



Determinación de hierro **y azúcares reductores en** **una muestra de vino** **artesanal**

Alumno: Franco Olivera y Facundo Vidal

Docentes: R. Britos, A. Gatto, N. Boscana,

Asignatura: Proyecto Final Integrado

Grupo: 3°BO Química Industrial

Fecha de realización: 07/11/22-08/12/22

Resumen:

El proyecto se basó en la determinación de la concentración de los azúcares reductores y de hierro (III) en una muestra de vino artesanal elaborado en junio de 2022. La pregunta que se planteó fue: ¿qué concentración de hierro y azúcares reductores tiene una muestra artesanal de vino rosado moscatel abocado realizada en junio de 2022? Esta determinación se realizó por el método Rebelein en el caso de los azúcares, basándose en las propiedades reductoras de la glucosa y la fructosa sobre las sales cúpricas. Por espectrofotometría se realizó la determinación de hierro a partir del complejo hexatiocianatoferrato (III). Como hipótesis se planteó que dado que en el proceso de fermentación fueron agregados azúcares para completar dicho proceso tendría un valor moderado de azúcares residuales. En cuanto a la concentración de hierro (III) no se esperaban alteraciones en cuanto al valor normal de hierro en la uva ya que en el proceso no se utilizaron materiales que pudieran contaminarlo, pero se tomó en cuenta que sí pudo haber alteraciones en su concentración debido a las trazas de hierro en los reactivos empleados. Se obtuvo un valor de $(14,00 \pm 0,02)$ g/L para azúcares reductores, que de acuerdo a la normativa del *Decreto N° 325/997 de 03/09/1997 artículo 1* es considerado un vino abocado (vino que, sin llegar a ser dulce, tiene ciertas sensaciones azucaradas) y un valor de $(2,0000 \pm 0,0003)$ mg/L de hierro (III) lo cual está dentro de los parámetros establecidos según la USDA ($3,7$ mg/L de Fe^{3+}).

Abstract:

The project was based on the determination of the concentration of reducing sugars and iron (III) in a sample of artisanal wine made in June 2022. The question that was posed was: What concentration of iron and reducing sugars does an artisan sample of muscatel rosé wine made in June 2022 have? In order to carry out this determination, it was carried out by the Rebelein method in the case of sugars, which is based on the reducing properties of glucose and fructose on cupric salts, and by spectrophotometry the determination of iron, where Lambert's law was used. -Beer to determine the concentration of this parameter from the absorbance of the hexathiocyanatoferrate (III) complex. As a hypothesis, it was proposed that since sugars were added in the fermentation process to complete said process, it would have a moderate value of residual sugars. Regarding the concentration of iron (III), no alterations were expected in terms of the normal value of iron in the grape since no materials that could contaminate it were used in the process, but it was taken into account that there could be alterations in its concentration. due to traces of iron in the reagents used. A value of 14.00 ± 0.02 g/L was obtained for reducing sugars, which according to the regulations of *Decreto N° 325/997 de 03/09/1997 artículo 1* is considered a doomed wine (Wine that, without become sweet, it has certain sugary sensations.) and a value of 2.0000 ± 0.0003 mg/L of iron (III) which is within the parameters established by the USDA ($3,7$ mg/L de Fe^{3+}).

Introducción:

El tema elegido vino fue seleccionado tanto por curiosidad de los integrantes de este equipo como por interés debido a los posibles beneficios en cuanto al consumo moderado de este y sus parámetros de calidad, además de aplicar técnicas aprendidas durante el curso, no obstante, el consumo de vino también puede resultar perjudicial a la salud y lo que buscamos en este documento es tan solo informar al respecto.

Pregunta investigable:

¿Qué concentración de hierro y azúcares reductores tiene una muestra artesanal de vino moscatel dulce realizada en junio de 2022?

Objetivos:

- Determinar la cantidad de azúcares reductores en una muestra de vino artesanal expresada como glucosa.
- Determinar la concentración de hierro en una muestra de vino artesanal.

Hipótesis:

Se espera tener un valor moderado de azúcares reductores debido a que el proceso de fermentación del vino fue realizado con agregados de azúcar, por lo que luego de terminado el proceso de fermentado quedaron restos de estos azúcares. En cuanto a la concentración de hierro en la muestra de vino se espera obtener un valor igual o menor a 4 mg/L debido a que no se utiliza ningún recipiente que pudiera alterar las concentraciones naturales de hierro en la uva.

Marco teórico

El vino es la bebida que se obtiene de la fermentación alcohólica total o parcial, del jugo de uvas maduras. El vino está formado por diferentes componentes, de los cuales el principal es el agua, que está presente entre un 82 % y un 88 %. El segundo componente más importante es el alcohol, que surge gracias a la fermentación, y le da cuerpo y aroma al vino. La graduación del vino suele variar entre el 7 % y el 17 %, dependiendo del tipo de vino. El resto de componentes aparecen en menor cantidad, como azúcares, influyen en el sabor del vino; taninos, que le dan color y textura al vino; sustancias volátiles, que constituyen parte del aroma; ácidos, que participan también en el sabor del vino; y algunos otros de menor importancia (Lucas, 2015).

Hay varios parámetros que miden la calidad de un vino, pero técnicamente estos son los más comunes:

- **Densidad:** Es un parámetro que se percibe al paladar como la estructura del vino o cómo espesor en boca. Como criterio de calidad consideramos vinos buenos aquellos que son ligeros pero con mucho cuerpo (sensación de volumen).
- **Grado alcohólico:** Este parámetro viene determinado por muchos factores: la variedad de la uva, el momento de la vendimia y los posteriores procesos de fermentación y tratamientos posteriores. El grado alcohólico es uno de los factores más importantes para conservar las características de un vino, pero no es determinante para la calidad. La influencia del grado alcohólico influye en la percepción sensorial del vino; Esto se refleja en el equilibrio del sabor. También puede enmascarar los componentes volátiles del vino. En cuanto al consumo, es uno de esos aspectos “subjetivos e individuales” que nos permite elegir los vinos favoritos.
- **pH:** Es uno de los factores más variables del vino, derivado del equilibrio de los ácidos que lo componen. Esta es la concentración real de ácido o iones H_3O^+ . Aquí también el tipo de suelo, la variedad de uva y el grado de madurez influyen en la acidez de la uva. Los niveles de ácido tartárico y ácido málico, que son los más comunes, pueden variar ampliamente. Es importante como criterio de calidad porque influye en el sabor del vino. El carácter ácido es fundamental porque, asociado a los polifenoles, contrasta las notas dulces del etanol.
- **Acidez volátil:** Son todos los ácidos presentes en el vino, de los cuales el ácido acético es el más importante. Este parámetro debe ser lo más bajo y estable posible, ya que contribuye a la conservación del vino, ya que es un producto que no contiene conservantes artificiales. El aumento de la acidez volátil tiene un efecto negativo y provoca picaduras en el vinagre. Durante la cata se perciben aromas y sabores a vinagre.
- **Color:** Es uno de los factores de calidad, visible a simple vista, que habla de la estructura, el cuerpo y el paso por boca del vino. Medir los matices del vino en la copa, su luminosidad y su transparencia nos puede dar una primera valoración. También en este caso, el vino tendrá diferentes tonalidades dependiendo de la variedad de uva y de los procesos enológicos que haya sufrido posteriormente, pero si existen defectos, estos pueden verse reflejados en su color. A veces el vino puede estar turbio o parecer opaco debido a los sólidos en suspensión que pueden haber aparecido en la botella; en este caso, con la ayuda de una jarra, podremos retirarlos fácilmente. Otras veces, este aspecto del vino está ligado a una alteración microbiológica y por tanto a un defecto del mismo.
- **Hierro:** El vino contiene metales en su composición, siendo el cobre y el hierro los dos más importantes. Estos ocurren en el vino debido a la "contaminación" durante el manejo de la uva y los procesos y equipos de vinificación. Su inestabilidad puede provocar fallas en las instalaciones de

