

## ¿Es posible determinar azúcares reductores en vinos por el método Fehling Causse Bonnans, sin utilizar acetato neutro de plomo?

### Is it possible measure reducing sugar in wines by Fehling Causse Bonnans method, without using neutral lead acetate?

David Cobos <sup>1,2</sup>, Laura Germano <sup>1</sup>, Emiliano Malovini <sup>3</sup>, Silvia Paladino <sup>4</sup>

Originales: *Recepción:* 24/08/2015 - *Aceptación:* 18/06/2016

*Nota científica*

#### RESUMEN

El método oficial argentino para determinar el contenido de azúcares reductores en mostos y vinos es el método Fehling Causse Bonnans. Este método implica la defecación de la muestra para obtener una solución azucarada decolorada y límpida. Para ello se emplea carbón activado y acetato de plomo. Son conocidos los efectos de la intoxicación con plomo en seres humanos y animales, así como en el ambiente, de modo que es necesario minimizar su uso para lograr una producción sustentable. Se analizaron 149 vinos y 67 mostos. En cada una de las muestras se efectuaron dos determinaciones de azúcares reductores, diferenciadas por la forma de efectuar la defecación: a) empleando 5 mL de acetato de plomo al 25% y 0,5 g de carbón activado y b) empleando 5 mL de agua destilada y 0,5 g de carbón activado. Los datos se procesaron efectuando análisis de regresión simple lineal. Se concluye que puede eliminarse el uso de acetato de plomo en el tratamiento previo de las muestras de mostos y vinos para determinar azúcares reductores por el método de Fehling Causse Bonnans. La defecación de la muestra se realiza empleando solo carbón vegetal activado. Esta modificación de la técnica original permite eliminar el empleo de sales de plomo y la contaminación que ello implica, sin incurrir en errores apreciables en la medida de los azúcares reductores.

#### Palabras clave

técnicas analíticas • vino • Fehling Causse Bonnans • azúcares reductores • plomo

- 
- 1 Instituto Nacional de Vitivinicultura, Laboratorio General, Sede Central.
  - 2 Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Mendoza, Departamento Enología, Cátedra Laboratorio de Enología.
  - 3 Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias. Cátedra de Fisiología Vegetal. Instituto de Biología Agrícola de Mendoza. CONICET.
  - 4 Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias. Cátedra de Enología I. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. spaladino@fca.uncu.edu.ar

## ABSTRACT

The Argentine official method to determine the content of reducing sugars in musts and wines is the Causse Bonnans Fehling method. This method requires a sample treatment to obtain a decolorized and clear solution. Activated charcoal and lead acetate are used for this procedure. The effects of lead poisoning in humans, animals and the environment are known, so it is necessary to minimize their use to achieve sustainable production. Reducing sugars were analyzed in 149 wines and 67 grape musts. For each sample, two different treatments were used: a) 5 mL of lead acetate at 25% and 0.5 g of activated charcoal and b) adding 5 mL of distilled water and 0.5 g of activated carbon. The data were processed by performing simple linear regression analysis. Lead acetate can be eliminated in the pretreatment of must and wine samples to determine reducing sugars by Fehling Bonnans Causse method. This modification of the original technique eliminates the use of lead salts and pollution involved, without faults in the measurement of the reducing sugars.

### Keywords

analytical techniques • wine • Fehling CausseBonnans • reducing sugars • lead

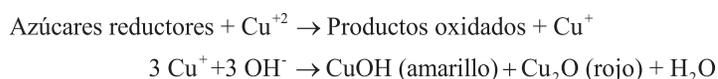
## INTRODUCCIÓN

En el año 2015 Argentina produjo 13.360.000 hectolitros de vino, en 884 bodegas, según el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). El método oficial argentino para determinar el contenido de azúcares reductores en mostos y vinos es el método Fehling Causse Bonnans, que fue adoptado en mayo de 1938 por la Dirección Nacional de Química, organismo preexistente al INV (4). Este método también se cita en el Reglamento Vitivinícola Del Mercosur (11), redactado en 1996.

