaluar el Fe total por destrucción de los complejos de Fe por un ácido mineral se acentúa tanto su color que hace la comparación muy difícil.

Por otra parte, sabemos que no conviene diluir mucho el vino. Es por eso que los sucesivos trabajos que se han efectuado a partir de 1933, se refieren todos al método sulfocianométrico que no presenta esas dificultades y es al mismo tiempo más sensible.

Como dato interesante citaremos que en la obra de Fabre (6) se aconseja una evaluación aproximada del Fe existente en los vinos.

Para aquellos analistas que no están acostumbrados a hacerla, indica el empleo de los tubos ferrométricos de Hubert, que están constituidos por un tubo de medidas fijas, terminados en una prolongación angostada dividida en 5 partes iguales cada una de las cuales constituye los grados Hubert, que son empíricos. Este ensayo se basa en la medida del volumen del precipitado que se recoge en esa prolongación cuando a una cantidad fijada de vino se le añade una cantidad determinada de ferrocianuro de K. Los resultados

obtenidos son los que se expresan a continuación:

0\_a\_1: Vino normal.

1\_a\_2: de tenor algo elevado y de persistencia dudosa.

2\_a\_3: " " muy " " el vino se enturbia~~rá~~.

3\_a\_4: el vino se quebrará.

Estos tubos ferrométricos han dejado de usarse.-

a) - Método sulfocianométrico.

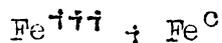
Los métodos sulfocianométricos de evaluación del hierro, que aprovechan la coloración rojo intensa que dan las sales férricas con el sulfocianuro de potasio o de amonio, han sido objeto de numerosas críticas, provenientes sobre todo de que la coloración obtenida varía no solamente con las cantidades de hierro, sino también con las cantidades de sulfocianuro empleado, con la acidez y con la composición del medio (13) y (25).-

Sin embargo, últimamente varios autores en estudios completos realizados sobre esta tema se han declarado cada vez más decididos partidarios de este método. Por su sensibilidad, ya que una parte de hierro puede ser determinada en 50.000.000 de partes y el hecho de que la presencia de ácidos minerales aumenta aquélla, lo hace especialmente aplicable a la determinación de pequeñas cantidades de hierro (26).-

En 1913. TASSYLY, (27), ha demostrado que operando en ciertas condiciones se puede determinar por este procedimiento con rapidez y precisión el hierro existente en las aguas.-

MATHIEU (28) recomienda ya este método para la evaluación del hierro total en las cenizas de los vinos.-

En el año 1931. RIBEREAU-GAYON, (29), indica que agregando directamente a los vinos ácido clorhídrico, sulfocianuro y agua oxigenada, se obtienen cifras comparables a las que da el método MATHIEU y que sin agua oxigenada se obtiene la suma:



Ferré y Michel, en el citado trabajo (13), han establecido las condiciones a cumplirse para que la intensidad de coloración dada por una cantidad determinada de hierro sea la misma en el vino que en la solución utilizada como escala. Como la coloración roja es

debida a las moléculas de sulfocianuro férrico no disociado, se concluye que todos los factores susceptibles de disminuir la disociación del sulfocianuro férrico, tales como la concentración de ión sulfocianúrico y la concentración de iones hidrógeno, provocan inevitablemente un aumento del tinto rojo.-

Según estos autores, en medios orgánicos la formación de sulfocianuro férrico no tiene lugar sino en presencia de ácido clorhídrico, y la coloración obtenida es tanto más acentuada cuanto la concentración en iones  $H^+$  es más elevada.-

Los ensayos efectuados al respecto muestran que para un pH de 1,5 la coloración es constante. Como la adición de ácido clorhídrico no modifica el equilibrio  $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+}$  por lo menos inmediatamente, resulta que el método sulfocianométrico aplicado directamente en los vinos puede ser utilizado para la determinación de hierro bajo dos estados  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ .-

La evaluación de los iones férricos en el citado trabajo es practicada según el siguiente modo operatorio: "En dos tubos de ensayo de igual diámetro (15 mm.) se introduce un centímetro cúbico de ácido clorhídrico al 50% y 5 cm<sup>3</sup>. de sulfocianuro de potasio al 5%. Uno de los tubos recibe 5 cm<sup>3</sup>. de vino mientras que en el otro se agrega 5 cm<sup>3</sup>. de agua destilada y tres gotas de agua oxigenada (esta adición es indispensable en razón de que la solución escala de cloruro férrico contiene casi siempre una cierta proporción de hierro al estado de sal ferrosa.). Con la ayuda de un cuenta-gotas, dando 20 gotas por cm<sup>3</sup>., se establece el equilibrio de coloración por adiciones sucesivas de soluciones tituladas de cloruro férrico, que han sido preparadas atacando alambre de hierro puro por ácido clorhídrico y conteniendo 200 mg. de hierro por litro, utilizando el comparador de Walpole. El número de gotas necesarias multiplicadas por dos, ya que cada gota corresponde a 0,01 mg. de hierro, da la

cantidad de hierro por litro".-

FERRÉ y MICHEL se refieren aquí a la evaluación de iones férricos solamente; pero hay que aclarar que según lo admitido por todos los autores como dijimos en la parte primera, la adición del ácido clorhídrico libera el hierro de los complejos con lo que en realidad el método anterior evalúa la suma de  $Fe^{0}$  ;  $Fe^{iii}$ .-

#### Evaluación de los iones ferrosos:

Esta determinación se efectúa con el mismo tubo que ha sido utilizado para la evaluación anterior y al que se le agregan tres gotas de agua oxigenada. En presencia de sales ferrosas se produce un aumento de la intensidad de color y se restablece el equilibrio como anteriormente.-

Aplicado en estas condiciones, el método sulfocianométrico da aproximaciones del orden de 1 a 2 mg. de  $Fe^{iii}$  y  $Fe^{ii}$  existente en los vinos blancos, aun en presencia de azúcar o de anhídrido sulfuroso libre y combinado.-

La suma de los hierros evaluados corresponde siempre al hierro total determinado después de la destrucción de las materias orgánicas por calcinación.-

Si la cantidad de hierro total pasa de 30 mg., lo que en la práctica se presenta pocas veces, las diferencias en las intensidades de coloración son difíciles de determinar; conviene entonces diluir el vino y la precisión se encuentra así disminuída.-

Los métodos de evaluación del hierro que hemos mencionado hasta ahora se refieren al caso de los vinos blancos. En los vinos tintos, se presenta inmediatamente la dificultad por tenerse que comparar intensidades de color análogas, desde que se trata del desarrollo de una coloración roja en el seno de un líquido que posee una coloración semejante o bastante parecida. En estos vinos la im-

portancia de la determinación no llega a ser la de los vinos blancos, como ya se ha expuesto, porque las cantidades de hierro necesarias para producir la quebradura o "casse" son más elevadas y esta concentración no se alcanza con tanta frecuencia como sucede en los vinos blancos. Con todo, su determinación, también tiene que ser contemplada. El primero que se ocupa del problema fué RIBERAU-GAYON (30) que solucionan la cuestión aprovechando la solubilidad del sulfocianuro férrico en el éter.-

La técnica por él aconsejada es la siguiente: se prepara una solución de cloruro férrico disolviendo un gramo de alambre de hierro en 50 cm<sup>3</sup>. de ácido clorhídrico y un cm<sup>3</sup>. de ácido nítrico, se lleva a ebullición y completa el volumen de un litro. A partir de esta solución se preparan por diluciones adecuadas seis líquidos cuyos títulos son: 3, 6, 9, 12, 15 y 18 mg. por litro.-