almacenamiento de vinos tintos y blancos. La cantidad máxima de hierro que un vino puede contener sin estropearse depende del tipo, composición y, en parte, de las condiciones de almacenamiento (2015).

La fermentación se produce por la acción metabólica de levaduras, que transforman los azúcares naturales del fruto (glucosa y fructosa) en etanol y gas en forma de dióxido de carbono. El metabolismo de la glucosa se refiere a las diversas reacciones bioquímicas que tienen lugar para la formación, descomposición e interconversión de glucosa en los seres vivos. El metabolismo de la glucosa implica dos vías bioquímicas diferentes; uno de ellos es aeróbico (requiere dioxígeno) y el otro es anaeróbico (sin dioxígeno). La vía aeróbica ocurre en las mitocondrias de las células y resulta en el uso eficiente de glucosa para liberar energía; mientras que la vía anaeróbica ocurre en el citoplasma de las células y da como resultado una liberación moderada de energía (El Metabolismo De La Glucosa Laparoscopia.MD, s.f.).

En la glucólisis, que también se denomina vía de Embden-Meyerhof-Parnas, cada molécula de glucosa se divide y se transforma en dos unidades de tres carbonos (piruvato). Durante este proceso se oxidan numerosos átomos de carbono. La pequeña cantidad de energía que se captura durante las reacciones glucolíticas (alrededor del 5 % de la total disponible) se almacena de forma temporal en dos moléculas de ATP (trifosfato de adenosina o adenosina trifosfato) y una de NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido) (la forma reducida de la coenzima NAD^+). El destino metabólico subsiguiente del piruvato depende del organismo que se considere y de sus circunstancias metabólicas. En los organismos anaerobios (aquellos que no utilizan dioxígeno para generar energía), el piruvato puede convertirse en productos de desecho como etanol, ácido láctico, ácido acético y moléculas semejantes. Utilizando el oxígeno como aceptor electrónico terminal, los organismos aerobios, como los animales y los vegetales, oxidan por completo el piruvato para formar CO_2 y H_2O en un complejo mecanismo escalonado, conocido como respiración aerobia (McKee y McKee, 2014, p. 236).

La fermentación alcohólica (denominada también como fermentación del etanol o incluso fermentación etílica) es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (dioxígeno - O_2), originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los glúcidos (como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, el cava, etc. Aunque en la actualidad se empieza a sintetizar también etanol mediante la fermentación a nivel industrial a gran escala para ser empleado como biocombustible (Vázquez, 2007).

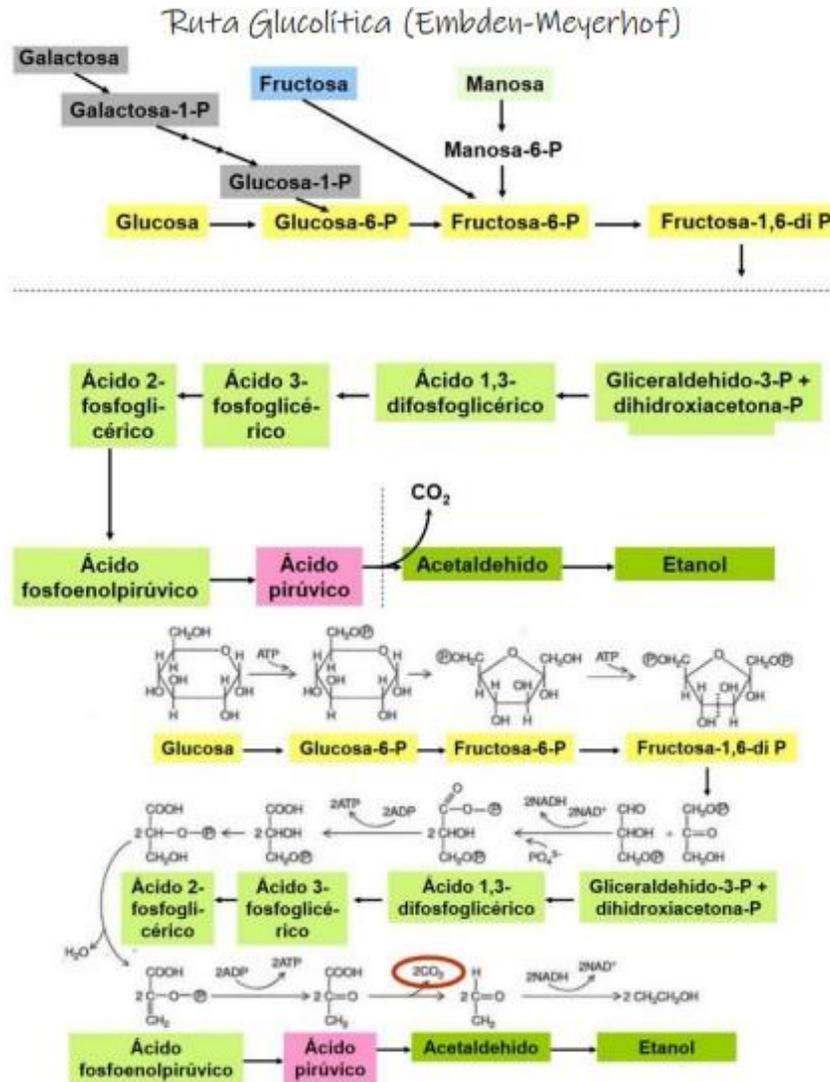
La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de dioxígeno para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO_2 como desechos consecuencia de la fermentación. Las levaduras y bacterias causantes de este fenómeno son microorganismos muy habituales en las frutas y cereales y contribuyen en gran medida al sabor de los productos fermentados. Una de las principales características de estos microorganismos es que viven en ambientes completamente carentes de dioxígeno, máxime durante la reacción química, por esta razón se dice que la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico (Harden, 1914).

