

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

APLICAÇÃO DA TITULAÇÃO TERMO
MÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DA
"ACIDEZ TOTAL" E "SUBSTÂN
CIAS POLIFENÓLICAS" EM VINHOS

TESE DE MESTRADO

JOSÉ AUGUSTO COELHO

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo E. S. Godinho

CAMPINAS, 1981

C65a

3986/BC

APLICAÇÃO DA TITULAÇÃO TERMO
MÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DA
"ACIDEZ TOTAL" E "SUBSTÂNCI
AS POLIFENÓLICAS" EM VINHOS

José Augusto Coelho

Aos meus pais,
Maria Alice, Marcos
e Regina.

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. *Oswaldo E. S. Godinho*, pela orientação segura e amizade demonstrada durante a realização deste trabalho;
- . Ao Prof. Dr. *Aécio Pereira Chagas*, pela colaboração e sugestões oferecidas;
- . À Diretoria do Instituto de Química da UNICAMP, pela oportunidade concedida;
- . À coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;
- . Aos técnicos do laboratório, *Neusa, Marcos, Aparecido e Cássia*, pela presteza às nossas solicitações;
- . Aos demais colegas, funcionários e professores que direta ou indiretamente colaboraram conosco na realização deste trabalho.

ÍNDICE

	PG.
LISTA DAS FIGURAS.	viii
LISTA DAS TABELAS.	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. CONSIDERAÇÕES GERAIS	4
II.1 Considerações sobre a titulação termométrica .	4
II.2 Princípios da técnica.	7
II.3 Termogramas.	10
II.4 Aparelhagem utilizada.	12
II.5 Titulação termométrica catalítica.	15
II.5.1 Considerações Gerais	15
II.5.2 O mecanismo das reações envolvidas nas titulações termométricas catalíticas .	19
II.5.3 A influência do indicador na análise por titulação termométrica catalítica.	22
II.5.3.1 Acetona e acetaldeído	22
II.5.3.2 Acrilonitrila e eter alquilvi nil	23
II.5.4 Solventes utilizados e suas influências as	24
II.5.5 A influência da presença de água em sol	

	PG.
ventes orgânicos	25
II.5.6 A seletividade da titulação termométrica catalítica.	27
III. CONSIDERAÇÕES SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VINHO E ALGUMAS PROPRIEDADES DE SEUS COMPONENTES	29
III.1 Composição	29
III.2 Substâncias Polifenólicas.	35
III.2.1 Classificação dos taninos.	36
III.2.2 A presença de taninos em vegetais e cereais e algumas de suas aplicações	37
IV. ALGUNS MÉTODOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA "ACIDEZ TOTAL" E TANINOS DOS VINHOS.	39
IV.1 Acidez Total	39
IV.2 Polifenóis (Taninos)	40
IV.2.1 Índice de permanganato	41
IV.2.2 Avaliação espectrofotométrica.	42
V. UTILIZAÇÃO DA TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CONVENCIONAL NA DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL E TANINOS EM VINHO.	44
VI. PARTE EXPERIMENTAL	47
VI.1 Determinação da relação vazão/velocidade do papel, através de uma titulação.	47
VI.2 Procedimento usado nas titulações termométricas	47

	PG.
cas de vinho	49
VI.3 Resultados da determinação da "acidez total" dos vinhos por titulação termométrica convencion <u>a</u> nal.	56
VI.4 Análise por titulação potenciométrica.	56
VI.5 Determinação termométrica de polifenóis.	62
VI.5.1 Titulação termométrica de Ácido Gálico	62
VI.5.2 Titulação termométrica de uma mistura de Ácido Tartárico e Ácido Gálico.	64
VI.5.3 Titulação termométrica Alcalimétrica de amostras de vinho, contendo quantida- des de fenol previamente adicionado.	67
VI.5.4 Titulação de amostras de vinho com adi- ções prévias de Ácido Gálico	72
VI.5.5 Titulação termométrica de amostras de vinho após o tratamento de carvão ati- vo	72
VI.6 Determinação de polifenóis termométricamente .	77
VI.7 Descrição de alguns métodos usados na determi- nação de polifenóis de vinho	78
VI.7.1 Índice de permanganato	78
VI.7.2 Utilização de proteínas na precipita- ção e determinação de substâncias tâni- cas do vinho	82
VI.7.3 Determinação espectrofotométrica de ta- ninos na região do ultra-violeta	85

	PG.
VI.7.3.1 Preparação da curva padrão. .	89
VI.7.3.2 Preparação da amostra	92
VI.8 Titulação termométrica catalítica de taninos extraídos do chá e do vinho.	94
VI.9 Uso da titulação termométrica catalítica na de- terminação da soma da "acidez total" e polife- nóis em vinho.	103
VI.9.1 Influência da proporção entre DMF e H ₂ O nas curvas de titulação.	103
VI.9.2 Padronização do titulante utilizado. .	104
VI.10 Combinação da titulação termométrica convencio- nal e a titulação termométrica catalítica, na determinação do conteúdo de polifenóis em vi- nhos	111
VII. DISCUSSÃO.	115
VIII. SUMÁRIO.	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

LISTA DAS FIGURAS

- Figura 01 - Titulações Potenciométricas de ácido bórico e ácido clorídrico com hidróxido de sódio.
- Figura 02 - Titulações termométricas de ácido bórico e ácido clorídrico com hidróxido de sódio.
- Figura 03 - Termogramas teóricos de reações exotérmicas e endotérmicas.
- Figura 04 - Diagrama de blocos de aparelhagem utilizada na titulação termométrica.
- Figura 05 - Esquema da aparelhagem usada nas titulações termométricas.
- Figura 06 - Termograma mostrando ponto final de uma titulação termométrica convencional.
- Figura 07 - Titulação termométrica catalítica de ácido benzóico.
- Figura 08 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 10) com NaOH 1 N.
- Figura 09 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 5) com NaOH 1 N.

- Figura 10 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 11) com NaOH 1 N.
- Figura 11 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 12) com NaOH 1 N.
- Figura 12 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 11) com NaOH 1 N.
- Figura 13 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 9) com NaOH 1 N.
- Figura 14 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 8) com NaOH 1 N.
- Figura 15 - Curva correspondente à titulação potenciométrica de 50,00 ml de vinho com NaOH 1 N.
- Figura 16 - Termograma da titulação de 50,00 ml de ácido gálico 0,03 M com NaOH 1 N.
- Figura 17 - Termograma da titulação de 40,00 ml de ácido tartárico com NaOH 1 N.
- Figura 18 - Termograma da titulação de uma mistura de ácido tartárico e ácido gálico com NaOH 1 N.

Figura 19 - Termograma da titulação de 50,00 ml de solução de fenol 0,05 M com NaOH 1 N.

Figura 20 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 6) e 50,00 ml de solução de fenol 0,03 M com NaOH 1 N.

Figura 21 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 6) e 0,093 gramas de ácido gálico - com NaOH 1 N.

Figura 22 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 6) com NaOH 1 N, após tratamento - com carvão ativo.

Figura 23 - Termograma da titulação do carvão ativo utilizado no tratamento de 150,00 ml de vinho (amostra 6), com NaOH 1 N.

Figura 24 - Termograma da titulação de 50,00 ml de vinho (amostra 12) com NaOH 1 N, utilizando-se o titulante em temperatura inferior ao titulado.

Figura 25 - Curva padrão utilizada na determinação de substâncias tânicas do vinho, através do mé

todo da precipitação com proteínas.

Figura 26 - Espectrograma na região visível de complexos formados por: tanino extraído de vinho - proteína - cloreto férrico e ácido tânico - proteína - cloreto férrico.

Figura 27 - Espectrograma na região ultra-violeta:

I - Tânino extraído do chá.

II - Tanino extraído do vinho.

III - ácido tânico.

Figura 28 - Curva padrão utilizada na determinação de substâncias tânicas do vinho, através do método espectrofotométrico na região do ultra-violeta.

Figura 29 - Titulação termométrica catalítica - 0,034 g de tanino extraído do chá em DMF, titulado com KOH em isopropanol.

Figura 30 - Titulação termométrica catalítica - 0,0193 g de tanino extraído do vinho em DMF, titulado com KOH em isopropanol.

Figura 31 - Titulação termométrica catalítica - 0,0616 g

de ácido tânico em DMF, titulado com KOH em isopropanol.

Figura 32 - Titulação termométrica catalítica 0,0757 de ácido gálico em DMF, titulado com KOH em isopropanol.

Figura 33 - Titulação termométrica catalítica - 1,00 ml de vinho (amostra 11) em 10,00 ml de DMF e 4,00 ml de acrilonitrila titulados com KOH em isopropanol.

Figura 34 - Titulação termométrica catalítica - 1,00 ml de vinho (amostra 12) em 10,00 ml de DMF e 4,00 ml de acrilonitrila titulados com KOH em isopropanol.

Figura 35 - Titulação termométrica catalítica - 1,00 ml de vinho (amostra 16) em 10,00 ml de DMF e 4,00 ml de acrilonitrila titulados com KOH em isopropanol.

Figura 36 - Titulação termométrica catalítica - 1,00 ml de vinho (amostra 10) em 10,00 ml de DMF e 4,00 ml de acrilonitrila titulados com KOH em isopropanol.

Figura 37 - Determinação da relação titulante (KOH)/cm do papel - do registrador.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Principais ácidos presentes nos vinhos.

Tabela 02 - Determinação da "Acidez Total" em vinho por titulação termométrica.

Tabela 03 - Determinação da "Acidez Total" em vinho por titulação potenciométrica.

Tabela 2/3 - Determinação da "Acidez Total" em vinho: comparação entre os resultados obtidos através dos métodos termométrico e potenciométrico.

Tabela 04 - Deslocamento nas curvas de titulações termométricas de vinho com adições de solução de fenol.

Tabela 05 - Índice termométrico de polifenóis em vinho.

Tabela 06 - Índice de permanganato para avaliação de polifenóis em vinho.

Tabela 07 - Determinação de taninos pelo método da precipitação por proteínas.

Tabela 08 - Determinação de taninos pelo método espectrofotométrico.

Tabela 09 - Determinação do Equivalente grama de substâncias tânicas extraídas de chá e vinho por titulação termométrica catalítica.

Tabela 10 - Determinação do "conteúdo ácido total" de vinhos por titulação termométrica catalítica.

Tabela 11 - Combinação das titulações termométricas convencional e catalítica na determinação de polifenóis em vinhos.

Tabela 12 - Valores obtidos para determinação de polifenóis através dos diversos métodos utilizados.

Tabela 13 - Determinação da acidez total e polifenóis em uma amostra de vinho por titulação termométrica convencional.

I INTRODUÇÃO

Um resumo com o título "Grupo de Termoquímica e Termoanalítica — Informações Gerais", publicado recentemente, mostra os vários tipos de pesquisas que vêm sendo realizadas nesta área, no Instituto de Química desta Universidade.

Dentro desta área, alguns assuntos estudados envolvem o uso da Titulação Termométrica e da Análise Entalpimétrica para solucionar vários problemas analíticos.

Assim temos o uso da Titulação Termométrica na análise de azotetos insolúveis (1, 2), o uso da análise entalpimétrica na determinação de açúcares totais em melaço e caldo de cana (3, 4 e 5). Encontram-se em andamento estudos que utilizam a Titulação

Termométrica Catalítica para determinação de grupos ácidos de proteínas ⁽⁶⁾ e uso da Análise Entalpimétrica na determinação do teor de etanol em soluções aquoso-alcolicas ⁽⁷⁾.

Nesta tese procurou-se utilizar a Titulação Termométrica Convencional na determinação da chamada "acidez total" e do teor de polifenóis em vinhos. Em um procedimento alternativo, procurou-se também utilizar uma combinação da Titulação Termométrica Convencional e da Titulação Termométrica Catalítica na determinação de polifenóis em vinho.

No início deste trabalho, procurou-se descrever aspectos gerais sobre a técnica da Titulação Termométrica.

Muitos dos assuntos relativos a esta técnica foram abordados apenas superficialmente, pois podem ser encontrados detalhadamente em outros trabalhos e livros que tratam desta Técnica ^(8, 9, 10, 11). Uma extensa e detalhada discussão desta Técnica, pode por exemplo, ser encontrada em uma tese já defendida neste Instituto ⁽¹⁾.

Levando-se em conta a facilidade

de de execução assim como a facilidade de automação da Titulação Termométrica, acredita-se que os métodos desenvolvidos nesta tese, venham a ser de real interesse na determinação da "acidez total" e do teor de polifenóis em vinho.

II CONSIDERAÇÕES GERAIS

II.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA

A Titulação Termométrica é a técnica quantitativa na qual a variação da temperatura de uma reação é acompanhada como função do volume do titulante adicionado.

O método é aplicável também a sistemas químicos, onde métodos analíticos como espectrometria, potenciometria e outros, falham ou não fornecem bons resultados.

Um exemplo pode ser observado nas figuras 1 e 2, onde as curvas de Titulações Potenciométricas e Termométricas são mostradas para reações entre ácido forte (HCl) e ácido fraco (H_3BO_3) com base forte (NaOH).

As curvas correspondentes às Titulações Potenciométricas, mostram um ponto de inflexão bem definido para a Titulação do ácido forte (neste caso o ácido clorídrico), enquanto que para o ácido

FIGURA 1

TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS:

I. Ácido bórico com hidróxido de sódio.

II. Ácido clorídrico com hidróxido de sódio.

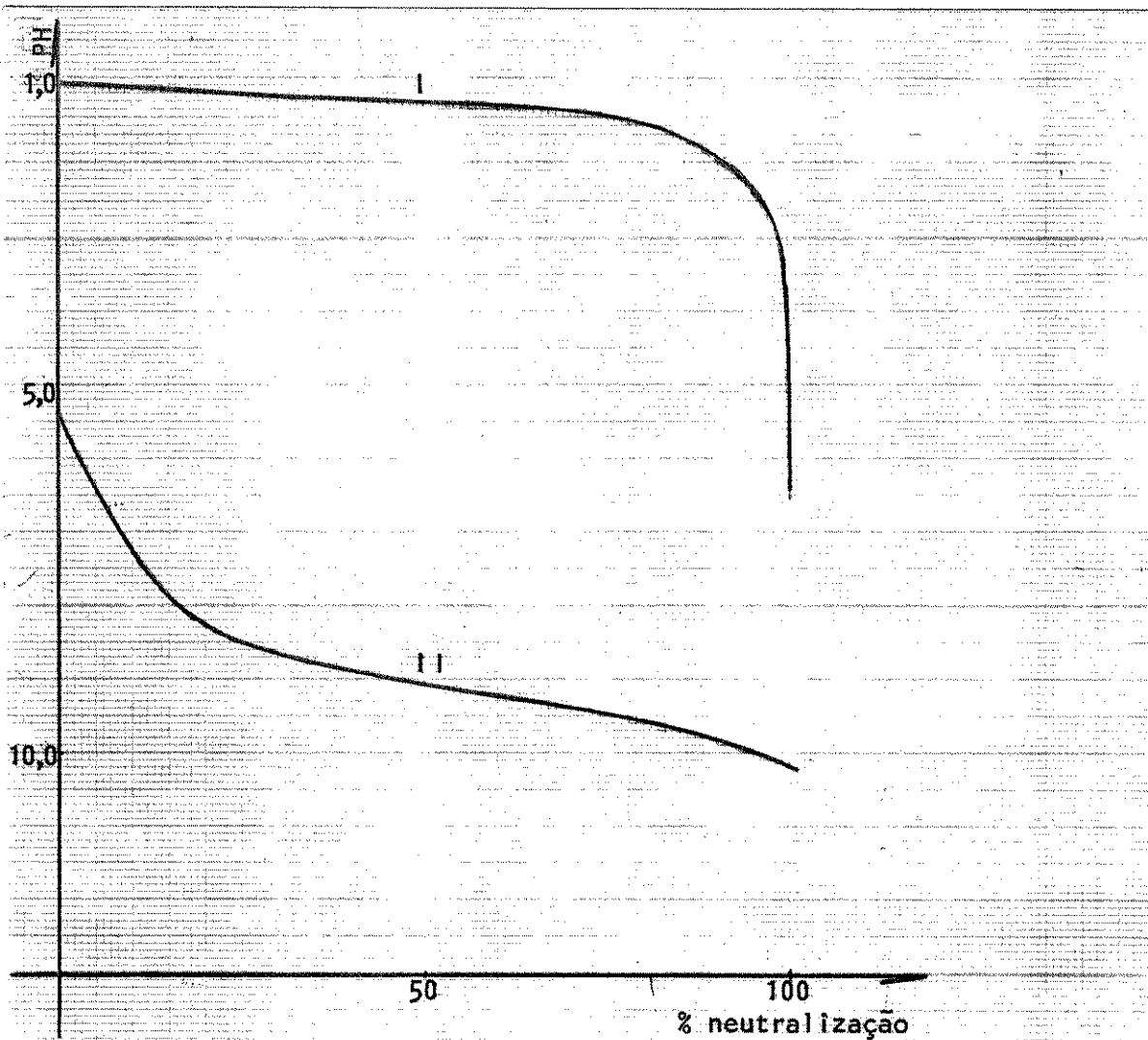
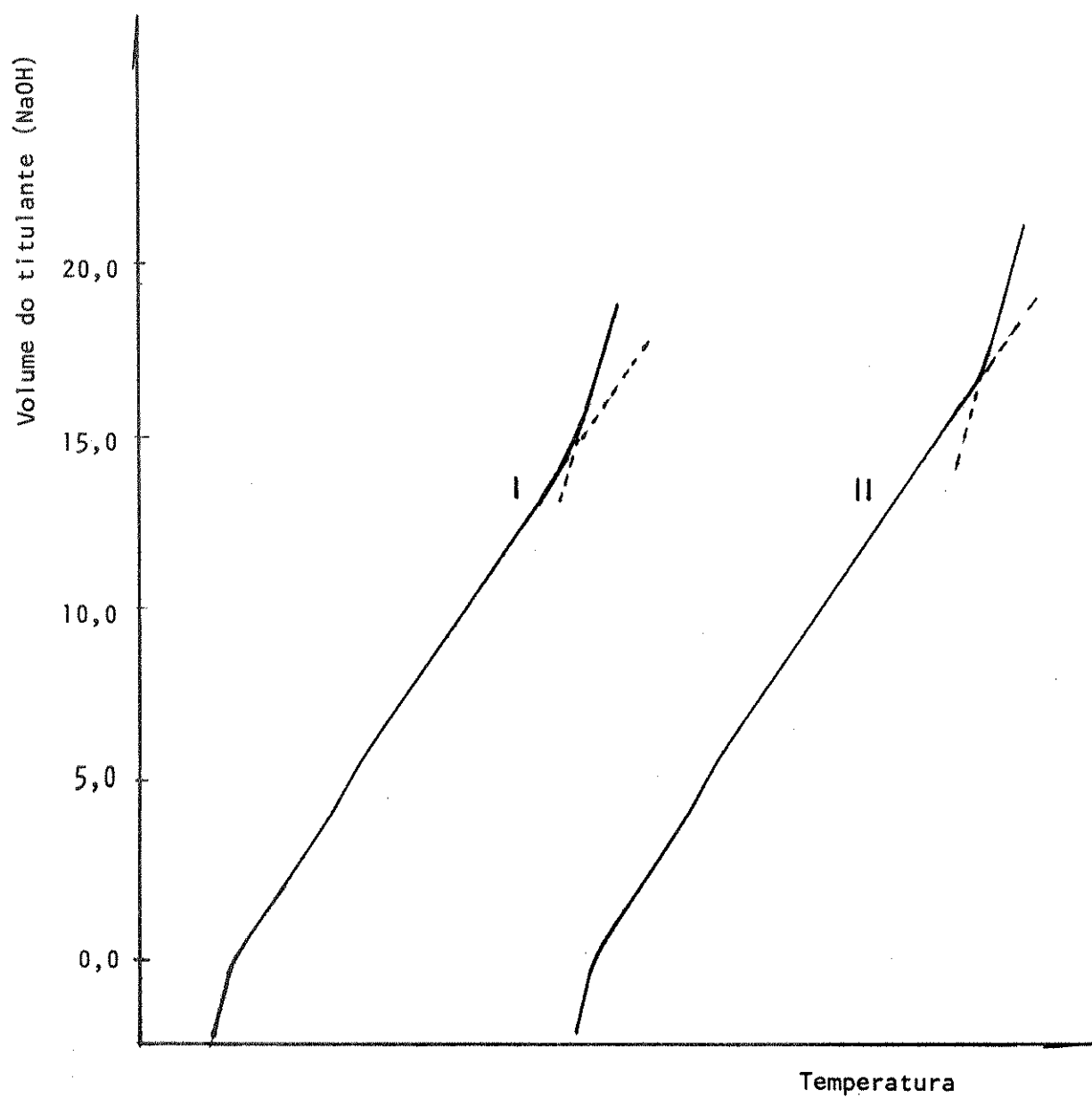


FIGURA 2

TITULAÇÕES TERMOMÉTRICAS

I. Ácido bórico com hidróxido de sódio.

II. Ácido clorídrico com hidróxido de sódio.



fraco (neste caso o ácido bórico), o ponto final não pode ser observado nitidamente. Por outro lado, as curvas de Titulação Termométrica, mostram pontos finais bem definidos para ambos os casos, ou seja, tanto para a titulação de ácido forte, como para o ácido fraco.

Pode-se aplicar a técnica, tanto a sistemas aquosos como não aquosos e também a sistemas contendo vários componentes, como é o caso da Titulação de uma mistura de ácidos fracos com base forte. Pode-se dizer que a determinação individual dos componentes de uma mistura por uma única Titulação Termométrica é possível quando existe uma diferença significativa com relação ao H das reações envolvidas (12).

A Titulação Termométrica é independente de muitas propriedades das soluções (viscosidade, constante dielétrica, coloração, etc.), portanto, pode ser aplicada a uma variedade de sistemas, onde a aplicação de outras técnicas de análise torna-se difícil.

11.2 PRINCIPIOS DA TÉCNICA

Como mencionado, na Titula-

ção Termométrica acompanha-se a variação de temperatura do sistema, em função do volume do titulante adicionado. Esta utilização do efeito térmico, típico de certas reações químicas, permite a determinação da concentração de substâncias.

A técnica da Titulação Termométrica baseia-se na existência de uma relação linear entre a variação de temperatura e o número de moles do produto formado pela reação.

$$\Delta t = Knp$$

onde:

Δt = variação de temperatura

K = constante

np = número de moles do produto formado

Esta expressão pode ser considerada verdadeira, pois o efeito térmico total da reação $aA + bB + cC \rightleftharpoons nP + bB$, está relacionado com a variação de entalpia da reação pela equação $Q = -np\Delta H$, onde np é o número de moles do produto formado. O efeito térmico está também relacionado com a variação de temperatura pela equação: $Q = k\Delta t$, onde: k = capacidade calorífica do sistema. Pode-se rela

cionar as equações acima, concluindo-se que:

$$\Delta t = \frac{-\Delta H \cdot n_p}{k}$$

Se a pressão permanecer constante, e a variação da temperatura for pequena, o ΔH da reação permanecerá constante.

Para proposições práticas, pode-se considerar que:

$$\Delta t = \frac{K n_p}{k}$$

uma vez que a variação de temperatura no sistema é mínima e a titulação é realizada a pressão constante.

Em um sistema adiabático, k depende da capacidade calorífica do aparelho, que é constante, e do volume dos reagentes. Utilizando-se o titulante em concentrações altas (10 a 100 vezes maior que a concentração do titulado), pode-se considerar que o volume permanece constante durante a titulação. Com isso, pode-se chegar a relação expressa pela equação:

$$\Delta t = K n_p.$$

11.3 TERMOGRAMAS

Na figura 3, observa-se os termogramas teóricos de reações endotérmicas e exotérmicas. Termograma é o gráfico da variação de temperatura versus volume do titulante adicionado, e contém as seguintes regiões⁽⁸⁾:

AB = Pré-reação; representa a temperatura do sistema antes da adição do titulante; linha base.

BC = Reação; calor de reação, calor de mistura e calor de diluição.

CD = Pós-reação; a reação já se completou e

o efeito térmico deve-se aos fatores, calor de diluição do titulante, o efeito Joule do sensor de temperatura, diferenças de temperatura entre o titulante e o titulado e a variação na capacidade térmica do sistema.

Estes termogramas ou curvas de titulações termométricas, podem ser afetados por diversos fatores tais como: calor de agitação, variação da capacidade térmica do sistema, diferença de temperatura entre o titulante e o titulado, calor de diluição, calor de solução.

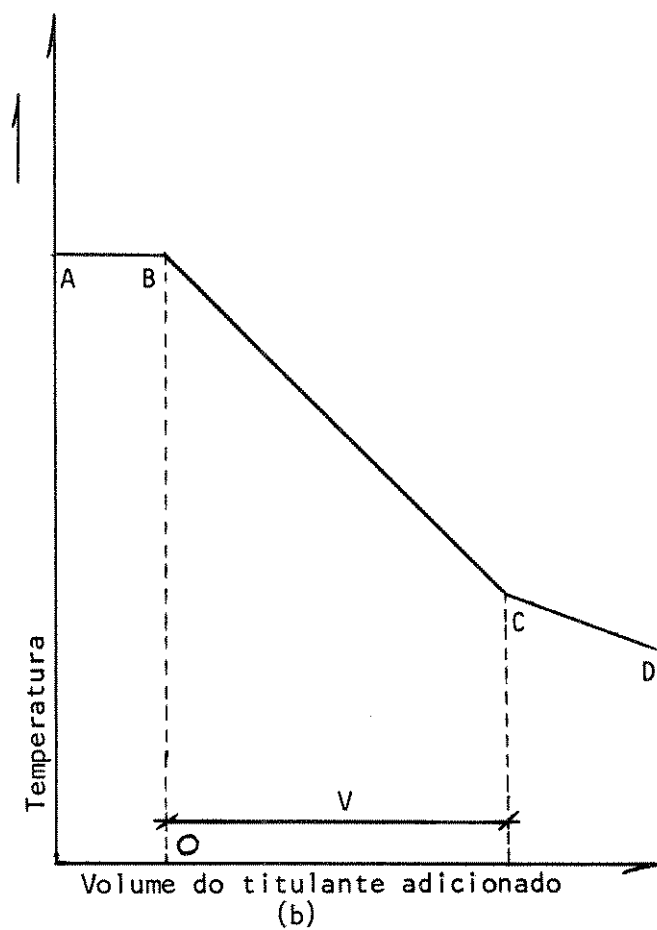
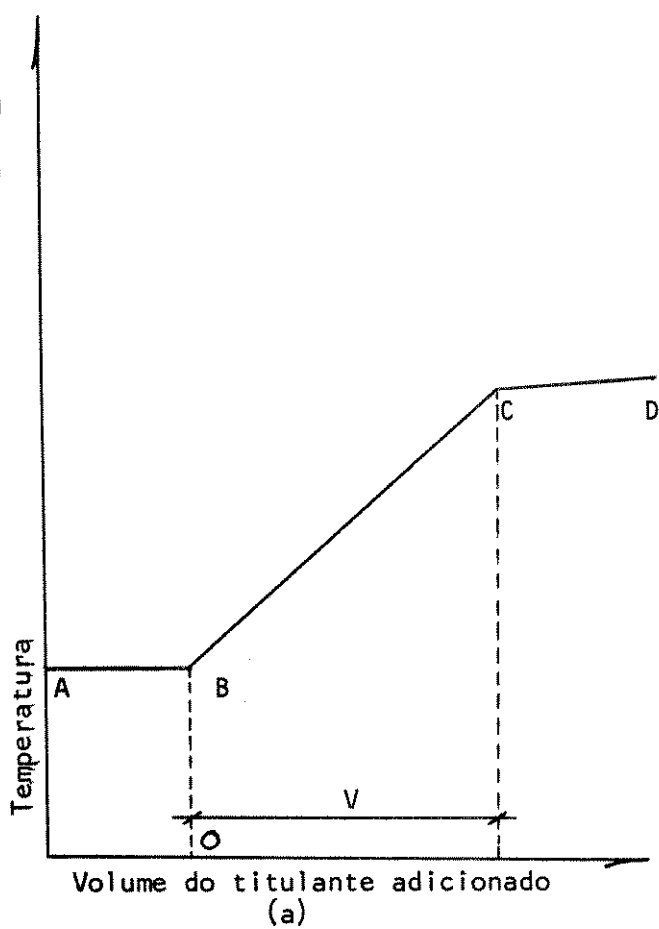
Estes efeitos não precisam

FIGURA 3

TERMOGRAMAS TEÓRICOS:

a. reação exotérmica.

b. reação endotérmica.



ser nulos para que a reação possa ser usada para titulação termométrica, eles podem ser descontados desde que não mascarem o ponto final.