En el momento de efectuar la evaluación se toman seis tubos de ensayo del mismo diámetro y en cada uno de ellos se vierte 10 cm<sup>3</sup>. de cada una de las seis soluciones, un cm<sup>3</sup>. de ácido clorhídrico, un cm<sup>3</sup>. de sulfocianuro de potasio al 0,5% y tres gotas de agua oxigenada. Estas soluciones constituyen la escala de comparación.-

Para la evaluación propiamente dicha se emplea un tubo del mismo diámetro que los precedentes y se vierte en éste 10 cm<sup>3</sup>. de vino, un cm<sup>3</sup>. de ácido clorhídrico puro, un cm<sup>3</sup>. de sulfocianuro de potasio de igual concentración que el anterior y tres gotas de agua oxigenada para determinar así, sales Fe<sup>ii</sup> ; Fe<sup>iii</sup> ; Fe<sup>o</sup>, vale decir hierro total.-

El método hasta este momento es idéntico para los vinos blancos que para los tintos. Para los primeros, el autor efectúa las comparaciones con los tubos de la escala colorimétrica en el block de Walpole, dirigido sobre una hoja de papel blanco fuertemente iluminada. Permite compensar la coloración propia del vino, colocando detrás de los tubos de la escala un tubo conteniendo vino y

detrás del tubo de vino otro conteniendo agua destilada.-

La aplicación del método a los vinos tintos implica simplemente una adición a todos los tubos, los de la escala y tubo con vino, de 10 cm<sup>3</sup>. de éter que se mezcla suavemente invirtiendo los tubos tres o cuatro veces. El éter disuelve al sulfocianuro férrico, que lo colorea fuertemente en rojo y se separa en la parte superior; la comparación de estas capas da inmediatamente la concentración de hierro total en el vino tinto. En la evaluación del hierro férrico solamente es necesario no agregar el agua oxigenada.-

Pero aquí ya hay una causa de error, pues el éter oxida una parte del hierro ferroso. Esta dificultad se suprime por completo empleando éter amilico recientemente destilado, de esta manera se capta exclusivamente el hierro trivalente, pues no oxida entonces al hierro ferroso.-

En los micrométodos para la evaluación de hierro en pequeñas cantidades, se indica como más conveniente tratar la solución en examen y la solución testigo con una mezcla de partes iguales de alcohol amílico y éter para comparar luego los extractos al colorímetro (A. O. A. C. 1930. pag.103).-

En la obra de FABRE, anteriormente citada (6) se menciona esta evaluación colorimétrica por el sulfocianuro férrico, método que emplea en la determinación del hierro total que es el único del cual se ocupa y cuya técnica es análoga a la de FERRÉ y MICHEL operando sobre las cenizas de los vinos.-

#### d) Métodos fotométricos:

Encaramos ahora la evaluación de los estados de hierro en los vinos por medio del espectrofotómetro. Para apreciar las ventajas que este método ofrece sobre los métodos colorimétricos ordinarios, es conveniente considerar aunque lo sea sintéticamente, la teoría sobre la que se funda toda la colorimetría.-

Ambas están basadas (20), (21) y (25) en la ley de LAMBERT y la ley de BEER. La primera se refiere a las longitudes y la segunda a las concentraciones.-

Cuando un rayo de luz monocromática incide sobre una capa homogénea de una sustancia, una parte de esta luz es reflejada, otra es absorbida y otra es transmitida,-

A la luz original vamos a llamarla  $I_0$ , a la luz reflejada  $I_r$ , la luz absorbida será  $I_a$  y la transmitida  $I_t$ . De manera que la igualdad será la siguiente:

$$I_0 = I_r + I_a + I_t$$

En colorimetría y espectrofotometría se opera con soluciones y en ellas  $I_r$  puede ser despreciada; entonces:

$$I_0 = I_a + I_t$$

Ley de LAMBERT:

Las cantidades de luz monocromática absorbida por la materia es proporcional a la intensidad de la luz incidente o expresada en otras palabras, la razón de la intensidad de la luz transmitida  $I_t$  e incidente  $I_0$  es constante:

$$I_t = I_0 \cdot a \quad \therefore \quad \frac{I_t}{I_0} = a \quad (1)$$

Este factor a expresa la fracción de luz incidente que es transmitida por una capa de un cm. de espesor, se lo denomina frecuentemente coeficiente de transmisión.-

Supongamos ahora que luz de intensidad  $I_0$ , cae sobre una infinitamente delgada capa dl del medio absorbente, el decrecimiento en intensidad dI de luz incidente es proporcional a  $I_0$  y dl:

$$dI = - k I_0 dl \quad (2)$$

k es un factor de proporcionalidad.-

El segundo miembro se encuentra afectado por el signo menos para indicar que a una disminución de la longitud de capa correspon-

de un aumento de la intensidad de luz transmitida. Por una aplicación de análisis matemático esta expresión (2) se convierte en la siguiente:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l} \quad (3)$$

BUNSEN y ROSCOE llaman a la constante:  $\epsilon$  coeficiente de extinción.-

Si queremos encontrar el valor de  $\epsilon$  no tenemos más que hacer a  $\frac{I_t}{I_0} = 0,1$ , en tal caso:

$$10^{-\epsilon l} = 0,1 \quad \text{y} \quad \epsilon l = 1$$

de donde.

$$\epsilon = \frac{1}{l} \text{ (ele)}$$

es decir que  $\epsilon$  es el valor recíproco del grosor de las capas en cm. cuando  $I_t$  es igual a:  $\frac{I_0}{10}$  .-

#### Ley de BEER:

Hasta ahora hemos considerado la absorción y transmisión de la luz únicamente como una función del espesor de la capa. BEER casi simultáneamente con BERNARD estudió la influencia de la concentración de la substancia coloreada en las soluciones, sobre la transmisión y la absorción de la luz. Hallaron la misma relación entre la transmisión y la concentración que LAMBERT había encontrado entre transmisión y espesor de la capa. De manera análoga y siguiendo el mismo camino que anteriormente se llega:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\epsilon c} \quad (4)$$

y combinando la ecuación (3) y (4) obtenemos la ecuación fundamental de la colorimetría y espectrofotometría:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l c} \quad (5)$$

El valor de  $\epsilon$  depende del método de expresión de concentración. Si  $c$  está expresada como concentración molar,  $\epsilon$  expresa el coeficiente molar de extinción y es igual al valor recíproco del espesor (en cm.) de una solución molar (concentración igual uno) en que

$I_t$  es 0,1 de  $I_0$ .-

Esta expresión (4) está en vigor siempre que la ley de BEER sea cumplida.-

Consideremos ahora dos soluciones de una sustancia coloreada con concentraciones  $c_1$  y  $c_2$  y supongámosla colocada en un instrumento en que el espesor de las capas puede ser variado y medido fácilmente (colorímetro). Cuando las dos luces tengan la misma intensidad de color es evidente que:

$$I_{t1} = I_{t2} = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l_1 c_1} = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l_2 c_2} \quad (6)$$

en estas condiciones y siempre que la ley de BEER sea cumplida se encuentra que:

$$l_1 c_1 = l_2 c_2 \quad (7)$$

El colorímetro sirve para dos propósitos:

- 1) Permite una investigación de la ley de BEER por variación de  $c_1$  y  $c_2$  determinando si la expresión (7) está en vigor.
- 2) Permite la determinación de la concentración  $c_x$  de una solución coloreada comparando con una solución de concentración conocida  $c$ .- Cuando el sistema esté ópticamente balanceado tendremos que:

$$c_x = \frac{l}{l_x} c$$

relación que ya empleamos más arriba.-

Cuando se usa un espectrofotómetro no hay necesidad de hacer comparaciones contra soluciones de concentración conocida. Si en la ecuación fundamental (5) hacemos sencillos cambios, tenemos:

$$\frac{I_t}{I_0} = 10^{-\epsilon l c} \quad \therefore \quad \log. \frac{I_t}{I_0} = -\epsilon l c$$

y por consiguiente:

$$\log. \frac{I_0}{I_t} = \epsilon l c$$

y si a este cociente logarítmico lo denominamos  $E$  tendremos:

$$E = \epsilon lc$$

El espectrofotómetro nos da directamente el valor de este cociente  $E$  en un conocido grosor  $l$ . Por cambio de  $l$  y  $c$  podemos ensayar la validez de la ley de LAMBERT-BEER para las soluciones en que estamos trabajando (ecuación (5); constancia de  $\epsilon$ ) y el valor del coeficiente de extinción puede ser determinado.-

Cuando  $\epsilon$  es conocido, la concentración  $c_x$  puede ser determinada simplemente de la relación (9):

$$c_x = \frac{E}{lc}$$

aún si la solución no sigue la ley de LAMBERT-BEER la aplicación de la fotometría puede hacerse. Tomamos una serie de soluciones testigos (concentración conocida) y en un gráfico de coordenadas representamos la curva de la variación de  $E$  con la concentración.-

Llevamos por ejemplo, en las abscisas las concentraciones y en las ordenadas el valor  $E$  que nos da la lectura del aparato. Tendremos así para cada par de valores determinado un punto y la unión de éstos representará la marcha del fenómeno. Habremos así determinado la curva que corresponde a nuestra solución y con ella y sin necesidad de nueva preparación de escala colorimétrica evaluamos cualquier otra solución del mismo compuesto desconocida.-

Cuando el compuesto coloreado sigue la ley de LAMBERT-BEER la representación en el gráfico construido de la manera antes indicada nos da una recta.-

Ventajas que ofrece la evaluación de los distintos estados de hierro por el método fotométrico, desarrollando la reacción del sulfocianuro férrico y con aplicación del fotómetro de Pullfrich.-

a) No hay necesidad de efectuar con éste método escala de comparación, pues la concentración la da directamente la lectura del apa-

rato referida a un gráfico que se determina inicialmente en forma definitiva; o sinó, aplicando el coeficiente de extinción específico medio a partir del cual y muy sencillamente puede ser hallada dicha concentración. Se consigue así un gran ahorro de tiempo y material.-

b) Permite efectuar la evaluación directamente tanto en los vinos blancos como en los tintos. Esta determinación directa en los vinos tintos, por tratarse de un color rojo que se desarrolla en el seno de una solución de análoga coloración, como ya hemos dicho, exige en los métodos hasta ahora propuestos extracción etérea del sulfocianuro férrico empleando éter de reciente destilación (hasta dos horas antes) para evitar que las sales ferrosas se oxiden, lo que es causa de error que se encuentra aumentada por el hecho de que esa extracción no es total y que en soluciones acuosas aproximadamente es de 7:1, coeficiente de equipartición que en el vino puede no cumplirse.

c) Si sumamos el ahorro de tiempo que resulta de las ventajas anteriores a) y b), tenemos que la rapidez en la determinación se ha aumentado considerablemente.-

d) Permite efectuar mediciones más cuidadosas y exactas que en los métodos colorimétricos, que son los únicos que han sido empleados, sobre todo en los casos extremos de concentración donde la apreciación a simple vista por ser el color muy intenso, no ofrece seguridad.-

Es por todo esto que el método espectrofotométrico es el que hemos aplicado en la evaluación de los estados del hierro en el vino, con los excelentes resultados obtenidos que se consignarán más adelante.-

#### Determinación de la curva:

##### 1) Preparación de la solución testigo de hierro.-

Elegimos como tipo la sal de Mohr ( $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot \text{SO}_4(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) aconsejada por WONG (31) y entre nosotros por MARENZI y LIDA (32) para

la evaluación colorimétrica y fotométrica respectivamente del hierro en sangre.-

Pesamos de esta sal cuyo PM. es de 392,15 (33), 7,022 g. que corresponden a un gramo de hierro y la disolvimos en unos 300 cm<sup>3</sup>. de agua destilada. Agregamos a la solución 2 cm<sup>3</sup>. de ácido sulfúrico concentrado, exento de hierro, y calentando ligeramente le adicionamos solución de permanganato de potasio N/10 aproximadamente, cuyo factor hallamos, en una pequeña cantidad por defecto con el objeto de oxidar la sal ferrosa en su casi totalidad. Trasvasamos la solución a un matraz controlado de 1.000 cm<sup>3</sup>. y completamos a un litro. Cada cm<sup>3</sup>. de esta solución contiene 0,001 g. de hierro.-

2) A partir de esta solución testigo preparamos seis soluciones con concentración en hierro comprendida entre los límites extremos en que éste se encuentra en los vinos: de cinco a treinta miligramos por litro. Para ello medimos: 5, 10, 15, 20, 25, y 30 cm<sup>3</sup>. de la solución "madre" de hierro y los diluimos, previo agregado a cada una de ellas de dos cm<sup>3</sup>. de ácido sulfúrico concentrado privado de hierro, a mil cm<sup>3</sup>. en matraz controlado.-

Tenemos así preparadas seis soluciones cuyos títulos en hierro por cada diez cm<sup>3</sup>. son las siguientes:

sol. N°1:	10 cm <sup>3</sup>	corresponden a	0,00005 g. ó	0,05 mg. de hierro %
" N°2:	" "	" "	0,00010 "	" 0,10 " " " "
" N°3:	" "	" "	0,00015 "	" 0,15 " " " "
" N°4:	" "	" "	0,00020 "	" 0,20 " " " "
" N°5:	" "	" "	0,00025 "	" 0,25 " " " "
" N°6:	" "	" "	0,00030 "	" 0,30 " " " "

3) Preparamos una solución normal de sulfocianuro de potasio pesando 9,718 g. y llevándola a 100 cm<sup>3</sup>. en matraz aforado.-

4) Preparamos una solución aproximadamente N/10 de agua oxigenada y le adicionamos 2 cm<sup>3</sup>. de ácido sulfúrico concentrado. Efectua-

mos las correspondientes reacciones en blanco.-

5) Preparación de la escala: En el desarrollo de la reacción de coloración que producen las sales férricas en presencia del sulfocianuro de potasio o amonio hemos tenido en cuenta los siguientes factores actuantes:

a) La presencia de ácido mineral aumenta la sensibilidad del método, por lo cual es especialmente aplicable a la determinación de pequeñas cantidades de hierro (26).-

b) El color rojo que se obtiene, cuya intensidad es proporcional al hierro presente, es debida a la formación del compuesto:  $(\text{SCN})_3\text{Fe} \cdot 9(\text{SCN})\text{K} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; entonces debe haber en la reacción exceso suficiente de ión sulfocianúrico con respecto al hierro presente.-