Existen diferentes formas de determinar azúcares reductores en vinos, tales como los métodos de Lane-Eynon y Rebelein, que se basan en el mismo principio que

el método de Fehling Causse Bonnans. El fundamento es la reacción de los azúcares reductores con el cobre en medio alcalino, en caliente. También existen métodos que permiten determinar el contenido de cada azúcar en particular, tales como los métodos enzimáticos y los cromatográficos, como la Cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con distintos tipos de detectores, por ejemplo, Índice de Refracción (RI) (7).

Un azúcar reductor es aquel que contiene funciones aldehído o cetona en forma libre, capaces de ser oxidadas. Los azúcares reductores, tales como glucosa y fructosa, reducen al  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^+$  en medio alcalino, a temperatura de ebullición, de acuerdo con la siguiente reacción:



El tartrato de sodio y potasio se incluye en el reactivo de Fehling Causse Bonnans para facilitar la separación del precipitado de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , mientras que se mantienen en solución los productos de la oxidación de los azúcares y el cobre que aún no ha sido reducido. El complejo  $\text{Cu}^{+2}$ -tartrato formado es estable aún a altas temperaturas de reacción. El cobre reducido no se combina con el tartrato y precipita rápidamente (14).

Dado que el punto final de este tipo de análisis implica el desarrollo de un color particular, es necesario trabajar con soluciones azucaradas desprovistas de sustancias extrañas, que puedan reaccionar de modo análogo a los azúcares, introduciendo errores por exceso en la determinación. Es especialmente necesario evitar la presencia de polifenoles, ya que presentan poder reductor. Para ello se lleva a cabo el proceso denominado defecación de la muestra. Este tratamiento tiene por objeto obtener una solución azucarada decolorada, límpida y que conserve esta limpidez durante el tiempo necesario para efectuar el análisis. La defecación requerida para el método de Fehling Causse Bonnans se efectúa empleando carbón activado y acetato de plomo (12). El acetato de plomo se prepara al 25% y se emplea a razón de 10% (10 mL cada 90 mL de vino a analizar) en cada muestra (2). Durante la elaboración del vino y hasta su salida al fraccionamiento, la determinación de azúcares reductores se realiza varias veces en cada vasija de vino. Esto implica verter a los desagües un gran volumen de líquidos que contienen plomo.

El plomo (Pb) es un elemento muy abundante en la naturaleza, se obtiene a partir de la galena (SPb, sulfuro de plomo).

Este metal se usa desde la antigüedad, debido a sus características de maleabilidad y ductilidad.

La intoxicación por Pb también se conoce desde hace mucho tiempo. Hipócrates (460 antes de Cristo) ya describe el cólico saturnino.

El Pb puede ser inhalado y absorbido a través del sistema respiratorio o ingerido y absorbido por el tracto gastrointestinal. La absorción percutánea del Pb inorgánico también es posible. Luego de su absorción, el Pb circula en sangre unido a los glóbulos rojos; se distribuye a los tejidos blandos como hígado, riñón, médula ósea y sistema nervioso central, causando diferentes efectos. Se altera la maduración de los glóbulos rojos, provocando anemia. En el sistema nervioso, el metabolismo de la acetilcolina se modifica, disminuyendo la velocidad del impulso nervioso. La afectación del sistema renal es progresiva, causando nefritis crónica. En el tejido óseo desplaza el calcio de los huesos, para depositarse en ellos, con lo que aumenta la fragilidad de los mismos. El Pb produce hipertensión y aumenta el riesgo cardiovascular por afectación renal y por aumento de la resistencia vascular. Además produce alteraciones del ritmo cardíaco (6). El Pb cruza la placenta y la barrera hemato-encefálica. Finalmente se excreta por orina en un 90%, y en menor cantidad en la bilis, piel, cabello, uñas, sudor y leche materna (10). El nivel sanguíneo de Pb materno aumenta el riesgo fetal y de alteraciones neurológicas en los recién nacidos. Los embarazos con niveles elevados de Pb en la sangre tienen un riesgo mayor de partos prematuros, abortos espontáneos, muertes fetales y de recién nacidos con peso bajo para su edad gestacional (10).