El proceso de fermentación alcohólica es un complejo proceso biológico originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los glúcidos como por ejemplo, la glucosa.

El agente biológico de la fermentación alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (un hongo unicelular utilizado industrialmente en la producción de pan, cerveza y vino) que se encuentra de forma natural en los hollejos de la uva. La cantidad de ATP producido en el cuerpo afecta directamente la cantidad de células adquiridas. La disponibilidad de glucosa y dioxígeno determina los mecanismos utilizados por la

levadura.

- ✓ Efecto Pasteur: activación de las vías de fermentación en ausencia de dioxígeno.
- ✓ Efecto Crabtree: inhibición de la respiración por altas concentraciones de glucosa. La levadura puede utilizar los siguientes monosacáridos como sustratos: glucosa, fructosa, galactosa y manosa (la glucosa es el sustrato preferido). Los disacáridos como la sacarosa y la maltosa tienen enzimas que los hidroliza, pero la lactosa no. Tampoco pueden metabolizar polisacáridos complejos como el almidón y la celulosa (Gatto, 2022).



No toda la glucosa se convierte en etanol, parte del sustrato se utiliza para producir más células (coproducto) El etanol se recupera en un 90 - 93 % del rendimiento teórico. En el fermentador ocurren otras reacciones, en las que se producen otros productos además del etanol como por ejemplo:

Glicerol: en las fermentaciones industriales se produce hasta aproximadamente 1,0 % m/V.

- ✓ Ácido acético o etanoico.
- ✓ Ácido láctico.
- ✓ Ácido succínico.
- ✓ Acetaldehído.
- ✓ Aceites/alcoholes de fusel: isoamílico, butílico, propílico y heptílico. Se les denomina aceites por su apariencia. Son subproductos en la fermentación alcohólica a partir de granos.

Las levaduras son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Son consideradas hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son mayores que las bacterias alcanzando un diámetro máximo de entre 4 y 5 μm . Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecen como micelio bajo condiciones ambientales especiales.

El contenido de proteínas en las levaduras varía entre el 40 - 50 % de su masa seca y tienen una excelente calidad en función de su perfil de aminoácidos esenciales (Pérez, 2007).

Las levaduras son cuerpos unicelulares (generalmente de forma esférica) de un tamaño que ronda los 2 a 4 μm y que están presentes de forma natural en algunos productos como las frutas, cereales y verduras. Son lo que se denominan: organismos anaeróbicos facultativos, es decir que pueden desarrollar sus funciones biológicas sin dioxígeno. Se puede decir que el 96 % de la producción de etanol la llevan a cabo hongos microscópicos, diferentes especies de levaduras, entre las que se encuentran principalmente: *saccharomyces cerevisiae*, *khuyveromyces fragilis*, *torulospora* y la *zymomonas mobilis*. Los microorganismos responsables de la fermentación son de tres tipos: bacterias, mohos y levaduras. Cada una de estos microorganismos posee una característica propia sobre la fermentación que son capaces de provocar, en algunos casos son capaces de proporcionar un sabor característico al producto final (como en el caso de los vinos o cervezas). A veces estos microorganismos no actúan solos, sino que cooperan entre sí para la obtención del proceso global de fermentación. Las propias levaduras se han empleado a veces en la alimentación humana como un subproducto industrial. Se ha descubierto que en algunos casos es mejor inmovilizar (reducir el movimiento) de algunas levaduras para que pueda atacar enzimáticamente mejor y con mayor eficiencia sobre el sustrato de glúcidos evitando que los microorganismos se difundan facilitando su recuperación (los biocatalizadores suelen ser caros), para ello se emplean 'fijadores' como las como agar, alginato de calcio, astillas de madera de bálsamo, etcétera (Vázquez, 2007).

Algunas cepas de levaduras tienen eficiencias de fermentación altas sin necesidad de fijación, incluso a relativas velocidades de movilidad, tal y como puede ser el caso de la *zymomonas mobilis* (de esta levadura ha sido extraída en el año 2005 completamente la secuencia genómica). Esta levadura ha sido siempre rechazada de la fermentación de la cerveza y de la sidra por proporcionar sabores y olores desagradables. No obstante posee una alta resistencia a sobrevivir a concentraciones elevadas de etanol lo que la convierte en una levadura ideal en la generación de etanol para usos no comestibles (como puede ser biocombustibles). El biólogo Lindner en el año 1928 fue el primero en describir la levadura *zymomonas mobilis* (conocida en honor de su descubridor como *Z. lindneri*, *thermobacterium mobile* o *pseudomonas lindneri*). Una de las características de esta levadura es que emplea la vía Entner-Doudoroff para el metabolismo de la glucosa, en lugar de la más habitual vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (2007).

Cuando el medio es rico en azúcar (como puede ser el caso de las melazas o siropes), la transformación del mismo en alcohol hace que la presencia de una cierta concentración (generalmente expresada en grados

brix) afecte a la supervivencia de levaduras no pudiendo realizar la fermentación en tal medio (las altas concentraciones de azúcar frenan los procesos osmóticos de las membranas de las células). Aunque hay distintos tipos de levaduras con diferentes tolerancias a las concentraciones de azúcares y de etanol, el límite suele estar en torno a los 14 ° de alcohol para las levaduras del vino, por ejemplo. Otros factores como el número de levaduras (contadas en el laboratorio, o la industria, a veces mediante cámaras de Neubauer) (2007).

Algunas enzimas participan en la fermentación, como puede ser la diastasa o la invertasa. Aunque la única responsable de convertir los glúcidos en etanol y dióxido de carbono es la zimasa. La zimasa es la responsable final de dirigir la reacción bioquímica que convierte la glucosa en etanol. La idea de que una sustancia albuminoide específica desarrollada en la célula de la levadura llega a producir la fermentación fue ya expuesta en el año 1858 por Moritz Traube como la teoría enzimática o fermentativa y, más tarde, ha sido defendida por Felix Hoppe-Seyler hasta llegar al descubrimiento de Eduard Buchner que llegó a hacer la fermentación sin la intervención de células y hongos de levadura (2007).

