

MICROMETODO PARA EL DOSAJE DE ALCOHOL ETILICO

(UNA VARIANTE DEL METODO FOTOCOLORIMETRO PARA EL
DOSAJE DE ALCOHOL EN VINOS)

Por los Ingenieros Agrónomos
NORBERTO J. PALLERONI
ROBERTO VEGA

INTRODUCCION

El dosaje de alcohol etílico en la sangre ha planteado la necesidad de desarrollar micrométodos apropiados al análisis de pequeñas cantidades de muestra con un contenido alcohólico variable entre 0.1 y 5 gramos por litro. La técnica propuesta en 1922 por Widmarck (1) se basa en oxidar el alcohol etílico por una mezcla sulfocrómica y en dosar el exceso de reactivo. El aparato propuesto por Widmarck (1) se basa en oxidar el alcohol etílico por una mezcla sulfocrómica y en dosar el exceso de reactivo. A pesar de todo, como lo señala Nicloux, el método puede conducir a resultados que difieren entre sí de un 10 por ciento. Este autor (2) propone el uso de un aparato de microdestilación de su invención y algunas modificaciones en cuanto a la titulación del exceso del reactivo. Cesaire y Rougieux (3) describen un aparato igualmente apropiado para el dosaje de alcohol en sangre y en vinagre. La estimación del alcohol presente en la muestra se hace también en este caso por una titulación del exceso de oxidante.

Entre los métodos fotocolorimétricos se halla el procedimiento descrito en el manual para el uso del fotocolorimétrico Leifo (4), cuyo fundamento está en la medida del color producido por el yodo liberado a partir de un exceso de yoduro de potasio agregado al líquido reactivo (solución sulfocrómica) al final de la reacción. El más sensible de los métodos conocidos es sin duda el enzimático, basado en la medida de la reducción de la Coenzima I en presencia de la enzima alcohol dehidrogenasa a 340 $m\mu$ en un espectrofotómetro. Euler y sus colaboradores (5) aplicaron la técnica espectrofotométrica de Warburg al estudio de la enzima mencionada, usando etanol como sustrato. Como método de dosaje del alcohol, sin embargo, este procedimiento cuenta con varias desventajas, entre ellas, un equilibrio desfavorable, la sensibilidad de la enzima a diversos factores físicos y químicos

la falta de especificidad, la necesidad del uso de un espectrofotómetro apropiado para la región ultravioleta, etc.

El método que proponemos resulta de una adaptación del que se ha descrito anteriormente (6). Ofrece algunas ventajas sobre los mencionados, y entre ellas se destaca la sencillez de las manipulaciones. En las experiencias que se describen más adelante la falta de especificidad, la necesidad del uso de un espectrofotómetro, hemos procedido a ajustar el método para hacer posible el dosaje de unos 5 micromoles (0.23 mg.) de alcohol. El procedimiento es tal vez poco preciso cuando se trata de determinar cantidades inferiores a 2.5 micromoles (0.11 mg.), pero admite la posibilidad de algunas variantes adaptadas al dosaje de cantidades mayores, utilizando filtros apropiados en el fotocolorímetro.

DESCRIPCION DEL METODO

El instrumental utilizado ha sido el mismo que el que se describe en el trabajo previo (6), y la única variante ha sido el uso del filtro azul N° 42 para las lecturas fotocolorimétricas.

La solución de bicromato de potasio ha sido preparada como sigue: se pesa 0.471 gr. de bicromato de potasio puro recristalizado, y disuelve en 5 ml. de agua destilada. Completa a 1000 ml. con una solución de ácido sulfúrico que se prepara previamente mezclando ácido sulfúrico D. 1.84 y agua en volúmenes iguales. Esta solución ha dado una lectura fotocolorimétrica de 340 unidades Klett en los tubos de los frascos de reacción usando el filtro azul N° 42. A mayores concentraciones, la lectura inicial carece de la precisión deseada.

La práctica de esta variante no difiere de la del método descrito anteriormente. La temperatura del líquido en el momento de realizar las lecturas no tiene influencia significativa en los resultados debido a que el reactivo reducido no absorbe apreciablemente en la zona de longitudes de onda de la luz transmitida por el filtro N° 42 de Klett. Luego del calentamiento por una hora a 63°C, la lectura registrada por el reactivo en un frasco testigo, que no lleva muestra, ha bajado en todos los casos 10 unidades de Klett. Dado que lo que se mide en este método es una disminución de la densidad óptica, es necesario incluir en las determinaciones un frasco testigo, y la diferencia entre la lectura de este frasco y la del frasco de una muestra determinada, es proporcional a la cantidad de alcohol contenido en la muestra. El volumen de muestra usado en todos los casos que se presentan más adelante, ha sido de 0.1 ml., y el calentamiento ha sido realizado a 63°C por una hora.