A obtenção de resultados favoráveis por aplicação de titulações termométricas com finalidade quantitativa, depende de uma série de fatores típicos do sistema químico envolvido. Os principais são:

- a. a variação de temperatura envolvida no sistema deve ser suficiente para provocar inflexão na curva termométrica
- b. a cinética da reação deve ser favorável, ou seja, a reação deve se completar durante o tempo gasto na titulação
- c. o ponto final da titulação deve ser bem definido. Para isto, a variação da energia livre não deve ser tão desfavorável, de maneira a produzir uma grande curvatura na região do ponto de inflexão da curva, impedindo uma extrapolação precisa das retas, que conduzem ao ponto final de reação

11.4 APARELHAGEM UTILIZADA

As figuras 4 e 5, mostram respectivamente o diagrama de blocos e o esquema do titulador termométrico utilizado.

FIGURA 4

DIAGRAMA DE BLOCOS DE APARELHAGEM UTILIZADA NA TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA

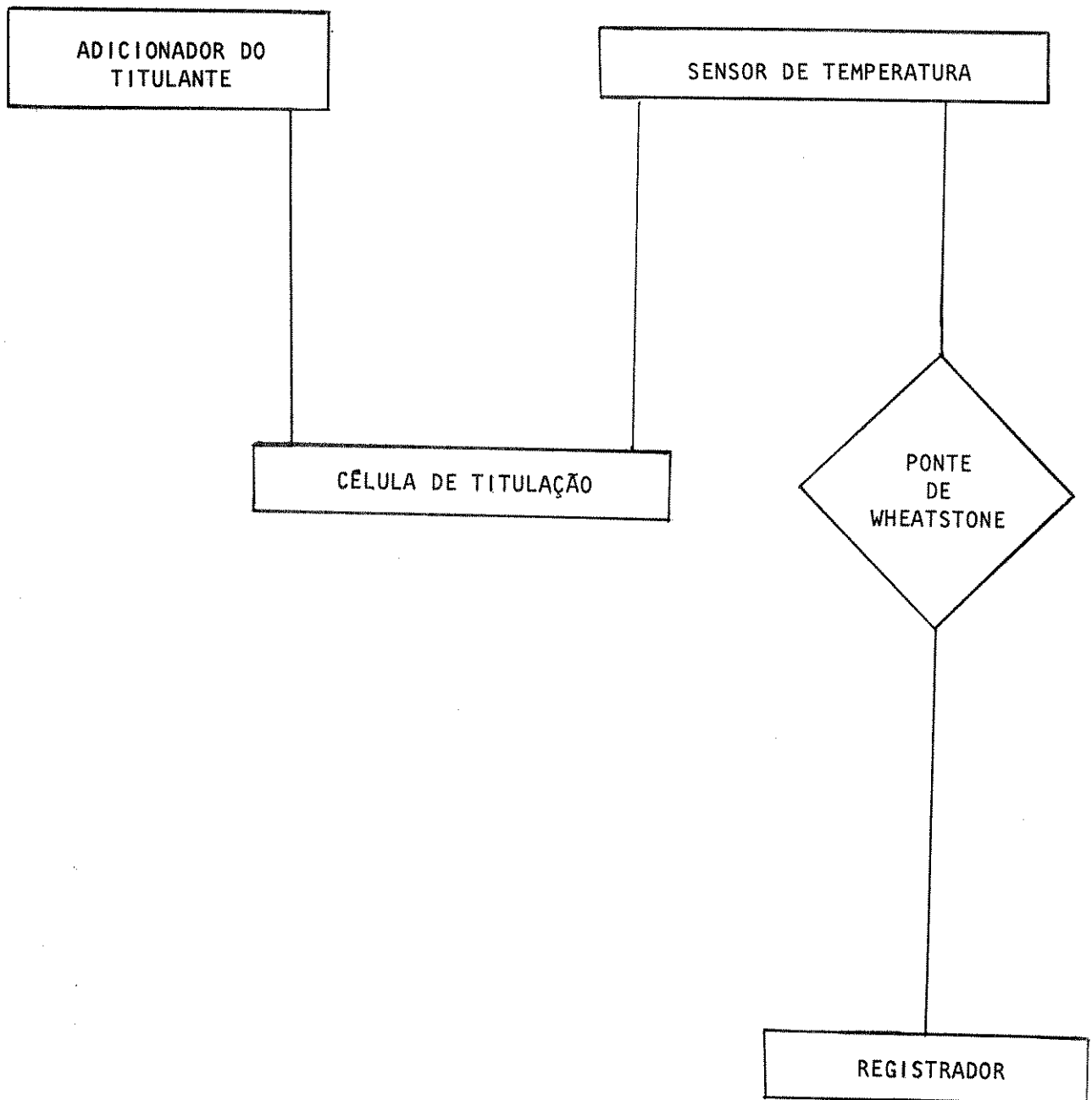
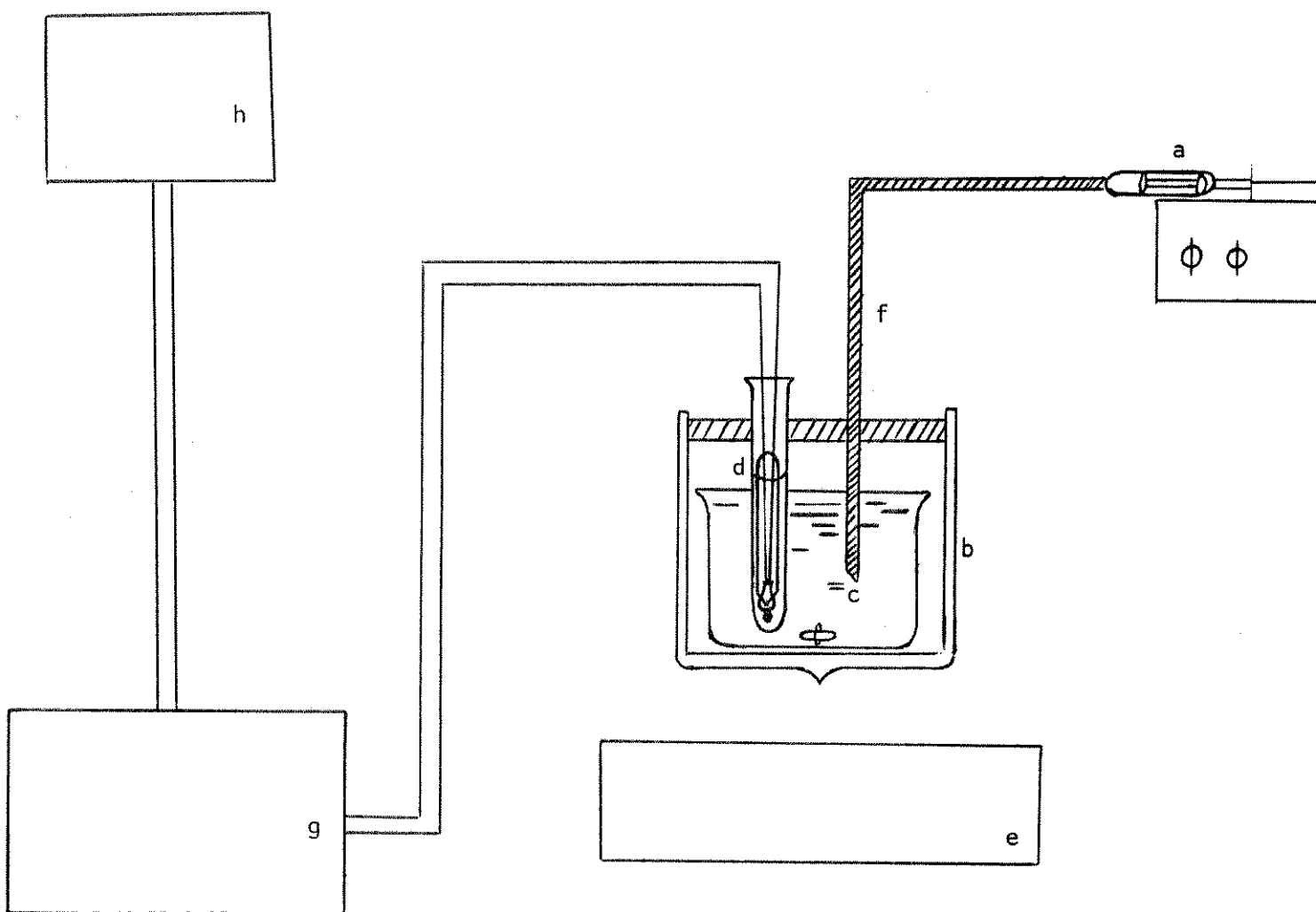


FIGURA 5

ESQUEMA DA APARELHAGEM USADA NAS TITULAÇÕES TERMOMÉTRICAS

- a. Seringa com vazão constante.
- b. Frasco de Dewar.
- c. Frasco de titulação.
- d. Termistor.
- e. Agitador magnético.
- f. Tubo de polietileno.
- g. Ponto de Wheatstone.
- h. Registrador potenciométrico.



O titulador contém:

- . uma seringa de vidro acoplada ao equipamento "Sering - Pump 351" da Sage Instruments. Este instrumento permite que se utilize a seringa com vazões constantes ;
- . um tubo de polietileno que conduz o titulante até o - frasco de titulação ;
- . o frasco de titulação, que consiste em um frasco de Dewar de 100ml de capacidade ;
- . e o sistema para medida de variação de temperatura ;
- . o termistor, ligado a uma parte de wheatstone ;
- . e o registrador potenciométrico .

11.5 TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

11.5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em uma titulação, o ponto final da reação é determinado instrumentalmente ou visualmente e a concentração da amostra é calculada a partir da quantidade de reagente consumido. Sendo assim, a determinação do ponto final é um dos fatores principais em análises por titulação. (13)

Na titulação termométrica convencional, o ponto final da reação é localizado pela mudança de inclinação (Gráfico Δt versus volume titulante adicionado), que ocorre na curva da titulação.

Após o término da reação, praticamente não há liberação ou absorção de calor, mantendo-se a temperatura constante. Isto pode ser observado na Figura 6.

A inflexão do ponto final pode ser aumentada fazendo-se a titulação em um meio em que o excesso de titulante funcione como catalizador de uma reação altamente energética, o que pode ser observado na Figura 7.

As titulações termométricas convencional e catalítica, diferem fundamentalmente. A convencional acompanha a variação de temperatura devido a reação entre o titulante e o titulado e, que neste caso, depende da quantidade da amostra. No método catalítico é utilizado um indicador para a localização do ponto final e a variação de temperatura depende da quantidade do indicador adicionado.

FIGURA 6

TERMOGRAMA MOSTRANDO O PONTO FINAL DE UMA TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CONVENCIONAL.

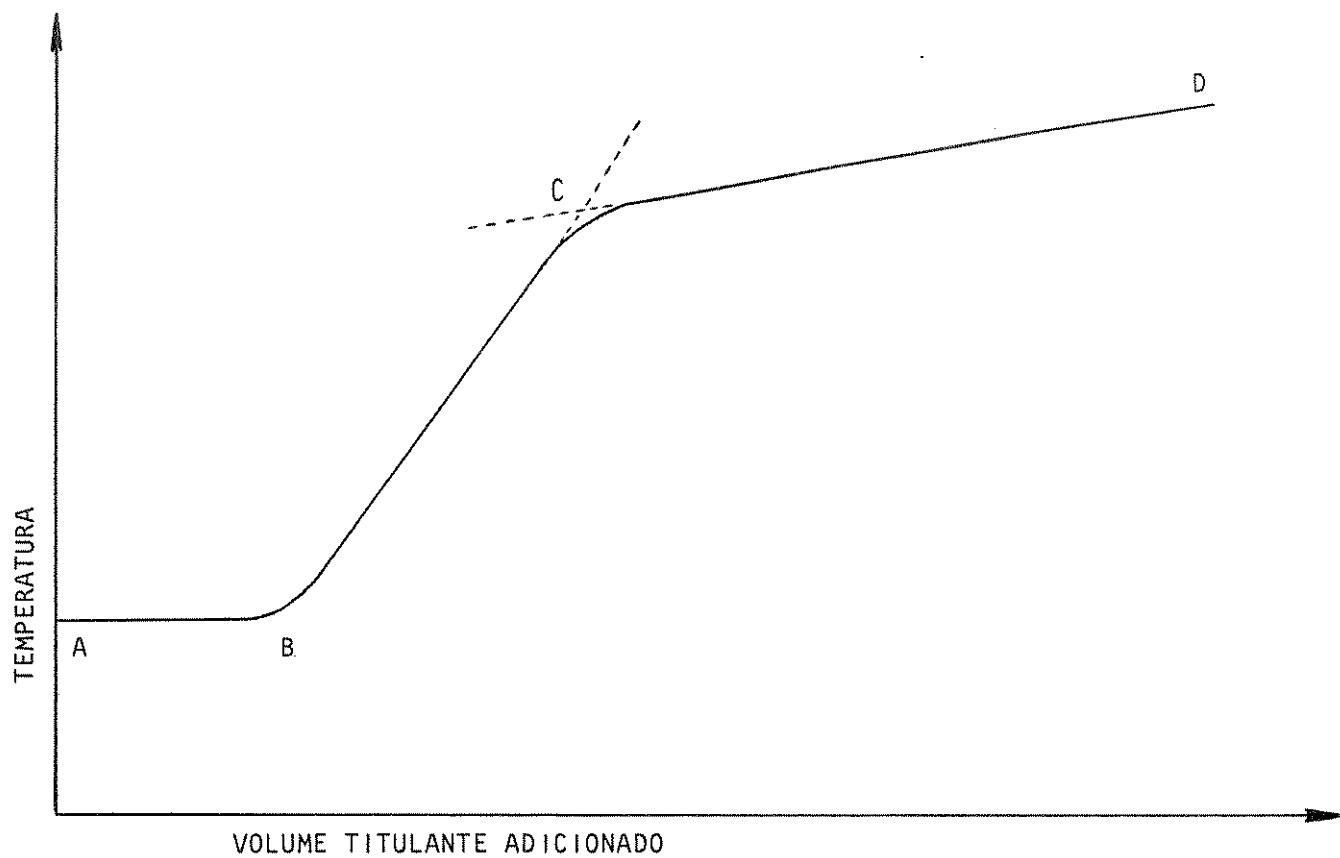
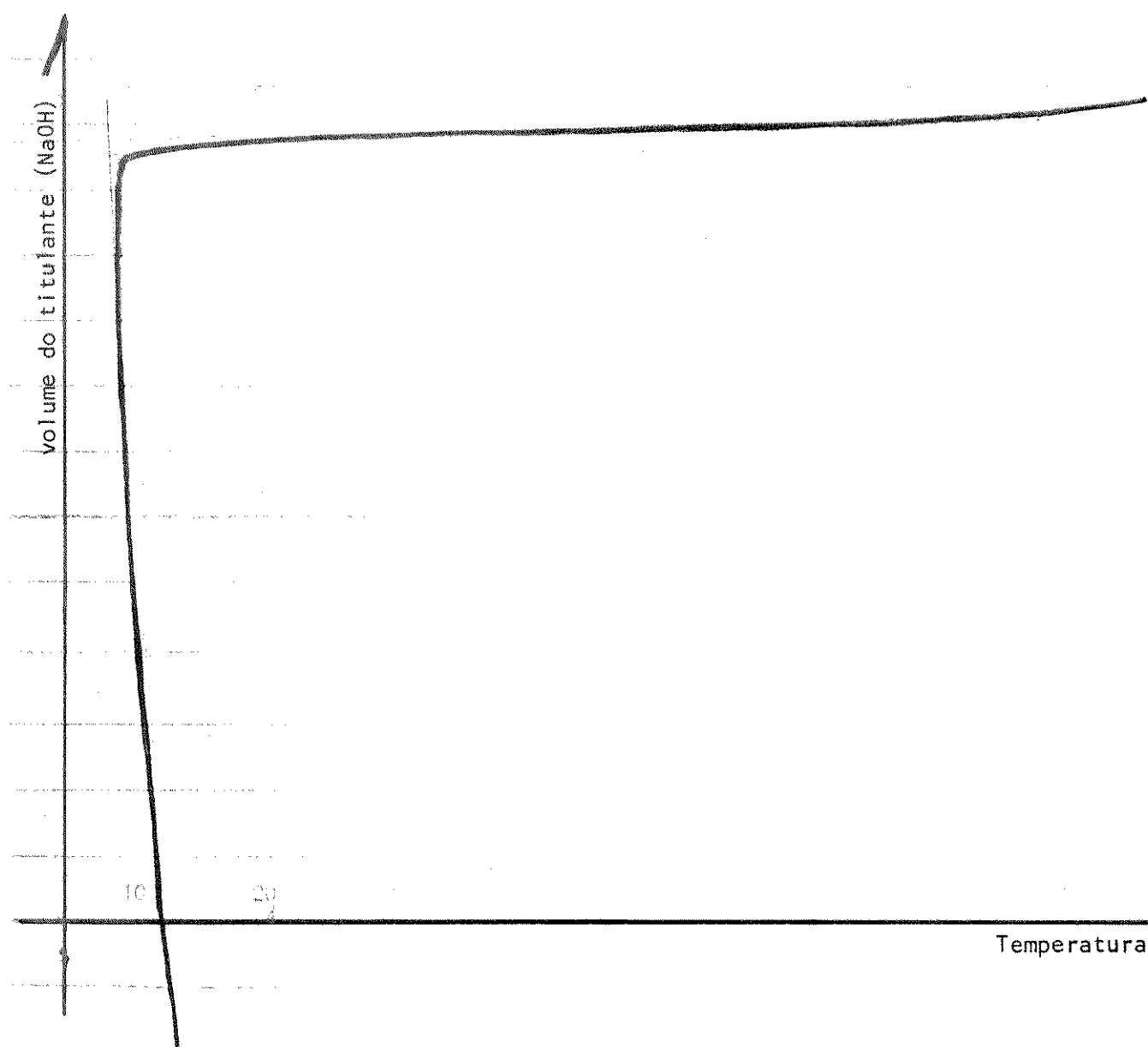


FIGURA 7

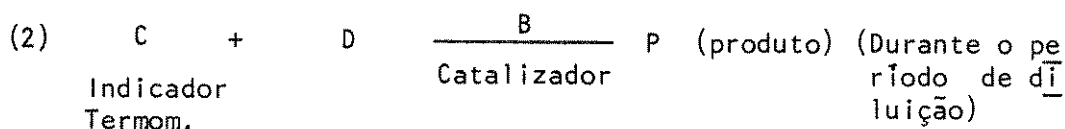
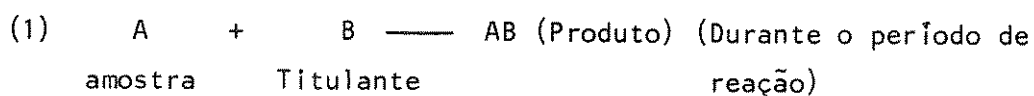
TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA:

Ácido benzóico titulado com hidróxido de potássio em presença de Acrilonitrila.



11.5.2 O MECANISMO DAS REAÇÕES ENVOLVIDAS NAS TITULAÇÕES TERMOMÉTRICAS CATALÍTICAS

As reações envolvidas com titulações termométricas catalíticas podem ser representadas como segue:

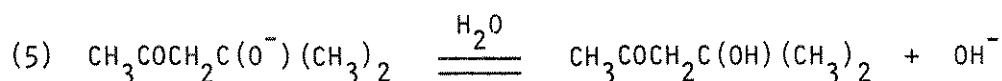
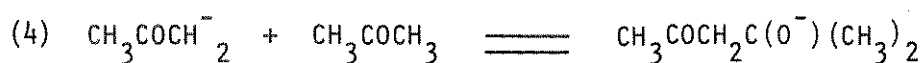
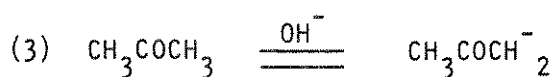


A equação 1 representa a combinação estequiométrica entre titulante e titulado, e a equação 2 a "reação indicadora", onde um pequeno excesso do titulante cataliza a reação, envolvendo os constituintes indicadores.

Das reações utilizadas como indicadoras, pode-se citar os seguintes exemplos:

Acetona pode ser utilizada como indicador termométrico na titulação não aquosa de ácidos fracos (14). As reações relativas ao

processo indicador, podem ser representadas pelas seguintes equações:

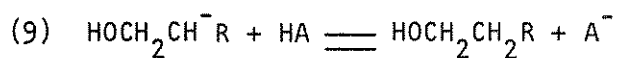
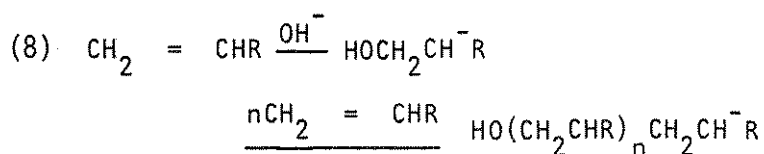
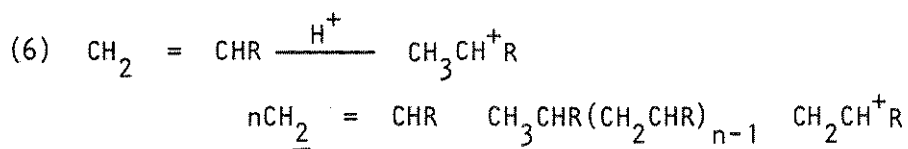


A polimerização vinílica iniciada por ácidos ou bases fortes, é bastante utilizada como indicador termométrico de ponto final para titulações não aquosas de bases e ácidos, respectivamente. Isto porque, bases neutralizam a catálise de ácidos diretamente, ou inibem a polimerização catiônica iniciada por ácidos, enquanto ácidos similarmente inibem a polimerização iniciada por base. A polimerização será iniciada logo que o inibidor, o titulado, por exemplo, tenha sido neutralizado pela reação com o ácido ou base forte, se as condições para uma titulação termométrica catalítica forem satisfeitas (15).

Substâncias tais como acrilonitrila, alquilacrilatos, são bons indicadores termométricos para titulações de ácidos orgânicos (16), enquanto 2-fenil propeno e alquil-vinil-eteres podem ser usados como indicadores para titulações de bases orgânicas

cas (17).

As reações de polimerização catalizadas por íons H^+ e inibidas por uma base (B) são representadas pelas equações 6 e 7, respectivamente, e as reações de polimerização catalizadas por íons OH^- e inibidas pelo ácido HA são representadas pelas equações 8 e 9, respectivamente.



O ácido perclórico é bastante utilizado como titulante e pode ser usado juntamente com um catalizador de polimerização, tal como o 2-fenilpropeno. Hidróxido de potássio, n-butil lítio, etóxido de potássio, metóxido de potássio, todos são catalizadores de polimerização da acrilonitrila e de alquilacrilatos (17). Além destes sistemas citados, muitos outros podem ser utilizados nas titulações termométricas catalíticas.

11.5.3 A INFLUÊNCIA DO INDICADOR NA ANÁLISE POR TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA - CATALÍTICA

Quando o indicador é o maior constituinte da amostra, como é usado frequentemente em Titulação Termométrica Catalítica, a possibilidade de ocorrerem efeitos significativos na análise, - causados por estes reagentes, também são maiores.

Os exemplos mais - característicos são:

11.5.3.1 ACETONA E ACETALDEÍDO:

Quando a acetona ⁽¹⁴⁾ é usada como solvente e indicador termométrico em titulações não aquosas de ácido succínico com hidróxido de potássio em propanol-2, somente um dos grupos carboxílicos é determinado. Entretanto, ambos os grupos podem ser determinados em solução aquosa por métodos convencionais. Similarmente, somente um grupo carboxílico dos ácidos succino ou oxálico é determinado quando acetaldeído anidro é usado como solvente e indicador ter-

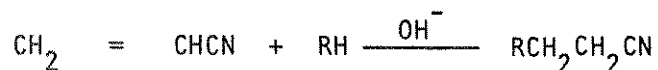
mométrico. Quando estes ácidos são titulados em acetal deído aquoso, o ponto final corresponde à titulação dos dois grupos carboxílicos.

Verifica-se ainda, para os exemplos citados, que a estequiometria depende da quantidade de água presente na amostra. Observa-se também, que metanol produz um efeito similar ao provocado pela água na reação. Com isto, conclui-se que ligações de hidrogênio intramolecular nos anions oxalatos e succinato são fortes o suficiente para evitar que o segundo grupo carboxílico seja determinado. A água e o metanol solvatam os ions carboxilatos e liberam a função ácida para a titulação (18).

11.5.3.2 ACRILONITRILA E ETHER ALQUILVINIL

É bastante grande a utilização destes reagentes como indicadores termométricos, porém, em muitos casos, encontram-se valores menores do que os esperados. Pode-se citar exemplos de titulações de ácidos com bases fortes com acrilonitrila como indicador, onde resultados baixos são obtidos. Este fato tem sido atribuído a cianoetilação durante o

curso da titulação.



A magnitude de esta interferência é dependente da velocidade relativa das reações de neutralização e cianoetilação (19). Fenóis podem ser titulados e não sofrem cianoetilação (16,20), enquanto que tióis sofrem completa cianoetilação antes que possam ser neutralizados (21).

11.5.4 SOLVENTES UTILIZADOS E SUAS INFLUÊNCIAS

Na maioria das aplicações da Titulação Termométrica Catalítica, amostras inorgânicas são determinadas em soluções aquosas com titulantes aquosos, enquanto que amostras orgânicas têm sido tituladas em solventes não aquosos, com reagentes dissolvidos em solventes orgânicos.

A utilização da Titulação Termométrica Catalítica em análises, requer uma investigação prévia do solvente a ser utilizado na preparação das amostras e reagentes.

A influência dos solventes pode ser notada na obtenção do ponto final da Titulação Termométrica Catalítica ou na estequiometria da reação entre o titulante e o titulado.

Quando o acrilonitrila é usado como indicador termométrico na titulação de ácidos fracos, a composição do solvente tem influência importante na forma da curva de titulação.

A utilização de um solvente apropriado na preparação da amostra, pode melhorar a curvatura do ponto final, enquanto que também com o uso de uma mistura de solventes, é possível o controle da estequiometria da reação na determinação de alguns ácidos polifuncionais (22).

11.5.5 A INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE ÁGUA EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Quando os resultados obtidos em condições aquosas não são satisfatórios, as titulações são frequentemente realizadas em soluções não aquosas.

A presença de água na titulação termométrica catalítica em solução não aquosa, pode interferir na análise. A sua influência é notada na obtenção do ponto final da titulação. Muitas vezes, o ponto final é dificultado ou não pode ser obtido, devido a presença de água nos solventes utilizados.

Para a titulação termométrica catalítica de ácidos fracos, nota-se que o efeito da água depende do indicador termométrico empregado. Quando se utiliza acetona ⁽¹⁴⁾ como indicador, encontram-se melhores resultados na ausência de água e geralmente recomenda-se que o conteúdo de água da acetona deve ser menor do que 0,2%. A determinação do ponto final é dificultada com o aumento da quantidade de água presente na acetona.

A influência da presença de água em titulação termométrica catalítica, como já foi mencionado, varia de acordo com o indicador utilizado.

De uma maneira geral, a presença de água deve ser evitada. Entretanto, certos indicadores toleram a presença de água em pequenas quantidades.

Quando se utiliza acrilonitrila como indicador e DMF ou DMSO como um "cosolvente" e KOH em 2-propanol como titulante, ácidos fracos e fortes podem ser determinados em soluções aquosas (1 a 10% em relação ao cosolvente) ⁽²⁰⁾

O sucesso destas titulações foi atribuído parcialmente, a forte propriedade de acceptora de ligações de hidrogênio do DMF ou DMSO que causa imobilização das moléculas de água em solução.