La actividad humana libera grandes cantidades de metales, sobre todo al suelo. El exceso de  $\text{Pb}^{+2}$  resulta tóxico para las plantas, especialmente en suelos ácidos; afecta tanto el crecimiento

como la formación de raíces laterales y secundarias. Además la acumulación de  $Cd^{+2}$  ó  $Pb^{+2}$  supone un peligro adicional al integrarse en la cadena trófica (3).

Dados los efectos conocidos de la intoxicación con Pb en seres humanos y animales, así como en la contaminación de suelo y agua, es necesario minimizar su utilización en los análisis químicos en la industria vitivinícola, con el objetivo de lograr una producción sustentable, con mínimo impacto sobre el ambiente.

### Hipótesis

Determinar azúcares reductores en mostos y vinos sin emplear acetato de plomo en la defecación de la muestra, sin que por ello resulte alterado el resultado cuantitativo del análisis.

### Objetivo

Comparar los resultados de la determinación de azúcares reductores en vinos y mostos empleando acetato de plomo junto con carbón activado en el proceso de defecación, con aquellos vinos y mostos en los que la defecación de la muestra se ha realizado sin acetato de plomo, usando solo carbón activado.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 149 muestras de vinos y 67 de mostos (concentrados y sin concentrar). Los diferentes vinos analizados se pueden clasificar en cuanto a su color: 14% rosados, 35% blancos, 51% tintos; en cuanto a su contenido de azúcares: 12% dulces, 46% abocados y 42% secos; y en cuanto a su contenido de  $CO_2$ : 72% tranquilos y 28% espumosos.

Los análisis se realizaron en el laboratorio general, sede central del Instituto Nacional de Vitivinicultura. El método de Fehling Causse Bonnans fue empleado para la determinación de azúcares reductores. En cada una de las muestras se efectuaron dos determinaciones de azúcares reductores. Estas determinaciones se diferenciaron en la forma de efectuar la defecación de la muestra, en forma previa a la titulación. Esta defecación se efectuó de dos maneras: a) empleando 5 mL de acetato de plomo al 25% y 0,5 g de carbón activado y b) empleando 5 mL de agua destilada y 0,5 g de carbón activado. Luego de 15 minutos de reposo, las muestras se filtraron con papel de filtro de poro mediano (Whatman N° 40). Con este filtrado se tituló el licor de Fehling Causse Bonnans, procediendo de la siguiente forma: el filtrado se colocó en una bureta acodada. En un erlenmeyer se colocaron 15 mL de licor de Fehling Causse Bonnans y 50 ml de agua destilada. Luego de homogeneizar la mezcla, se calentó sobre mechero hasta lograr la ebullición. Llegado este punto, se inició la titulación con un ritmo de 2 gotas por segundo. Se tituló sobre el fuego, la agitación se produjo por efecto de la ebullición. El ritmo de goteo fue tal que no se interrumpiera la ebullición, por el descenso de temperatura debido al volumen de filtrado agregado. Se continuó la titulación hasta que el color del Licor de Fehling Causse Bonnans cambió de azul a celeste claro, en ese momento se agregaron dos gotas de azul de metileno al 1%. Este indicador permite observar con mayor exactitud el viraje. Se prosiguió titulando hasta la aparición de una mancha amarilla, que luego se generalizó a toda la masa. La concentración de azúcares reductores se calculó del siguiente modo:

$$\text{Azúcares reductores } \frac{g}{L} = 0,041 \times \frac{1000}{N} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{D} = \times \frac{45,1}{N} \times \frac{1}{D}$$

donde:

0,041 = representa los gramos de azúcar invertido, contenidos en 8,2 mL de Licor de Neubauer (solución de azúcar invertido 5 g/L), que reaccionan con 15 mL de Licor de FehlingCausseBonnans

N = volumen de filtrado consumido en la titulación

la fracción 11/10 = dilución realizada por el agregado de acetato de plomo

D = es la dilución del filtrado

Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente aplicando regresión simple lineal, con el programa Statgraphics plus<sup>(C)</sup> 4.0. copyright 1994-1999 by Statistical Graphics Corp. USA.

## RESULTADOS

### Vinos

Se determinó azúcares reductores en 149 vinos, empleando las dos variantes de tratamiento previo de la muestra. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión simple lineal. Se obtuvo la ecuación 1.

Puesto que el valor de probabilidad (P) en la tabla análisis de la varianza es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre el contenido de azúcares reductores en vino sin emplear acetato de

plomo en la defecación y el contenido de azúcares reductores en vino empleando acetato de plomo en la defecación, con un nivel de confianza del 95,0%.

El coeficiente de determinación  $R^2$  indica que la variable Azúcares Reductores sin Acetato de Plomo permite explicar en un 99,86% la variable Azúcares Reductores con acetato de plomo (figura 1, pág. 202), ecuación 2.

### Mostos

Se determinó azúcares reductores en 67mostos, empleando las dos variantes de tratamiento previo de la muestra. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión simple lineal. Se obtuvo la ecuación 3.

Puesto que el valor de probabilidad (P) en la tabla Análisis de la varianza es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre el contenido de Azúcares reductores en vino sin emplear acetato de plomo en la defecación y el contenido de azúcares reductores en vino empleando acetato de plomo en la defecación, con un nivel de confianza del 95,0% (ecuación 4).

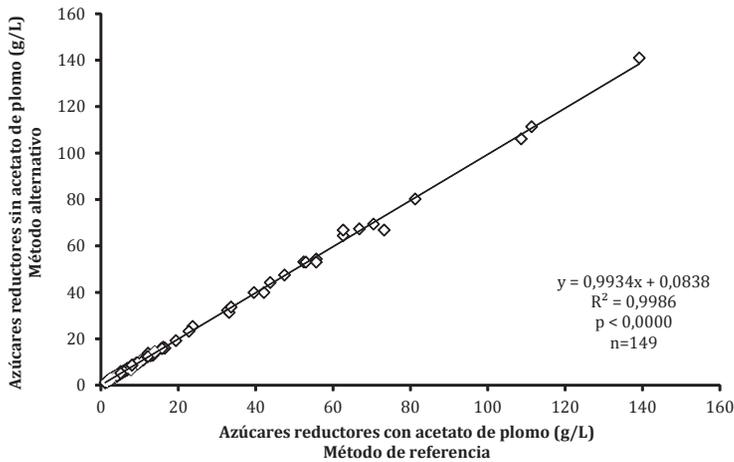
El coeficiente de determinación  $R^2$  indica que la variable Azúcares Reductores sin Acetato de Plomo permite explicar en un 99,77% la variable Azúcares Reductores con acetato de plomo (figura 2, pág. 202).

$$\text{Az.Red. (g/L) sin acetato de plomo} = 0,9934^* \text{Az. Red. (g/L) con acetato de plomo} + 0,0838 \quad (1)$$