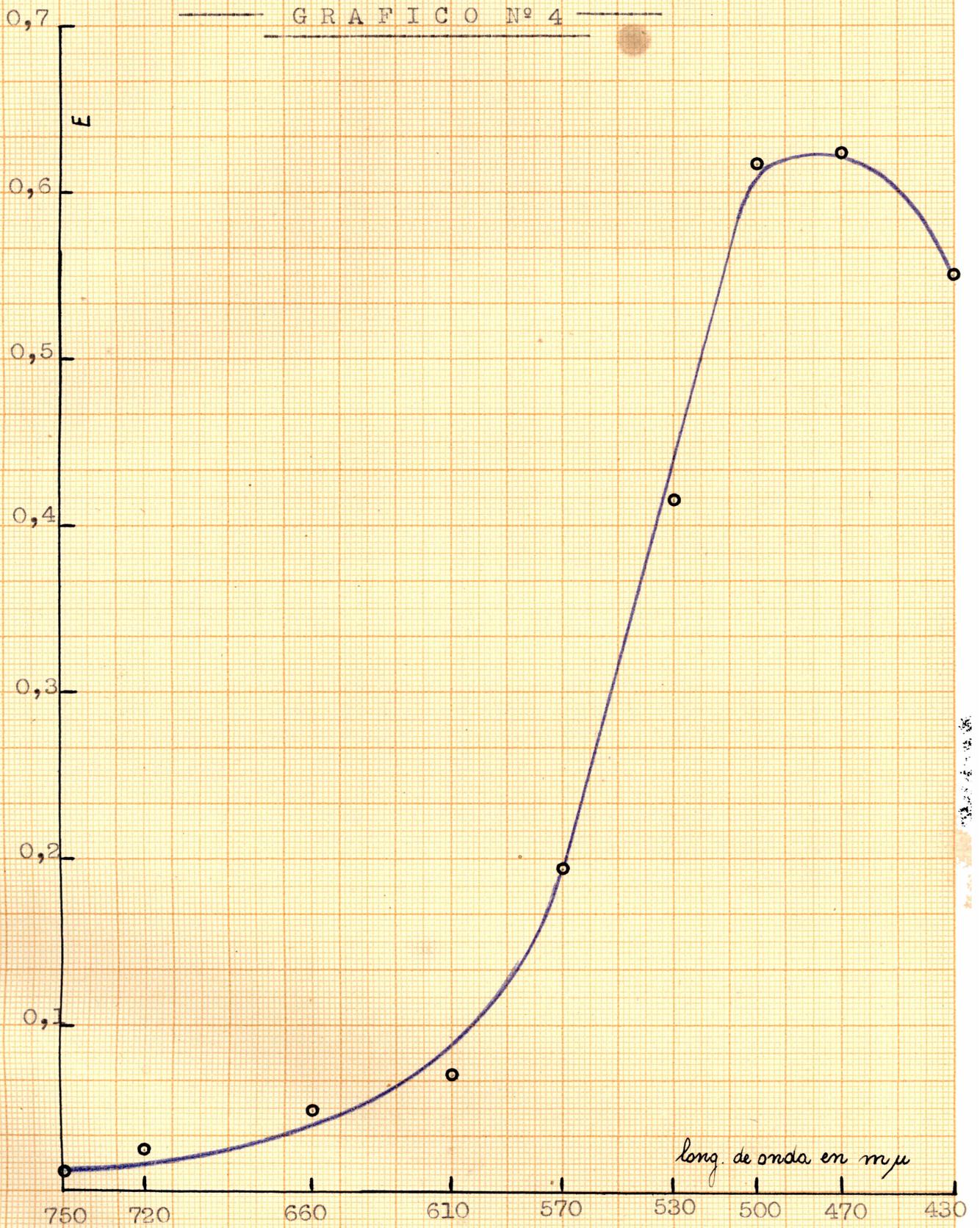
c) La concentración de iones hidrógeno (pH) del medio debe ser alrededor de 1,5 como ya lo hemos dicho anteriormente (13) y que está dentro de lo aconsejado por MELLON y KASLINE (34) para la preparación de soluciones testigos colorimétricas de sales férricas.-

Considerando todos estos factores preparados así nuestra escala: a diez  $\text{cm}^3$ . de las soluciones de hierro obtenidas, como anteriormente se ha indicado se agrega dos  $\text{cm}^3$ . de solución de sulfocianuro de potasio N/10, dos  $\text{cm}^3$ . de solución de agua oxigenada aproximadamente N/10 y completamos el volumen de 20  $\text{cm}^3$ . con ácido sulfúrico al 2% libre de hierro.-

Una vez preparada la escala de las distintas diluciones de hierro, practicamos la determinación espectrofotométrica empleando un aparato de PULLFRICH construido por la casa ZEISS, siguiendo este modo operatorio.-

6) Elección del filtro: Determinamos la curva de absorción para todas las soluciones y resumiendo daremos la obtenida con la solución N°2, trabajando con una concentración en hierro de 0,1 mg. por mil  $\text{cm}^3$ . y con la cubeta de 10 mm. colocando en la cubeta compensa-

GRAFICO N° 4



dora agua destilada, pues los componentes de la reacción no poseen absorción específica.-

<u>Filtro</u>	<u>Lectura del tambor</u>	<u>E</u>	<u>ε</u>
1(S43)	28,1	0,55129	0,551
2(S47)	23,8	0,62342	0,623
3(S50)	24,0	0,61979	0,619
4(S53)	38,4	0,41567	0,415
5(S57)	63,9	0,19450	0,194
6(S61)	85,1	0,07207	0,070
7(S66)	89,0	0,05061	0,050
8(S72)	94,0	0,02687	0,026
9(S75)	96,0	0,1773	0,017

OBSERVACIONES:

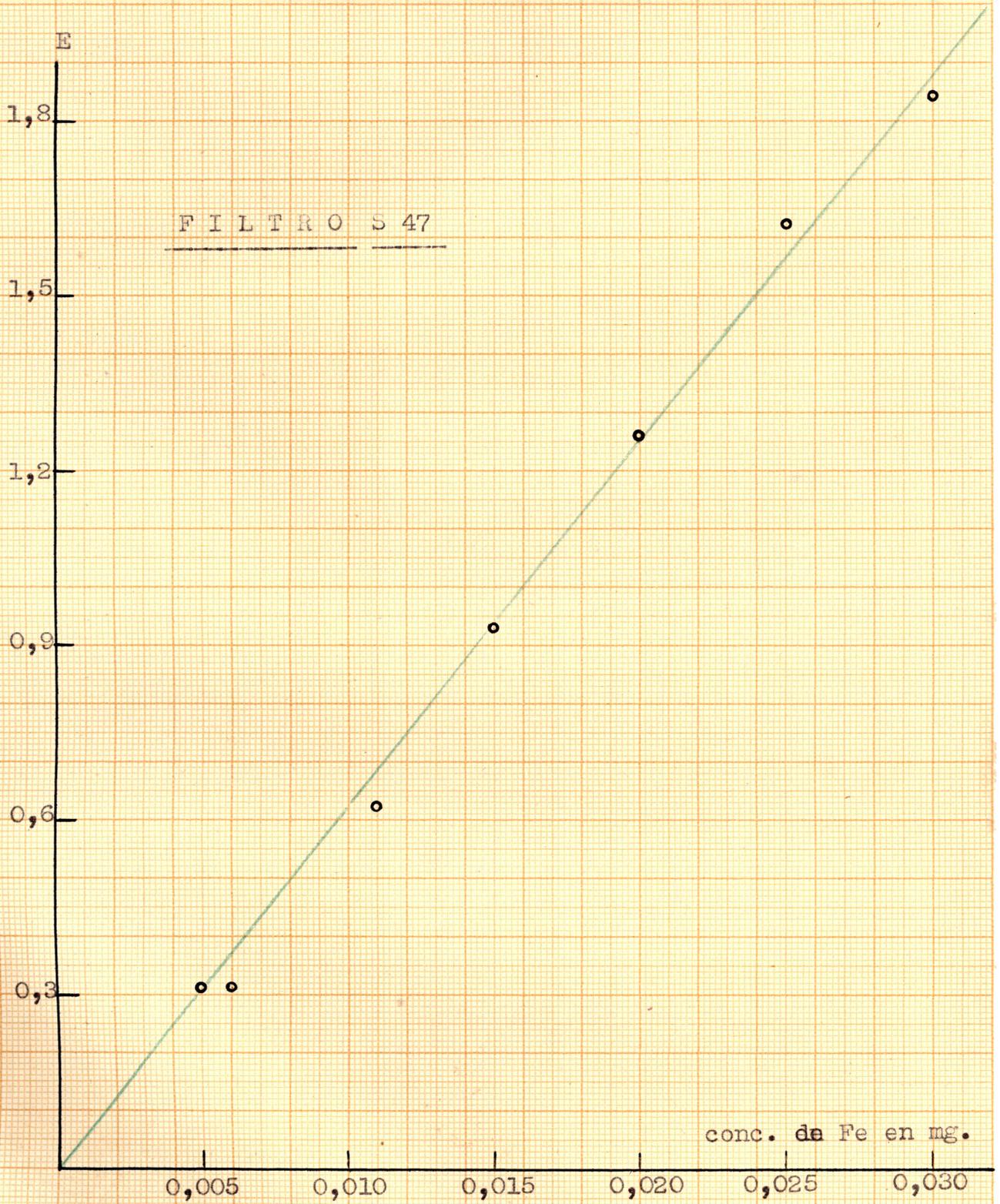
Las lecturas del tambor son promedios de lecturas realizadas con la cubeta a derecha é izquierda.-