11.5.6 A SELETIVIDADE DA TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

A titulação termométrica catalítica é um método não seletivo, pois seu princípio básico é a iniciação catalítica de uma reação exotérmica por um excesso de titulante. Como consequência, somente um ponto de inflexão é observado.

Entretanto, a utilização deste método na análise de componentes de uma mistura, resorcinol e fenol ⁽²³⁾, por exemplo, pode, às vezes, ser efetuada. Isto baseia-se no fato de que dife

rentes combinações de solventes, indicadores e titulantes podem dar resultados diferentes na determinação de um mesmo composto ou uma mistura de compostos.

III CONSIDERAÇÕES SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VINHO E ALGUMAS PROPRIEDADES DE SEUS COMPONENTES

Neste trabalho a técnica da titulação termométrica foi aplicada na análise de vinho. Sendo assim, achou-se necessário comentar alguns aspectos com relação aos mesmos.

III.1 COMPOSIÇÃO

Basicamente os vinhos são constituídos por uma mistura de compostos bastante complexa (24 a 30).

Os principais estão relacionados abaixo:

- . água
- . hidratos de carbono: glicose, levulose, pentoses
- . álcoois: etílico, isobutileno-glicol, glicerina, manitol
- . aldeídos: acético
- . Nitrogênio na forma de: albuminóides, albuminosas e peptonas, aminoácidos, amônio e bases nitrogenadas
- . Substâncias minerais: cinzas, K, Na, Ca, Mg, Fe, Al, P_2O_5 , Cl, Si, SO_4
- . Gases: CO_2
- . Ácidos: os ácidos presentes podem ser divididos em grupos, tal como observados na Tabela 1.

TABELA 1

PRINCIPAIS ÁCIDOS PRESENTES NOS VINHOS

NOME	pKa	QUANTIDADES NORMALMENTE PRESENTES EM VINHOS (g/l)
Ácido tartárico	1-3,01 2-4,05	2 - 5
Ácido málico	1-3,46 2-5,05	0 - 5
Ácido cítrico	1-3,09 2-4,39	0 - 0,5
Ácido succínico	1-4,18 2-5,23	0,5 - 1,5
Ácido láctico	1-3,81	1 - 5
Ácido fosfórico	1-1,96 2-6,70 3-12,44	0,1 - 1
Ácido acético	1-4,73	0,5 - 1
Ácido sulfúrico	-	0,5 - 1
Ácido clorídrico	-	0,05 - 0,5
Poli fenóis	7 a 10	0,1 - 3

Nesta tabela, pode-se observar os valores das constantes de dissociação dos ácidos presentes, assim como as quantidades relativas de cada ácido.

Levando-se em conta a composição do vinho, observa-se que o mesmo é constituído por substâncias que se desprendem pela evaporação à temperatura em torno de 100° C e que se denominam matérias voláteis e pelos demais que permanecem, ou materiais fixos, que constituem o extrato de vinho.

Entre os primeiros, encontra-se o álcool etílico, os éteres, os ésteres, ácidos voláteis, oleoresinas e os gases dissolvidos no vinho. No extrato encontram-se os demais constituintes entre os quais se salientam os ácidos fixos e seus sais, a glicerina, as substâncias corantes, tânicas e azotadas e os fermentos e bactérias.

Os principais álcoois dos vinhos são o álcool etílico, a glicerina, "manitol", o álcool metílico, o álcool amílico, álcool isopropílico e álcool butílico.

O álcool etílico é um fator im-

portante na conservação do vinho.

A glicerina do vinho, que é formada durante o processo fermentativo, é proveniente de 3,5 a 7,5% do açúcar contido no mosto. Ela confere ao vinho características de "morbidez" e de "harmoniosidade".

Os álcoois superiores, junto ao ácido succínico encontram-se em pequenas quantidades e contribuem para a formação do seu "bouquet".

Os principais ácidos presentes no vinho são ácido málico, o ácido tartárico, o ácido cítrico e o ácido tânico, todos provenientes do "mosto".

Durante o processo fermentativo, originam-se os ácidos succínico, láctico, acético, propionico, butírico, fórmico e carbônico.

O ácido succínico se origina da decomposição de substâncias albuminóides que, em primeiro lugar, se degradam em aminoácidos.

O ácido láctico é originado pela quebra biológica do ácido málico, denominada fermenta

ção malo-láctica, provocada por diversos microorganismos.

O ácido acético, junto aos ácidos propiônico, butírico e fórmico constituem a chamada "acidez volátil" do vinho, sendo que o ácido acético representa cerca de 80% dessa acidez.

O ácido acético provém da oxidação natural do álcool e do desenvolvimento de fermentos patogênicos.

O ácido propiônico e o butírico são provenientes da fermentação por certas espécies de bactérias. O ácido fórmico encontra-se, às vezes, em certos vinhos, em pequena quantidade.

O ácido carbônico é abundante nos vinhos, conservados em recipientes não porosos. Este produto é ótimo elemento de conservação do vinho e proporciona boas qualidades organolépticas aos vinhos.

Deduzindo-se da acidez total de um vinho a acidez volátil, obtém-se a chamada acidez fixa do vinho.

O aldeído que prevalece no vi-

nho é o aldeído acético, sendo que o vinho ainda pode conter furfural e aldeído fórmico, embora isso ocorra raramente. O aldeído típico do vinho, ou aldeído acético, origina-se, em maior quantidade, quando se excede no emprego de SO_2 , quando o vinho é branco ou rosado, quando seu teor alcoólico é elevado e quando o vinho é envelhecido.

Os esteres são combinações de álcoois com ácidos que no vinho se originam tanto por via química, quanto por via biológica.

Entre os éteres, o mais importante é o éter acético que é acompanhado por traços de éteres isobutíricos, succinato de etila, éter isoamílico, caprílico.

Estes éteres nada têm em comum com o aroma da uva. Junto, entretanto, aos aldeídos, óleos, sais aromáticos, álcoois e esteres, constituem o que se denomina "bouquet" do vinho, que caracteriza os produtos convencionalmente e racionalmente envelhecidos.

Os produtos gasosos do vinho são representados pelo ácido sulfídrico, presente em determinadas vinificações e o ácido carbônico, já menciona

do.

III.2 SUBSTÂNCIAS POLIFENÓLICAS

As substâncias polifenólicas, - neste trabalho chamadas indistintamente de taninos ou - substâncias tânicas, são componentes muito importantes dos vinhos (31, 32) pelas influências que têm sobre suas características físico-químicas e organolépticas.

Pode-se enfatizar as suas propriedades: de adstringência, que no caso contribui para o sabor, ação antissética, ação clarificante, ação antioxidante, capacidade de formar precipitados com proteínas e alguns sais de metais pesados, etc. Os taninos estão diretamente relacionados com o fenômeno complexo que acompanha o envelhecimento e maturação dos vinhos. (33 - 34).

Não é conhecida com precisão a natureza química do tanino contido no vinho. Comumente, diz-se que ele é constituído de galotaninos e de tanino condensado. (35, 36).

O tanino forma um grupo de com-

postos que contêm em comum a função fenólica e um certo número de propriedades, algumas já mencionadas.

III.2.1 CLASSIFICAÇÃO DOS TANINOS

Uma classificação baseada nos tipos estruturais, divide os taninos em hidrolisáveis e condensados. (37)

a. Taninos hidrolisáveis

São constituídos de glucosídeos de ácidos polifenólicos (ácido gálico, ácido elágico), ou seja, tem estrutura poliéster, são hidrolisados por ácidos (ou enzimas) à açúcar ou álcoois e ácidos carboxílicos fenólicos.

Eles podem ser subdivididos em galotaninos e elagitaninos. Na hidrólise os galotaninos dão ácido gálico e os elagitaninos dão ácido hexahidróxidodifenico.

b. Taninos Condensados

Taninos condensados não quebram com ácidos, mas sofrem polimerização progressiva sob a ação dos ácidos, produzindo aglomerados amorfos ou "rede de taninos".

III.2.2 A PRESENÇA DE TANINOS EM VEGETAIS E CEREAIS E ALGUMAS DE SUAS APLICAÇÕES

Taninos vegetais são compostos solúveis em água, produtos metabólicos de plantas e árvores, com peso molecular entre 500 e 3000. Eles combinam com proteínas e esta propriedade é à base do processo de curtimento, pelo qual peles são convertidas em couro.

Eles possuem outras aplicações industriais e tecnológicas, tais como na manufatura de tintas e plásticos, como antioxidantes, colas, etc. (38)

A essência do "curtimento vegetal" é o aumento da força do couro devido a alteração da forma das fibras das peles. Isto é efetuado por empacotamento das regiões amorfas da estrutura fibrilar com taninos (39, 40). Grupos hidroxilas são responsáveis por algumas ligações químicas que ocorrem entre a molécula do tanino e as fibras, durante o processo de curtimento.

Os taninos estão presen

tes em uma grande quantidade de plantas usadas como alimentos e rações, incluindo sorgo (41), feijão (42), cevada (41), milho (43).

Eles são responsáveis - pela adstringência de plantas e diminuem o valor nutricional quando encontrados em nível muito alto em certos comestíveis (42, 44).

IV ALGUNS MÉTODOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA "ACIDEZ TOTAL" E TANINOS DOS VINHOS

IV.1 ACIDEZ TOTAL

A acidez é elemento de grande importância para a cor e a conservação do vinho, influenciando eficazmente também nos fenômenos da fermentação alcoólica e ainda mais nos de envelhecimento do produto. Influencia ainda em seu sabor e, além disso, os ácidos exercem ótima ação antisséptica e bactericida.

Quando o vinho é demasiado rico em "acidez total", apresenta-se com cor brilhante, mas com sabor áspero, "azedo". Ao passo que o vinho dotado de "acidez total" deficiente tem cor pouco intensa e sem brilho; facilmente sofre alterações.

A "acidez total" em vinho pode ser determinada por titulação simples. Os problemas que aparecem são devido a quantidades diferentes dos diversos ácidos presentes no vinho. Os diferentes valores de pKa desses ácidos tornam difícil a pré-determinação do pH do ponto final da titulação. Utilizando-se uma ba

se forte para titulação, o pH será maior do que 7. Tem sido utilizado indicadores, tais como: fenolftalena (8.3) ou vermelho cresol (7.7) ⁽⁴⁵⁾. A técnica mais utilizada é a titulação potenciométrica com bases fortes. - Neste método, o ponto final da titulação é considerado - diferentemente em diversas regiões. Na Europa, o pH 8,4 é tomado usualmente como o pH do ponto final, enquanto - que no Brasil admite-se o pH 8,2 como sendo o ponto final da titulação ⁽⁴⁶⁾.

Os resultados da determinação da acidez total, são expressos em alguns lugares como - meq de ácido sulfúrico, tal como na França e Portugal e em meq de ácido tartárico como na Alemanha ⁽⁴⁷⁾.

IV.2 POLIFENÓIS (TANINOS)

Os polifenóis exigem métodos - mais sofisticados para a sua determinação. As dificuldades encontradas na dosagem do conteúdo total de tanino em vinho são devido ao não completo conhecimento de sua composição química.

Os métodos comumente utilizados baseiam-se essencialmente na propriedade das substân

cias polifenólicas (taninos) em reduzir alguns oxidantes (ex: KMnO_4) ou de formar complexos coloridos com sais de ferro.

Pode-se citar os seguintes métodos:

IV.2.1 ÍNDICE DE PERMANGANATO

O poder redutor da substância fenólica com relação ao KMnO_4 é uma propriedade bastante utilizada para sua dosagem. Trata-se de uma determinação do conteúdo total de polifenóis que fornece um índice chamado de "Índice de Permanganato" (25). É um método empírico, onde as condições de dosagem devem ser bem definidas e exatamente repetidas.

A determinação de taninos com base no seu poder redutor de KMnO_4 é influenciada pela natureza da substância que o constitui (catequina, leucoantocianina, etc.) e pela presença do mesmo na forma oxidada.

Isto porque, os diversos compostos fenólicos, mesmo em concentrações iguais,

não reduzem igualmente o KMnO_4 ⁽⁴⁸⁾ e o consumo de KMnO_4 diminui, se na amostra estão presentes taninos oxidados (49).

O "Índice de Permaganato" expressa razoavelmente bem o teor das substâncias fenólicas dos vinhos.

IV.2.2 AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA

Vários métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos para determinação do conteúdo fenólico em vinho. Entre estes métodos pode-se citar a utilização do reagente de Folin-Denis e o reagente de Folin-Ciocalteu ⁽²⁵⁾.

O método colorimétrico baseado na precipitação com proteínas e posterior complexação com cloreto férrico, foi utilizado para determinação de taninos em vegetais ⁽⁵⁰⁾. Pensou-se em adaptá-lo para determinação de taninos em vinhos.

A dosagem colorimétrica, mesmo sendo mais simples, é dificultada pelo fato de

vários constituintes formarem com o FeCl_3 (ou outro reagente), compostos coloridos de características diferentes (ex: o catecol forma uma cor amarela e o pirogáolol uma cor azul com FeCl_3), onde a densidade ótica varia com a predominância de um componente sobre outro.

Para a dosagem da substância tânica de vinhos, pode ainda ser aplicada a técnica espectrofotométrica na região ultra-violeta, que se baseia no fato do material tânico apresentar uma banda de absorção na região do ultra violeta com máximo em 275nm (51, 52).

V UTILIZAÇÃO DA TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CONVENCIONAL NA DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL E TANINOS EM VINHO

Como pode ser visto na tabela⁽¹⁾, pode-se considerar que no vinho encontra-se uma mistura de ácidos de pKas muito próximos, os quais são responsáveis pela chamada "acidez total" do vinho. É esta "acidez total" que é determinada na titulação potenciométrica ou utilizando o indicador fenolftaleína⁽⁴⁵⁾. Por outro lado, as substâncias tânicas e as substâncias corantes que constituem os chamados compostos polifenólicos e que apresentam pKa na faixa de 7 a 10, não aparecem na titulação potenciométrica.

A curva de titulação termométrica alcalimétrica utilizando base forte como titulante apresenta pelo menos um ponto de inflexão bem definido. Acredita-se que este ponto de inflexão corresponde à titulação dos ácidos carboxílicos presentes no vinho.

Por esta razão, achamos que a chamada "acidez total" do vinho pode ser determinada através desta técnica. Entretanto, além do ponto de inflexão que corresponderia à "acidez total", a curva de titulação alcalimétrica apresenta uma segunda inflexão menos definida (figura 8). Assim, a parte da curva que vai do

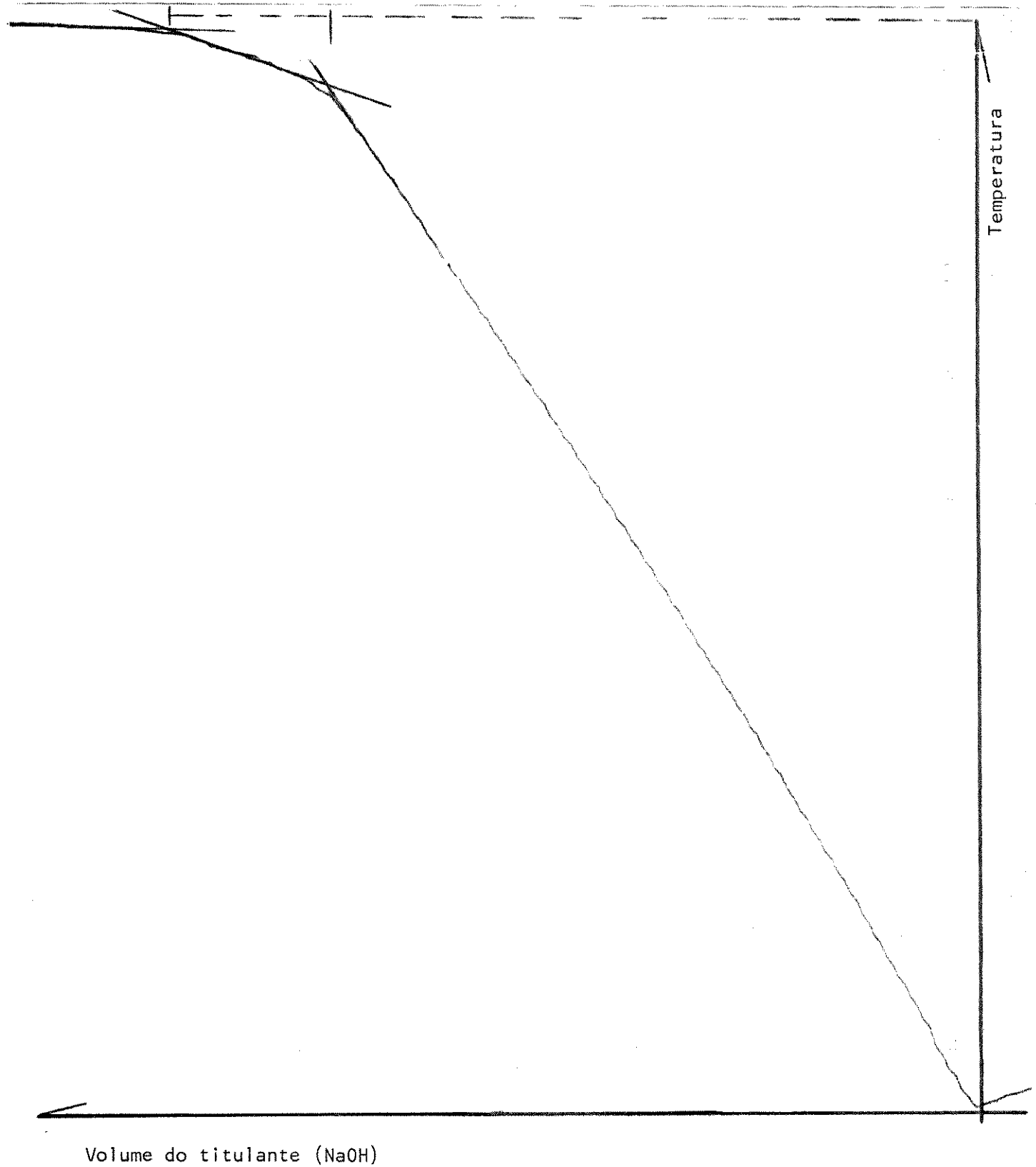
FIGURA 8

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 10) COM NaOH
1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.



início até o primeiro ponto de inflexão corresponderia à determinação da "acidez total" e a parte que vai do primeiro ao segundo ponto de inflexão corresponderá à titulação dos polifenóis encontrados no vinho.

VI PARTE EXPERIMENTAL

VI.1 DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO VAZÃO/VELOCIDADE DO PAPEL, ATRAVÉS DE UMA TITULAÇÃO

Quando se faz uma titulação com o sistema termométrico, interessa-se em calcular o volume do titulante, o que é feito através da equação:

$$\text{VOLUME} = \text{VAZÃO} \times \text{TEMPO}$$

Na prática, o que se mede é a distância percorrida pelo papel entre o início e o fim da titulação. Conhecendo-se a velocidade do papel, pode-se calcular o tempo:

$$\text{TEMPO} = \frac{\text{DISTÂNCIA}}{\text{VELOCIDADE DO PAPEL}}$$

portanto:

$$\text{VOLUME} = \frac{\text{VAZÃO}}{\text{VELOCIDADE DO PAPEL}} \times \text{DISTÂNCIA}$$

Essa relação foi determinada na prática através da titulação de uma amostra de hidró-

xido de sódio de título conhecido, com uma solução de ácido clorídrico de concentração conhecida. Então, o volume do titulante gasto na titulação pode ser calculado.

Conhecendo-se o volume do titulante gasto e medindo-se a distância do papel, a relação vazão/velocidade do papel pode ser calculada através da equação:

$$\frac{\text{VAZÃO}}{\text{VELOCIDADE}} = \frac{\text{VOLUME}}{\text{DISTÂNCIA}}$$

Os valores das relações vazão/velocidade foram determinados para as diversas vazões usadas. Um exemplo é mostrado para a vazão nominal da seringa igual a 0,4ml/min.

Volume de NaOH	= 50,00 ml
Normalidade do NaOH	= 0,0999 N
Normalidade do HCl	= 1,002 N
Velocidade nominal do papel	= 1,0 cm/min.
Vazão nominal da seringa	= 0,4 ml/min.

<u>Amostra</u>	<u>Comprimento do papel</u>
1	11,55
2	11,35
3	11,40
4	Valor Médio = 11,45
	11,50

Volume de ácido clorídrico gasto até o ponto de equivalência:

4,985 ml

Relação vazão/velocidade do papel = $\frac{4,985\text{ml}}{11,45\text{cm}} = 0,4353\text{ml/cm}$

VI.2 PROCEDIMENTO USADO NAS TITULAÇÕES TERMOMÉTRICAS DE VINHO

Amostras de vinho foram tituladas termometricamente, utilizando-se como titulante, solução padrão de hidróxido de sódio, procedendo-se da maneira que descrevemos a seguir:

Tomou-se 50,00ml da amostra de vinho com o auxílio de uma pipeta volumétrica, previamente calibrada e transferiu-se para o frasco da titulação. Após a espera de alguns minutos, para que a solução atingisse o equilíbrio térmico, iniciou-se a titulação termométrica usando-se hidróxido de sódio padronizado como titulante.

Em todas as titulações termométricas convencionais, utilizou-se velocidade do papel - 1,0cm/min., vazão nominal da seringa 0,4ml/min. e sensibilidade do registrador 5,0mV. Alguns termogramas obtidos nestas condições são mostrados nas figuras de 8 a 14.

FIGURA 9

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 5) COM NaOH 1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.

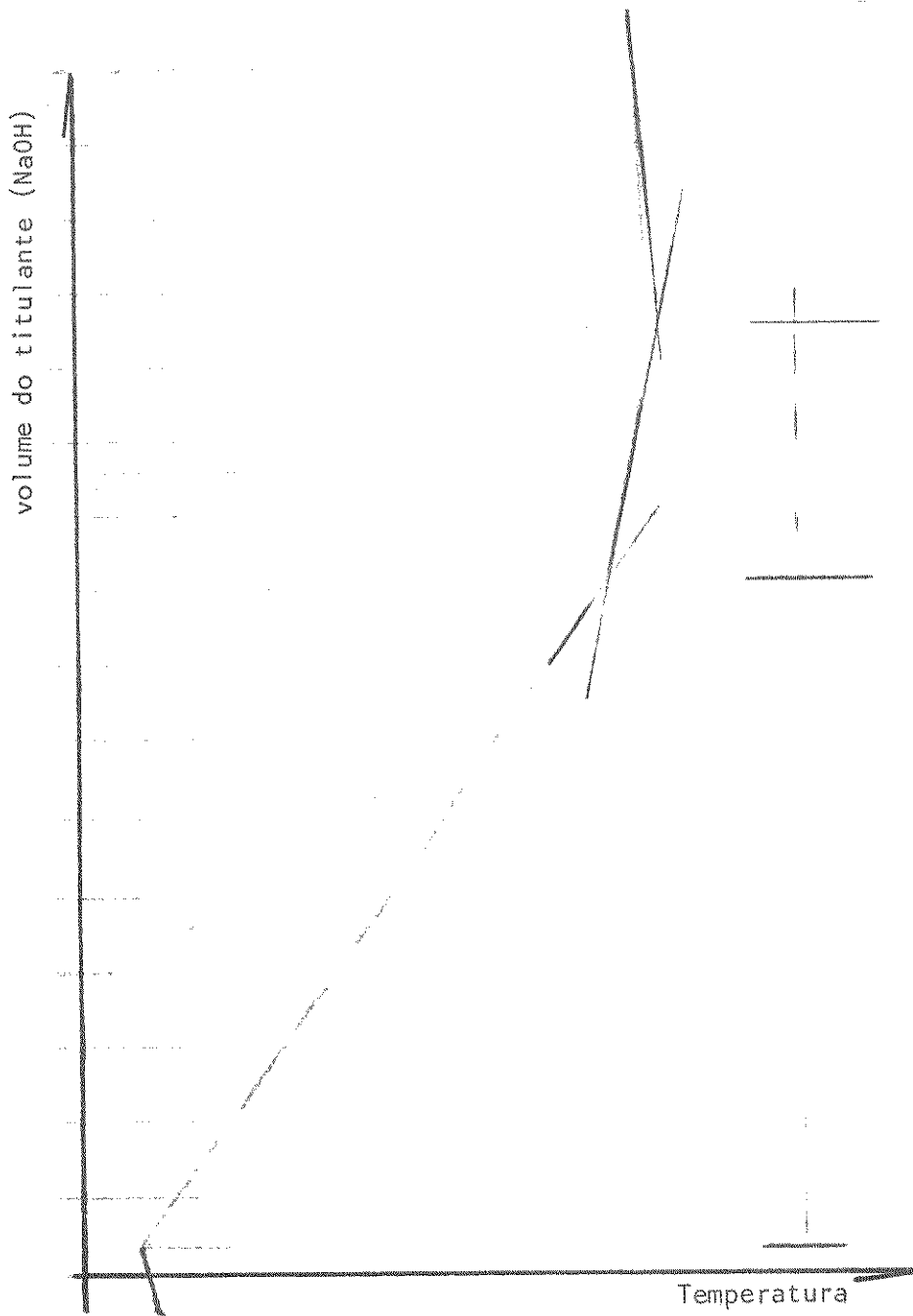


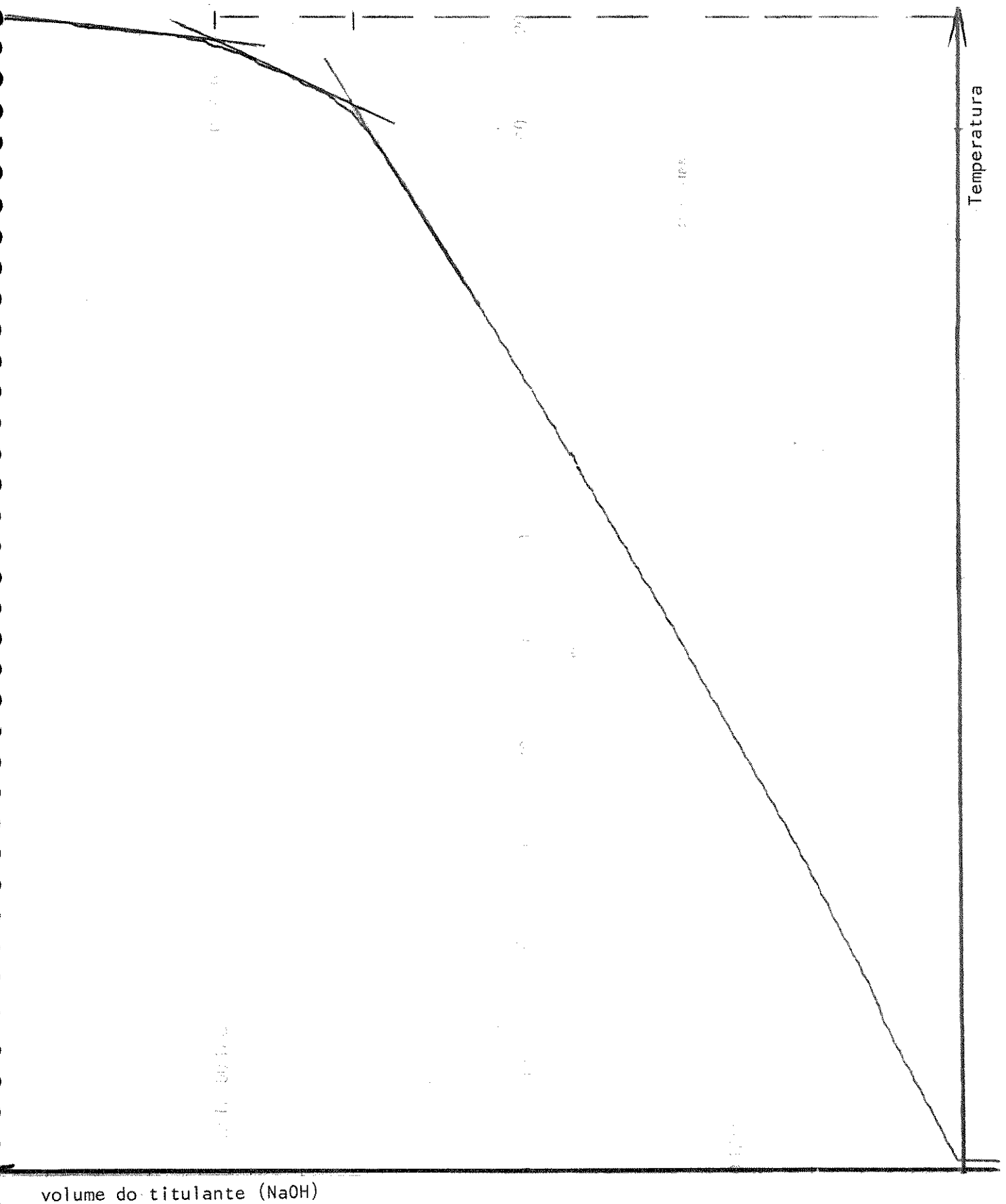
FIGURA 10

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 11) COM NaOH
1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.



volume do titulante (NaOH)

FIGURA 11

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 12) COM NaOH 1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.