Bioquímica de la reacción

La glucólisis es la primera etapa de la fermentación, lo mismo que en la respiración celular, y al igual que ésta necesita de enzimas para su completo funcionamiento. A pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos una forma esquemática de la reacción química de la fermentación alcohólica puede describirse como una glicólisis (en la denominada *vía Embden-Meyerhof-Parnes*) de tal forma que puede verse cómo participa inicialmente una molécula de hexosa:



Se puede ver que la fermentación alcohólica es desde el punto de vista energético una reacción exotérmica, se libera una cierta cantidad de energía. La fermentación alcohólica produce gran cantidad de CO₂, que es la que provoca que el cava (al igual que el Champagne y algunos vinos) tengan burbujas. Este CO₂ (denominado en la edad media como *gas vinorum*) pesa más que el aire, y puede llegar a crear bolsas que desplazan el dióxigeno de los recipientes donde se produce la fermentación. Por ello es necesario ventilar bien los espacios dedicados a tal fin. En las bodegas de vino, por ejemplo, se suele ir con una vela encendida y colocada a la altura de la cintura, para que en el caso de que la vela se apague, se pueda salir inmediatamente de la bodega. La liberación del dióxido de carbono es a veces "tumultuosa" y da la sensación de hervir, de ahí proviene el nombre de fermentación, palabra que en castellano tiene por etimología del latín *fervere* (Lubert, 1975).

Un cálculo realizado sobre la reacción química muestra que el etanol resultante es casi un 51 % de la masa, los rendimientos obtenidos en la industria alcanzan el 7 %. Se puede ver igualmente que la presencia de fósforo (en forma de fosfatos), es importante para la evolución del proceso de fermentación. La fermentación alcohólica se produce por regla general antes que la fermentación maloláctica, aunque existen procesos de fermentación específicos en los que ambas fermentaciones tienen lugar al mismo tiempo. La presencia de azúcares asimilables superiores a una concentración sobre los 0,16 g/L produce invariablemente la formación de alcohol etílico en proceso de crecimiento de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) incluso en presencia de exceso de dióxigeno (aeróbico), este es el denominado efecto Crabtree, este efecto es tenido en cuenta a la hora de estudiar y tratar de modificar la producción de etanol durante la fermentación (1975).

Si bien el proceso completo (*vía Embden-Meyerhof-Parnes*) descrito simplificado anteriormente explica los productos resultantes de la fermentación etílica de un hexano, cabe destacar que el proceso se puede detallar

en una glicólisis previa gobernada por un conjunto de enzimas en la que se obtiene un piruvato tal y como se describe a continuación:



La reacción química se describe como la reducción de dos moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) de NADH (forma reducida del NAD^+) con un balance final de dos moléculas de ADP que finalmente por la reacción general mostrada anteriormente se convierten en ATP (adenosín trifosfato). Otros compuestos trazados en menores proporciones que se encuentran presentes tras la fermentación son: el ácido succínico, el glicerol, el ácido fumárico (1975).

En más detalle durante la fermentación etílica en el interior de las levaduras, la vía de la glucólisis es idéntica a la producida en el eritrocito (con la excepción del piruvato que se convierte finalmente en etanol). En primer lugar el piruvato se descarboxila mediante la acción de la piruvato descarboxilasa para dar como producto final acetaldehído liberando por ello dióxido de carbono (CO_2) a partir de iones hidrógeno (H^+) y electrones del NADH . Tras esta operación el NADH sintetizado en la reacción bioquímica catalizada por el GADHP se vuelve a oxidar por el alcohol deshidrogenasa, regenerando NAD^+ para la continuación de la glucólisis y sintetizando al mismo tiempo etanol. Se debe considerar que el etanol va aumentando de concentración durante el proceso de fermentación y debido a que es un compuesto tóxico, cuando su concentración alcanza aproximadamente un 12 % de volumen las levaduras tienden a morir. Esta es una de las razones fundamentales por las que las bebidas alcohólicas (no destiladas) no alcanzan valores superiores a los 20 % de concentración de etanol (1975).

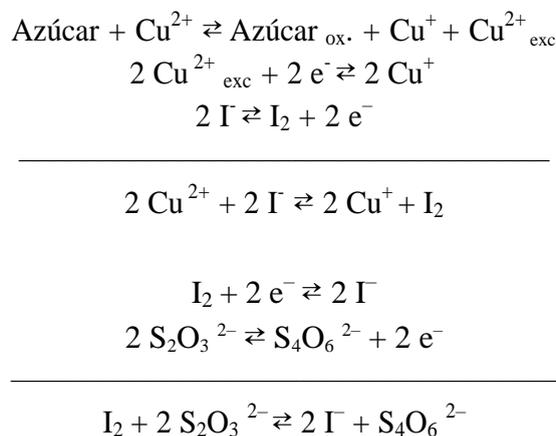
Balance energético

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico exotérmico (libera energía) y moléculas de ATP necesarias para el funcionamiento metabólico de las levaduras. Debido a las condiciones de ausencia de dióxígeno durante el bioproceso, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la glicólisis de la glucosa con la formación de moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. El balance a nivel molecular del proceso se puede decir que genera 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Si se compara este balance con el de la respiración celular se verá que se generan 38 moléculas de ATP . A pesar de ello parece ser suficiente energía para los organismos anaeróbicos. La energía libre de Gibbs (entalpía libre) de la reacción de fermentación etílica muestra un valor de ΔG de - 234,6 kJ/mol (en un entorno neutro de $\text{pH} = 7$) este valor negativo de la energía libre de Gibbs indica que: desde el punto de vista termodinámico la fermentación etílica es un proceso químico espontáneo (Fogler, 2001)

La fermentación del vino es de las más conocidas y estudiadas por afectar a una industria muy extendida y con gran solera. En el caso del vino las levaduras responsables de la vinificación son unos hongos microscópicos que se encuentran de forma natural en los hollejos de las uvas (generalmente en una capa en forma de polvo blanco fino que recubre la piel de las uvas (*vitis vinifera l.*) y que se denomina "pruina"). Los vinos deben tener una cantidad de alcohol debido a la fermentación de al menos un 9 % en volumen. Con la excepción de los vinos verdes como puede ser el chacolí que pueden tener una graduación inferior. La fermentación alcohólica del vino es muy antigua y ya en la Biblia se hacen numerosas referencias al proceso. Las especies de levaduras empleadas en la elaboración del vino suelen ser por regla general las *Saccharomyces cerevisiae* aunque a veces también se emplean la *S. bayanus* y la *S. oviformis*, aunque en muchas variedades de vides la *kloeckera apiculata* y la *metschnikowia pulcherrima* son levaduras endógenas capaces de participar en las primeras fases de la fermentación. Para frenar la aparición de bacterias indeseables y otros organismos limitantes de la fermentación se suele esterilizar el mosto a veces con dióxido de azufre (SO_2) antes del proceso (Harden, 1914).