Por las razones expuestas más arriba, el cálculo de la canti-

dad de alcohol se puede hacer partiendo de la ecuación de una recta tipo, sin que sea necesario introducir en aquélla modificación alguna en determinaciones sucesivas. Con una serie de muestras hidroalcohólicas de tenor alcohólico conocido, convenientemente diluídas, se ha obtenido una serie de valores que fueron representados en un gráfico. Los puntos se disponen según una recta, y la linealidad se mantiene en forma satisfactoria cuando el contenido alcohólico de la muestra analizada se halla entre 2.5 y 6.5 micromoles (0.11 y 0.30 mg. de alcohol, aproximadamente). La ecuación de la recta obtenida en las condiciones experimentales de nuestro trabajo ha sido:

Micromoles de alcohol = diferencia de lectura \times 0.0425 — 0.38

RESULTADOS OBTENIDOS

1) *Dosaje de alcohol en experiencias manométricas:*

Las experiencias manométricas que se realizan con el aparato de Warburg pueden ser complementadas con el análisis químico del líquido contenido en los recipientes del respirómetro. La concentración de las sustancias utilizadas en experiencias de ese tipo es por lo general pequeña, para permitir la medida precisa de los gases intercambiados con la atmósfera del frasco. Por esta razón, si al final de una experiencia se desea analizar la composición del líquido en cuanto a substrato remanente y productos de la reacción, es necesario disponer de métodos químicos muy sensibles.

Hemos aplicado nuestro método para el dosaje del alcohol etílico producido por una suspensión de células de levaduras en presencia de cantidades de glucosa que hacen posible la medida del anhídrido carbónico producido con precisión aceptable en el aparato de Warburg. Las experiencias fueron realizadas usando la técnica manométrica convencional.

La levadura utilizada es un "mutante" conocido en la literatura con el nombre de "pequeña" por el tamaño de las colonias en comparación con las de la cepa original. Estos "mutantes" tienen la interesante particularidad de haber perdido su capacidad respiratoria y sólo son capaces de fermentar los azúcares aún en presencia de oxígeno (7). El empleo de este tipo de cepas nos ha relevado de la necesidad de usar una atmósfera sin oxígeno en los frascos de respirómetro; de haber utilizado una cepa normal en condiciones aerobias, hubiera sido imposible correlacionar la cantidad de anhídrido carbónico producido con la de alcohol, ya que el gas medido habría sido el resultante de una mezcla de

respiración y fermentación cuyas proporciones no hubiéramos podido determinar con exactitud. La cepa utilizada ha sido obtenida en nuestro laboratorio por un método que será descrito oportunamente.

Las células cultivadas en mosto de uva por 24 horas, fueron separadas por centrifugación, lavadas dos veces y resuspendidas en una solución M/30 de fosfato monopotásico. La turbidez de la suspensión, medida con el fotocolorímetro Klett usando el filtro rojo N° 66, ha sido de 450 unidades. En cada frasco de Warburg se usó 1 ml. de esta suspensión y 0.1 ó 0.2 ml. de glucosa M/5 en la rama lateral.

Las medidas gasométricas se suspendieron cuando la producción de anhídrido carbónico en cada frasco había disminuído considerablemente por consumo de la mayor parte del azúcar. De inmediato, los frascos fueron enfriados en un baño de agua a cero grado, y el contenido fué transferido a tubitos de centrifuga previamente enfriados. Las células fueron eliminadas por centrifugación, y 0.1 ml. del sobrenadante fué analizado. El resumen de las experiencias va a continuación:

TABLA 1

a) Glucosa inicial: 20 micromoles	b) Glucosa inicial: 40 micromoles
CO ₂ producido: 32,6 micromoles	CO ₂ producido: 56,8 micromoles
Alcohol producido: 30.36 micromoles	alcohol producido: 58.08 micromoles.
Relación alcohol/CO ₂ : 0,93	Relación alcohol/CO ₂ : 1.02

Según puede verse, la proporción alcohol/CO₂ se acerca bastante a lo esperado. El método por lo tanto, tendría una aplicación de interés en el estudio de los balances de fermentación en microescala.

2) Dosaje de alcohol en sangre

Hemos dosado el alcohol en una serie de muestras de sangre que nos han sido cedidas gentilmente por los doctores Segundo R. Rosales y Marta Romero Ríos. A la vez, hemos contado con los datos obtenidos por estos investigadores mediante la técnica de Widmark; estos datos, junto a los nuestros, se dan en la Tabla 2. Nuestros resultados han sido calculados, a partir de la misma fórmula dada anteriormente. Multiplicando por 0.46 el número de micromoles hallado, se tiene el número de gramos de alcohol por litro de sangre, y éste es el dato que aparece en la tabla.