$$R^2(\text{coeficiente de determinación}) = 99,86\% \quad (2)$$

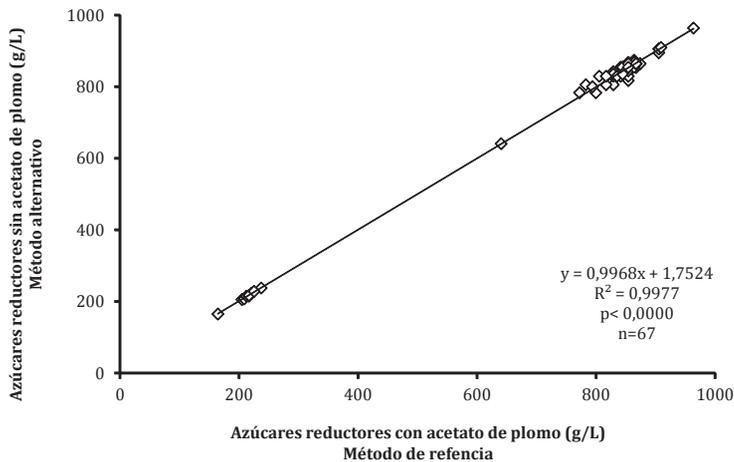
$$\text{Az. reductores (g/L) sin acetato de plomo} = 0,9968^* \text{Az. Red. (g/L) con acetato de plomo} + 1,7524 \quad (3)$$

$$R^2(\text{coeficiente de determinación}) = 99,77\% \quad (4)$$



**Figura 1.** Regresión en vinos.

**Figure 1.** Regression in wines.



**Figura 2.** Regresión en mostos.

**Figure 2.** Regression in Grape Must.

## DISCUSIÓN

La defecación con acetato de plomo no es la única vía para obtener un filtrado límpido. Browne y Zerban (1948) postulan que el uso de acetato de plomo como clarificante, causa una precipitación y oclusión de azúcares

reductores en el precipitado de sales de plomo; esta precipitación es importante, oscilando de 3 a 17% para glucosa, y 8 a 35 % para fructosa si se emplea acetato básico de plomo. Si se utiliza acetato neutro de plomo, las precipitaciones se

reducen a 0,9% para glucosa y 0% para fructosa. Estos autores indican que en algunos casos, se puede evitar el uso de acetato de plomo, reemplazándolo por kieselguhr o alúmina. Se demuestra que el error causado por omitir la defecación con acetato de plomo no excede el error experimental de la determinación, en el caso de azúcar de caña (sacarosa), pero es necesario defecar con plomo cuando se analizan melazas.

P. Jaulmes (1951) indica que en forma previa a la reacción con el licor cúprico de la muestra, es necesario eliminar las sustancias no azucaradas que puedan reducir al cobre, en particular las pectinas y los taninos. Para ello se decolora el vino, se defeca el vino con licores plúmbicos o mercúricos, o por adsorción del tanato de zinc debido al ferrocianuro de zinc. El uso del plomo y carbón activado genera pérdidas apreciables de fructosa. El zinc resulta adecuado para vinos dulces poco coloreados y mostos, pero la decoloración es incompleta en vinos tintos.

J. Ribéreau Gayon y E. Peynaud (1958) sostienen que el empleo de un método químico de valoración de los azúcares exige que se opere con soluciones azucaradas despojadas de sustancias extrañas, en particular polifenoles. Tales soluciones deben estar perfectamente decoloradas, limpias y conservar su limpidez durante el tiempo necesario. La precisión de los resultados depende de la defecación del vino. Para ello indican tres posibilidades 1) para una prueba rápida, la decoloración con carbón; 2) para una valoración rigurosa, la defecación con acetato de plomo y 3) para mayor precisión, usar defecación con sales mercúricas. El carbón puede retener azúcares cuando se usa en fuertes dosis para los vinos tintos. El acetato de plomo también puede arrastrar pequeñas cantidades de fructosa y glucosa, la defecación

no es completa y debe complementarse con carbón, las soluciones decoloradas se enturbian pronto si no se acidulan. Por estas razones se sugiere defecar con sales mercúricas, ya sea sulfato o acetato mercúrico. J. Ribéreau Gayon *et al.* (1972), citan para la defecación el uso de resinas intercambiadoras de aniones, óxido de mercurio, acetato neutro de plomo y ferrocianuro de zinc.