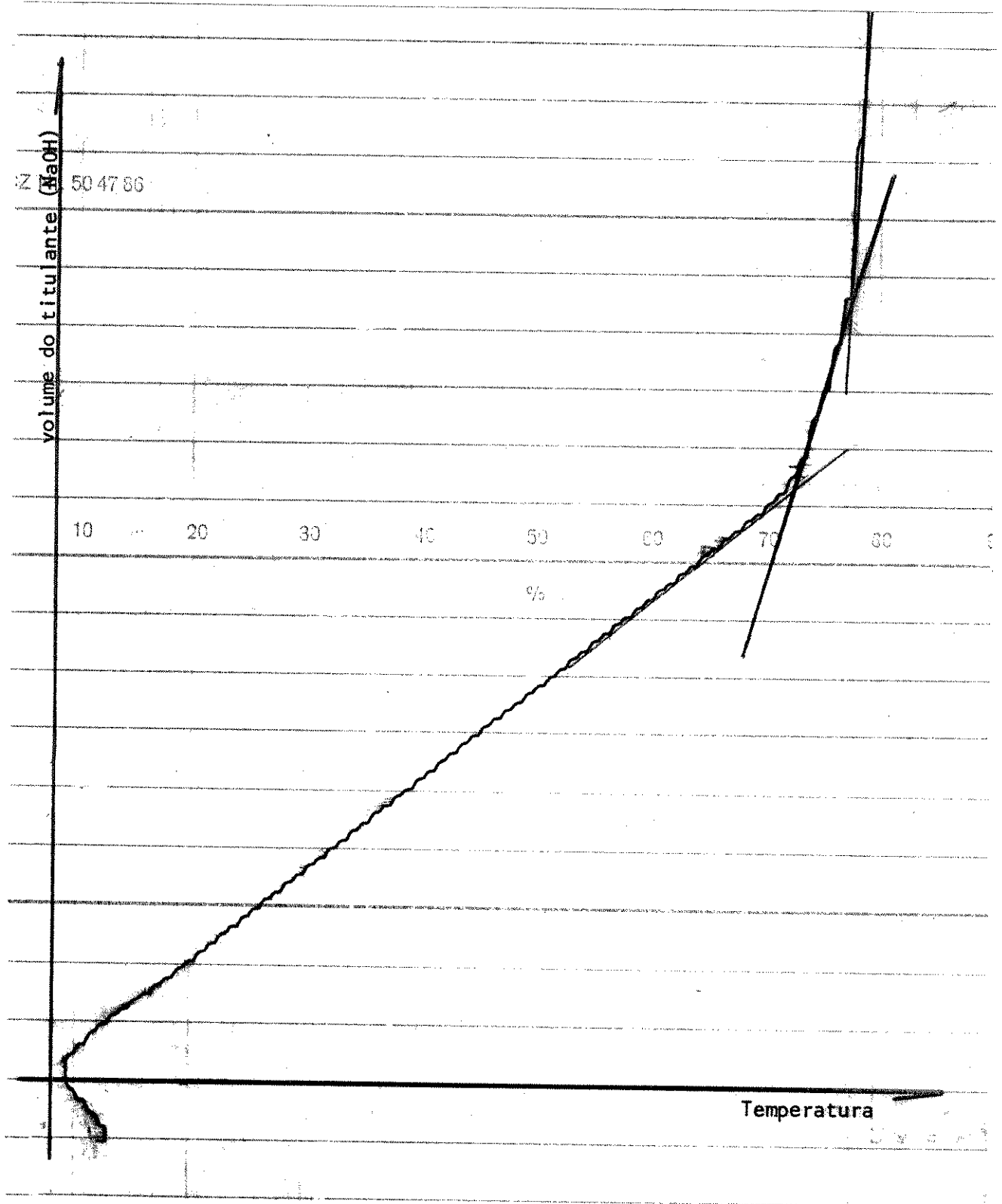


FIGURA 12

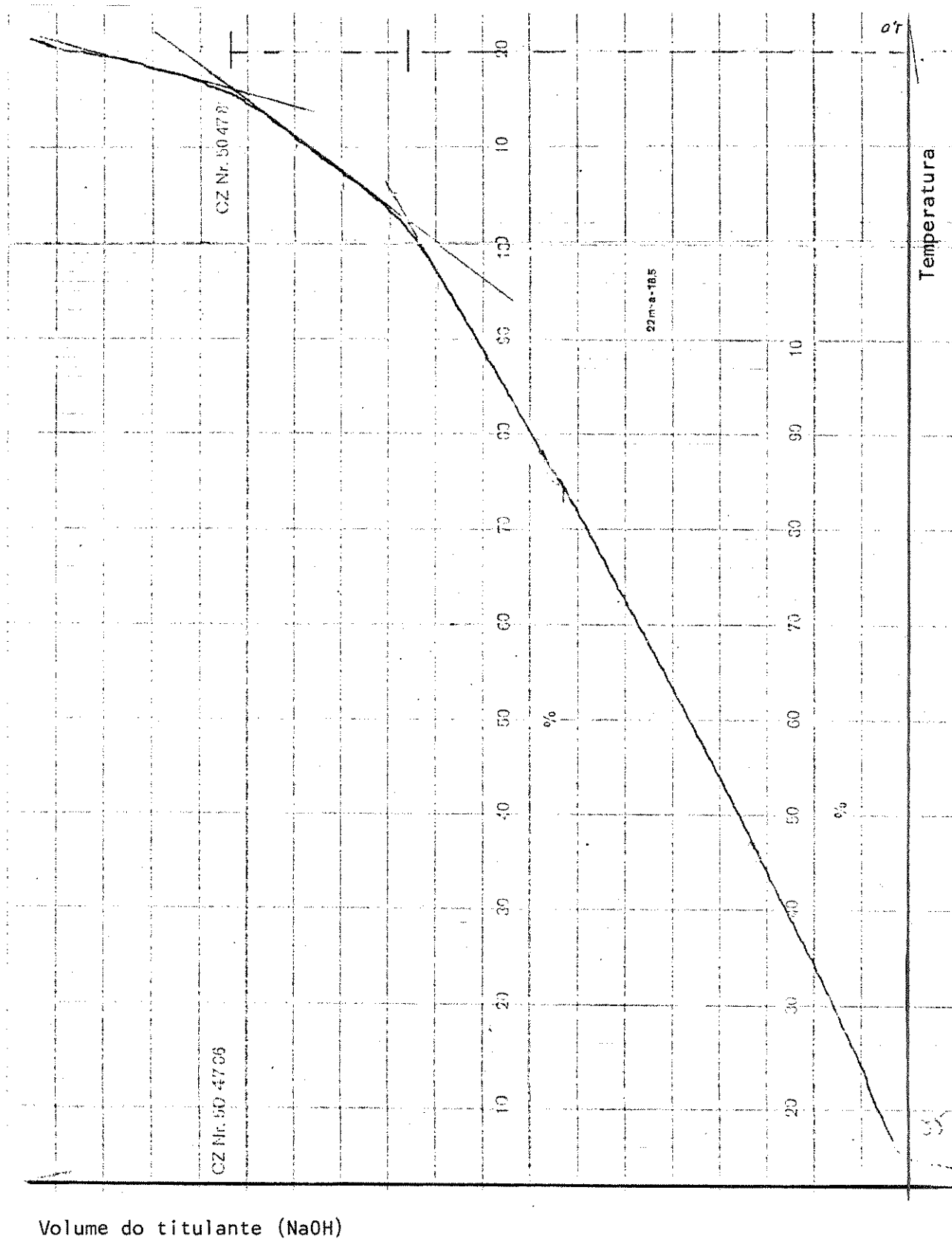
TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 1) COM NaOH

1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa - 0,4 ml/min.



Volume do titulante (NaOH)

FIGURA 13

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 9) COM NaOH
1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.

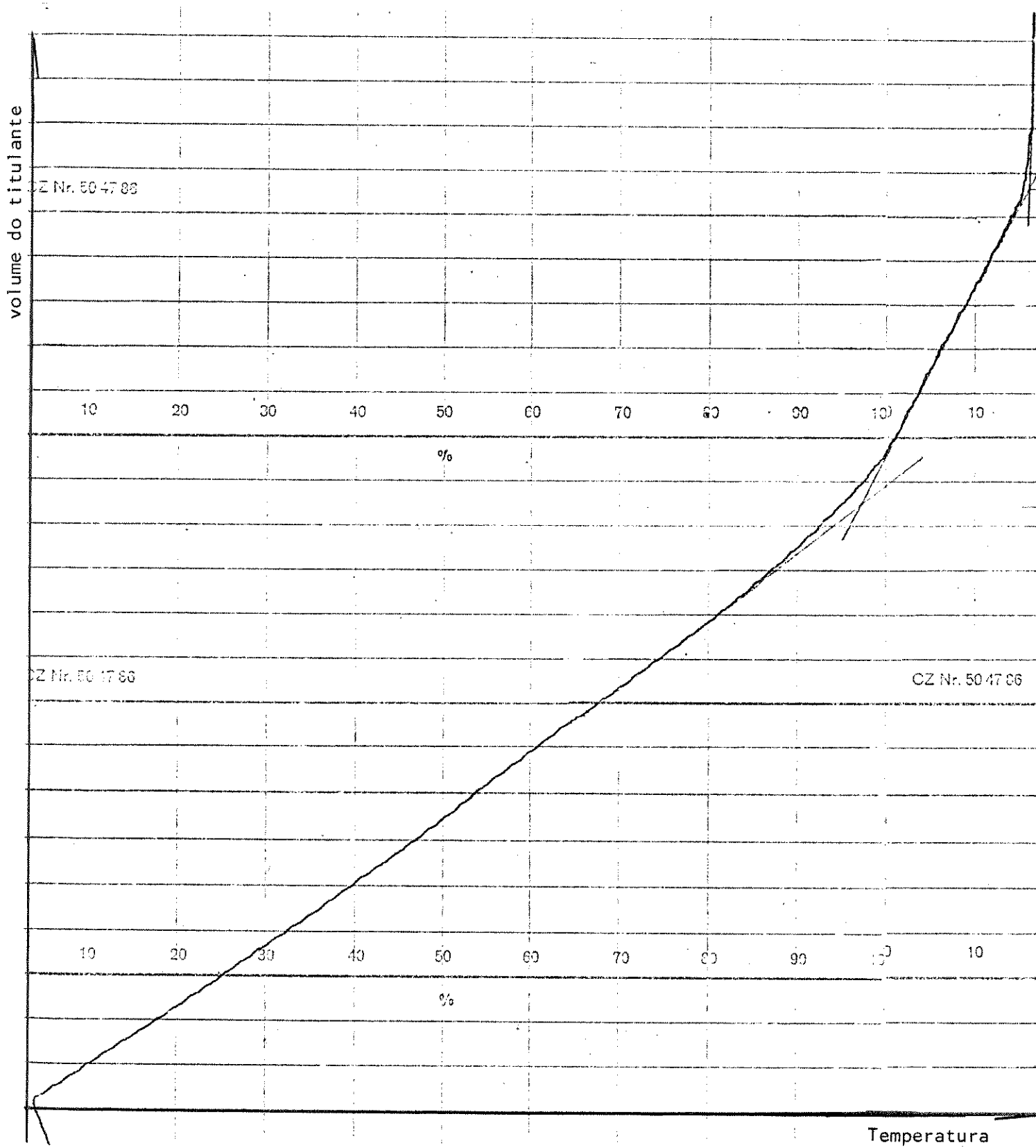


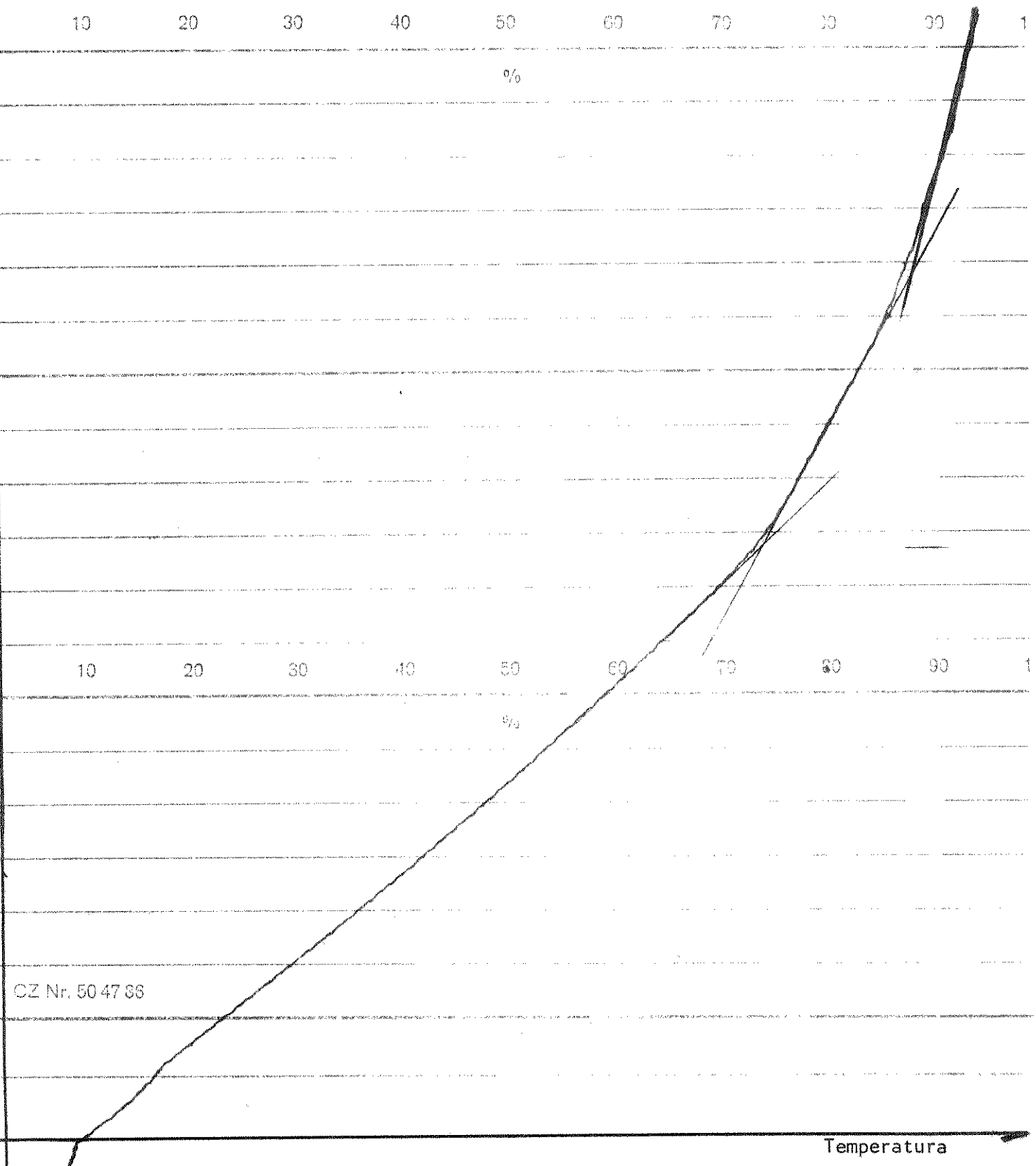
FIGURA 14

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 8) COM NaOH
1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.



CZ Nr. 50 47 86

Após a realização das titulações em diversas condições, escolheu-se as condições acima como sendo as mais favoráveis.

VI.3 RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA "ACIDEZ TOTAL" DOS VINHOS POR TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CONVENCIONAL

Na tabela 2 estão relacionados os valores encontrados para as determinações efetuadas. Estes valores correspondem à média entre 3 titulações realizadas para cada amostra.

VI.4 ANÁLISE POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

Os resultados obtidos para "acidez total" através da titulação termométrica foram comparados aqueles obtidos com o método potenciométrico que é utilizado rotineiramente em análises de vinho, sendo aceito como o método oficial, pela maioria das indústrias de vinho.

A avaliação da acidez total -

TABELA 2

DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL EM VINHO
POR TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA

AMOSTRA	Mililitros de NaOH (1N) 100 ml da Amostra
1	8,93
2	7,97
3	9,35
4	7,11
5	7,57
6	8,21
7	7,65
8	8,50
9	9,20
10	9,66
11	10,58
12	9,18
13	8,01
14	9,05
15	6,62
16	11,62
17	10,27

por via potenciométrica, foi realizada procedendo-se da seguinte maneira:

A fim de remover o gás carbônico dissolvido no vinho em geral e, particularmente, nos vinhos espumantes ou gasificados, é necessário expulsá-lo com agitação sob vácuo ou passagem de um gás inerte, antes da tomada da amostra para a titulação.

Em um becker de 250ml. pipetam-se 10,00ml de amostra de vinho e adiciona-se 100ml de água destilada. Titula-se com hidróxido de sódio 0,1N, até que o pH medido seja igual a 8,2 a 20°C. A adição de hidróxido de sódio deve ser feita lentamente e a solução constantemente agitada.

A acidez total é expressa em ml de NaOH 1N gasto para neutralização de 100ml de vinho. Os valores obtidos para as amostras analisadas, são mostrados na tabela 3 e uma curva de titulação obtida é mostrada na figura 15.

Na tabela 2-3 são mostrados comparativamente os valores para acidez total obtidos por titulação potenciométrica e por titulação termométrica. Acredita-se, em razão da concordância observada, que a ti

TABELA 3

DETERMINAÇÃO DA "ACIDEZ TOTAL" EM VINHO
POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

AMOSTRA	Mililitros de NaOH (1N) gastos na tit. de 100ml da amostra
1	9,18
2	8,35
3	9,63
4	7,00
5	7,68
6	8,30
7	7,95
8	8,75
9	9,30
10	9,50
11	10,40
12	9,10
13	7,95
14	8,90
15	6,50
16	11,45
17	10,10

FIGURA 15

CURVA CORRESPONDENTE À TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 16), COM NaOH 1 N.

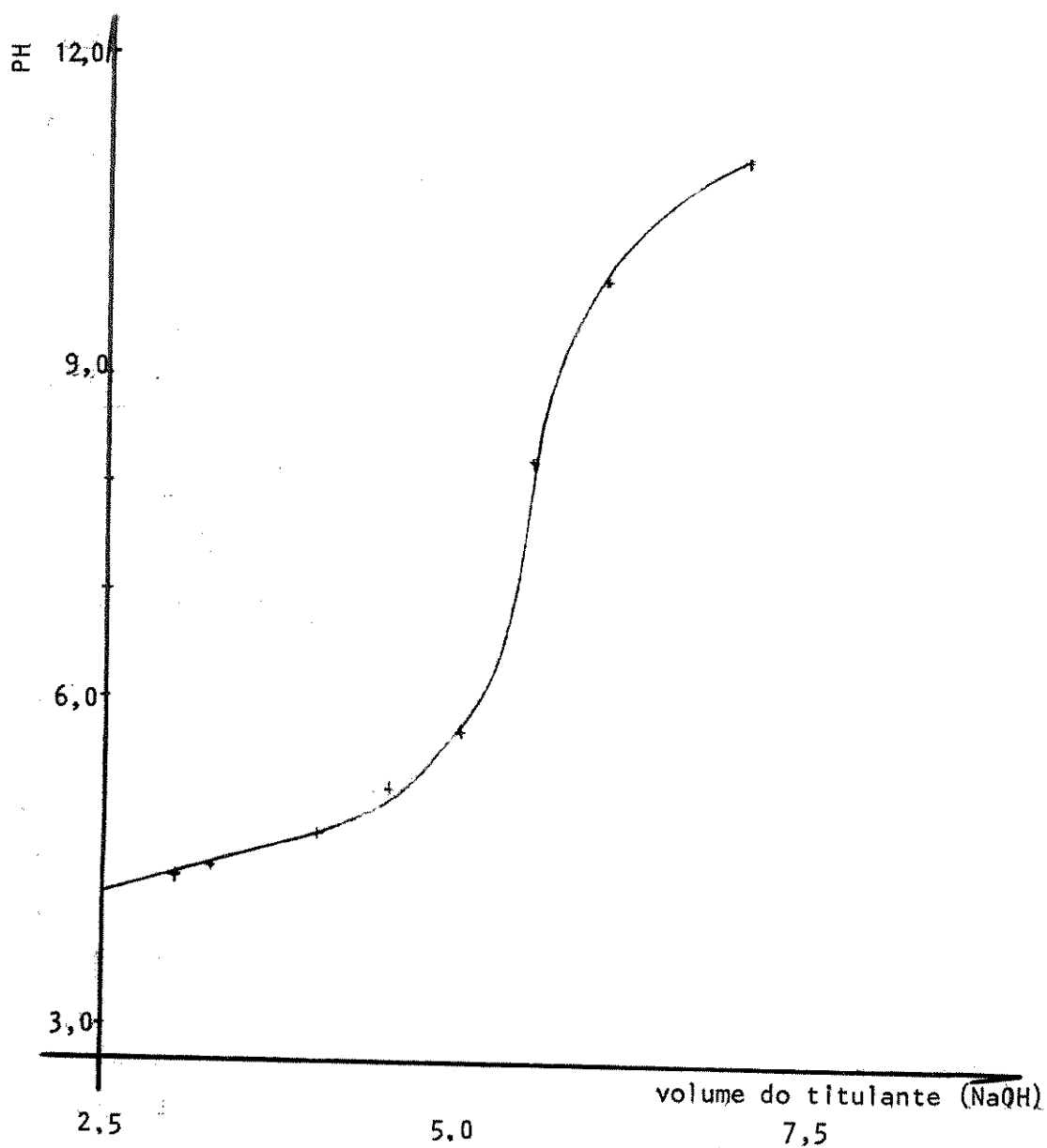


TABELA 2-3

DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL EM VINHO: COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS
 ATRAVÉS DOS MÉTODOS TERMOMÉTRICO E POTENCIOMÉTRICO

AMOSTRA	Termométrico Mililitros de NaOH (1N) gastos na tit. de 100,00ml da amostra	Potenciométrico Mililitros de NaOH (1N) gastos na tit. de 100,00ml da amostra
1	8,93	9,18
2	7,97	8,35
3	9,35	9,63
4	7,11	7,00
5	7,57	7,68
6	8,21	8,30
7	7,65	7,95
8	8,50	8,75
9	9,20	9,30
10	9,66	9,50
11	10,58	10,40
12	9,18	9,10
13	8,01	7,95
14	9,05	8,90
15	6,62	6,50
16	11,62	11,45
17	10,27	10,10

tulação termométrica pode ser usada para determinação da "acidez total do vinho".

VI.5 DETERMINAÇÃO TERMOMÉTRICA DE POLIFENÓIS

Como vimos anteriormente, as titulações termométricas alcalimétricas apresentam uma segunda inflexão além daquela usada como ponto final da determinação da "acidez total". Em razão disso, mostramos o propósito de usar essa segunda inflexão como ponto final da determinação de polifenóis.

Uma série de experimentos descritos a seguir, foram realizados com o intuito de evidenciar esta possibilidade, já que a titulação termométrica, a princípio, é um método não específico.

VI.5.1 TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA DE ÁCIDO GÁLICO

Uma das substâncias polifenólicas encontradas no vinho é o ácido gálico (24, 36). Como mostra a figura 16, o ácido gálico pode ser titula

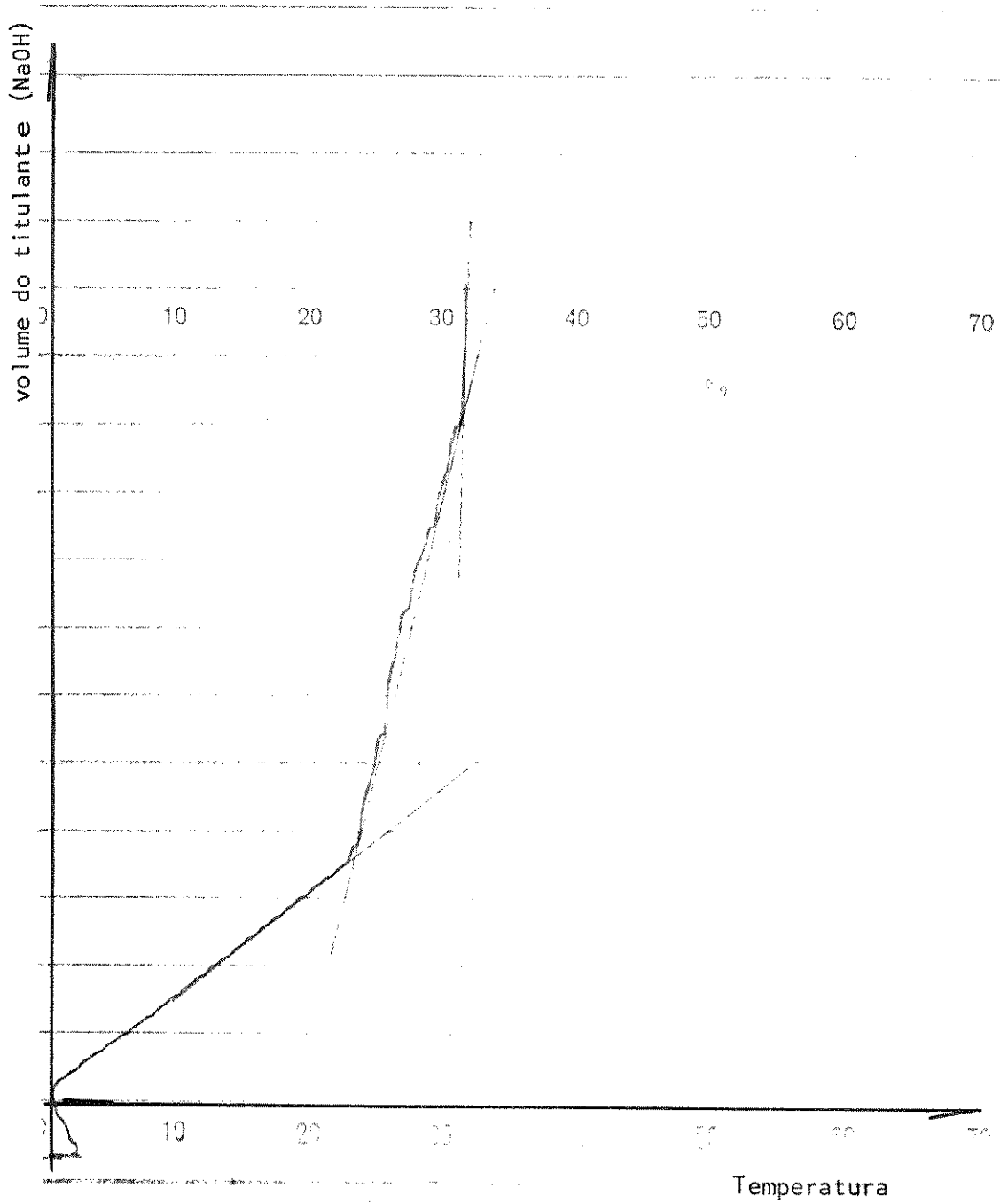
FIGURA 16

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE ÁCIDO GÁLICO 0,03 M COM NaOH
1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.



do termometricamente utilizando-se solução de hidróxido de sódio em condições igualmente utilizado nas análises de vinho.