El coeficiente de extinción  $\epsilon$  ha sido hallado dividiendo  $E$  por la longitud de la cuba en milímetros (10 mm.) y la concentración tomada en décimas de miligramos (0,1 mg).-

La representación en una curva de este cuadro es la que corresponde al gráfico N°4. De la observación de él se deduce que el filtro a usar es el S47, que corresponde a una longitud de onda de 470 m $\mu$ ., pues es el que presenta máxima absorción.-

7) Determinación de los coeficientes de extinción de las distintas concentraciones de hierro: En el siguiente cuadro figuran los valores de  $E$  obtenidos con los distintos testigos, así como los coeficientes de extinción trabajando con el filtro S47 y referidos todos a un espesor tipo de 10 mm. Estos valores han sido hallados como promedios de 4 determinaciones:

— GRAFICO N° 5 —



<u>CONCENTRACION DE HIERRO EN MG.</u>	<u>VALOR DE E</u>	<u>VALOR DE <math>\epsilon</math></u>
0,05	0,311	0,621
0,10	0,623	0,623
0,15	0,934	0,622
0,20	1,261	0,621
0,25	1,610	0,644
0,30	1,842	0,605

La representación gráfica (Gráfico N° 5) del cuadro en un sistema de coordenadas llevando en el eje de las abscisas las concentraciones del hierro en miligramos y en el de las ordenadas los valores de E nos demuestran que la reacción del sulfocianuro férrico sigue la ley de LAMBERT-BEER, lo que nos permite emplear entonces un coeficiente de extinción medio como factor general.- Este coeficiente resulta ser de 0,625 como valor medio de los coeficientes encontrados para las distintas concentraciones del hierro.-

La fórmula entonces a aplicar resulta ser:

$$\frac{1}{0,625} E_x = C_x$$

o si nó:

$$1,6 E_x = C_x$$

en la cual  $E_x$  es el valor del desconocido y  $C_x$  la concentración del desconocido en mg. de hierro.-

O sino para averiguar  $C_x$  por medio del gráfico, trazaremos una paralela al eje de las abscisas por el  $E_x$  encontrado y el punto en que dicha recta corta a la recta de absorción representa la concentración buscada.-

Aplicación del método y técnica seguida:

Efectuada la elección del filtro y determinada la curva en el caso del sulfocianuro férrico, por seguir la ley de LAMBERT-BEER es una recta; procedimos a la aplicación del método en los vinos emplean

do las siguientes técnicas:

1) Evaluación del hierro total por calcinación:

Con una pipeta, se miden exactamente 10 cm<sup>3</sup>. del vino a analizar y se colocan en una pequeña cápsula de porcelana de 6 a 8 cm. de diámetro.-

Se evaporan lentamente estos 10 cm<sup>3</sup>. de vino al baño maría y luego el extracto siruposo se carboniza sobre llama pequeña y calentando sobre una tela de amianto. El residuo carbonoso obtenido se calienta en la mufla para completar la incineración.-

Terminada la calcinación y una vez enfriada la cápsula, se tratan las cenizas por 10 cm<sup>3</sup>. de ácido clorhídrico puro, libre de hierro, a las que se le agregan después algunas gotas de ácido nítrico concentrado y puro.-

Se hace hervir en seguida muy suavemente, este líquido en una cápsula con buen tiraje, evaporándose cautelosamente hasta completa sequedad.-

El residuo se trata con solución de ácido sulfúrico al 2 por mil calentando suavemente, y si es necesario se filtra; si se efectúa la filtración debe cuidarse de lavar bien el filtro, siempre con soluciones sulfúricas. Una vez lavada la cápsula y el filtro, se efectúan reacciones en blanco en cada una de ellas para comprobar de que la operación ha sido practicada convenientemente.-

Al filtrado se adicionan dos cm<sup>3</sup>. de agua oxigenada aproximadamente N/10 y dos cm<sup>3</sup>. de sulfocianuro de potasio N/10 completándose a 20 cm<sup>3</sup>. con solución al 2 por mil de ácido sulfúrico.-

Esta solución se emplea para las lecturas fotométricas empleando como líquido compensador agua destilada.-

2) Evaluación del ión férrico.

Se miden exactamente 10 cm<sup>3</sup>. de vino al que se le agregan 2 cm<sup>3</sup>.

de sulfocianuro de potasio N/10 y se completa a 20 cm<sup>3</sup>. con ácido sulfúrico al 2 por mil.-

El líquido se lleva al fotómetro empleándose como líquido compensador 10 cm<sup>3</sup>. del mismo vino que se lleva a 20 cm<sup>3</sup>. con ácido sulfúrico al 2 por mil.-

5) Evaluación del ión ferroso más férrico:

Se miden exactamente 10 cm<sup>3</sup>. de vino al que se le agregan 2 cm<sup>3</sup>. de sulfocianuro de potasio N/10, y 2 cm<sup>3</sup>. de agua oxigenada aproximadamente N/10 y se completa a 20 cm<sup>3</sup>. con ácido sulfúrico al 2 por mil.-

Se efectúa la lectura fotométrica empleando análoga solución compensadora que para la evaluación de sales Fe<sup>iii</sup>.-

La diferencia entre (2) y (3) corresponde al ión Fe<sup>ii</sup>.-

4) Evaluación Fe<sup>ii</sup> ; Fe<sup>iii</sup> ; FeC.-

a) 10 cm<sup>3</sup>. de vino exactamente medidos se le añaden dos cm<sup>3</sup>. solución de sulfocianuro de potasio N/10 más dos cm<sup>3</sup>. de agua oxigenada aproximadamente N/10 más un cm<sup>3</sup>. de ácido clorhídrico al 50% y se completa a 20 cm<sup>3</sup>. con ácido sulfúrico.-

b) La solución así preparada se lleva al fotómetro empleando para hacer las lecturas idéntico líquido compensador que en la evaluación de sales Fe<sup>iii</sup>.-

### III - Resultados:

Hemos aplicado el método en 18 muestras de vino, blancos y tintos, que nos han sido facilitados por la Oficina Química Nacional de la Capital Federal para tener así seguridad de su procedencia y de la genuinidad del producto, ya que se tratan de muestras de control oficial.-

Nos apresuraremos a decir que la evaluación de hierro en los vinos, como ya lo hemos hecho resaltar, debe practicarse inmediatamente de extraídos de las cubas de fermentación, de modo que nuestra evaluación en estas muestras no va a tener ya resultados aplicables, pues los vinos sobre los que hemos operado han sufrido muchos trastornos con las oxidaciones correspondientes a cada uno de ellos.-

Sin embargo, para las finalidades que nosotros perseguimos que no son otras que comprobar la aplicabilidad del método fotométrico en la evaluación de los estados del hierro en los vinos, llenan todos los requisitos necesarios.-

Basaremos ahora a reseñar estos resultados:

MUESTRA N° 1

Vino blanco.