Ough y Amerine (1988) citan el uso de acetato de plomo, acetato básico de plomo y ferrocianuro de zinc como agentes para la defecación de las soluciones azucaradas.

Madrid Cenzano *et al.* (2003), proponen hacer la defecación de los vinos con acetato de plomo, pero sugieren emplear una defecación con hexacianoferrato (III) de cinc en vinos blancos, vinos dulces poco coloreados y mostos, sin fundamentar la elección de este método.

Esto permite considerar que no es indispensable el empleo de acetato de plomo en el pretratamiento de una muestra, para determinar en forma exacta el contenido de azúcares reductores de un mosto o un vino.

## CONCLUSIONES

Dada la relación establecida entre el método de referencia y el método alternativo, se considera que puede eliminarse el uso de acetato de plomo en el tratamiento previo de las muestras de mostos y vinos, para determinar azúcares reductores por el método de Fehling Causse Bonnans. La defecación de la muestra se realiza empleando solo carbón vegetal activado. Esta modificación de la técnica original permite eliminar el empleo de sales de plomo y la contaminación que ello implica, sin incurrir en errores apreciables en la medida de los azúcares reductores.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Browne, C. A.; Zerban, F. W. 1948. Physical and Chemical methods of sugar analysis. Wiley&Sons, Chapman &Hall, London. p. 641-651; 744-774; 786-803.
2. Fernández, Nora M. de; Zeballos, C. H. 1972. Manual del Enólogo. Imp. Regalado, Mendoza, Argentina. p. 69-89.
3. García Vargas, D. 2006. Efectos fisiológicos y compartimentación radicular en plantas de *Zea mays* L. expuestas a la toxicidad por plomo. Tesis. Universidad Autónoma de Barcelona, España. p. 14-15.
4. Instituto Nacional de Vitivinicultura. 2013. Tolerancias analíticas y resoluciones reglamentarias. Disponible en: <http://www.inv.gov.ar>. Fecha de la consulta: 30 de julio de 2015.
5. Jaulmes, P. 1951. Analyse des vins. Librairie Poulain, Montpellier, France. p. 170-177.
6. Labanda Urbano, P. H.; Fernández García, C. 2012. Saturnismo, a propósito de un caso. Medicina y Seguridad del Trabajo. Madrid. 58(227): 168-173.
7. Luque de Castro, M. D.; González Rodríguez, J.; Pérez Juan, P. 2005. Analytical methods in wineries. Is it time to change? Food Reviews International. 21(2): 231-265.
8. Madrid Cenzano, J.; Madrid Vicente, A.; Moreno Tejero, G. 2003. Análisis de vinos, mostos y alcoholes. AMV ediciones. Mundi Prensa, Madrid, España. p. 156-164.
9. Ough, C. S.; Amerine, M. 1988. Methods for analysis of musts and wines. University of California, Wiley, New York, USA. p. 39-48.
10. Poma, P. Intoxicación por plomo en humanos. 2008. An. Fac. Med. V. 69 N°2. Lima, Perú. Valdivia Infantas, Melinda. Intoxicación por plomo. Rev. Soc. Per. Med. Inter. 2005. 18(1): 123-125.
11. Reglamento Vitivinícola del Mercosur. 1996. p. 16-17.
12. Ribéreau Gayon, J.; Peynaud, E. Análisis de vinos. 1958. Editorial Aguilar. Madrid. p. 219-222.
13. Ribéreau Gayon, J.; Peynaud, E.; Sudraud, P. Ribéreau Gayon, P. 1972. Tratado de Enología, Ciencias y técnicas del vino. Tomo I: Análisis y Control de los vinos. Editorial Hemisferio Sur, Argentina. p. 282-283.
14. Zoecklein, B. W.; Fugelsang, K.C.; Gump, B.; Nury, F. S. 1994. Wine analysis and production. Chapman &Hall, New York. p. 89-96.