A curva de titulação, a exemplo do que acontece com análise de amostras de vinho, apresenta dois pontos de inflexão. O primeiro pode ser atribuído ao ponto final da titulação do grupo carboxílico pertencente ao ácido gálico enquanto que o segundo corresponde ao ponto final da titulação dos grupos hidroxílicos do ácido gálico. Pode-se observar ainda que não são titulados todos os grupos hidroxílicos.

VI.5.2 TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA DE UMA MISTURA DE ÁCIDO TARTÁRICO E ÁCIDO GÁLICO

Acredita-se que uma mistura de ácido tartárico (figura 17) e ácido gálico em meio aquoso contendo 10% (v/v) de álcool, pode comparar-se à mistura de ácidos e substâncias polifenólicas encontradas nos vinhos. Titulações alcalimétricas de amostras contendo ácido gálico e ácido tartárico, foram realizadas (figura 18) e as curvas de titulação obtidas foram comparadas com as titulações das amostras de vinhos

FIGURA 17

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 40,00 ML DE ÁCIDO TARTÁRICO COM NaOH 1 N

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.

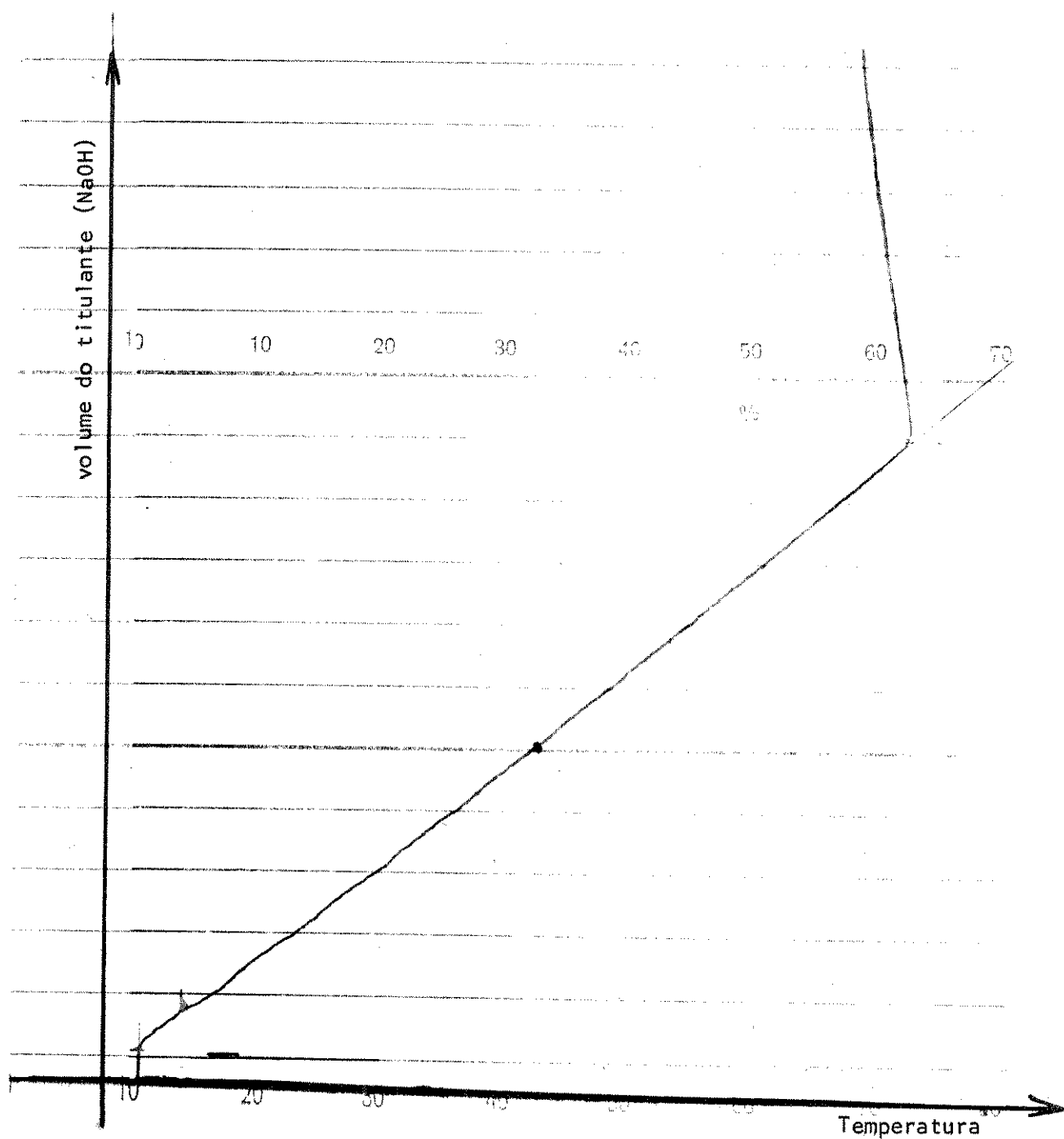
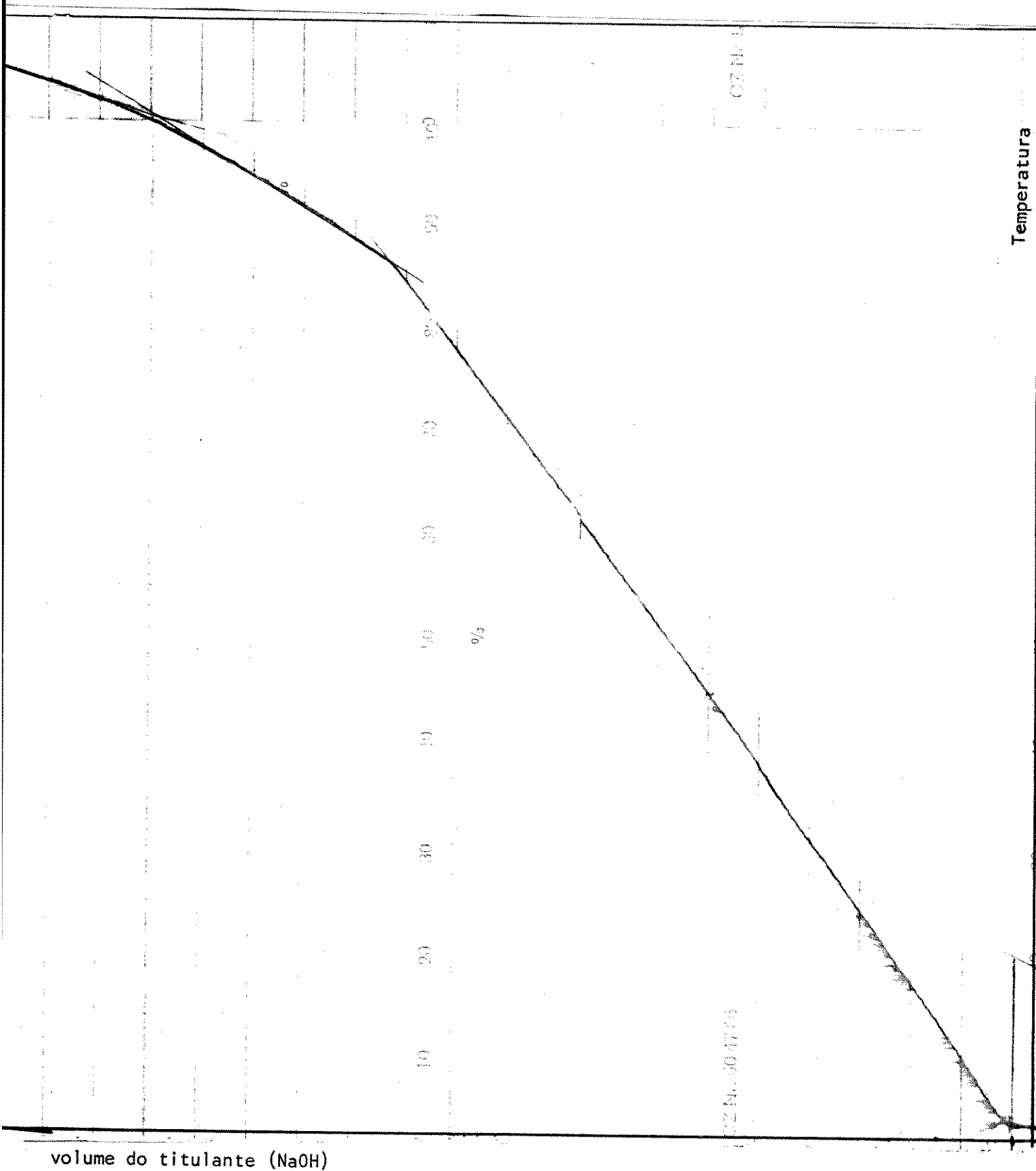


FIGURA 18

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE UMA MISTURA DE ÁCIDO TARTÁRICO E ÁCIDO -
GÁLICO COM NaOH 1 N



realizadas em condições idênticas. Pode-se observar a -
semelhança entre as curvas de titulação.

VI.5.3 TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA ALCALI MÉTRICA DE AMOSTRAS DE VINHO, CONTENDO QUANTIDADES DE FENOL PREVIAMENTE ADICIONADO

Inicialmente preparou-se uma solução de 0,05M de fenol 10% em álcool. Amostras - desta solução foram tituladas termometricamente, com hi-
dróxido de sódio como titulante. Os gráficos obtidos (figura 19) mostram uma curva de titulação bem delineada com um ponto final bem definido.

A seguir, adicionou-se - volumes definidos de solução de fenol à amostras de vi-
nho, fazendo-se a seguir as titulações com hidróxido de sódio (figura 20).

A finalidade destas expe-
riências seria comprovar que os grupos fenólicos são ti-
tulados entre o primeiro e segundo ponto de inflexão da curva.

FIGURA 19

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE SOLUÇÃO DE FENOL 0,05 M COM NaOH 1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.

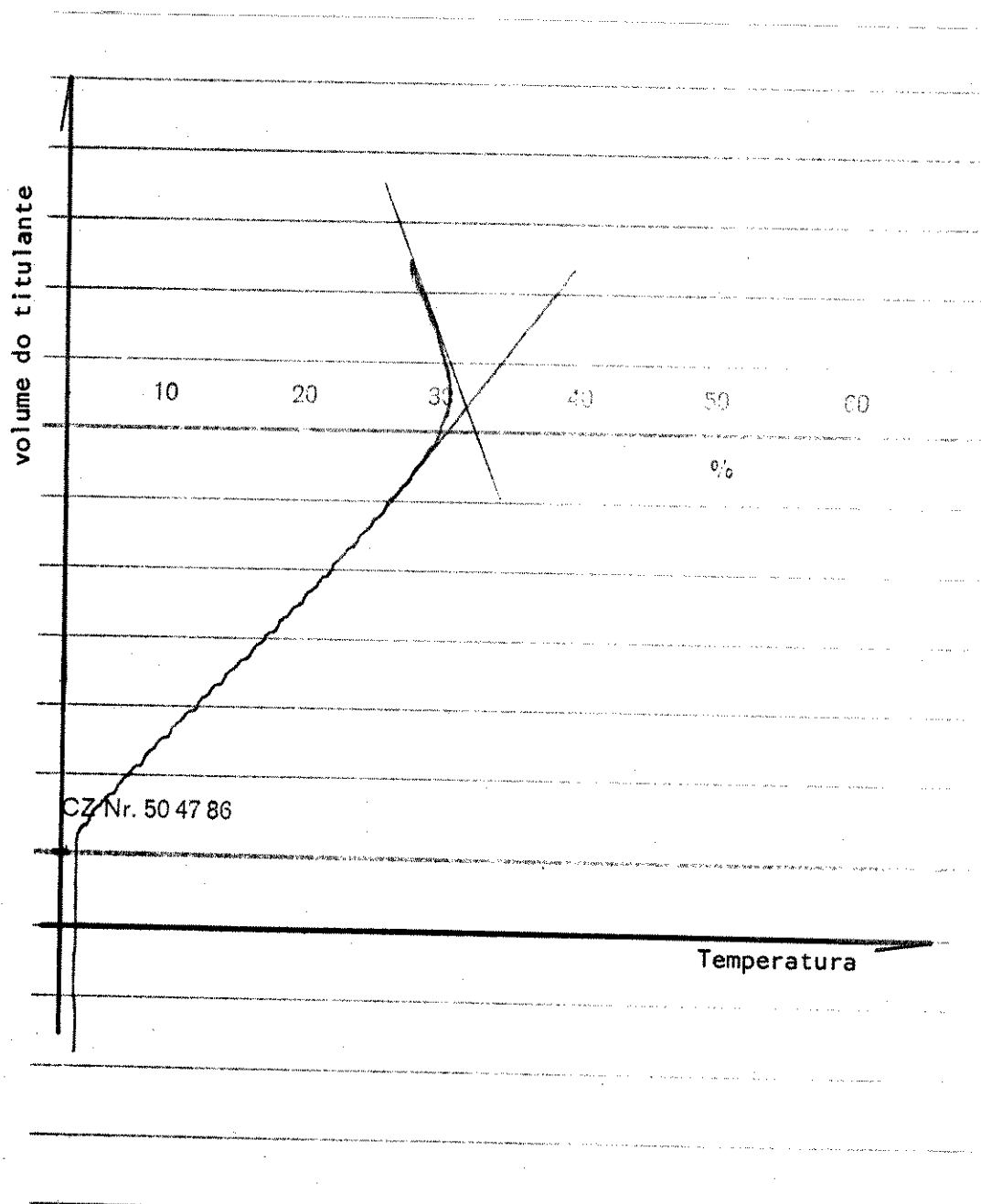


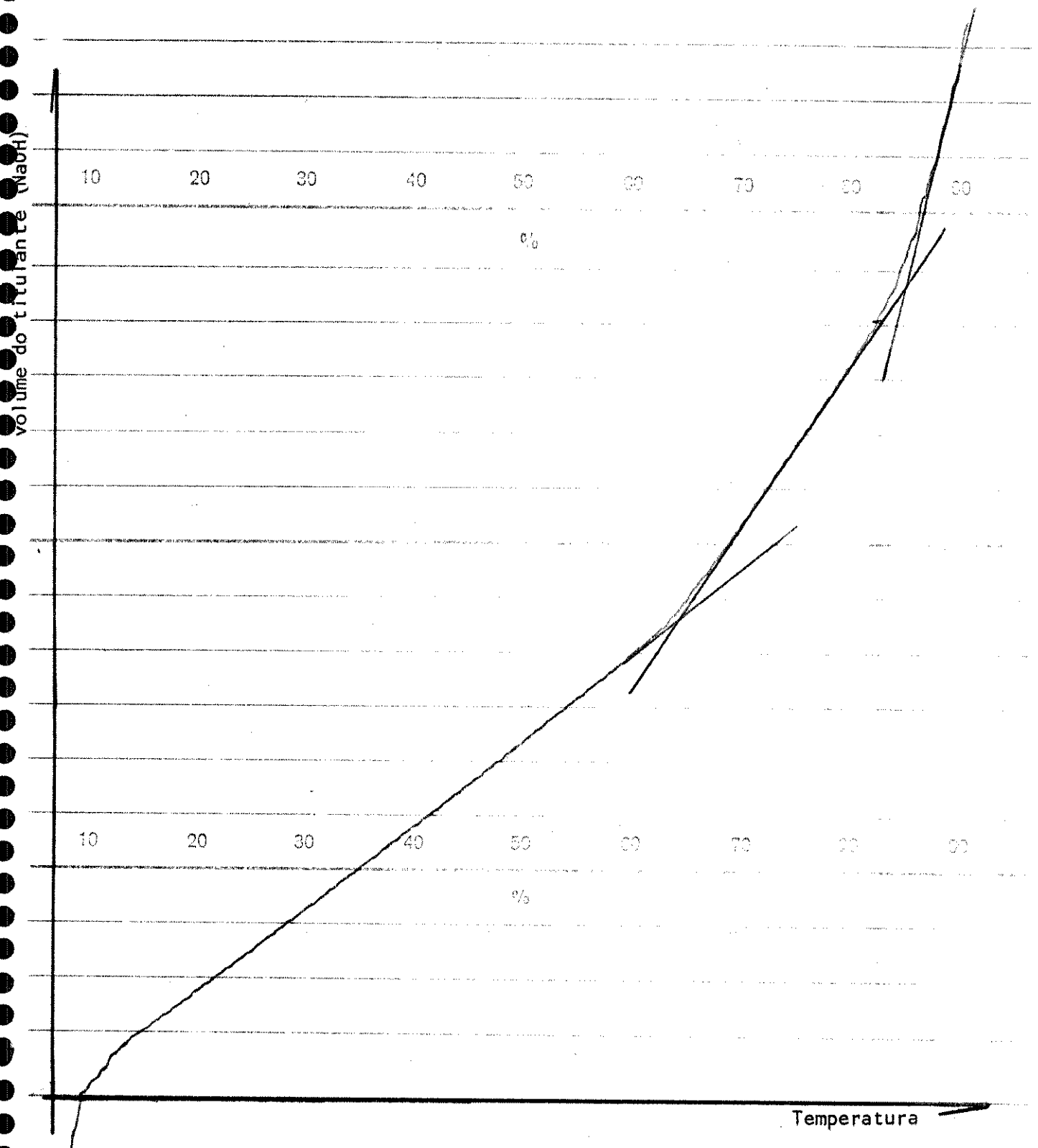
FIGURA 20

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 6) e 50,00
ML DE SOLUÇÃO DE FENOL 0,03 M COM NaOH 1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.



Quando se compara as curvas de titulações de amostras de mesmo vinho, na presença e na ausência de fenol, observa-se uma diferença na parte correspondente à neutralização dos grupos fenólicos. De fato, a titulação da amostra em que foi adicionado fenol, requer uma quantidade maior de titulante para atingir o 2º ponto de neutralização. Isso é também comprovado pelo fato de que a medida que foram adicionadas quantidades crescentes da solução de fenol ao vinho, observou-se um aumento, também crescente, da parte da curva da titulação correspondente à titulação de polifenóis.

Na tabela 4 tem-se comparativamente os valores calculados teoricamente para o deslocamento gráfico da titulação de polifenóis que era de se esperar, levando em conta as quantidades de fenol adicionados e os deslocamentos reais observados.

Os cálculos teóricos foram baseados na titulação da amostra de fenol realizada anteriormente. Como pode ser observado, há uma boa concordância entre os valores esperados e os observados.

TABELA 4 — DESLOCAMENTO NAS CURVAS DE TITULAÇÕES TERMOMETRICAS DE VINHO COM ADIÇÕES DE SOLUÇÃO DE FENOL

VOLUME DA AMOSTRA UTILIZADA (ML)	AMOSTRA DE FENOL ADICIONADA (0,5M) (ML)	DESLOCAMENTO NA CURVA DE TITULAÇÃO REFERENTE A NEUTRALIZAÇÃO DE POLIFENÓIS	DESLOCAMENTO ESPERADO NA CURVA DE TITULAÇÃO DEVIDO A ADIÇÃO DA SOLUÇÃO DE FENOL	DESLOCAMENTO TOTAL ESPERADO APÓS ADIÇÃO DE SOLUÇÃO DE FENOL	DESLOCAMENTO TOTAL ENCONTRADO APÓS ADIÇÃO DE FENOL
50,00	0,00	3,10	0,00	3,10	3,10
50,00	1,00	3,10	1,25	4,35	4,4
50,00	2,00	3,10	2,5	5,60	5,8
50,00	3,00	3,10	3,75	6,86	6,6
50,00	4,00	3,10	5,00	8,10	8,0
50,00	5,00	3,10	6,25	9,35	9,45
50,00	6,00	3,10	7,50	10,60	10,45

VI.5.4 TITULAÇÃO DE AMOSTRAS DE VINHO COM ADIÇÕES PRÉVIAS DE ÁCIDO GÁLICO

A algumas amostras de vinho, adicionou-se ácido gálico e posteriormente, titulou-se com hidróxido de sódio. Na figura 21, pode-se notar o aumento da parte da curva pertencente à titulação dos grupos fenólicos devido ao ácido gálico adicionado.

É interessante notar que também houve um aumento na parte correspondente a titulação dos grupos carboxílicos como era de se esperar.

VI.5.5 TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE VINHOS APÓS O TRATAMENTO DE CARVÃO ATIVO

O tanino, bem como outras substâncias contidas no vinho podem ser parcialmente adsorvidos mediante tratamento com carvão ativo.

O vinho pode ser tratado com carvão ativo e, posteriormente titulado termometricamente, como mostra a figura 22. Nesta titulação, nota-

FIGURA 21

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 DE VINHO (AMOSTRA 6) E 0,0933 -
GRAMAS DE ÁCIDO GÁLICO COM NaOH 1 N.

Velocidade nominal do papel = 1.0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.

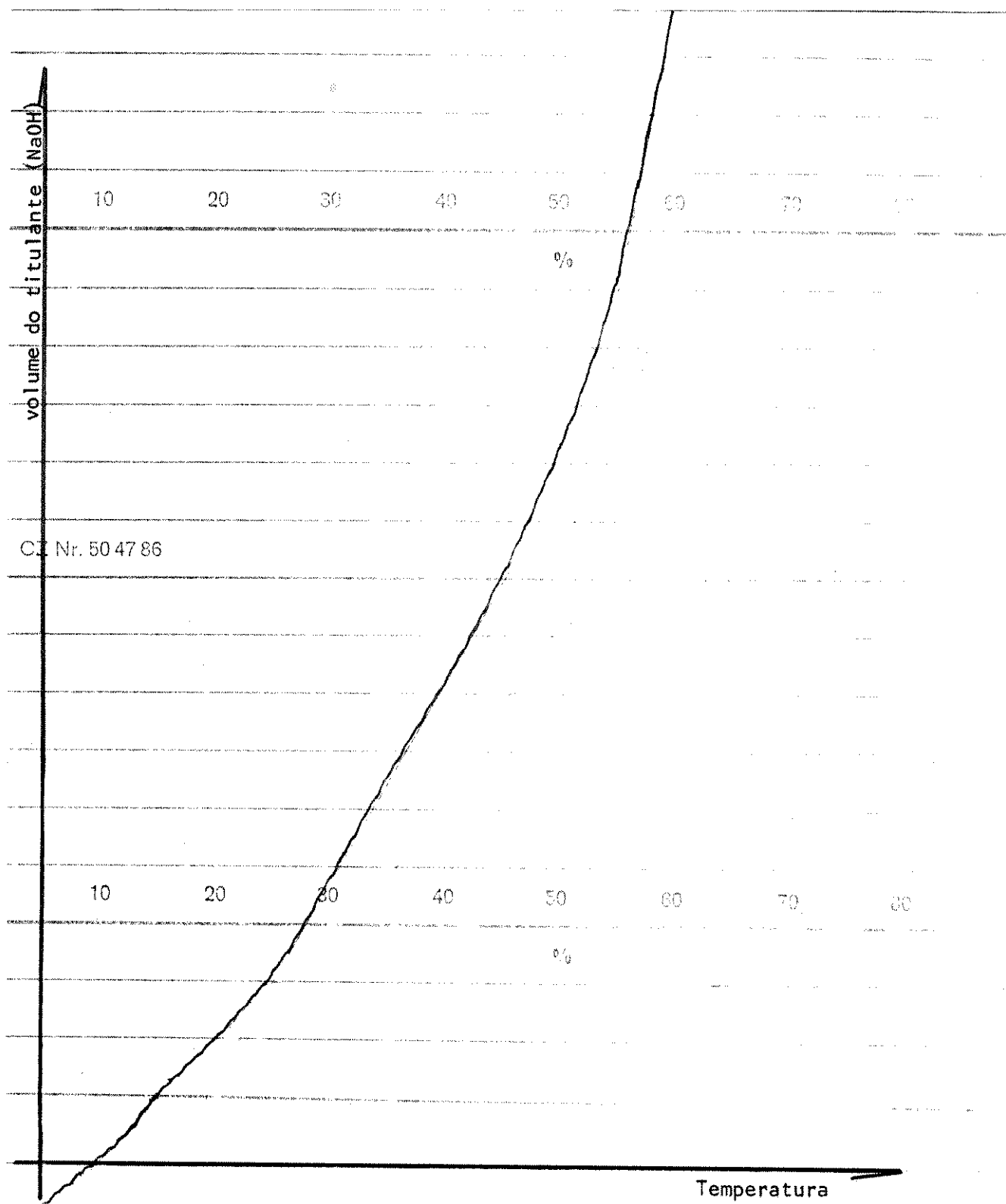


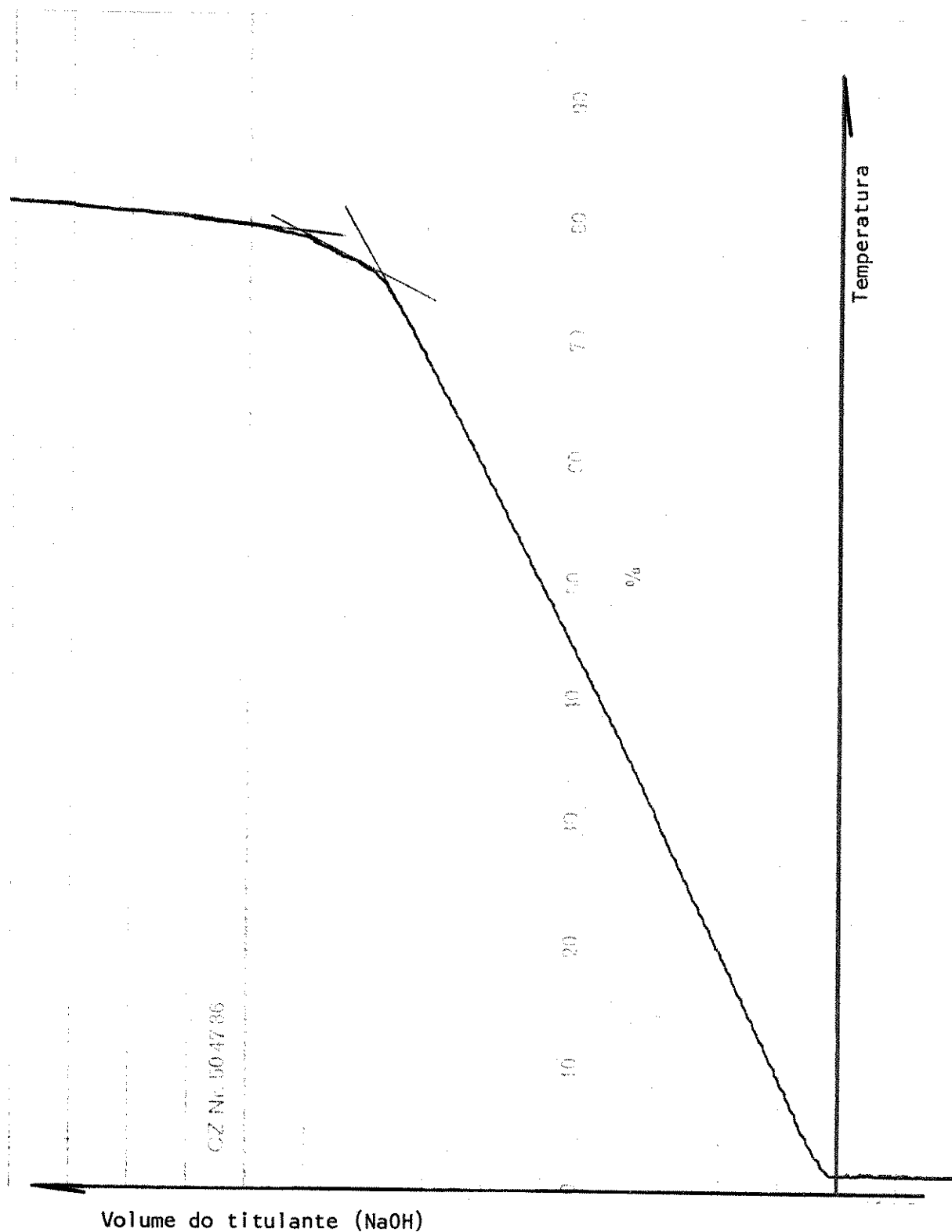
FIGURA 22

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 6) COM NaOH 1 N, APÓS TRATAMENTO COM CARVÃO ATIVO.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.