La elaboración del vino pasa por una fermentación alcohólica de la fruta de la vid en unos recipientes (hoy en día elaborados en acero inoxidable) en lo que se denomina fermentación tumultuosa debido a gran ebullición que produce durante un periodo de 10 días aproximadamente (llegando hasta aproximadamente unas dos semanas). Tras esta fermentación 'principal' en la industria del vino se suele hacer referencia a una fermentación secundaria que se produce en otros contenedores empleados en el trasiego del vino joven (tal y como puede ser en las botellas de vino). Los vinos blancos fermentan a temperaturas relativamente bajas de 10°-15 °C y los vinos tintos a temperaturas mayores de 20°-30 °C. A veces se interrumpe voluntariamente la fermentación etílica en el vino por diversas causas, una de las más habituales es que haya alcanzado la densidad alcohólica establecida por la ley. En otros casos por el contrario se activa de forma voluntaria el proceso de fermentado mediante la adición de materiales azucarados, este fenómeno recibe el nombre de chaptalización y está muy regulado en los países productores de vino (Hutkins, 2006).

Para la determinación de los azúcares reductores en el vino utilizamos el método de Rebelein que se basa en las propiedades reductoras de la glucosa y fructosa sobre las sales cúpricas. Estos azúcares son oxidados a la temperatura de ebullición por un exceso de solución alcalina de Cu^{2+} que contiene tartrato para mantener la estabilidad de la solución. El Cu^{2+} es reducido a Cu^+ y el Cu^{2+} en exceso se puede determinar por yodometría después de adicionar exceso de KI y acidular. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



El azúcar es un componente esencial en la producción de vino. Durante la fermentación alcohólica, la levadura consume azúcares encontrados en el jugo de uva o mostos y lo convierte en etanol y dióxido de carbono. En el caso de ciertos estilos de vinos, tales como el semi dulce o para postres, algo de azúcar es permitido que permanezca tras la fermentación. Esta azúcar residual puede servir para dar un carácter más dulce a la mezcla final o jugar un rol en la estabilidad microbiana.

Los azúcares primarios fermentables encontrados en las uvas son la glucosa y la fructosa. Estos dos azúcares simples son también conocidos como azúcares reductores porque contienen grupos funcionales capaces de ser oxidados bajo ciertas condiciones. Un fabricante de vinos interesado en confirmar el contenido de azúcar residual de un producto tras la fermentación o un producto de vino terminado, puede utilizar titulación redox para facilitar la oxidación y el análisis de estos azúcares (Hanna instruments, 2019).

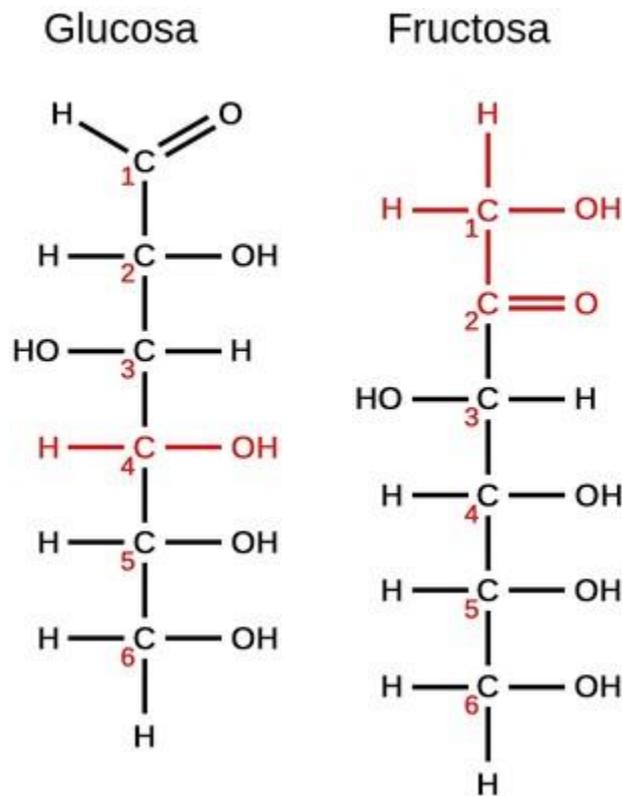


Imagen 1: Estructura de la glucosa y fructosa

Se fundamenta también en la reducción del reactivo cuproalcalino. No es necesaria decoloración alguna, lo que representa una mayor exactitud en la determinación, por cuanto no hay pérdidas de materias reductoras, que siempre tienen lugar en el proceso de decoloración. Un adicional calentamiento puede causar variaciones en los resultados, por ello es necesario respetar los tiempos indicados de ebullición (3 minutos). (Rebelein, 1973).

Ambos se someten a reducción química en soluciones cuproalcalinas. El azúcar se almacena en las uvas durante la maduración. Cuando se completa la fermentación, el vino resultante casi no contiene sustancias azucaradas (García, 2015).

Los vinos se pueden clasificar según su cantidad de azúcares, ésta es su clasificación según el Decreto N° 325/997 de 03/09/1997 artículo 1.

Para los vinos livianos, de mesa, frisante y finos:

- ✓ Seco: Hasta 4 g/L de azúcar.
- ✓ Demi Sec., Medio Seco o Abocado: Superior a 4 y hasta 25 g/L de azúcar.
- ✓ Suave o Dulce: superior a 25 g/L y hasta 80 g/L de azúcar.

Para los vinos espumosos naturales o gasificados:

- ✓ Nature: hasta 3 g/L de azúcar.
- ✓ Extra Brut: Superior a 3 g/L y hasta 8 g/L de azúcar.
- ✓ Brut: Superior a 8 g/L y hasta 15 g/L de azúcar.
- ✓ Sec o Seco: Superior a 15 g/L y hasta 20 g/L.
- ✓ Medio dulce, medio seco, demi sec: Superior a 20 g/L y hasta 60 g/L de azúcar.
- ✓ Dulce: Superior a 60 g/L de azúcar.

Para licorosos:

- ✓ Seco: hasta 20 g/L de azúcar.
- ✓ Dulce: Superior a 20 g/L de azúcar.

Para compuesto:

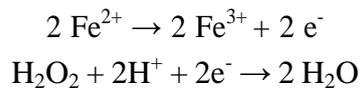
- ✓ Seco o Dry: hasta 40 g/L de azúcar.
- ✓ Medio Seco, medio dulce: Superior a 40 g/L y hasta 80 g/L de azúcar.
- ✓ Dulce: Superior a 80 g/L de azúcar.

