

69 N^o 199 - *Una nota sobre el tenor en nitrógeno amídico en vinos genuinos del Uruguay.*

C. R. Cano Marotta y C. López

Laboratorio de Fermentaciones y Enología.
Facultad de Química. Montevideo. Uruguay.

Siguiendo la técnica propuesta por Peynaud (1) se determinó dicho nitrógeno en 100 muestras de vinos genuinos de diverso tipo y edad. El tenor máximo en nitrógeno amídico es de 14 mg/l (expresado en nitrógeno). Este tenor es muy superior al señalado por Peynaud en vinos franceses (1 a 7 mg/l) (2). En el 95% de las muestras examinadas el nitrógeno amídico osciló entre 3 mg/l y 10 mg/l. El contacto prolongado del vino con sus borras (heces) que aumenta el tenor en Nitrógeno amoniacal llevándolo hasta 50-60 mg/l, *no* modifica, prácticamente, el tenor en nitrógeno amídico.

Bibliografía: (1) Riberau-Gayon J. et Peynaud E. — "Analyse et controle des vins", Ed. Lib. Polytechnique Ch. Beranger. Paris, pág. 294 (1958).

(2) Op. cit. pág. 287.

Recibido: 10.X.1963.

70 N^o 200 - *Determinación de la alcoholemia con fines legales o clínicos.*

J. F. Saredo y W. O. Justet.

La determinación del alcohol etílico en la sangre, orina, saliva o aire espirado es importante como método de control del grado de intoxicación alcohólica en personas. Los autores proponen un método químico y enzimático combinado para muestras líquidas. En el método microquímico de Widmark (Biochem. Z. 131-473 (1922) adaptado por los autores, el alcohol difunde en un matraz cerrado (ver esquemas de aparatos similares en textos de análisis clínico o C.O.R. 1 N^o 2, com. 80) desde una muestra de sangre de 0,1 ml, que se coloca en una copela situada en la parte inferior de un vástago hueco cuya parte superior se continúa con el tapón del matraz. Se recoge en mezcla sulfocrómica que oxida el alcohol a ácido acético. El exceso de dicromato se valora por

iodometría. Para facilitar la difusión del alcohol los autores enrollan una tira de papel Whatman (20mm x 65 mm) alrededor del vástago fijándolo con un hilo o alambre. El papel absorbe el líquido de la copela. Primero se calienta el matraz durante 10 min. con una lámpara infrarroja y luego se completa la difusión del alcohol introduciendo un calefactor de cobre en el vástago hueco, y calentando a no más de 80° durante 10 min. El método resulta rápido pero no es específico.

El *método enzimático* es usado en Suecia (R. Bonnischen y G. Lundgren; Acta Pharmacol. Toxicol. 53 pg. 157-66 (1957)). Tiene la ventaja de ser muy sensible y específico. Son suficientes muestras de 0,01 ml. Los alcoholes alifáticos superiores y el alcohol metílico no interfiere. Es sin embargo más engorroso y requiere una manipulación más cuidadosa que el método químico. Se basa en la oxidación catalítica del alcohol a etanal en presencia de una enzima alcohol-dehidrogenasa (ADH) en presencia de DPN. El etanal es fijado por clorhidrato de semicarbazida y el DPN se reduce a DPNH. La reacción se produce en presencia de solución tope. El DPNH se determina luego por espectrofotometría.

En el *método químico-enzimático* combinado la difusión del alcohol se realiza como se indicó arriba, pero se recoge este en 2 ml de solución de ácido perclórico al 1%. Cuando la destilación ha terminado y el alcohol se fijó, se enfría el matraz a temperatura ambiente y se extrae una muestra de 0,02 o 0,01 ml para el ensayo enzimático. Para la determinación química se agregan entonces al resto del líquido, 5 ml de mezcla oxidante. Esta puede ser mezcla nitrocromica (100 ml HNO₃ conc. d= 1,40; 25 ml K₂Cr₂O₇ 0,2 N; y H₂O dest. hasta 250 ml) o solución nitrocromica-perclórica (50 ml HNO₃ conc. d=1,40; 65 ml HClO₄ 70%, d= 1,67; 25 ml K₂Cr₂O₇ 0,2 N y H₂O dest. hasta 250 ml). Después de 45 min. se determina el exceso de dicromato por iodometría: se agregan 5 ml de agua y 5 ml de sol. de KI 5% lavando las paredes del matraz. Se tapa y se deja 5 min. en la oscuridad. Luego se destapa el matraz y se enjuaga con otros 10 ml de agua. El iodo liberado se determina inmediatamente con Na₂S₂O₃ 0,02 N usando almidón como indicador. Se hace una

valoración en blanco. Se agrega un 10% al valor obtenido teniendo en cuenta la muestra retirada para la realización del método enzimático. Para el *método enzimático* se preparan cinco tubos de hemólisis como es específica:

Tubo A: 3 ml de solución tope (8,25 gr pirofosfato de sodio; 2,07 gr. clorhidrato de semicarbazida; 0,40 gr de glicina; 16,3 ml NaOH(1N) y llevar a 250 ml con agua bidestilada). *Tubo B*: 3 ml solución tope, + 0,1 ml. sol DPN (contiene 12 mg DPN por ml de agua destilada (conservada no más de 2 semanas en heladera (ver F. Lundquist; Methods of Biochemical Analysis. Interscience Publishers. New York. Vol. 7, pg. 245 (1959) + 0,2 ml sol. ADH (contiene 1 mg de enzima por cada ml de sol. tope, es preparada en el momento y conservada sobre hielo). *Tubo T₁* — 3 ml solución tope + 0,1 ml sol. DPN + 0,1 ml sol. tipo T. Ver abajo (*) + 0,2 ml sol. de ADH. *Tubo T₂* — 3 ml sol. tope + 0,1 ml sol. de DPN + 0,2 ml sol. T + 0,2 ml sol. ADH. *Tubo S* — 3 ml sol. tope + 0,1 ml sol. de DPN + 0,2 ml de destilado + 0,2 ml de sol. ADH.

Cada tubo se agita cuidadosamente con una varilla de vidrio y se deja en lugar fresco durante 90 min. Su contenido se transfiere entonces a las cubetas del espectrofotómetro Beckmann y se determina la absorbancia a 340 m μ . Se aconseja trabajar por duplicado.

(*) Para preparar la solución tipo se obtiene en primer lugar una solución 2 mg/ml por dilución con HClO₄ 1% de una solución que contiene 20 mg/ml de alcohol absoluto preparada por pesada. De esta se toma 1 ml y se le agregan 19 ml HClO₄ 1% (solución T). Esta se valora agregando a 0,1 ml de la sol. T, 5 ml de solución oxidante, dejándola en reposo durante 45 min. y determinando luego el exceso de dicromato por iodometría. Se prepara una curva de calibración.

Se hicieron numerosas determinaciones para verificar la exactitud y la aplicabilidad de este método químico-enzimático combinado. Finalmente se indica un *método rápido* para casos de determinaciones clínicas en las cuales la velocidad de la determinación es más importante que una alta precisión. Se trabaja del mismo modo descrito pero se modifica el modo y tiempo de calentamiento:

Una vez armado el matraz y colocada la mezcla oxidante se deja el matraz durante 5 min. a temperatura ambiente. Se adapta luego el calefactor de espiral de cobre y se calienta con la lámpara infrarroja durante 10 min. a aproximadamente 80°C con disco de amianto. Se calienta otros 5 min. sin el disco. Se enfría el matraz con agua y se valora el exceso de dicromato como se describe arriba. De este modo el ensayo completo se puede llevar a cabo en 30 minutos.

Resumen: I. M. de S.

Recibido: 15. VII. 1963.

Sección E-e) Microanálisis

71 N° 201 - Dosificación de microcantidades de nitrato y amoníaco. *está referenciado*

W. E. Cerveñansky

Fundamento. — Se desprende (o se evalúa) el amoníaco existente en la muestra como amonio o aminas volátiles y seguidamente se reduce el nitrato con aleación Devarda. El amoníaco desprendido en segunda instancia, se recoge sobre un papel reactivo. Finalmente se compara con escala o con curva de calibración. *Reactivos:* 1) Hidróxido de sodio 2N; 2) Hidróxido de sodio 18N; 3) Tiras de papel Whatman N° 1 impregnadas en el reactivo (4); 4) Disolver en 100 ml. de agua 3 grs. de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 3 grs. de $AgNO_3$. Neutralizar la solución obtenida, exactamente, con NaOH 0,1N y filtrar. (Reagents for Qualitative Inorganic Analysis. 2nd. Report of the I Cometeo on New Analytical Reagents and Reactions of the I.U.C. pág. 250); 5) Aleación Devarda con un tamaño de partículas entre 20-25 mallas por cm^2 . Material más fino produce espuma que puede hacer fracasar la determinación.

Preparación de las tiras. — Hojas de Papel Whatman N° 1 se mojan con el reactivo (4), se escurren y se secan en la oscuridad. El papel no debe tocarse con los dedos ni antes ni después de tratado. Luego de seco se dobla 4 a 6 veces y se corta con un elemento muy afilado como por ej. hojillas de afeitar, usando como guía una regla de vidrio que tiene la cara que apoya sobre el papel, esmerilada (a fin de tenerla firmemente apoyada y po-