

CROMATOGRAFÍA DE LOS ÁCIDOS DEL VINO.

1.- NIVEL EDUCATIVO.

Esta práctica es adecuada para Bachillerato.

Se puede hacer en 3º y 4º de ESO una práctica similar para separar los pigmentos de las hojas utilizando etanol normal en lugar de los disolventes para la cromatografía de los ácidos del vino.

2.- OBJETIVO.

- Practicar una técnica de separación muy utilizada.
- Separar los componentes de una mezcla.
- Seguimiento de nivel de ácido málico durante la fermentación maloláctica posterior a la fermentación alcohólica.
- Conocer algunos de los ácidos orgánicos presentes en el vino.

3.- DESCRIPCIÓN. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

En 1906 el botánico ruso M. Tswett realizó un experimento para separar pigmentos vegetales que condujo al descubrimiento de la cromatografía. Una de las características de la cromatografía es la presencia de dos fases: estacionaria y móvil. La separación por cromatografía se basa en que la velocidad con que se mueve cada sustancia que depende de su afinidad relativa por ambas fases. En general los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan más lentamente (son más retenidos) mientras que los más afines a la fase móvil (menos retenidos) se desplazan con mayor rapidez.

Hay varios tipos de cromatografía. En esta práctica utilizamos la cromatografía en papel. La cromatografía en papel fue descubierta en 1943 por A.J. Porter y R.L. Millington la aplicó para estudiar los constituyentes de plantas, su separación e identificación.

La cromatografía en papel es un proceso muy utilizado para análisis cualitativos porque no requiere ningún tipo de equipamiento y es fácil de realizar. La fase estacionaria está constituida por un papel para cromatografía o un simple papel de filtro. La muestra se coloca en un extremo del papel. Después el disolvente utilizado como fase móvil se hace ascender por capilaridad. La separación de componentes de la muestra se hace en función de la afinidad de los solutos con las dos fases: los más solubles en agua quedan cerca del punto en que se depositó la muestra, mientras que los menos solubles en agua y más solubles en el disolvente llegarán más lejos.

Como medida en cromatografía sobre papel se emplea el R_f (retention factor) el cual se define como el cociente entre la distancia del origen al centro de la mancha y la distancia desde el origen al frente del disolvente.

En el caso de los ácidos del vino la cromatografía en papel puede utilizarse para el control de la fermentación maloláctica.

La cromatografía de los ácidos orgánicos permite conocer el comienzo de la fermentación maloláctica y confirmar la desaparición del ácido málico. Al final de la fermentación maloláctica los azúcares residuales pueden ser atacados por bacterias ácidas provocando un aumento de la acidez volátil (picado láctico). En estas condiciones pueden desarrollar levaduras patógenas que producen aromas desagradables y aminas biógenas que pueden provocar alergias. Cuando ya no aparezca ácido málico en la cromatografía nos indica el final de la fermentación maloláctica y el vino se trasiega a una cuba y se añade anhídrido sulfuroso para estabilizarlo.

Los ácidos fijos del vino que separaremos por cromatografía en papel son el ácido tartárico (se desplaza poco), el ácido málico (desplazamiento intermedio) y el ácido láctico que es fácilmente arrastrado por el disolvente y llega casi al extremo superior del papel.

4.- MATERIALES Y PRODUCTOS.

Material.

- Papel Whatman nº 1: una hoja de tamaño adecuado a la cubeta de cromatografía.
- Una cubeta de cromatografía o un tarro que cierre herméticamente.
- Micropipetas para depositar la muestra (y en su caso) el patrón.
- Un secador de pelo para acelerar el secado de la muestra entre un depósito y otro.
- Un vaso de precipitado de 50 ml

Productos.

- n-butanol 1g de azul de bromofenol por litro.
- Ácido acético al 50 %.

4.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Se mezclan 50 ml de n-butanol con 1g/l de azul de bromofenol con 25 ml de ácido acético al 50 %. Este disolvente se vierte con antelación en la cubeta de cromatografía para saturar la atmósfera interior. La cubeta debe estar herméticamente cerrada.