La calidad organoléptica del vino depende principalmente de su aroma. Muchos de los compuestos que contribuyen a este sabor se deben a la geografía y al entorno natural. La falta de hierro en el viñedo provoca cambios en el producto final, en este caso el vino. Sin embargo, estos cambios no tienen por qué tener un impacto negativo. La clorosis férrica reduce el valor del pH del vino, mejorando la percepción sensorial. “Como resultado de bajar el valor del pH, aumenta la percepción de acidez y el balance de azúcares ácidos en la boca. Visualmente, un pH más bajo ayuda a aumentar la intensidad del color del vino, especialmente en las partes rojas” (Martín, 2022, p. 2).

En condiciones de deficiencia de hierro o cloración de hierro, la baja disponibilidad reduce la producción de clorofila, lo que afecta la función fotosintética de las plantas, mediante la cual convierten la materia inorgánica en materia orgánica utilizando la luz y la síntesis de glúcidos. Esto compromete el normal crecimiento de la planta, su capacidad productiva y el desarrollo de las características del fruto durante su maduración (2022).

Para la determinación de hierro utilizamos el método de Ferre Michel. El método analítico se basa en la determinación colorimétrica, previa oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} mediante el peróxido de hidrógeno en medio ácido, con tiocianato de potasio formándose complejos de tiocianato de hierro [$\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$ o $\text{Fe}(\text{SCN})_2^{2+}$] de color rojizo.

Reacción de oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} mediante el peróxido de hidrógeno



Equilibrio de formación del complejo:



La metodología empleada para la determinación de Fe^{3+} fue el espectrofotometría, en la cual mediante un espectrofotómetro que es un instrumento que permite proyectar un haz de luz a través de una muestra y medir la absorbancia (la cantidad de luz absorbida por la muestra) o la transmitancia (la cantidad de luz que pasa a través de la muestra, es decir, el recíproco matemático de la absorbancia). La cantidad de luz absorbida o transmitida a una determinada longitud de onda es proporcional a la concentración del material. (Britos, Gatto y Gurin, 2021).

La ley de Lambert-Beer explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. La absorbancia es proporcional a la concentración de la sustancia (C) y al espesor de la cubeta (b) o camino óptico. La absorptividad molar (ϵ) es característica de cada sustancia y de cada longitud de onda (Britos, 2022).

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Unidades: C = concentración en mol/L

b = camino óptico (cm)

Absortividad molar (ϵ) = L/mol.cm

Se mide la absorbancia de la reacción del color con un espectrofotómetro a 480 nm. Como paso previo se debe decolorar el vino para que el color natural de este no afecte en el color final de la reacción. El valor normal de hierro en una porción de vino (100 g) es de 0,37 mg (USDA, 2018).

Medidas de seguridad

Emplear equipo de protección personal: Túnica de laboratorio, lentes de protección y guantes.

Materiales y sustancias

Materiales

- Placa calefactora.
- Reactor: matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón y embudo de vidrio acoplado
- Pipetas Pasteur.
- Probeta de 10,0 mL.
- Bureta de 25,00 mL.

Sustancias

- Agua destilada
- Solución Cúprica 0,168 mol/L - Solución alcalina (potasio sodio tartrato) 0,886 mol/L
-
- Solución de yoduro de potasio 30 % m/V
- Ácido sulfúrico solución 16 % V/V
- Solución de almidón 2 %
- Solución de tiosulfato de sodio 0,0551 mol/L (0,0551 eq/L)

Materiales y sustancias para la determinación de hierro

Materiales

- Espectrofotómetro VIS, que permite medir la absorbancia a las longitudes de onda 480 o 580 nm.
- Pipetas Pasteur.
- Matraces aforados de 50,00 mL
- Pipetas de 2 y 10 mL.
- Bureta de 25,00 mL.

Sustancias y soluciones

- Agua destilada
- Hidrógeno Peróxido 10 % m/V
- Solución patrón de Fe
- Ácido Clorhídrico-Agua solución 50:50
- Tiocianato de potasio solución 20 % m/V

Armado del dispositivo fermentador

Materiales

- Botella plástica de un litro
- Tapón acoplado con un tubo flexible
- Tubo de ensayo
- Parafilm
- gomitas elásticas

Sustancias y soluciones

- Seis uvas cortadas (para adicionar la levadura).
- Jugo de 1 racimo de uvas (jugo diluido de uva, 500 mL).
- Solución 1:1 de sacarosa con agua (aproximadamente 175 mL).

Procedimiento

Determinación de azúcares reductores:

En un matraz Erlenmeyer se introdujeron de forma sucesiva 2 mL de vino, 10 mL de solución cúprica y 5 mL de la solución alcalina, se tapó el Erlenmeyer y se calentó sobre la placa calefactora hasta ebullición que se mantuvo durante 3 min. Se enfrió bajo el chorro del grifo y se añadió de forma sucesiva con la probeta 10 mL de la solución de yoduro de potasio, 10 mL solución de ácido sulfúrico y 10 mL de solución de almidón. Se hizo un blanco con todos los reactivos excepto el vino que se sustituyó por agua destilada. La valoración se realizó con la solución de tiosulfato hasta coloración amarillo crema. Antes de realizar el análisis fue necesario conocer la cantidad aproximada de azúcar reductor de la muestra que debe ser ≤ 28 g/L.

En caso contrario será necesario diluir la muestra.

Decoloración del vino (para hierro):

Se armó el dispositivo de filtrado conectado al grifo canilla con agua corriente para el correcto funcionamiento de la trampa de vacío, luego se colocó un papel de filtro húmedo cortado a medida dentro del embudo, previo a colocar el vino con el carbón activado en el embudo se dejó reposar 15 minutos el vino en conjunto con el carbón. Por último se recogió la solución decolorada de vino.

Determinación de Fe^{3+} :

En los matraces aforados de 50,00 mL correspondientes se añadieron 1 mL de ácido clorhídrico, 1 mL de tiocianato de potasio, 4 gotas de peróxido de hidrógeno, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mL de solución patrón dependiendo de su concentración (1; 2; 3; 4; 5 y 6 mg/L) y se enrasó con agua destilada. Se realizó un blanco con todos los reactivos excepto el patrón de hierro. Para el desarrollo de color de la muestra se añadieron 1 mL de ácido clorhídrico, 1 mL de tiocianato de potasio y se enrasó con la muestra misma.

Se prendió el espectrofotómetro y se esperaron 15 minutos hasta que este se estabilizó. Una vez estabilizado y ya desarrollado los patrones, se eligieron las celdas de camino óptico y se procedió al uso correcto del espectrofotómetro.