-se que a parte da curva correspondente à titulação de polifenóis é menor que na titulação da amostra original do vinho. Observa-se também, que a curva pertencente à titulação dos ácidos também é diminuída. Isto mostra - que o carvão ativo adsorve, além das substâncias tanícas, parte das substâncias responsáveis pela acidez total do vinho.

Por outro lado, a titulação do carvão ativo utilizado no tratamento do vinho (figura 23) está de acordo com o que foi mencionado. Observa-se uma curva de titulação também com dois pontos de inflexão, ou seja, a titulação dos ácidos e dos polifenóis adsorvidos pelo carvão ativo.

De acordo com os experimentos aqui descritos, acredita-se que fica evidenciada a possibilidade de determinar-se as substâncias polifenólicas, mediante uma titulação termométrica alcalimétrica. Outras observações que reafirmam este fato, serão relatadas posteriormente.

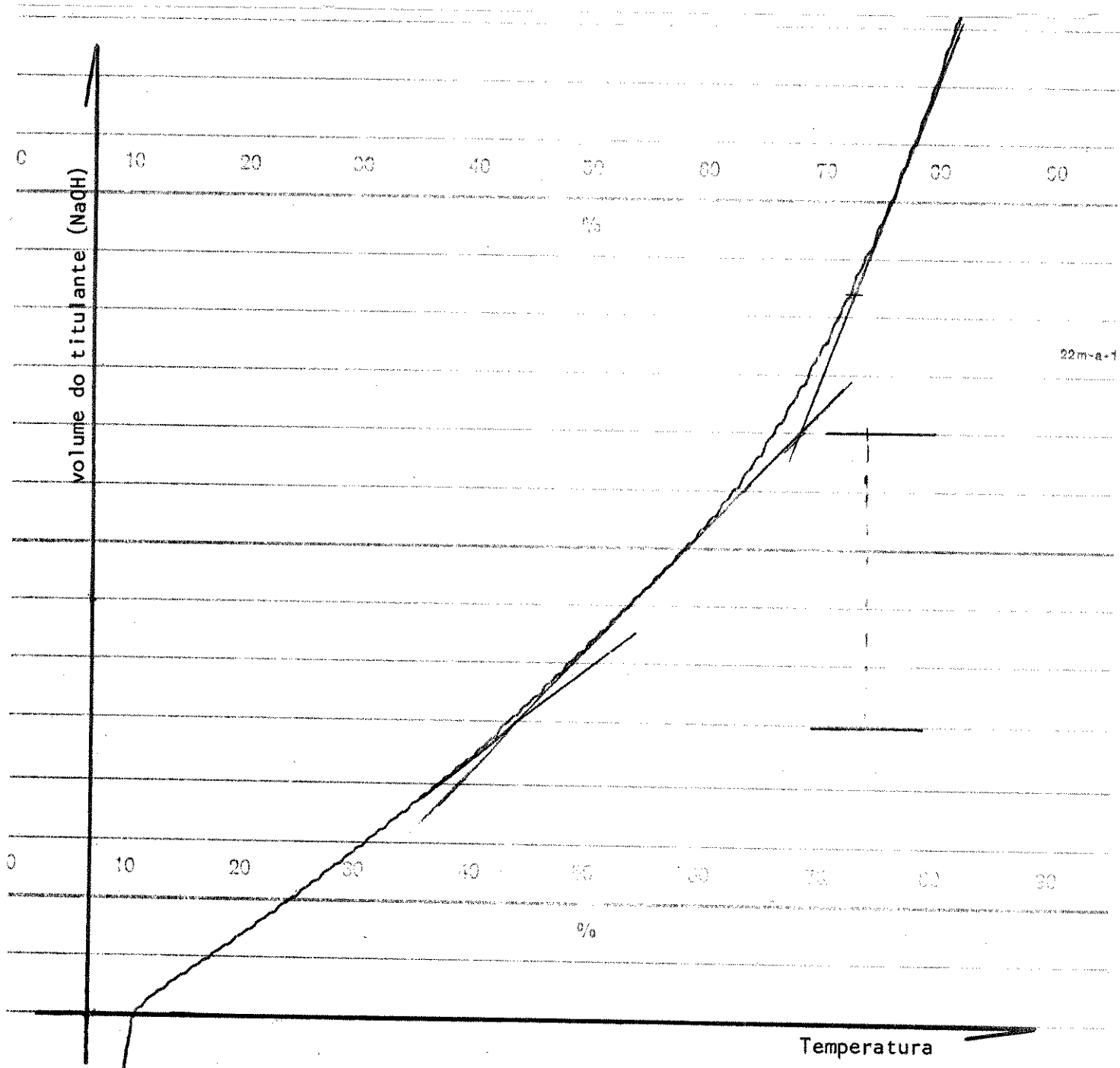
FIGURA 23

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DO CARVÃO ATIVO UTILIZADO NO TRATAMENTO DE 150,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 6), COM NaOH 1 N.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.



VI.6 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TERMOMÉ - TRICAMENTE

Mediante os argumentos apresen-
tados anteriormente, concluiu-se que através das titula-
ções termométricas das amostras de vinho, pode-se deter-
minar o conteúdo de substâncias polifenólicas.

Isto nos levou a propor o uso
da titulação termométrica alcalimétrica para a determina-
ção de polifenóis, cujos resultados passamos a discutir:

Utilizando-se os gráficos das
titulações termométricas realizadas nas determinações da
acidez total, calculou-se o número de equivalentes de
NaOH necessários para a neutralização dos polifenóis con-
tidos nas amostras.

Alguns dos termogramas apresen-
tados mostram como foram obtidos os pontos finais da ti-
tulação para a acidez total como para polifenóis.

Com estas determinações calcu-
lou-se o que chamamos de "Índice termométrico para poli-
fenóis em vinho", o que vem a ser o número de equivalen-
tes de NaOH necessários para a neutralização de 1,0 li-

tro da amostra.

Os resultados são mostrados na tabela 5 e correspondem a média entre as 3 determinações realizadas para cada amostra.

Algumas titulações apresentam um termograma bastante desfavorável para a detecção do ponto final. Este problema foi solucionado utilizando-se o titulante em temperatura mais baixa que o titulado. Observou-se que uma diferença de 1 a 2°C aproximadamente, fornece bons resultados em relação ao ponto final. Na figura 24 encontra-se uma titulação onde amostra e titulante estão em temperaturas diferentes. Esta técnica foi utilizada sempre que a determinação do ponto final da titulação mostrou-se de difícil localização.

VI.7 DESCRIÇÃO DE ALGUNS MÉTODOS USADOS - NA DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS NO V NHO

VI.7.1 ÍNDICE DE PERMANGANATO

Entre os métodos existen

TABELA 5

ÍNDICE TERMOMÉTRICO DE POLIFENÓIS EM VINHO

AMOSTRA	Miliequivalentes de NaOH por litro de Amostra
1	31,77
2	45,50
3	30,47
4	34,74
5	29,17
6	27,85
7	31,01
8	39,17
9	57,45
10	27,89
11	23,50
12	26,11
13	60,50
14	26,98
15	28,72
16	33,95
17	31,34

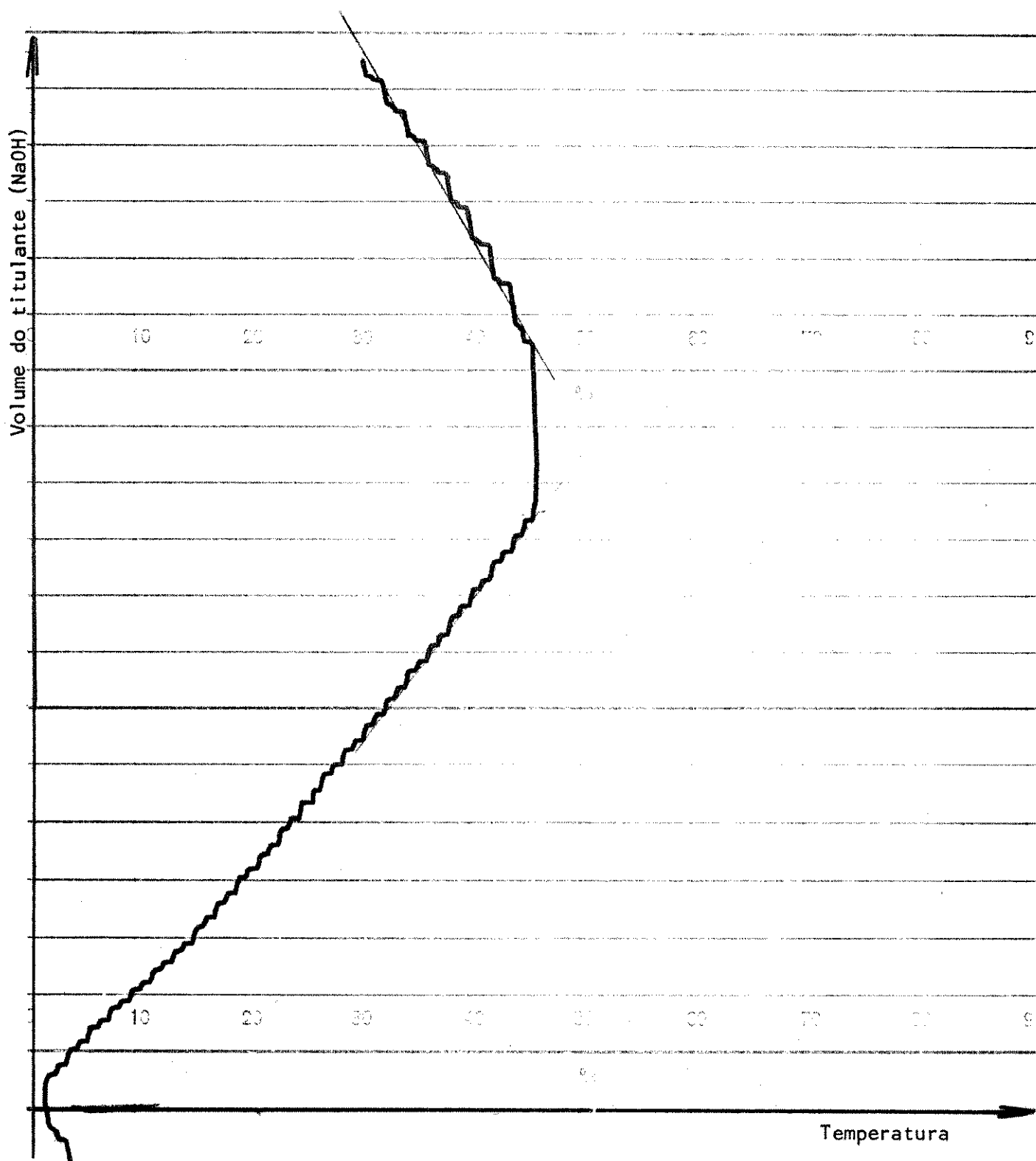
FIGURA 24

TERMOGRAMA DA TITULAÇÃO DE 50,00 ML DE VINHO (AMOSTRA 12) COM NaOH 1 N, UTILIZANDO-SE O TITULANTE EM TEMPERATURA INFERIOR AO TITULADO.

Velocidade nominal do papel = 1,0 cm/min.

Sensibilidade = 5 mV

Vazão nominal da seringa = 0,4 ml/min.



tes, este é o rotineiramente usado na determinação do -
conteúdo de polifenóis em vinhos.

Como já mencionado, o índice de permanganato é um método empírico e baseia-se no poder redutor das substâncias fenólicas em relação ao -
permanganato. Trata-se de uma dosagem do conteúdo total de polifenóis e suas condições devem ser bem definidas -
para obter-se resultados reprodutíveis.

Foram analisadas várias amostras, realizando-se 3 determinações para cada uma de -
las; procedeu-se da seguinte maneira:

Preparou-se uma solução denominada "A", contendo 50,0ml de solução do indicador "indigo" a 3% e 50,0ml de solução de ácido sulfúrico a -
proximadamente 1N e diluindo-se a 1 litro com água desti -
lada. A amostra foi preparada tomando-se 50,0ml da solu -
ção A e adicionando-se 2,00ml da amostra do vinho. Titu -
lou-se com KMnO_4 padronizado 1N.

É necessário fazer-se, -
paralelamente, uma prova em branco utilizando-se 50,0ml do indicador (Solução A) e 2,00ml de ácido tartárico -
0,5% (10% em álcool).

Por ser este método o -
mais usado rotineiramente, procuramos aplicá-lo às vári-
as amostras de vinho que foram analisadas termometrica -
mente. Visamos com isso, comparar os resultados obtidos
pelos métodos termométricos propostos, com os resultados
obtidos por esse método já aprovado pelos órgãos ofici-
ais que controlam as indústrias de vinhos no Brasil e em
vários outros países.

Os resultados obtidos ex -
pressos em meq de KMnO_4 gastos na titulação de 1 litro
de vinho, são mostrados na tabela 6.

VI.7.2 UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS NA - PRECIPITAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS TÂNICAS DO VINHO

Substâncias tânicas for -
mam com proteínas complexos pouco solúveis em meio áci-
do. Esta propriedade é utilizada na determinação do con -
teúdo tânico em vegetais ⁽⁴⁰⁾. O teor de tanino pode -
ser determinado por adição de solução padrão de proteí -
na; isolando-se o complexo proteína-tanino precipitado,
dissolvendo-o em solução alcalina e medindo-se a absor -
vância a 520nm após adição de cloreto férrico. O comple -

TABELA 6

ÍNDICE DE PERMANGANATO PARA AVALIAÇÃO DE POLIFENÓIS EM VINHO

AMOSTRA	MILIEQUIVALENTES DE KMnO_4 POR LITRO DE AMOSTRA
1	34,64
2	50,55
3	33,94
4	42,43
5	31,40
6	30,66
7	31,57
8	44,16
9	52,17
10	30,71
11	23,10
12	23,80
13	58,27
14	29,66
15	24,15
16	39,90
17	6,30

o tanino-proteína-cloreto férrico apresenta uma banda de absorção na região visível do espectro, com máximo em 510nm.

Procurou-se adaptar o método da precipitação por proteínas na determinação de tanino de vinhos, procedendo-se da seguinte maneira:

As amostras de 1,00ml de vinho foram adicionados 2,00ml de solução de proteína (ovoalbumina 1,0 mg/ml) em tubo de centrífuga de 20 ml. As soluções foram misturadas e deixadas em repouso por 15 minutos e posteriormente centrifugadas por 30 minutos (3000 rpm). O sobrenadante foi descartado e o resíduo lavado com água.

O precipitado foi dissolvido em 10,00ml de solução de Dodecil sulfato de sódio - Trietanolamina (1% de SDS e 5% V/V trietanolamina em água destilada).

Tomou-se 2,50ml dessa solução em balão volumétrico de 25,0ml, adicionou-se 1,00 ml de solução de cloreto férrico 0,1M, completou-se o volume com água destilada.

Após 15 minutos, mediu-se a absorvância da solução em 510 nm em um espectrofotômetro (Zeiss PMQ II).

Foram realizadas dez de terminações de cada amostra utilizando-se como branco u ma solução contendo SDS.Trietanolamina e cloreto férrico nas mesmas condições de preparação da amostra.

Para obtenção da curva padrão (figura 25) utilizou-se ácido-tânico pois o com - plexo ácido-tânico-proteína e cloreto férrico apresenta absorvância máxima também em 510 nm, como mostram os es pectros da fig. 26.

Os resultados de algumas análises de vinhos podem ser observados na tabela 7. Es ses valores foram obtidos fazendo-se a média entre as 3 melhores determinações de cada amostra.

VI.7.3 DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉ - TRICA DE TANINOS NA REGIÃO DO ULTRA-VIOLETA

Soluções de taninos de -

FIGURA 25

CURVA PADRÃO UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS TÂNICAS DO VINHO, ATRAVÉS DO MÉTODO DA PRECIPITAÇÃO COM PROTEÍNAS.

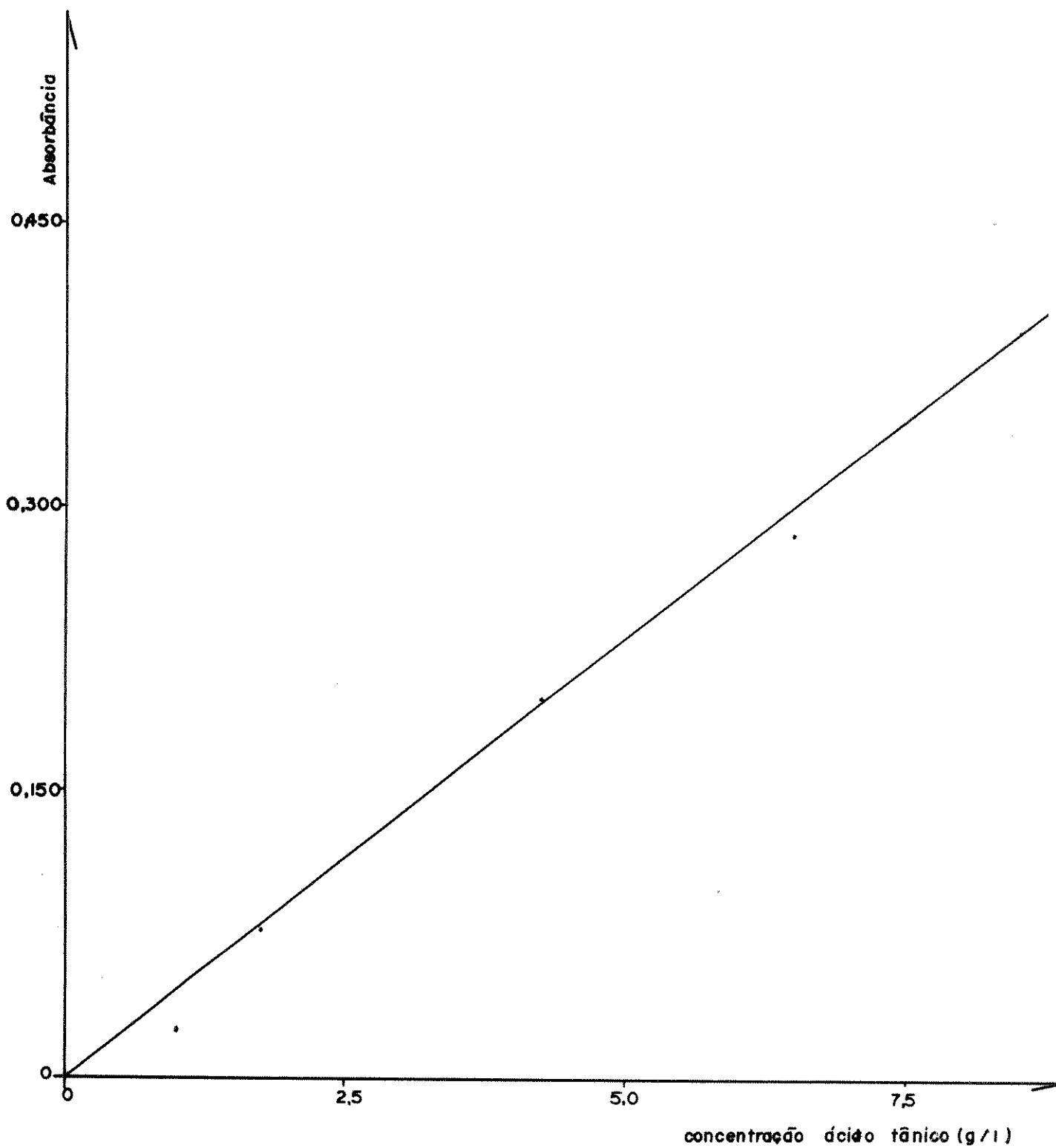


FIGURA 27.

ESPECTROGRAMA NA REGIÃO ULTRA-VIOLETA:

- I. Tanino extraído de vinho
- II. Tanino extraído de chá
- III. Ácido tânico

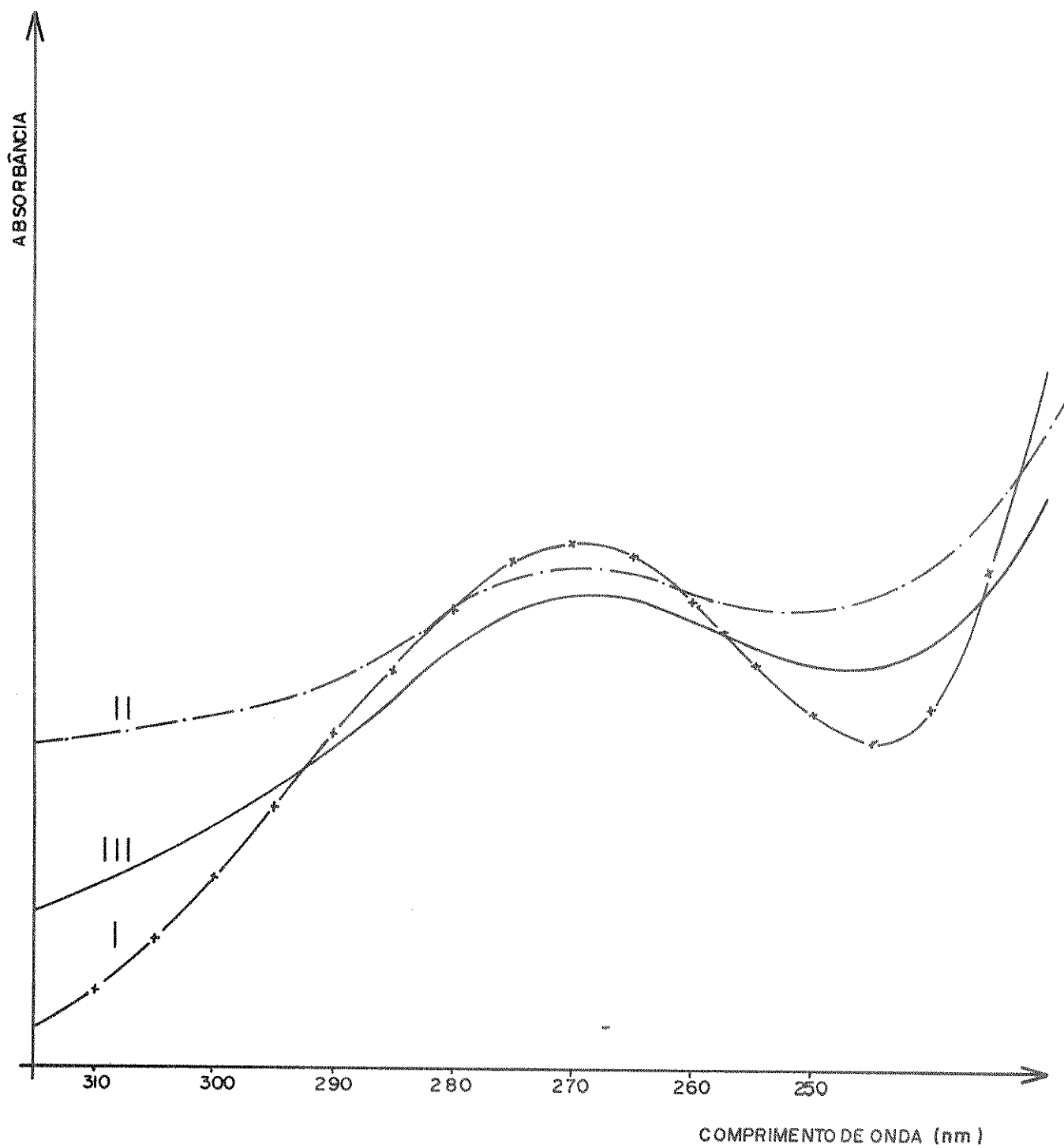


TABELA 7

DETERMINAÇÃO DE TANINOS PELO MÉTODO DA
PRECIPITAÇÃO POR PROTEÍNAS

AMOSTRA	SUBSTÂNCIAS POLIFENÓLICAS (g/l)
2	1,45
12	1,50
11	1,36
14	1,30
16	1,35
15	1,30

vinho apresentam uma banda de absorção na região do ultra-violeta com máximo em 275 nm.

Esta banda de absorção foi proposta para ser usada na determinação de taninos do vinho (53). Tentamos aqui testar este método cujo procedimento descreveremos a seguir.

VI.7.3.1 PREPARAÇÃO DA CURVA

PADRÃO

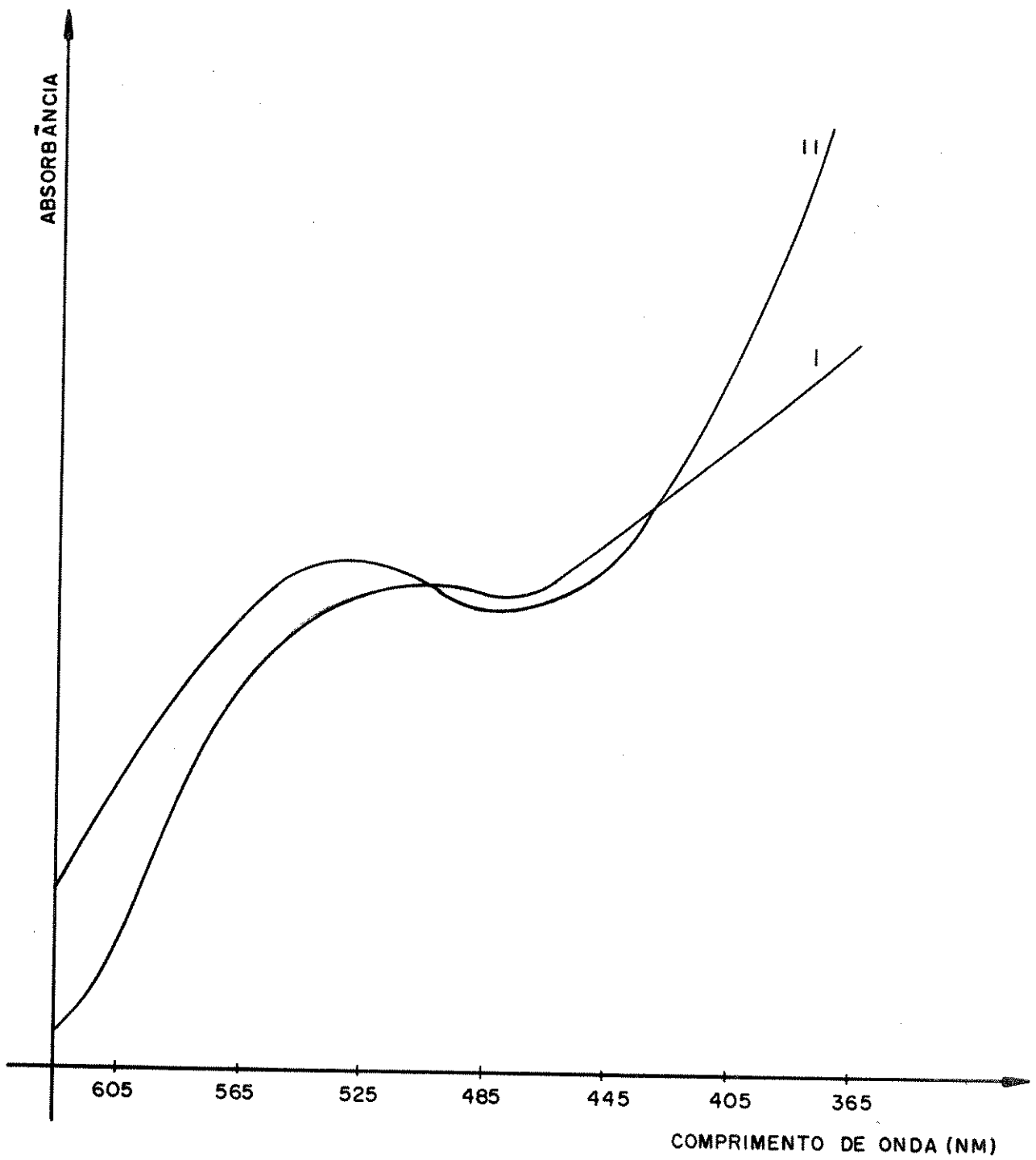
Comumente nas análises colorimétricas utiliza-se como substância padrão o ácido tânico.