Procedencia Mendoza.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro
Fe <sup>+++</sup>	96,9	0,013	0,22
Fe <sup>++</sup> y Fe <sup>+++</sup>	88	0,055	0,88
Fe <sup>++</sup> y Fe <sup>+++</sup> y Fe <sup>c</sup>	68	0,1675	2,90
Fe total por calcinación.	62,8	0,2020	3,23

Fe<sup>+++</sup> = 0,22 mg. por litro

Fe<sup>++</sup> = 0,66 " " "

Fe<sup>c</sup> = 2,02 " " "

Las cantidades de hierro total en esta muestra son muy reducidas, lo que hace sospechar que haya sido sometida a algún tratamiento de eliminación de hierro que en los vinos blancos, particularmente, es muy frecuente.-

La concentración en ión Fe<sup>+++</sup> es como siempre débil pues tiende a combinarse y pasar a Fe<sup>c</sup>.-

MUESTRA N° 2

Vino blanco.

Procedencia San Juan.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro
Fe <sup>+++</sup>	85,1	0,070	1,1
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup>	72,2	0,141	2,2
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup> + Fe <sup>c</sup>	35,4	0,451	7,2
Fe total por calcinación.	31,5	0,504	8,0

Fe<sup>+++</sup> = 1,1 mg. por litro

Fe<sup>++</sup> = 1,1 " " "

Fe<sup>c</sup> = 5,0 " " "

En esta muestra las concentraciones de hierro están dentro de las normales y en consecuencia el vino no presentará fenómenos de quebradura.-

MUESTRA N° 3

Vino tinto.

Procedencia: Surandí (Prov. Buenos Aires).

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro
Fe <sup>+++</sup>	98	0,008	0,14
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup>	68,5	0,164	2,6
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup> + Fe <sup>c</sup>	35,8	0,446	7,1
Fe total por calcinación.	35,3	0,452	7,2

Fe<sup>+++</sup> = 0,14 mg. por litro.

Fe<sup>++</sup> = 2,46 " " "

Fe<sup>c</sup> = 4,5 " " "

La cantidad de sal Fe<sup>++</sup> a pesar de ser superior a los casos anteriores, tampoco alcanza a los límites en que se producirá el fenómeno, que es de 5 a 6 mg. por litro.

Se observa en esta muestra casi una exacta correspondencia entre la suma de Fe<sup>++</sup> + Fe<sup>+++</sup> + Fe<sup>c</sup> y el hierro total evaluado por calcinación.-

MUESTRA N° 4

Vino tinto.

Procedencia La Plata.

	Lectura	E	Concentración por mg. por litro.
Fe <sup>+++</sup>	90,8	0,041	0,67
Fe <sup>++</sup> ; Fe <sup>+++</sup>	20,4	0,690	11,04
Fe <sup>++</sup> ; Fe <sup>+++</sup> ; Fe <sup>c</sup>	16,8	0,774	12,6
Fe total por calcinación.	41,3	0,384	6,1

Fe<sup>+++</sup> = 0,67 mg. por litro.

Fe<sup>++</sup> = 10,3 mg. " "

Fe<sup>c</sup> = 1,6 " " "

En esta muestra la concentración en sal Fe<sup>++</sup> es tal que en ella deberá presentarse el fenómeno de quebradura férrica, pues excede en mucho las cantidades límites.-

Para comprobarlo, aceleramos la oxidación por agitación y al cabo de tres días evaluamos el hierro total por calcinación, cuidando de tomar la muestra de la parte límpida del vino para separarla así del depósito formado.-

El resultado encontrado, 6,1 mg., prueba que el hierro ha sido eliminado con el sedimento ya que esta cantidad está muy por debajo de la evaluada en la suma Fe<sup>++</sup> ; Fe<sup>+++</sup> ; Fe<sup>c</sup>.-

MUESTRA N° 5

Vino blanco.

Procedencia San Juan.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro
Fe <sup>+++</sup>	94	0,026	0,41
Fe <sup>++</sup>	76,2	0,117	1,88
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup> + Fe <sup>c</sup>	37	0,451	6,9
Fe total por calcinación.	32,3	0,490	7,8

Fe<sup>+++</sup> = 0,4 mg. por litro.

Fe<sup>++</sup> = 1,48 " " "

Fe<sup>c</sup> = 4,02 " " "

Esta muestra se trata de un vino blanco dulce; observamos en casi todos estos tipos de vino que la proporción de hierro que se encuentra formando parte de complejos es muy elevada.-

Por otra parte la concentración en hierro ferroso es baja y el vino en consecuencia no sufrirá ningún trastorno.-

MUESTRA N° 6

Vino blanco

Procedencia Mendoza.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro.
Fe <sup>iii</sup>	90	0,045	0,73
Fe <sup>ii</sup>	61,9	0,207	3,3
Fe <sup>ii</sup> + Fe <sup>iii</sup> + Fe <sup>c</sup>	34,2	0,408	7,6
Fe total por calcinación.	36,1	0,442	7,1

Fe<sup>iii</sup> = 0,73 mg. por litro.

Fe<sup>ii</sup> = 2,57 " " "

Fe<sup>c</sup> = 4,30 " " "

Las proporciones de los distintos estados de hierro son normales en esta muestra.-

MUESTRA N° 7

Vino tinto.

Procedencia San Nicolás (Prov. de Buenos Aires).

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro
Fe <sup>iii</sup>	88,3	0,054	1,7
Fe <sup>ii</sup>	----	-----	---
Fe <sup>ii</sup> ; Fe <sup>iii</sup> ; Fe <sup>c</sup>	20,2	0,694	22,2
Fe total por calcinación.	20,5	0,688	22,0
Observaciones: se trabajó en las mediciones con cubas de 5 mm.			

Fe<sup>iii</sup> = 1,7 mg. por litro.

Fe<sup>ii</sup> = -----

Fe<sup>c</sup> = -----

En esta muestra no fué posible realizar las lecturas fotométricas correspondientes a hierro ferroso, pues a medida que el tiempo progresaba se producía enturbiamiento en el líquido; con lo que dichas lecturas no eran constantes y disminuían como indican los siguientes valores leídos: 25,5; 23,5; 20,2.-

La interpretación que damos de este hecho práctico es, que por acción del agua oxigenada las sales ferrosas, que se encuentran en gran cantidad, se oxidan y las sales férricas resultantes se combinan activamente con los taninos, materias colorantes, etc., del vino, y da origen así rápidamente al fenómeno que investigamos.-

Esto se confirma por la elevada concentración de hierro total que alcanza a los 22 mg. por litro.-

MUESTRA N° 8

Vino tinto.

Procedencia: San Nicolás (Provincia de Buenos Aires).