Armado del dispositivo fermentador

Con una botella de un litro, un tubo de silicona en conjunto con un tapón, un tubo de ensayo, parafilm y gomitas elásticas se armó un dispositivo donde se añadieron seis uvas cortadas (para adicionar la levadura), el jugo de 1 racimo de uvas (jugo diluido de uva, 500 mL) y una solución 1:1 de sacarosa con agua (aproximadamente 175 mL).

Se cerró el dispositivo de forma correcta y dejó la punta libre del caño de goma por debajo del nivel del agua en el tubo de ensayo.

Tratamiento de datos y resultados

Determinación de azúcares reductores:

Muestra	Volumen gasto de la muestra
Blanco	10,10 mL
1	24,10 mL
2	24,15 mL
3	24,10 mL
4	24,12 mL
5	24,15 mL
Media	24,12 mL

Tabla n°1. Azúcares reductores

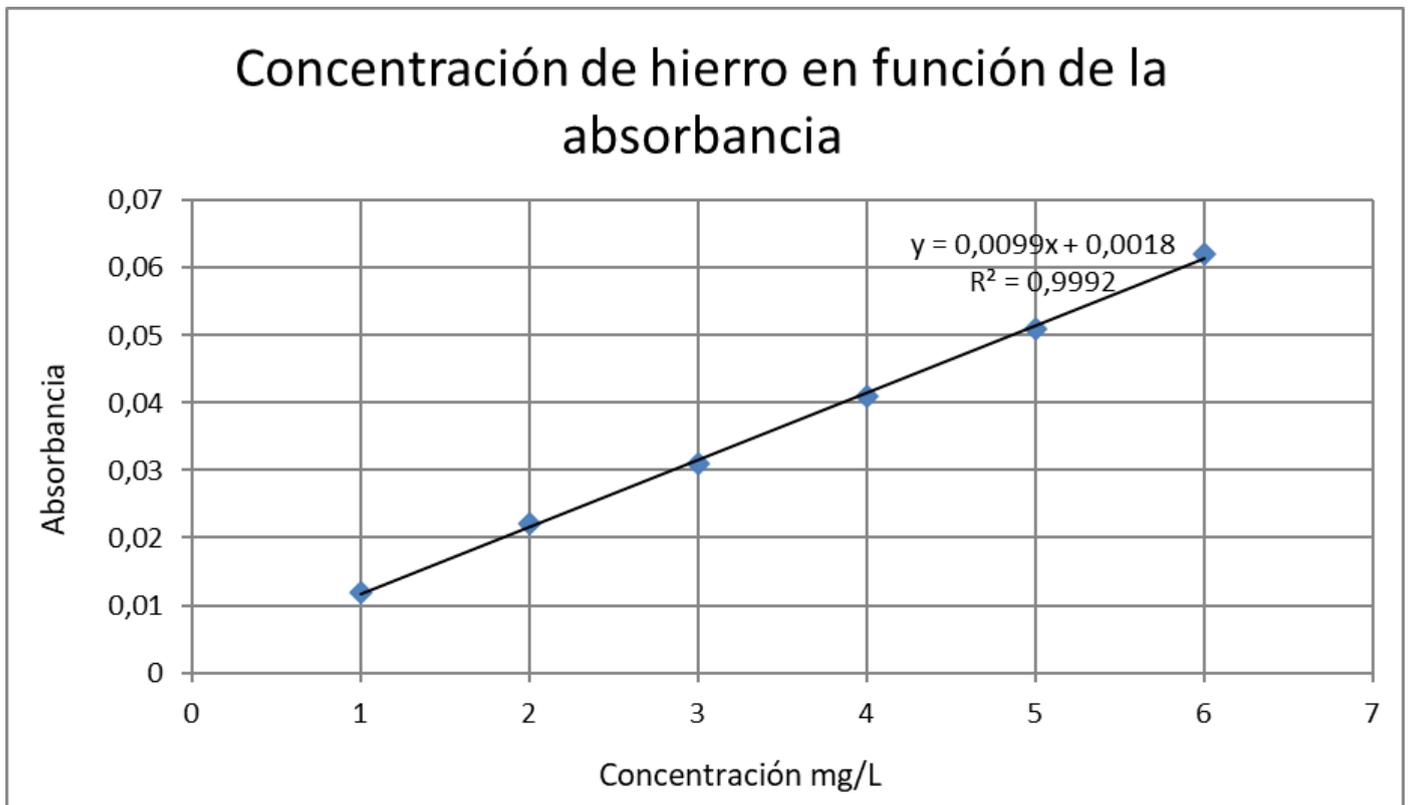
$$\text{Azúcares reductores (g/L)} = (v - v')$$

$$\text{Azúcares reductores (g/L)} = 24,12 \text{ mL} - 10,10 \text{ mL} = 14,02 \text{ g/L}$$

Determinación de hierro:

Concentración mg/L	ABS
Blanco (0,00 mg/L)	0,003
1,00	0,012
2,00	0,022
3,00	0,031
4,00	0,041
5,00	0,051
6,00	0,062
Muestra	0,022