Neste caso utilizou-se como padrão o tanino extraído do chá. Isto deveu-se ao fato de o tanino do chá apresentar grande semelhança com o tanino do vinho, pois os dois são constituídos de uma mistura de compostos bastante semelhantes. A figura 27 apresenta os espectros de absorção na região ultra-violeta das substâncias tânicas extraídas do chá, substâncias tânicas extraídas do vinho e também do ácido tânico puro.

FIGURA 26

ESPECTROGRAMA NA REGIÃO VISÍVEL

- I. Complexo tânico extraído de vinho - proteína - cloreto fêrrico
- II. Complexo ácido tânico - proteína - cloreto fêrrico



Ao contrário do tanino do vinho, o tanino contido no chá apresenta facilidade quanto à sua extração. A extração do tanino do chá foi feita de acordo com o procedimento que descreveremos a seguir.

Cerca de 150g de chá preto, foram tratados com metanol fervente repetidas vezes.

O extrato foi concentrado em evaporador rotatório. Ao concentrado (cerca de 200 ml) adicionou-se clorofórmio até a precipitação total do material tânico. O precipitado, constituído de tanino bastante impuro, foi recolhido em funil de Gooch, lavado repetidamente com clorofórmio e secado sob vácuo.

O resíduo obtido foi dissolvido em água destilada e acidificado a pH 2 com HCl 1N. Esta solução foi tratada com acetado de etila para extração do tanino.

O tanino obtido após evaporação do solvente, foi purificado por dissolução em metanol e reprecipitação com clorofórmio.

Com o material ob
tido, construiu-se a curva padrão apresentada na figura
28.

VI.7.3.2 PREPARAÇÃO DA AMOS - TRA

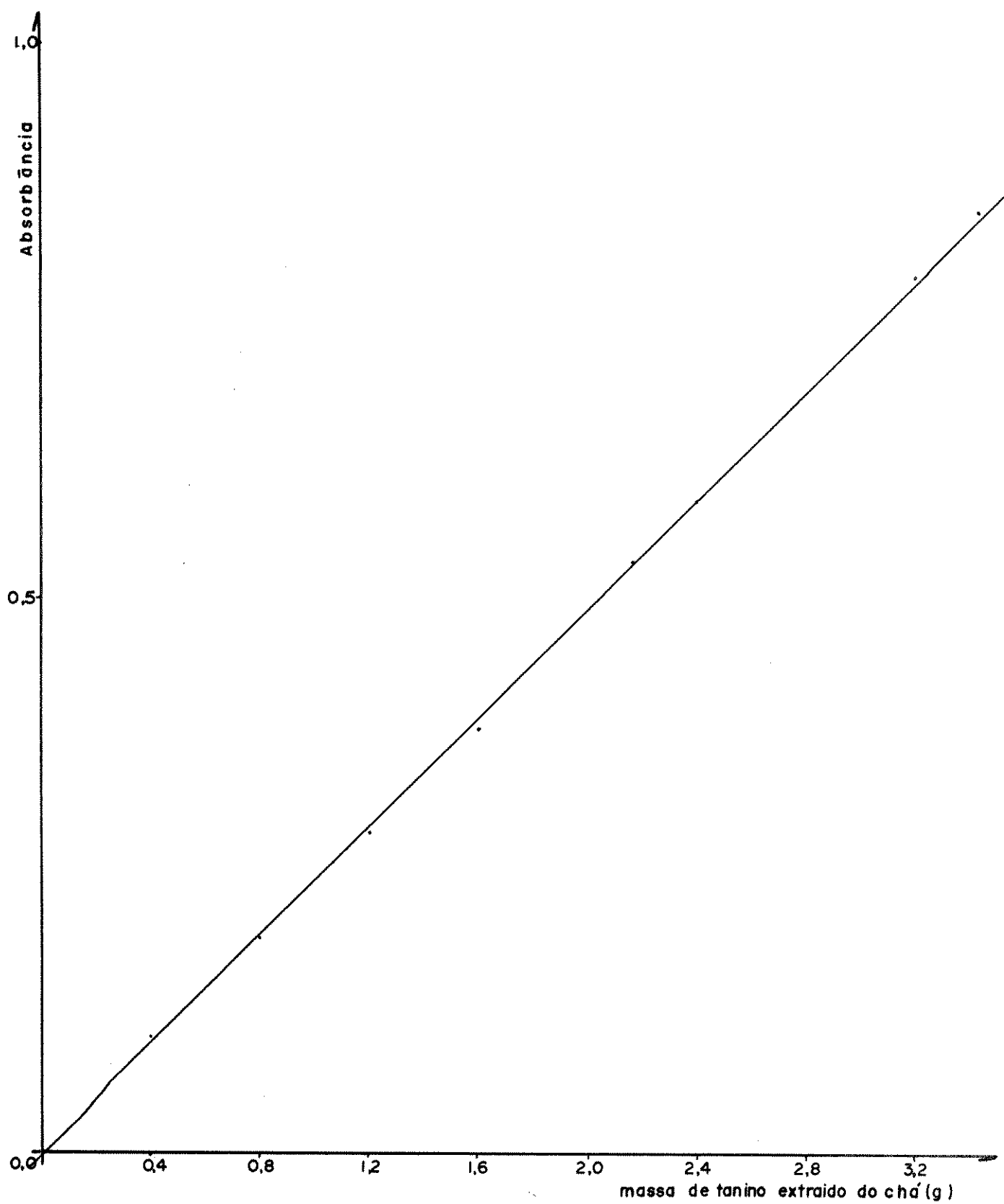
5,00 ml de vinho
foram acidificados a pH 2 com HCl 1N e diluídos a 100,00
ml com água destilada em um balão volumétrico.

A 5,00 ml desta
solução foram adicionados 10 a 15 ml de acetato de etila
agitando-se vigorosamente por 5 ou 6 vezes. Separou-se
a fase orgânica e repetiu-se a extração por 7 a 8 vezes.
O extrato foi reunido e desidratado com sulfato de sódio
anidro e evaporado até a secura.

O resíduo anidro
obtido após evaporação de acetato de etila foi aquecido
a 80°C durante 30 minutos para eliminar traços de ácido
acético e de acetato de etila que interferem na leitura
espectrofotométrica ⁽⁵⁴⁾ Dissolveu-se o resíduo em me
tanol, transferindo-se para um balão volumétrico de 25,00
ml contendo 1,25 ml de ácido clorídrico 1N e diluiu-se a

FIGURA 28

CURVA PADRÃO UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS TÂNICAS DO VINHO, ATRAVÉS DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO ULTRA-VIOLETA.



té a marca com metanol. A absorbância desta solução foi medida em um espectrofotômetro (Modelo Zeiss PMQ II) em 275 nm.

Paralalmente efetuou-se uma prova em branco com uma solução contendo - 1,25 ml de ácido clorídrico 1 N e 22,75 ml de metanol.

O teor de tanino foi obtido através do uso da curva padrão preparada anteriormente. Os resultados obtidos nas análises são mostrados na tabela 8.

VI.8 TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA DE TANINOS EXTRAÍDOS DO CHÁ E DO VINHO

Foram realizados estudos envolvendo o uso da titulação termométrica catalítica num meio constituído de uma mistura dos solventes dimetilformamida e acrilonitrila usando-se solução de hidróxido de sódio em isopropanol como titulante.

Taninos extraídos do chá e do vinho, titulados utilizando este sistema, mostraram curvas de titulação com pontos finais bem definidos, utili-

TABELA 8

DETERMINAÇÃO DE TANINOS PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

AMOSTRA	MASSA DAS SUBSTÂNCIAS POLIFENÓLICAS (Taninos) g/l
1	2,08
3	1,91
7	2,10
9	2,35
10	1,92
11	1,90
12	1,88
13	2,45
14	1,85
15	2,09
16	1,90
17	1,84

zando acrilonitrila como indicador catalítico. Nas figuras 29 e 30 são mostradas as curvas de titulações de taninos do chá e do vinho.

Pode-se observar uma concordância entre o número de equivalentes de KOH necessários para neutralização de quantidade iguais de tanino extraído do chá e do vinho. Isto mostra outra semelhança entre os dois compostos, em adição à já observada entre seus espectros na região do ultra-violeta que foi utilizada para fins analíticos.

Utilizando-se os resultados destas titulações, calculou-se o Equivalente-grama para tanino extraído do chá e do vinho, valores obtidos estão na tabela 9.

Ácido tânico e ácido gálico também foram titulados utilizando o mesmo sistema de solvente e indicador catalítico e comprovaram a possibilidade de determinação do conteúdo ácido através deste método.

Curvas de titulação de ácido tânico e ácido gálico são mostradas respectivamente nas figuras 31 e 32.

FIGURA 29

TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

0,034 g de tanino extraído do chá em DMF, titulado com KOH em isopropanol.

Sensibilidade = 100mV

Relação titulante (KOH)/cm do papel do registrador = 0,0869 meq/cm

Indicador Catalítico = Acrilonitrila

FIGURA 29

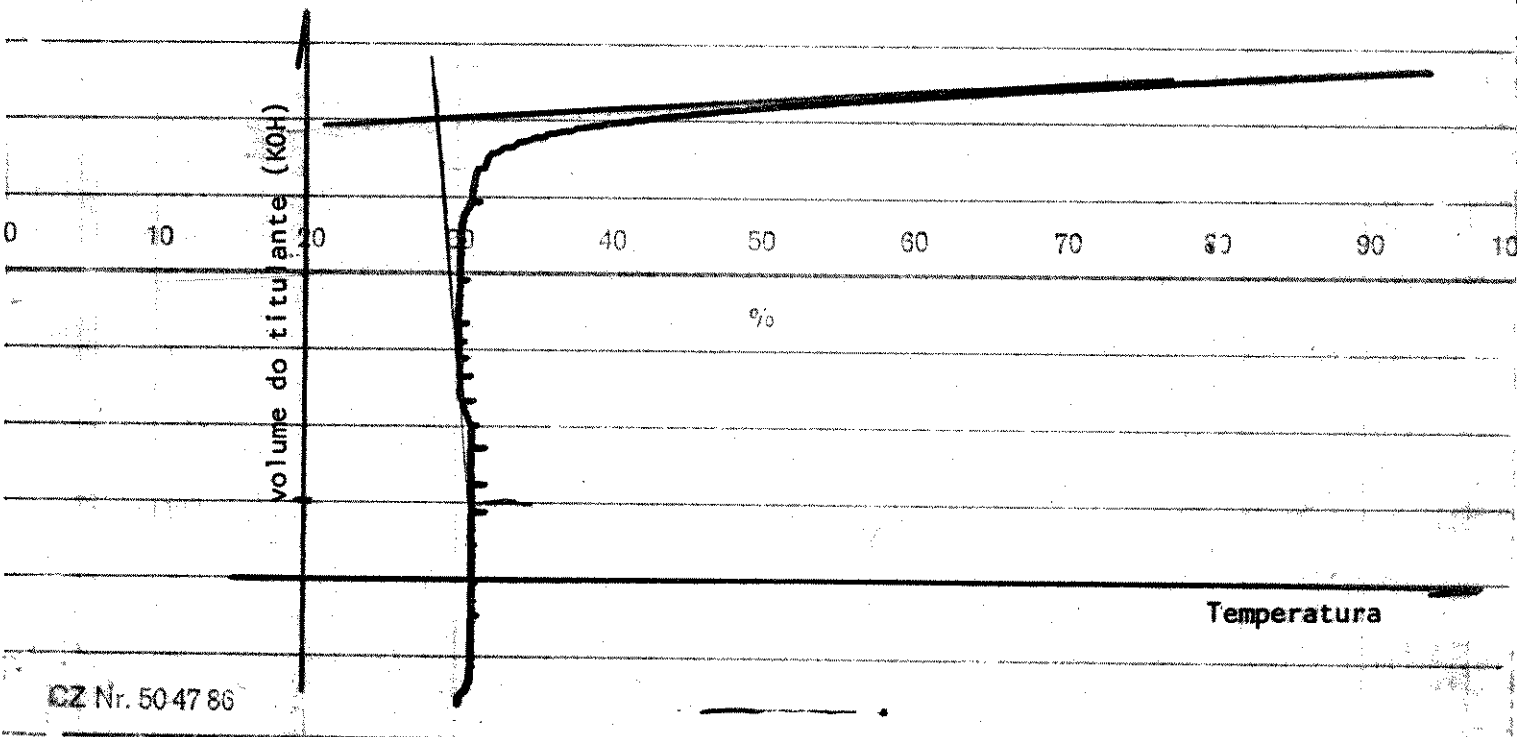
TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

0,034 g de tanino extraído do chá em DMF, titulado com KOH em iso propanol.

Sensibilidade = 100 mV

Relação titulante (KOH)/cm do papel do registrador = 0,0869 meq/cm

Indicador Catalítico = Acrilonitrila



CZ Nr. 50-47 86

FIGURA 30

TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

0,0190 g de tanino extraído do vinho em DMF, titulado com KOH em i
sopropanol.

Sensibilidade = 100 mV

Relação titulante (KOH)/cm do papel do registrador = 0,0869 meq/cm

Indicador Catalítico = Acrilonitrila

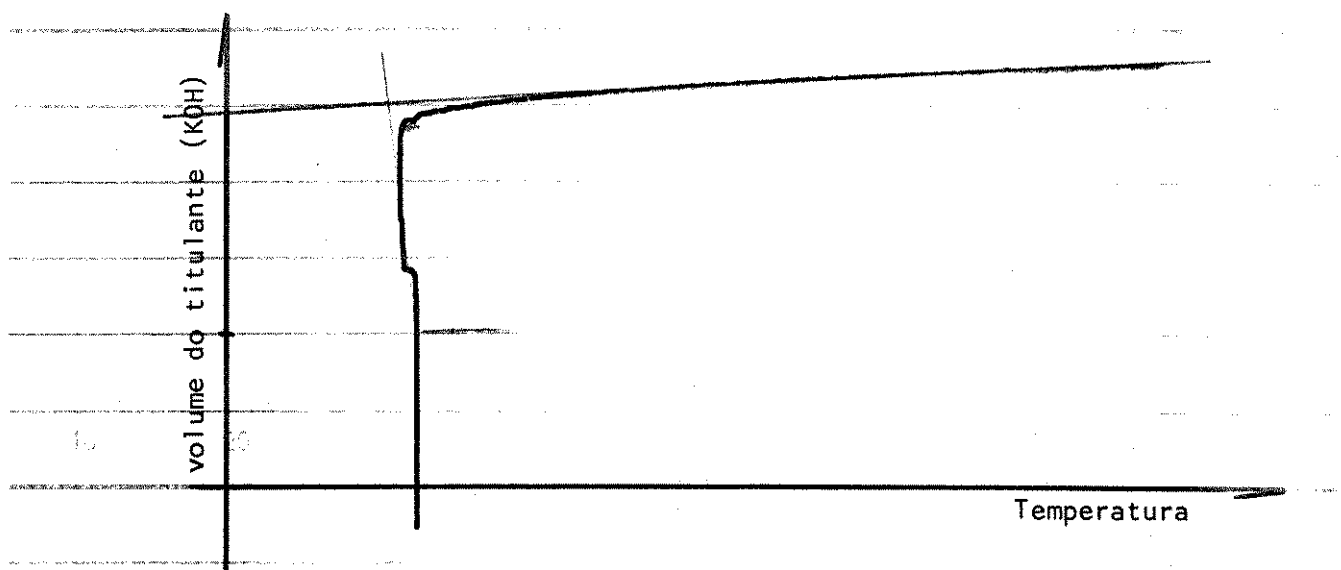


TABELA 9

DETERMINAÇÃO DO EQUIVALENTE GRAMA DE SUBSTÂNCIAS TÂNICAS EXTRAÍDAS DE CHÁ E VINHO POR TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

a. Titulação de tanino extraído de chá:

Massa de tanino utilizada: 0,034 g

Solvente utilizado:

DMF = 1,00 ml

Indicador catalítico:

Acrilonitrila = 4 ml

Titulante:

Hidróxido de potássio em Isopropanol: 0,0869 equivalentes/cm

Deslocamento observado na curva de titulação:

5,0 cm (Fig. 29)

Deslocamento observado na curva de Titulação do branco:

0,5 cm

Equivalente grama encontrado = 86,85 g

b. Titulação de tanino extraído do vinho:

Massa de tanino utilizada: 0,0190 g

Solvente utilizado:

DMF: 1,00 ml

Indicador catalítico:

DMF: 1,00 ml

Titulante:

Hidróxido de potássio em Isopropanol: 0,0869 equivalentes/cm

Deslocamento observado na curva de Titulação:

3,0 cm (Fig. 30)

Deslocamento observado na curva de Titulação do branco:

0,5 cm

Equivalente grama encontrado = 87,36 g

FIGURA 31

TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

0,0616 g de ácido tânico em DMF, titulado com KOH em isopropanol.

Sensibilidade = 100 mV

Relação titulante (KOH)/cm do papel do registrador = 0,0869 meq/cm

Indicador Catalítico = Acrilonitrila

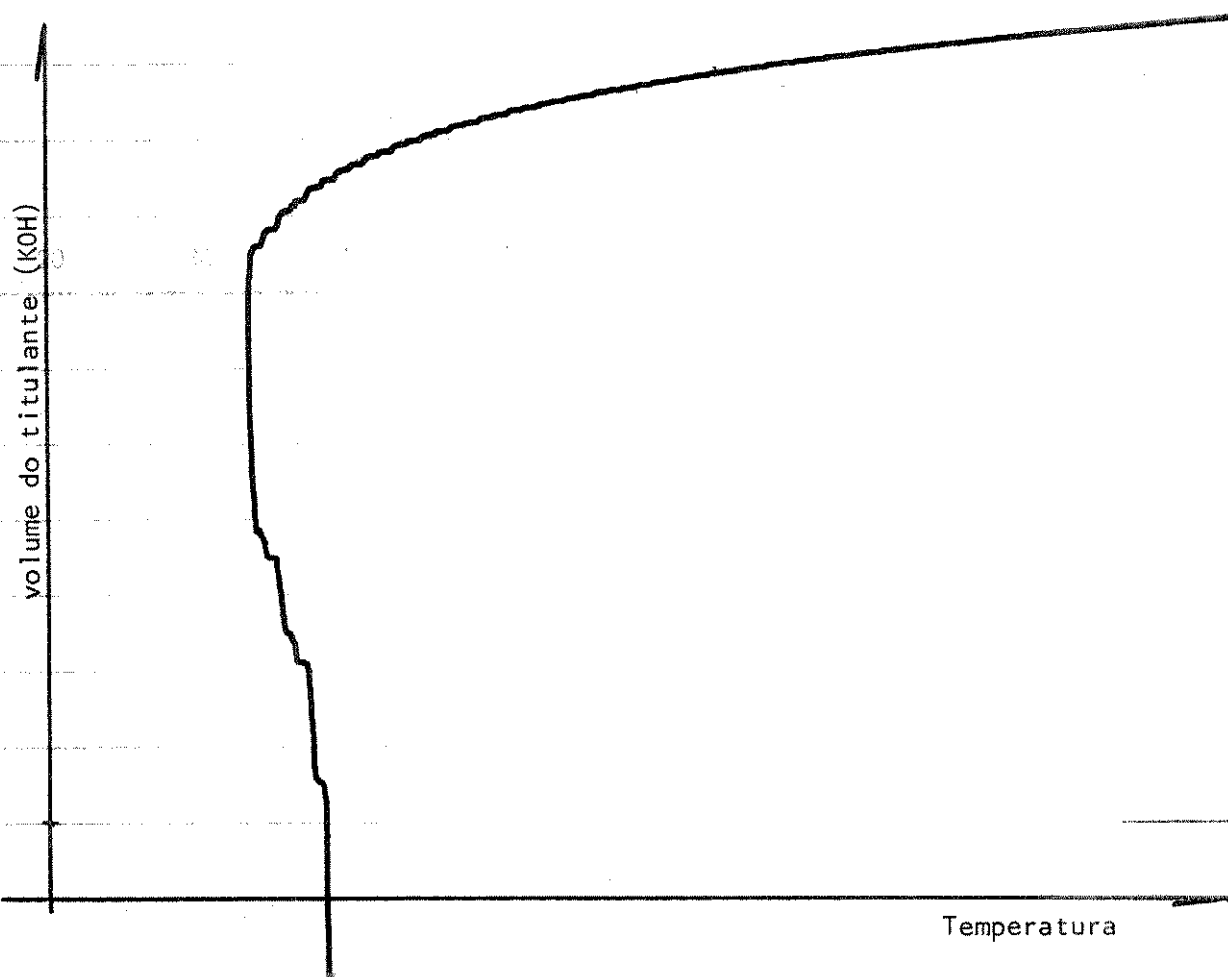


FIGURA 32

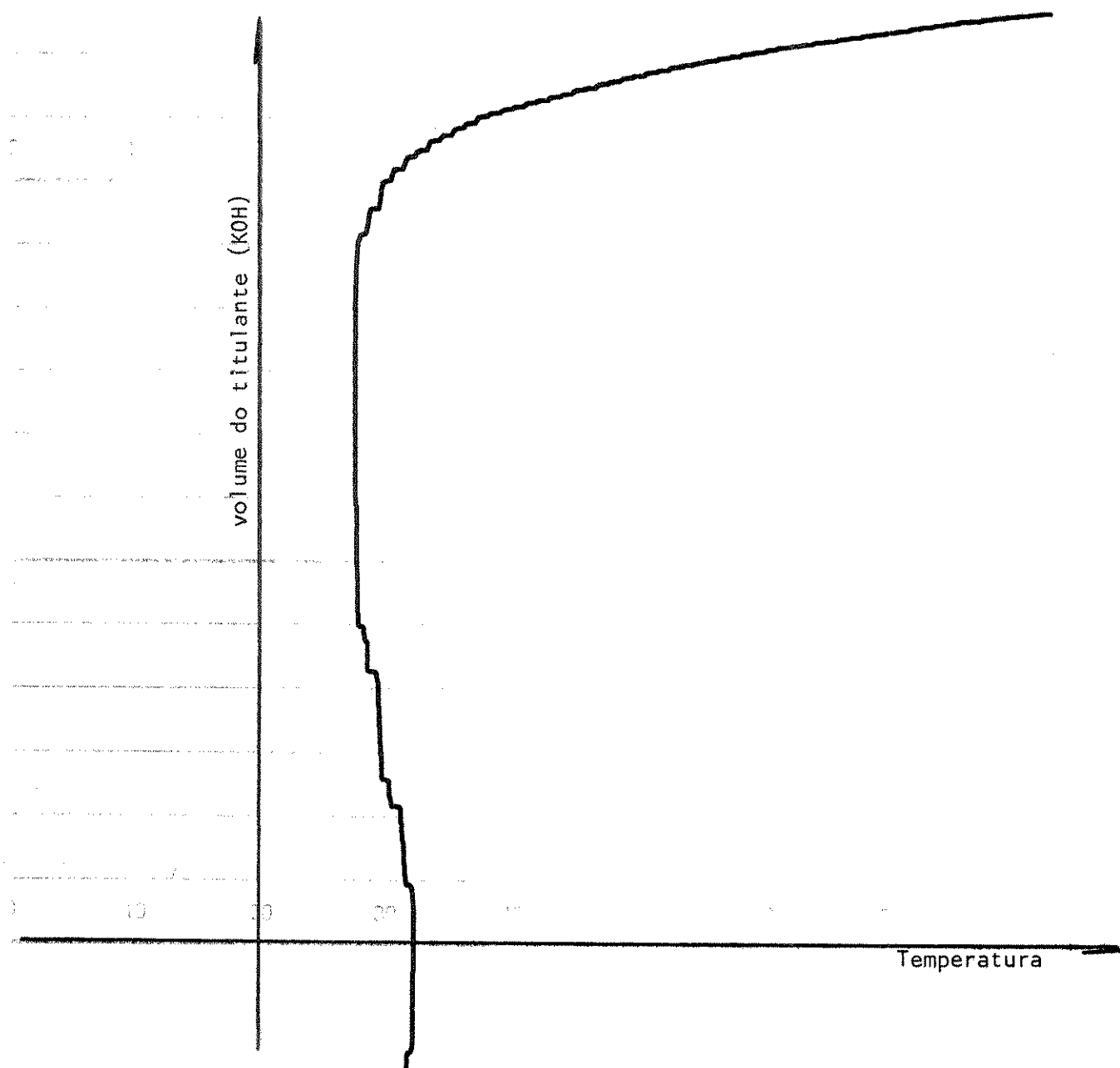
TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

0,0757 g de ácido gálico em DMF, titulado com KOH em isopropanol.

Sensibilidade = 100 mV

Relação titulante (KOH)/cm do papel do registrador = 0,0869 meq/cm

Indicador Catalítico = Acrilonitrila



VI.9 USO DA TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA NA DETERMINAÇÃO DA SOMA DA "ACIDEZ TOTAL" E POLIFENÓIS EM VINHO

As titulações termométricas catalíticas normalmente são realizadas utilizando-se solventes não aquosos. Porém, como já mencionado, em alguns casos é possível a realização das mesmas em presença de água.

Realizou-se a titulação termométrica catalítica de amostras em soluções que além do vinho contém DMF e acrilonitrila em proporções adequadas. Para chegar-se a resultados satisfatórios, realizou-se os seguintes experimentos:

VI.9.1 INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO ENTRE DMF E H₂O NAS CURVAS DE TITULAÇÃO

A forma das curvas de titulação e talvez a própria estequiometria da reação usada na titulação podem depender da proporção da mistura de água e solventes usados na titulação.

Encontrou-se que uma pro

porção adequada para titulação de vinho pelo método termométrico catalítico pode ser:

1 ml de vinho: 10 ml de DMF e 4 ml de acrilonitrila

O titulante usado foi uma solução de aproximadamente 0,5 M de KOH em isopropanol.

Para as titulações termométricas catalíticas, utilizou-se o mesmo aparelho usado nas titulações termométricas convencionais, com exceção do frasco de titulação. O frasco utilizado nas titulações termométricas catalíticas tem capacidade de 50 ml e as paredes de vidro não são espelhadas, para permitir a observação daquilo que acontece durante a titulação.

As figuras de 33 a 36 mostram alguns dos termogramas obtidos.

VI.9.2 PADRONIZAÇÃO DO TITULANTE UTILIZADO

Preparou-se uma solução de ácido benzóico em DMF 0,4792 M. Com o auxílio de uma

FIGURA 33

TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

1,00 ml de vinho (amostra 11) em 10,00 ml de DMF e 4,00 ml de acrilonitrila titulados com KOH em isopropanol.

Sensibilidade = 100 mV

Relação titulante (KOH)/cm do papel do registrador = 0,0422 meq/cm

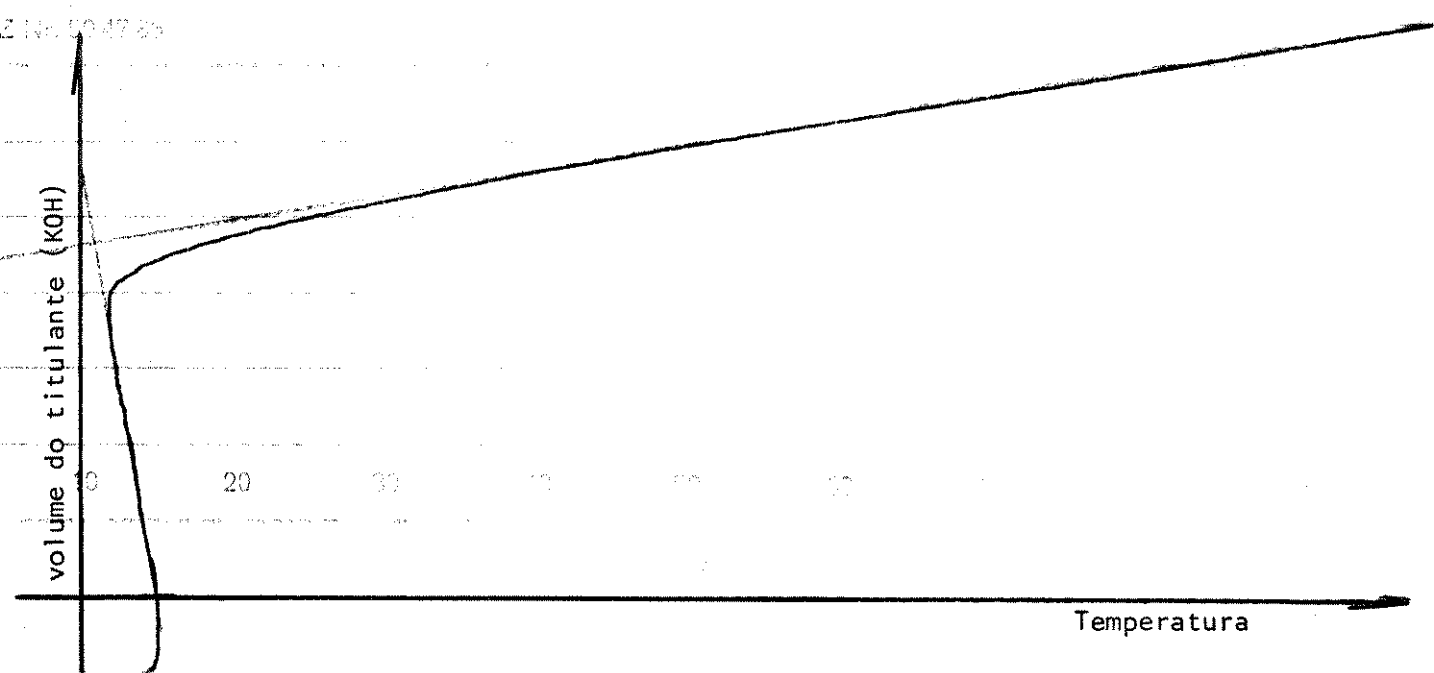


FIGURA 34

TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

1,00 ml de vinho (amostra 12) em 10,00 ml de DMF e 4,00 ml de acrilonitrila titulados com KOH em isopropanol.