Se traza una línea con lápiz a 3 o 4 cm de la base del papel en la que se depositarán las muestras y el patrón. Sobre esta línea se depositan las gotas de las distintas muestras que se quieren analizar y si se quiere un patrón. Se utilizan distintas micropipetas para evitar contaminaciones de unas muestras por otras. Se repite el depósito de 8 a 10 veces secando con el secador antes del siguiente depósito. La mancha no debe sobrepasar 5 mm de diámetro. Se introduce la hoja de papel en la cubeta (previamente saturada) sin que las muestras toquen el disolvente. Se cierra herméticamente la cubeta y el disolvente empezará a subir por capilaridad. Cuando se acerque al límite superior del papel (3 o 4 horas) se retira el papel y se deja secar. El color del papel pasará de amarillo a azul apareciendo unas manchas amarillas correspondientes a los ácidos orgánicos del vino.

5.- RESULTADOS/CONCLUSIONES.

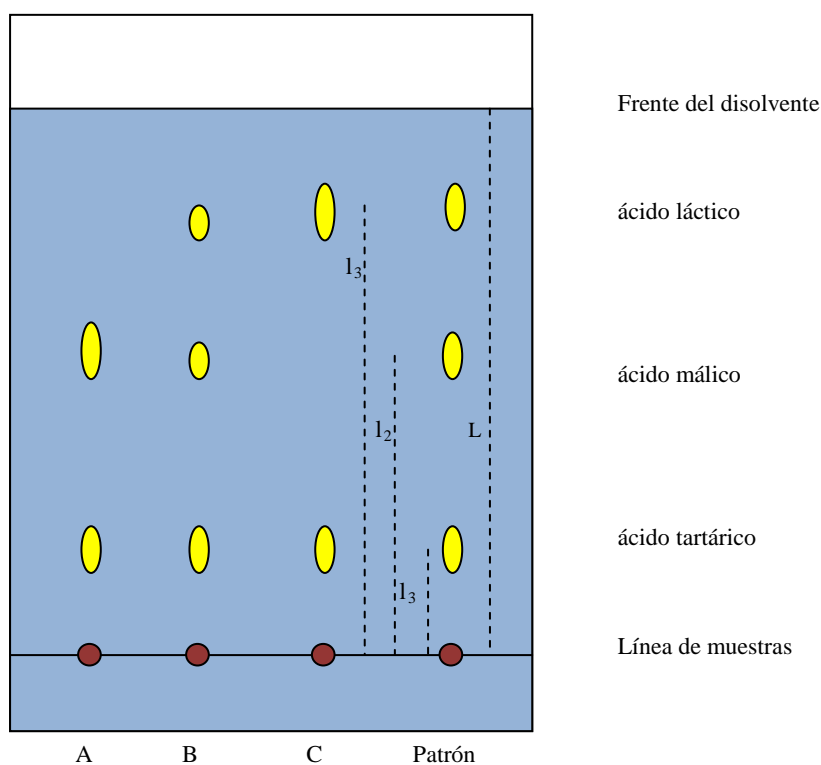
El orden de desplazamiento de los ácidos es tartárico (avanza poco), málico y láctico (el que más se desplaza). Si la mancha de málico no aparece nos indica que la fermentación maloláctica ha terminado.

A - Presencia de ácido tartárico y málico: no hay fermentación maloláctica.

B - Presencia de ácido tartárico, málico y láctico: la fermentación maloláctica ha comenzado.

C - Presencia de una mancha de tartárico y una de láctico: la fermentación maloláctica ha terminado.

Las cantidades de ácidos málico y láctico pueden ser evaluadas por el tamaño de las manchas, pero esta evaluación es sólo aproximada.



$$Rf_{\text{ácido tartárico}} = l_1/L = 1/10 \text{ a } 2/10$$

$$Rf_{\text{ácido málico}} = l_2/L = 4/10 \text{ a } 6/10$$

$$Rf_{\text{ácido láctico}} = l_3/L = 8/10 \text{ a } 9/10$$