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro
Fe <sup>+++</sup>	98	0,008	----
Fe <sup>++</sup>	85	0,073	1,17
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup> + Fe <sup>c</sup>	59,1	0,228	3,6
Fe total por calcinación.	53,2	0,274	4,4

Fe<sup>+++</sup> = prácticamente no contiene.

Fe<sup>++</sup> = 1,17 mg. por litro

Fe<sup>c</sup> = 2,43 " " "

Esta muestra no presentará fenómeno de quebradura ya que sus concentraciones en hierro son muy pequeñas. Por ser de idéntica procedencia que la muestra N° 7, existe la posibilidad de que aquí se haya efectuado un tratamiento tendiente a eliminar el hierro o que éste se produjo naturalmente en su elaboración.-

MUESTRA N° 9

Vino blanco.

Procedencia San Juan.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro.
Fe <sup>iii</sup>	97	0,013	----
Fe <sup>ii</sup>	73,6	0,133	2,1
Fe <sup>ii</sup> ; Fe <sup>iii</sup> ; Fe <sup>c</sup>	32,3	0,490	7,8
Fe total por calcinación.	27,4	0,562	8,9

Fe<sup>iii</sup> = prácticamente no contiene.

Fe<sup>ii</sup> = 2,1 mg. por litro.

Fe<sup>c</sup> = 5,7 " " "

En esta muestra las proporciones de hierro son normales.-

MUESTRA N° 10

Vino blanco

Procedencia Mendoza.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro
Fe <sup>+++</sup>	52,2	0,284	4,5
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup>	50,7	0,295	4,7
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup> + Fe <sup>c</sup>	39,6	0,402	6,4
Fe total por calcinación.	41	0,387	6,1

Fe<sup>+++</sup> = 4,5 mg. por litro.

Fe<sup>++</sup> = 0,2 " " "

Fe<sup>c</sup> = 1,7 " " "

En esta muestra el hierro se encuentra en su mayor parte oxidado, al estado de sal férrica, siendo casi nula prácticamente la concentración de sales ferrosas.-

Este hierro pasará ahora gradualmente a formar parte del hierro complejo pero sin que sobrevenga ningún inconveniente pues la concentración de hierro total es baja.-

MUESTRA N° 11

Vino blanco.

Procedencia San Juan.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro.
Fe <sup>+++</sup>	87,5	0,058	1,8
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup>	80,4	0,094	3,03
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup> + Fe <sup>c</sup>	20,6	0,686	21,9
Fe total por cal- cinación	21,4	0,669	21,4
Observaciones: las medidas fueron hechas con cubas de 5 mm.			

Fe<sup>+++</sup> = 1,8 mg. por litro.

Fe<sup>++</sup> = 1,2 " " "

Fe<sup>c</sup> = 18,9 " " "

Esta muestra se trata de un vino blanco, dulce. A pesar de la gran cantidad de hierro total que posee su permanencia sin mostrar fenómeno de quebradura o "casse" está asegurada, pues casi todo el hierro se encuentra al estado de Fe<sup>c</sup>.

Podría interpretarse como si la cantidad de azúcar presente ayu-  
dara a captar el hierro férrico y mantenerlo al estado de complejo.

MUESTRA N° 12

Vino blanco

Procedencia: San Juan.-

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro
Fe <sup>iii</sup>	95	0,022	0,356
Fe <sup>ii</sup> + Fe <sup>iii</sup>	68,2	0,166	2,65
Fe <sup>ii</sup> + Fe <sup>iii</sup> + Fe <sup>c</sup>	39,7	0,401	6,42
Fe total por calcinación	33,3	0,477	7,64

Fe<sup>iii</sup> = 0,356 mg. por litro

Fe<sup>ii</sup> = 2,29 " " "

Fe<sup>c</sup> = 3,77 " " "

En esta muestra se observa que una cantidad apreciable del hierro total se encuentra al estado de sal ferrosa que puede pasar a férrica por oxidación.-

Sin embargo, por ser las cantidades pequeñas para presentar fenómenos de quebradura el posible Fe<sup>ii</sup> que se oxide pasará a formar parte de los complejos férricos sin que sobrevenga trastorno.-

MUESTRA N° 13

Vino tinto

Procedencia: Mendoza.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro.
Fe <sup>iii</sup>	91,2	0,040	2,51
Fe <sup>ii</sup> + Fe <sup>iii</sup>	82,6	0,083	5,3
Fe <sup>ii</sup> + Fe <sup>iii</sup> + Fe <sup>c</sup>	62,4	0,204	13,1
Fe total por cal- cinación	16,4	0,785	12,8

Observación: Las lecturas de Fe<sup>iii</sup>, Fe<sup>ii</sup> + Fe<sup>iii</sup> y Fe<sup>ii</sup> + Fe<sup>iii</sup> + Fe<sup>c</sup> fueron hechas con cubas de 2,5 mm. La de Fe total por calcinación con cuba de 10 mm.-

Fe<sup>iii</sup> = 2,5 mg. por litro.

Fe<sup>ii</sup> = 2,8 " " "

Fe<sup>c</sup> = 7,8 " " "

Las concentraciones de los distintos estados de hierro en esta muestra son normales.-

MUESTRA N° 14

Vino tinto.

Procedencia: San Juan.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro.
Fe <sup>+++</sup>	75	0,124	1,9
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup>	51,2	0,290	4,7
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup> + Fe <sup>0</sup>	23,9	0,621	9,9
Fe total por calcinación.	22,8	0,642	10,2

Fe<sup>+++</sup> = 1,9 mg. por litro.

Fe<sup>++</sup> = 2,8 " " "

Fe<sup>0</sup> = 5,2 " " "

En esta muestra las concentraciones de hierro indican que se trata de vino normal.-

MUESTRA N° 15

Vino tinto.

Procedencia: Catamarca.-

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro.
Fe <sup>iii</sup>	84,7	0,072	2,3
Fe <sup>ii</sup> ; Fe <sup>iii</sup>	70,3	0,153	4,9
Fe <sup>ii</sup> ; Fe <sup>iii</sup> ; Fe <sup>c</sup>	35,6	0,448	14,3
Fe total por calcinación.	34,8	0,458	14,6

Observación: las lecturas fueron hechas empleando cubas de 5 mm

Fe<sup>iii</sup> = 2,3 mg. por litro

Fe<sup>ii</sup> = 2,6 " " "

Fe<sup>c</sup> = 9,4 " " "

Trátase de una muestra en la que la sal ferroso va oxidándose gradualmente a sal férrica la cual pasará finalmente a hierro complejo.-

A pesar de ser las concentraciones suficientes para producir quebradura férrica no tendrá consecuencias porque ésta no será muy evidente tratándose de un vino tinto.-

MUESTRA N° 16

Vino tinto.

Procedencia: Sarandí.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro.
Fe <sup>+++</sup>	90,5	0,043	1,39
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup>	87,2	0,059	1,8
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup> + Fe <sup>0</sup>	50,3	0,298	9,5
Fe total por calcinación	49,1	0,308	9,9

Observación: Las lecturas fueron hechas con cubas de 5 mm.

Fe<sup>+++</sup> = 1,39 mg. por litro.

Fe<sup>++</sup> = 0,41 " " "

Fe<sup>0</sup> = 7,7 " " "

En esta muestra la totalidad del hierro se encuentra al estado de complejo; siendo por lo demás completamente normal.-

MUESTRA N° 17

Vino blanco

Procedencia: Mendoza

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro
Fe <sup>+++</sup>	97,2	0,012	0,19
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup>	68,1	0,166	2,6
Fe <sup>++</sup> + Fe <sup>+++</sup> + Fe <sup>c</sup>	53,7	0,270	4,3
Fe total por calcinación.	52,8	0,277	4,45

Fe<sup>+++</sup> = 0,19 mg. por litro.