Sensibilidade = 100 mV

Relação titulante (KOH)/cm do papel do registrador = 0,0422 meq/cm

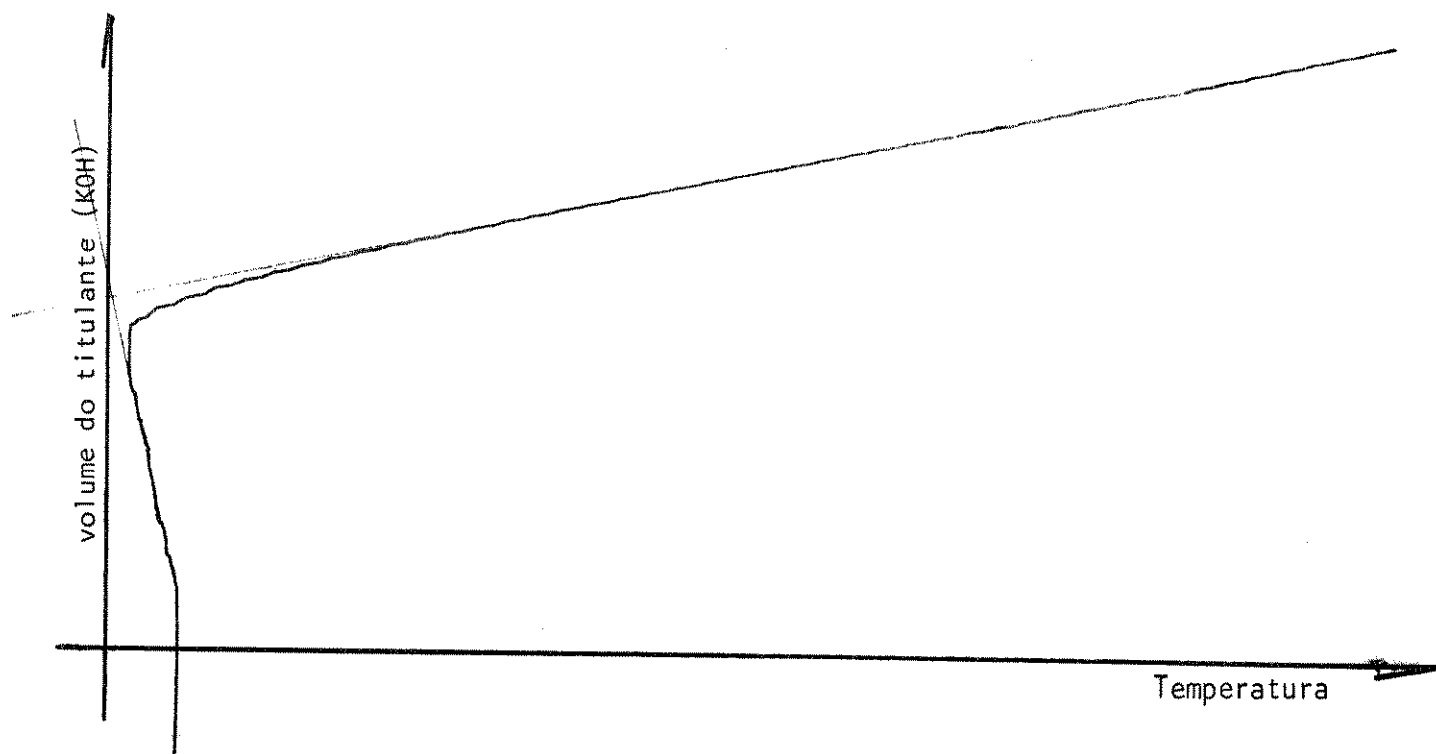


FIGURA 35

TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

1,00 ml de vinho (amostra 16) em 10,00 ml de DMF e 4,00 ml de acrilonitrila titulados com KOH em isopropanol.

Sensibilidade = 100 mV

Relação titulante (KOH)/cm do papel do registrador = 0,0422 meq/cm

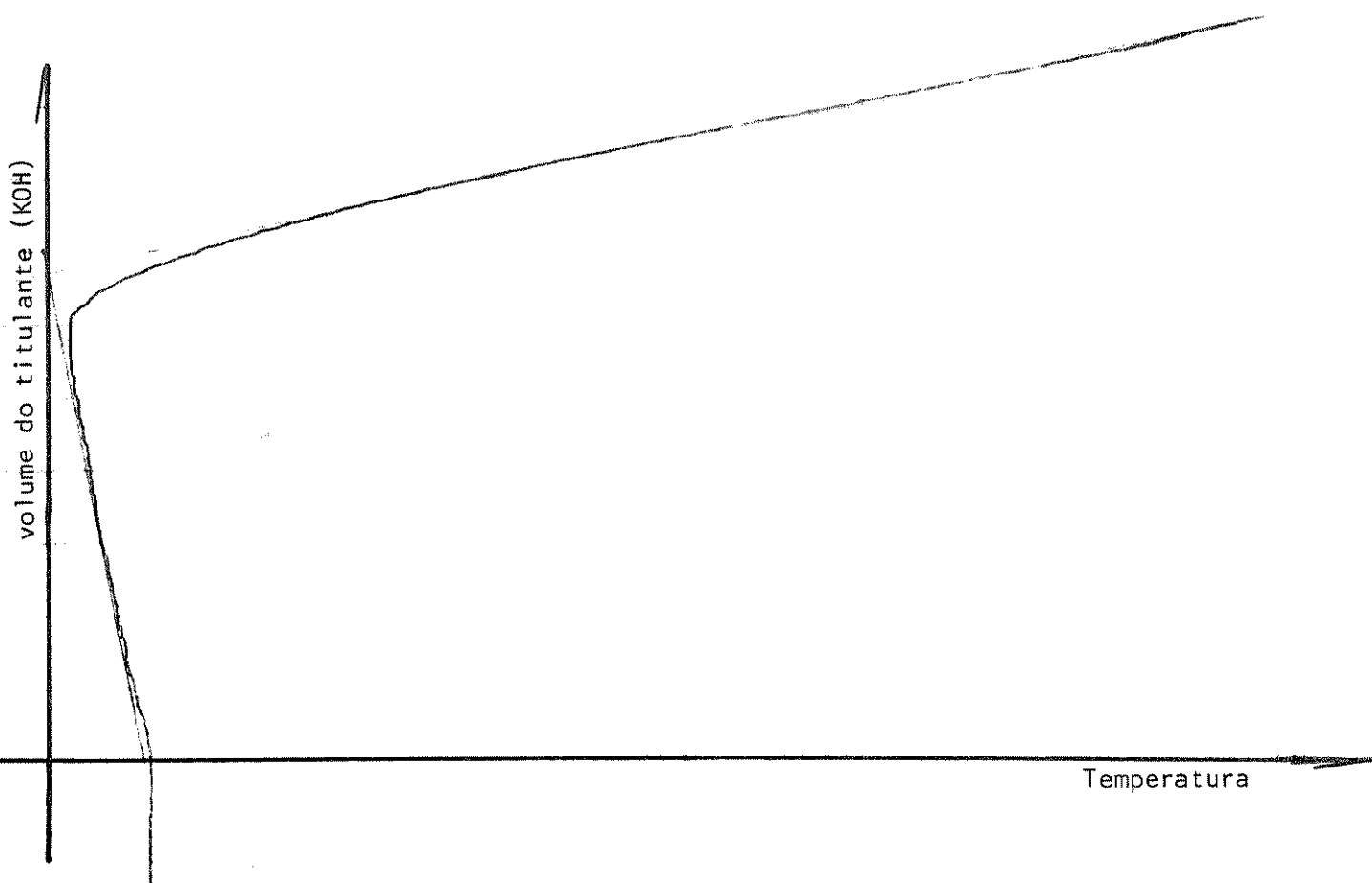


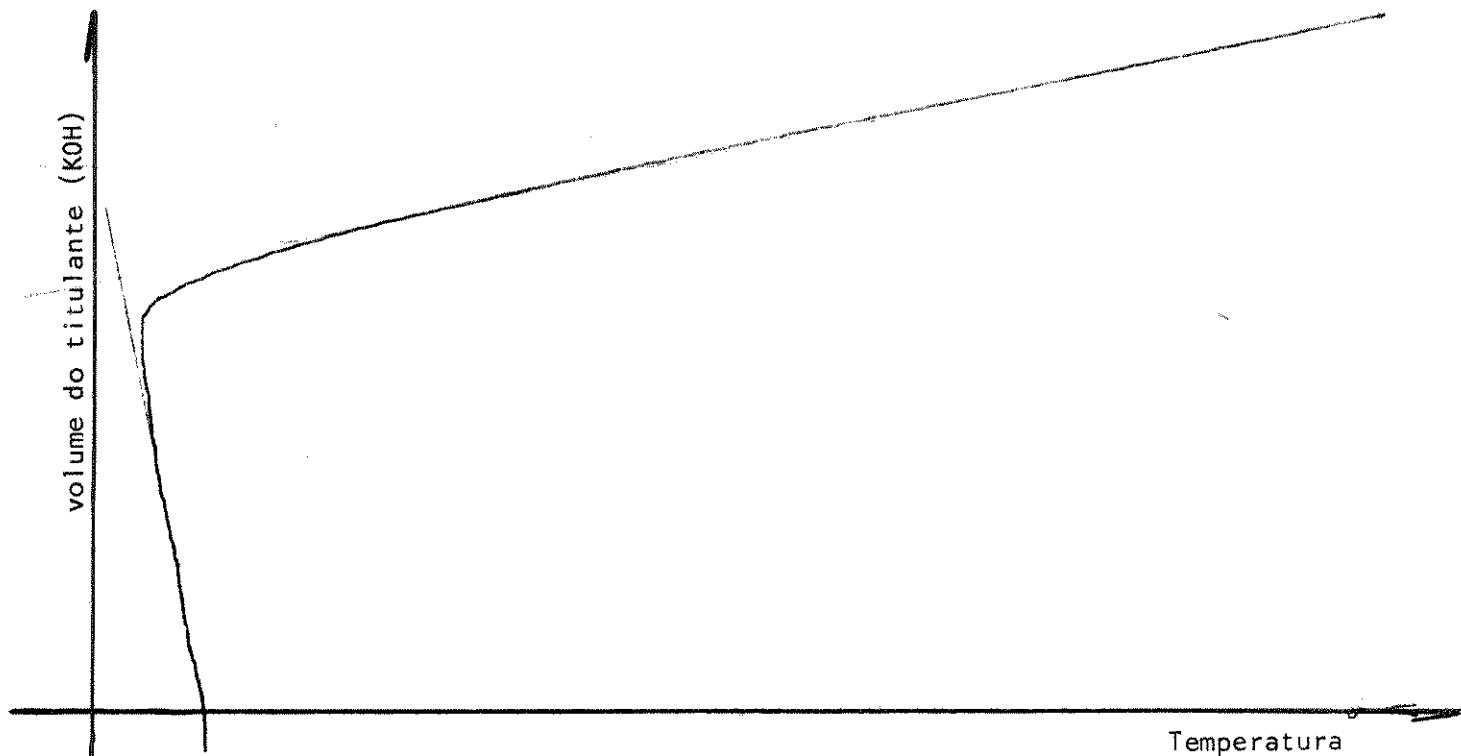
FIGURA 36

TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CATALÍTICA

1,00 ml de vinho (amostra 10) em 10,00 ml de DMF e 4,00 ml de acrilonitrila titulados com KOH em isopropanol.

Sensibilidade = 100 mV

Relação titulante (KOH)/cm do papel do registrador = 0,0422 meq/cm



Tentamos utilizar os valores - obtidos através dos dois métodos para se avaliar o teor de polifenóis. Isto foi feito subtraindo-se dos valores obtidos através da Titulação termométrica Catalítica os valores obtidos na determinação da "acidez total" pela Titulação Termométrica Convencional.

Os resultados obtidos para o teor polifenóis calculado desta maneira, são mostrados - na Tabela 11. Estes resultados podem expressos em número de equivalentes de base gastos na titulação de polifenóis, por litro de vinho e foram denominados de Índice - Termométrico Catalítico.

Comparou-se o número de equivalentes de base gastos por litro de vinho, calculado da maneira acima, com o chamado Índice permanganato do vinho. É interessante ver se há uma proporcionalidade entre esses dois métodos, uma vez que o chamado Índice de permanganato é o método usado convencionalmente para avaliação do teor de polifenóis do vinho.

TABELA 11 - COMBINAÇÃO DAS TITULAÇÕES TERMOMÉTRICAS CONVENCIONAL E CATALÍTICA NA DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS EM VINHOS

AMOSTRA	Número de miliequivalentes de KOH gastos na titulação termo-métrica catalítica de 1,00 ml de vinho. ("conteúdo ácido total"). (I)	Número de miliequivalentes de NaOH gastos na titulação termométrica de 1,00 ml de vinho (acidez total). (II)	Número de miliequivalentes de KOH necessários para titulação das substâncias polifenólicas. (I-II)	Número de miliequivalentes de KOH por litro de amostra de vinho "Índice Termométrico catalítico".
10	0,2370	0,0966	0,1404	140,4
11	0,1975	0,1058	0,0917	91,7
12	0,1900	0,0918	0,0982	98,2
13	0,5082	0,0801	0,4281	428,1
14	0,2263	0,0905	0,1358	135,8
15	0,1858	0,0662	0,1196	119,6
16	0,2904	0,1162	0,1742	174,2
17	0,1815	0,1027	0,0789	78,9

VII DISCUSSÃO

Como discutimos no início desta tese, nosso objetivo era explorar a titulação termométrica na determinação de substâncias ácidas no vinho. Isto foi encorajado pelo aspecto apresentado pelas curvas obtidas através da titulação termométrica convencional, quando se fazia a titulação do mesmo com base forte. Esta curva foi usada então na determinação da "acidez total" e de substâncias polifenólicas do vinho em uma única titulação. Levando em conta a relação entre os valores da "acidez total" determinada potenciométricamente e os valores obtidos por titulação termométrica, achamos - que o método poderá ser de interesse para este fim. Por outro lado, levando-se em conta a proporcionalidade entre os valores obtidos para as substâncias polifenólicas pelo método termométrico e o método baseado na titulação com permanganato, acreditamos que o método proposto possa ser de interesse neste tipo de análise.

Esta proporcionalidade pode ser observada na tabela 12 onde os valores obtidos através do método da titulação com permanganato estão dispostos em ordem crescente e são comparados com os resultados obtidos pelos outros métodos utilizados.

TABELA 12

VALORES OBTIDOS PARA DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS ATRAVÉS
DOS DIVERSOS MÉTODOS UTILIZADOS

AMOSTRA	Índice de Permanganato	Índice Termométrico (Convencional)	Índice Termométrico catalítico	Determinação espectrofotométrica (g/l)	Determinação por precipitação com proteínas (g/l)
17	6,30	31,34	78,9	1,84	(x)
11	23,10	23,50	91,7	1,90	1,36
12	23,80	26,11	98,2	1,88	1,50
15	24,15	28,72	119,6	2,09	1,30
14	29,66	26,98	135,8	1,85	1,30
6	30,66	27,85	(x)	(x)	(x)
10	30,71	27,89	140,4	1,92	(x)
5	31,40	29,17	(x)	(x)	(x)
7	31,57	31,01	(x)	2,10	(x)
3	33,94	30,47	(x)	1,91	(x)
1	34,64	31,77	(x)	2,08	(x)
16	39,90	33,95	174,2	1,90	1,35
4	42,43	34,74	(x)	(x)	(x)
8	44,16	39,17	(x)	(x)	(x)
2	50,55	45,50	(x)	(x)	1,45
9	52,17	57,45	(x)	2,35	(x)
13	58,27	60,50	428,1	2,45	(x)

(x) - amostra não analisada pelo método correspondente.

Uma vantagem sobre o método espec -
trofotométrico na região U.V. ou o método de precipita -
ção com proteínas é a facilidade na execução do método.

O método espectrofotométrico apre -
senta dificuldades na preparação da curva padrão, pois o
composto utilizado é de difícil obtenção. Convém salien -
tar também, que a própria preparação da amostra é bastan -
te trabalhosa neste caso.

A técnica de precipitação com pro -
teínas também é bastante trabalhosa e apresentou resulta -
dos não muito reprodutíveis. Por outro lado, os resulta -
dos apresentados mostraram ser muito dependentes de fato -
res, tais como, da quantidade de proteína utilizada na
precipitação, o pH da solução, assim como da própria pro -
teína utilizada.

Levando-se em conta esses fatos, a
creditamos que este método deve ser melhor estudado para
sua aplicação na determinação de taninos do vinho.

Outro aspecto positivo na utiliza -
ção do método termométrico é a reprodutibilidade do méto -
do. Isso pode ser observado na Tabela 13, onde encon -
tram-se os resultados de cinco determinações de acidez -

TABELA 13

DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL E POLIFENÓIS EM UMA AMOSTRA
DE VINHO POR TITULAÇÃO TERMOMÉTRICA CONVENCIONAL

AMOSTRA	Mililitros de NaOH 1N gastos na titulação de 100,00 ml de amostra de vinho	
	ACIDEZ TOTAL	POLIFENÓIS
10	8,95	3,20
10	8,85	3,10
10	8,87	3,25
10	8,95	3,10
10	8,90	3,30

total e polifenóis de uma mesma amostra.

O aspecto negativo do método é a de terminação do ponto final correspondente à titulação de substâncias polifenólicas. Esta localização nem sempre é nítida. O uso do titulante em temperatura menor do - que o titulado, parece melhorar a 2a. inflexão em alguns casos.

Outro método desenvolvido envolve - ria além da titulação termométrica convencional, para de terminação da "acidez total" a titulação termométrica ca talítica para determinação da soma da "acidez total" e substâncias polifenólicas. No caso da titulação catalítica conseguiu-se curvas de titulação bastante favorá - veis para se localizar o ponto final. Embora a presença de água seja adversa no que se refere à forma das curvas de titulação, a adição do solvente Dimetilformamida con segue minimizar essa ação negativa da água.

Pode-se observar a proporcionalida de entre os resultados da avaliação do conteúdo de substâncias polifenólicas por este método como o da titula - ção com permanganato. Acreditamos que esta proporcionalidade torna interessante a aplicação do método neste ti po de análise.

Resumindo, foram propostos dois métodos de análise que acreditamos serem de real interesse para determinação da acidez total e substâncias polifenólicas do vinho.

VIII SUMÁRIO

Este trabalho teve como objetivos - principais o desenvolvimento da técnica da titulação termométrica e a tentativa de sua aplicação na análise de substâncias ácidas de vinho. Os tópicos principais deste estudo são os seguintes:

1. Aplicação da titulação termométrica alcalimétrica de vinhos na determinação da chamada "acidez total" dos vinhos. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados da titulação potenciométrica, que é o método oficialmente usado para esse fim.
2. Aplicação da mesma curva de titulação termométrica alcalimétrica, descrita no item 1, para determinação do teor de polifenóis (taninos) do vinho. Os resultados foram comparados com os resultados obtidos pela titulação com permanganato, oficialmente usada para este fim e também outros métodos alternativos.
3. Aplicação da titulação termométrica catalítica na titulação de substâncias ácidas do vinho com base forte.

4. Tentou-se combinar os resultados da titulação termométrica catalítica e titulação termométrica convencional, para elaborar um outro método para determinar o teor de polifenóis do vinho. Os resultados foram sempre comparados com métodos oficialmente aceitos para este tipo de análise.

VIII SUMMARY

The main objective of this work was the development of the thermometric titration technique and a trial of its application in the determination of acid compounds in wines. In this study the following topics were developed:

1. Application of the thermometric alcalimetric titration in the determination of the "total acidity" in wines. The results were compared with the ones obtained by potentiometric titration, which is the official method for this analysis.
2. Application of the thermometric alcalimetric titration curve described above in the determination of polyphenols (tanins) in wines. The results were compared with the ones obtained by permanganate titration, which is the official method for this test, as well as with other alternative methods.
3. Application of catalytic thermometric titration in the strong base titration of acid compounds in wines.
4. A trial was made to combine the results of the

catalytic thermometric titration and the conventional one to elaborate a new method for the determination of polyphenols in wines. The results are always compared with the ones obtained by officially accepted methods for this kind of analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. J.L.M. Costa, "Desenvolvimento de um titulador termo métrico e sua aplicação na análise de azotetos insolúveis". Tese de Mestrado. UNICAMP, 1977.
2. A.P. Chagas, O.E.S. Godinho e J.L.M. Costa, Talanta, 24, 593 (1977).
3. A.A. Rodella. "Determinação de Açúcares por Entalpi metria de Injeção Direta", Tese de Mestrado, UNICAMP 1979.
4. W.A. Oliveira e A.A. Rodella, Talanta, 26, 995(1979).
5. A.A. Rodella e W.A. Oliveira, Brasil Açucareiro, 94, 185 (1979).
6. E. I. Greenhow e O.E.S. Godinho, Trabalhos em Andamento.
7. W.A. de Oliveira e C. Pasquini, Trabalhos em Andamento.
8. L.S. Bark and; S.M. Bark, "Thermometric Titrimetry"

Pergamon Press (1969).

9. G.A. Vaughan, "Thermometric and Enthalpimetric Titrimetry", Van Nostrand Reinhold, New York, (1973).
10. H. I. V. Tyrrel and A.E. Beezer, "Thermometric Titrimetry", Chapman and Hall, (1968).
11. J. Jordan, "Thermometric Enthalpy Titrations" in "Treatise on Analytical Chemistry", (I.M. Volthoff e P. J. Elving, eds), 8 (parte 1) Interscience, (1968).
12. N. D. Jespersen and J. Jordan, Analytical Letters, 3 (6), 324.340 (1970).
13. J. Jordan, Ed., "New Developments in Titrimetry", vol. 2, "Treatise on Titrimetry", Marcel Dekker, New York, N.Y., (1974). p. vii.
14. G.A. Voughan and J.J. Swithenbank, Analyst. (London), 90, 594 (1965).
15. E.J. Greenhow, Analyst (London), 102, 584 (1977).
16. E.J. Greenhow, L.E. Spencer, Analyst (London), 98, 90

- (1973).
17. E. J. Greenhow and L.E. Spencer, *Analyst (London)*, - 98, 81 (1973).
 18. M. K. Chantooni, Jr., and H. M. Kolthoff, *J. Phys - Chem*, 79, 1176 (1975).
 19. E. J. Greenhow, A. Nadjafi, L. D. de Tommijos, *Ana_lyst*, 103, 411 (1978).
 20. E. J. Greenhow, *Chem. Ind. (London)*, 422 (1972).
 21. E. J. Greenhow and L. H. Loo, *Analyst (London)*, 99, 360 (1974).
 22. E. J. Greenhow and A. A. Shafi, *Analyst (London)*, - 101 (421) (1976).
 23. E. J. Greenhow and R. Hargitt, *Proc. Soc. Anal. Chem*, 10, 276 (1973).
 24. Webb, A. D., *Chemistry of Winemaking*, American Chemical Society, (1974).
 25. "Analisi e Controllo dei Vini", J. Ribereau - Gayon e E. Peynaud, *Versão Italiana*, Tulio de Rosa, Edizione Agricole Bologna, 1966.

26. Ribéreau - Gayon, P. Ann. Physiol. Vegetable (1964)
6, 119, 211, 259.
27. Amerine, M. A. Joslyn, M. A., "Tables Wines the Technology of their production", University of California Press Berkeley and Los Angeles, Calif. 1970.
28. Amerine, M. A., Berg. H. W., Cruess, W. V., "The technology of Wine Making", 3a. ed. Avi, Westpost, t (1972).
29. Ribéreau - Gayon, J., Peymond, E., Sudraud, P., Ribéreau - Gayon, P., "Analyse et. Controle des, Vins", Dunod, Paris, (1972).
30. "Manual do Viti - Vinicultor Brasileiro, Celeste Gobbato, Edição da Livraria do Globo, (1942).
31. Singleton, V. L. Esau, P., "Phenolic Substances in Grapes and Wine, and their significance", suppl. 1, Advon. Food. Res, Academic, London and New York, t (1969).
32. Ribéreau - Gayon, P., "Les composés phénoliques des végétaux". Dunod, Paris, (1968).

33. Henning K. und Burkhardt. R. - Weinberg u. Keller 4, 374 (1957).
34. Deibner L. - Rev. Fermt. Ind. Alim. n. 1, 76 e n. 2, 47 (1953).
35. Masquelier J. - Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 65 (1956).
36. Henning K. und. Burkhardt. R. - Weinberg u. Keller,- 5, 542-552, 593-600 (1958).
37. Freudenberg., "Die Chemie der Naturlichen Gerbsu -
stoffe", Springer Vulog, Berlin, (1920).
38. Haslam, E., Editor "Chemistry of Vegetable Tannins",
Academic Press, London, 1966, P. 2.
39. Phillips, H. J. L., R. Soc. Arts., 1954, 102, 824.
40. Guslavson, K. H. "the Chemistry of tanning process -
ses", Academic Press, New York, (1956).
41. Bate - Smith, E. C., Rasper, V., J. Food Soc. 34, 203
(1969).
42. Martin-Tanguy, J., Guillaume, J. Kona, J., J., Sci

- Food Agric. 28, 757 (1977).
43. Ramachandra, G., Virupaksha, T.K., Shadaksharaswamy'
M., J. Agric. Food Chem. 25, 1101 (1977).
44. Tamir, M., Alumot, E., J. Nutr. 100, 573 (1970).
45. "Official Methods of Analysis", 11 th. ed. Associa -
tion of Official Agricultural Chemist, Washington, -
(1970).
46. Métodos de Análise — Regulamento Geral de Bebidas.-
Diário Oficial. Suplemento nº 181. 19.09.(1974).
47. Owades, T. L. Dono, J. M., J. Ass. off. Anal. Chem -
(1968) 51, 148.
48. Bate - Smith E. C. - Advances in Food Research, Aca
demic Press, New York, 5, 274-275 (1954).
49. Smith C. J. B., Toslyn A. M. And Lukton A., Anal. -
Chem., 27, 1159-1162 (1955).
50. Hagermon, A. E., Butlher, L. Gl. Agricultural and -
Food Chemistry, Vol. 26, nº 4, 809 (1978).

51. Johnson G., Foreman E. M. and Mayer M. M., Food, Techn. 4, 237 (1950).
52. Roberts. E. A. H. and Williams D. H., J. Sci. Food. - Agr. 9, 217 (1958).
53. Colagrande, O., Rivista di Viti Colt. enologia 14, 9, 323-331 (1961).
54. Awades J. L., Rubin G. and Brenner M. W., J. Agr. - Food. Chem. 6, 44 (1958).