TABLA 2

Muestra	gramos de alcohol por litro de sangre	
	Método fotocolorimétrico	Método de Widmarck
1	1.96	1.70
2	0.32	0.34
3	0.11	0.08
4	0.10	0.05
5	1.38	1.34
6	2.25	2.20
7	0.10	0.08
8	0.90	0.90
9	1.85	1.76
10	1.91	1.90
11	2.11	2.00
12	0.10	0.06

TABLA 3

Resultados de nueve determinación de alcohol de una misma sangre por el método propuesto.

Resultados

(gr./litro)

1.89	Media: 1.91
1.94	Desviación standard: 0.084
2.12	
1.85	Ceficiente de variabilidad: 4.4 %.
1.85	
1.87	Desviación standard de la media: 0.028
1.87	
1.89	Coeficiente de variabilidad de la media: 1.46%
1.93	

Debemos tener en cuenta que carecemos aquí de un verdadero método patrón para juzgar el valor de nuestro método aplicado al análisis de alcohol en sangre ya que, como dijimos más arriba, el procedimiento de Widmarck puede conducir a errores de hasta un 10 por ciento. Por otra parte, nuestro método carece evidentemente de precisión cuando la cantidad de alcohol es inferior a 100 mg. por litro. Pero debemos aclarar que tanto el método de Widmarck como el nuestro satisfacen perfectamente los requerimientos que deben cumplir los métodos de determinación en este caso, por cuanto con ambos es posible llegar a establecer los lími-

tes exigidos por la Medicina Legal para establecer el estado de intoxicación alcohólica. Creemos, además, que el método fotocolorimétrico presenta, sobre el de Widmarck, la ventaja de la sencillez en las manipulaciones. En algunos casos, al inclinar los frascos en el momento de tomar las lecturas, algunos trocitos de la película de sangre seca pueden caer al compartimento principal, tomar contacto con el líquido y alterar los resultados. En nuestras experiencias hemos procedido a humedecer la sangre con una o dos gotas de agua antes de tomar las lecturas.

En la Tabla 3 se transcriben los resultados de nueve determinaciones de una misma sangre, junto a los datos del análisis estadístico de esos resultados. Los valores anotados permiten ver que la reproducibilidad de los resultados es muy satisfactoria.

R E S U M E N

Se propone una modificación del método fotocolorimétrico de Vega y Palleroni para el dosaje de alcohol étílico en vinos, que permite la determinación de cantidades muy pequeñas de alcohol.

La modificación que se propone es susceptible de algunas variantes que permitirían el dosaje de cantidades variable de alcohol. En las condiciones de las experiencias que se detallan, el método ha sido ajustado de modo de poder dosar el alcohol en una escala de concentraciones variables entre 2.5 y 6.5 micromoles (0.11 y 0.30 mg. de alcohol) en una muestra de 0.1 ml.

El método ofrece una precisión considerable, y ha sido aplicado al dosaje del alcohol producido en algunas experiencias manométricas en las condiciones de la técnica convencional de Warburg, y al dosaje de alcohol en sangre. En ambos casos, el método ha satisfecho plenamente los requerimientos de los casos respectivos. Por lo tanto, puede ser aplicado para el estudio de balances de fermentación alcohólica, a los casos de determinación del grado de intoxicación alcohólica que plantea la Medicina Legal, y a otros diversos casos, tales como el dosaje de alcohol en vinagres u otros líquidos de bajo contenido alcohólico.

S U M M A R Y

A modification of the procedure of Vega and Palleroni for the estimation of alcohol in wines is proposed. It permits the quantitative determination of amounts of alcohol ranging from 2.5 and 6.5 micromoles (0.11 and 0.30 mg. of alcohol) in a 0.1 ml. sample.

The method has been used for the estimation of ethanol in the final mixture coming from manometric experiments performed with the conventional Warburg technique, and also, to the determination of alcohol in blood. The procedure has satisfied the requirements of the respective cases, and it is recommended for the determination of ethanol in liquids of low alcoholic content.

B I B L I O G R A F I A

Bibliografía del trabajo: "Micrométodo para el dosaje de alcohol etílico".

- 1º) WIDMARCK, *Biochem. Z.*, 131, 473, 1922.
- 2º) NICLOUX, LE BRETON y DOUTCHEFF, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XVI, 1314, 1934.
- 3º) CESAIRE y ROUGIEUX, *Ann. Inst. Agric. et Serv. Rech. et Expt. Agr. de L'Algerie*, 8, fasc. 6, 1954.
- 4º) FRETWURST y MAENCHEN, *Photometrische Bestimmungen in der medizinischen Chemie mit dem Leifo-Photometer*, Wetzlar, 1937.
- 5º) EULER, ADLER y HELLSTROM, *Svensk. Kem. Tid.*, 47,290, 1935.
- 6º) VEGA y PALLERONI, *Rev. Fac. Cien. Ag.* Tomo 2 N° 2.
- 7º) EPHRUSSI, *Nucleo-cytoplasmic relations in micro-organisms*, Oxford, 1953.