Fe<sup>++</sup> = 2,41 " " "

Fe<sup>c</sup> = 1,7 " " "

Esta muestra es muy pobre en hierro total, lo que parece indicar que ha sido sometida a algún tratamiento para la eliminación del mismo o que naturalmente el proceso se ha efectuado por un proceso oxidante cuyo origen puede ser muy variado.-

MUESTRA N° 18

Vino tinto.

Procedencia: Mendoza.

	Lectura	E	Concentración en mg. por litro.
Fe <sup>iii</sup>	89,6	0,047	3,05
Fe <sup>ii</sup> + Fe <sup>iii</sup>	82,4	0,084	5,3
Fe <sup>ii</sup> + Fe <sup>iii</sup> + Fe <sup>o</sup>	38,7	0,412	26,4
Fe total por cal- cinación.	16,1	0,795	25,4
Observación: todas las lecturas fueron hechas con cubas de 2,5 mm., menos la correspondiente a Fe total por cal- cinación que fué efectuada con cuba de 5 mm.-			

Fe<sup>iii</sup> = 3,05 mg. por litro.

Fe<sup>ii</sup> = 2,25 " " "

Fe<sup>o</sup> = 21,1 " " "

En esta muestra la concentración total en hierro es muy grande a pesar de lo cual el fenómeno de quebradura no se presentará por ser la concentración correspondiente a sal ferrosa poco elevada.-

IV.- CONCLUSIONES.-

a).- Los fundamentos teóricos, experiencias realizadas sobre vinos argentinos y la revisión bibliográfica efectuada, permiten destacar la importancia de la evaluación del hierro en sus diferentes combinaciones, como medio de comprobar la enfermedad de naturaleza química conocida con la denominación genérica de quebradura o "cassee" férrica.-

b).- Para obtener resultados que puedan tener valor en su aplicación práctica, es aconsejable determinar los distintos estados en que el hierro puede encontrarse en los vinos tintos y blancos, a saber:

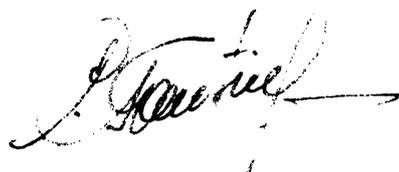
hierro ferroso ( $Fe^{++}$ )

hierro férrico ( $Fe^{+++}$ ) y

hierro complejo ( $Fe^c$ ),

aplicándose de preferencia la evaluación fotométrica con el aparato de Ballfrich y siguiéndose las normas indicadas en el texto de este trabajo.-

c).- A fin de corregir el exceso de combinaciones ferrosas, férricas, y complejas, especialmente las ferrosas, y evitar en consecuencia las alteraciones susceptibles de producirse en los vinos de consumo, se sugiere la conveniencia de incluir en la legislación oficial de nuestro país prescripciones tendientes a eliminar las causas originarias de los fenómenos mencionados, que pueden llegar a afectar seriamente el prestigio de la industria vitivinícola Nacional.-



V.- BIBLIOGRAFIA.-

- 1) SHERMAN (H. C.). Chemistry of food and nutrition. New York, 1919, pag. 426.-
- 2) TIBBLES (W.). FOODS. their origin, composition and manufacture. London, 1912, pag. 4-885.-
- 3) SANNINO (F. A.). Trattato completo di Enologia. 2º edición. 1920. Tomo II, pag. 184.-
- 4) PACCOTTE (P.). Vinificación. Barcelona 1924, pag. 379.-
- 5) PACCOTTE (P.). Vinificación en la Provincia de Mendoza. 1911, pag. 267.-
- 6) FABRE (H.). Analyses des vins et interpretation des Resultast. 1936, pag. 253.-
- 7) RIBEREAU-GAYON. Ann. des Falsif. et Fraudes. Paris 1930, pag. 535.-
- 8) SMITHE (C. V.). The Journal of Biological Chemistry. Baltimore. 1931, 9º, 251.-
- 9) MUSSO (L.). Ann. des Falsif. et Fraudes. Paris. 1929, pag. 94 - 131 - 136.-
- 10) CHELLE (L.). Bulletin de la Societé de Pharmacie de Bordeaux. 65 année. Tomo III. 1927.-
- 11) RIBEREAU-GAYON. Ann. des Falsif. et Fraudes. Paris 1929, pag. 522.-
- 12) DUBAQUIE (J.). Revue de viticulture, 1933, pag. 2027 - 2028. Ann. des Falsif. et Fraudes. Paris 1933, pag. 418.-
- 13) FERRE et MICHEL. Ann. des Falsif. et Fraudes. Paris 1933, pag. 18.-
- 14) GENEVOIS (L.). Ann. de brass. et dest. 1933, 31, 188.-
- 15) CASALE (L.). Ann. chimica applicata, 1934, 24, 155 y 302.-
- 16) CASALE (L.). L' Industria Chimica. 1934, 9, 306-313.-
- 17) SCOTT (W. W.). Standards Methods of Chemical Analysis. New

- York. Fourth Edition. Pag. 249.-
- 18) SCOTT (W. W.). Obra citada. Pag.250.-
  - 19) BENEDETTI (E.). Contribución al estudio de la nitrosufenilhidroxilamina-amónica como reactivo cuantitativo.-  
Tesis. La Plata. Tomo IX de la Revista de la Facultad de Ciencias Químicas. (Química y Farmacia 1934, pag.59).-
  - 20) AMERICAN INSTRUMENT COMPANY. Bulletin 2080. Enero 1940.-
  - 21) KOLTHOFF and SANDELL.- Textbook of Quantitative inorganic analyses New York, 1938.-
  - 22) MAGISTOCCHI (G.). Trattato de Enologia. Mendoza 1934, pag. 847.-
  - 23) MALVEZIN (P.). Ann. des Falsif. et Fraudes. Paris. 1930, pag. 412-414.-
  - 24) HANAK (H.). Z. Unters. Lebensm. 60, 291, 97 (1930).-  
Chem. Abst. 1931. (3767<sup>4</sup>).-
  - 25) SNELL, FOSTE DEE and SNELL, CORNELIA F. Colorimetric Methods of Analysis. New York. 1939, pag. 283.-
  - 26) SCOTT (W. W. ).- Obra citada. Pag.261.-
  - 27) TASSILLY (M.). Ann. des Chimie analitiques, 1913.-
  - 28) MATHIEU (M.). Bulletin des Chimistes de Sucrierie et Distillerie, 1919.-
  - 29) RIBEREAU-GAYON. Tesis del doctorado.-
  - 30) RIBEREAU-GAYON. Ann. des Falsif. et Fraudes, 1933, pag.297-552.-
  - 31) WONG (S. J.). Journal of Biological Chemistry, 1928, 77, pag.40.-
  - 32) MARENZI (A. D.) y LIDA (E.). Anales de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires 1939, Tomo X N°1 pag.12.-
  - 33) KÜSTER (F. W.) y THIEL (A.). Barcelona 1925. pag.17.-

34) MELLON (M. G.) and KASLINE (C. T.) . Industrial and Engineering Chem. Easton, P.A. 1935. pag. 187. Anal. Ed.

PRADO DE (L.).- Valoración del Cobre y del Hierro en algunos mostos y Vinos argentinos. Industria y Química. 1937. Vol.2 N°3, pag. 67.-