Tabla n°2. Hierro

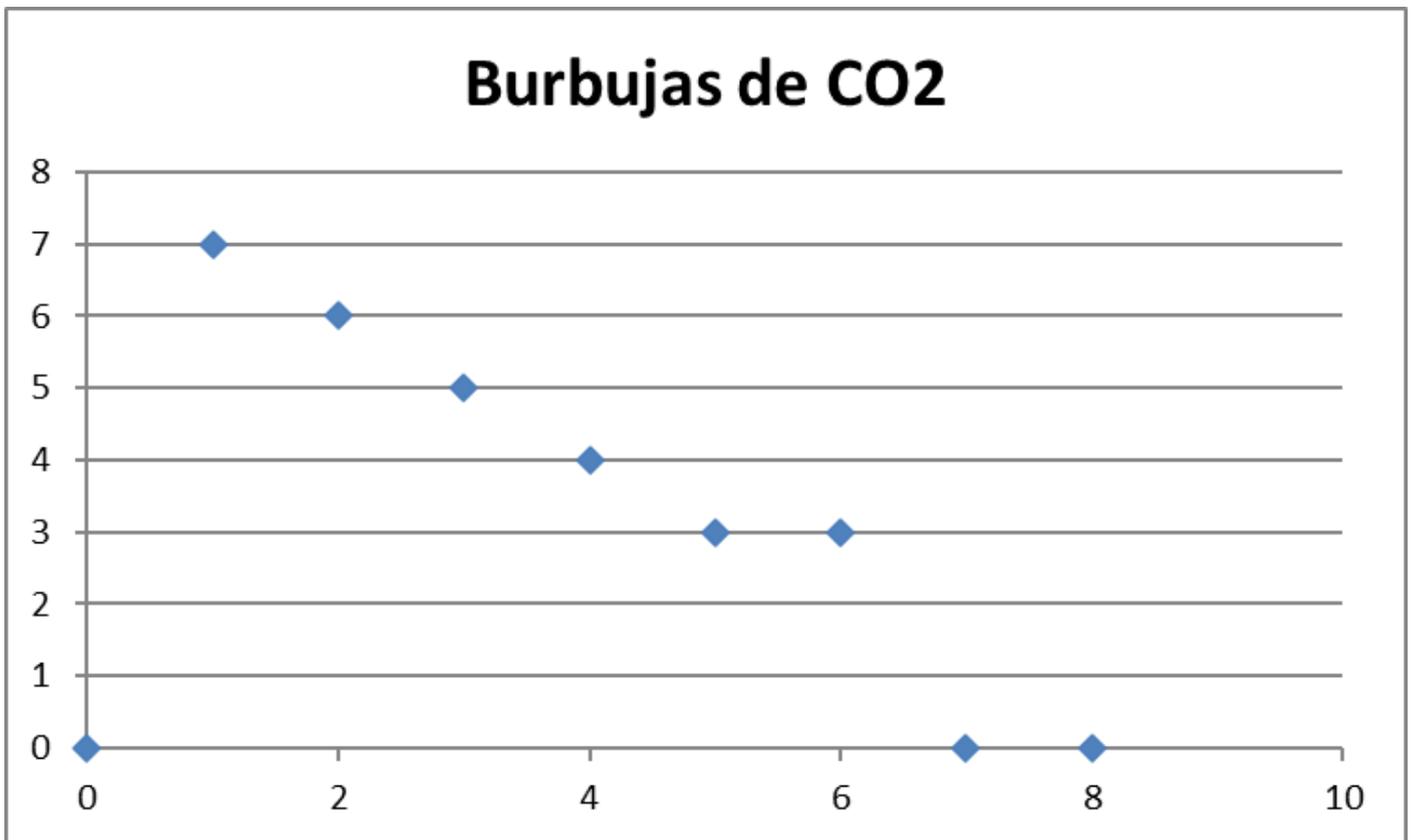


Gráfica n°1: Curva de calibración (hierro)

Seguimiento del funcionamiento del fermentado: (se contabilizó la cantidad de burbujas liberadas por minuto del sistema. hora: 3 pm días: 21/11/22 - 29/11/22)

Enumeración de días transcurridos	Enumeración de burbujas liberadas por minuto
0	0
1	7
2	6
3	5
4	4
5	3
6	3
7	0
8	0

Tabla n°3. Fermentación



Gráfica n°2: curva de dispersión - fermentador

Discusión de resultados

Determinación de azúcares reductores:

Una razón por la cual en la muestra de vino se detectó esa cantidad de azúcares residuales reductores (14 g/L) se puede deber a que en el proceso de fermentación se le agregó una cantidad mayor de sacarosa a la necesaria para completar el proceso de fermentado. Por lo cual luego de finalizado este proceso aún quedan estos azúcares en el vino que contribuyen a darle un sabor aún más dulce.

Determinación de Fe³⁺:

Luego de realizado el análisis y que la muestra coincidiera con el segundo punto de la curva de calibración, se obtuvo un valor de 2,00 mg/L de Fe³⁺, que es un valor que está por debajo de lo permitido (4,00 mg/L según la USDA), lo cual era lo esperado ya que en el proceso de fermentado del vino no se utilizó ningún recipiente que pueda alterar la cantidad natural de hierro de la uva (0,3 mg en 100 g) aunque sí se pudo haber visto afectado por trazas de hierro que se pueden encontrar como contaminante en los reactivos.

Dispositivo fermentador:

Comparando con la gráfica “anexo n°1” y la gráfica de este ensayo, “Gráfica n°2” se puede decir que se obtuvieron resultados semejantes, la diferencia se puede deber a las cantidades empleadas y las condiciones distintas, temperatura sobre todo, además de que el recuento de burbujas fue de un solo minuto en vez de cinco a diez minutos.

Durante el paso del tiempo, a medida que el proceso se va completando, se va reduciendo el contenido de azúcar en el mosto y se incrementa la cantidad de alcohol, generando así la transformación a vino. De esta manera, las levaduras se van muriendo poco a poco por falta de alimento y el proceso se detiene (Cots, s.f.). Además, cabe destacar que la cantidad de CO₂ que se produce para 100 g de azúcar de uva, producen, a una temperatura de 0 °C y una presión de 760 mm de Hg, 23,6 L.

Conclusiones

Tras concluir con la práctica se logró determinar la concentración de hierro en la muestra de vino artesanal siendo de $(2,0000 \pm 0,0003)$ mg/L de Fe^{3+} y la concentración de azúcares reductores de $(14,00 \pm 0,02)$ g/L.

Fuentes bibliográficas

"*Alcoholic Fermentation*", Arthur Harden, 1914, Ed. Longmans, Green and co.

(n.d.). Bioquímica - La base molecular de la vida. Retrieved December 6, 2022, from <http://librodigital.sangregorio.edu.ec/librosusgp/02447.pdf>

Departamento de Agricultura. (n.d.). USA.gov. Retrieved December 6, 2022, from <https://www.usa.gov/espanol/agencias-federales/departamento-de-agricultura>

"*Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*", H. Scott Fogler, Roberto Luis Escalona García, Jorge Fernando, 2001; Ed. Pearson Educación

El metabolismo de la glucosa | Laparoscopia.MD. (n.d.). Laparoscopic.MD. Retrieved November 29, 2022, from <https://www.laparoscopic.md/es/glosario/el-metabolismo-de-la-glucosa>

"*Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas*", H.J. Vázquez, INGENIERÍA Investigación y Tecnología VIII. 4. 249-259, 2007

FoodData Central Search Results. (n.d.). FoodData Central. Retrieved December 6, 2022, from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/173185/nutrients>

Garcia, A. (2020, March 24). *¿Qué es el vino? y sus características.* Tour y Vino. Retrieved December 6, 2022, from <https://touryvino.com/el-vino/que-es-el-vino/>

Hierro, Cobre, etc. Nuestros enemigos. (2016, August 24). AZ3 Oeno. Retrieved December 6, 2022, from <https://www.az3oeno.com/juntos-sabemos-mas/blog/hierro-cobre-etc-nuestros-enemigos>

Holzappel, W. H. (Ed.). (2004). *Lexikon Lebensmittel-Mikrobiologie und -Hygiene.* Behr.

INTRODUCCION A LA PRCTICA DE TERMOQUIMICA. (n.d.). INTRODUCCION A LA PRCTICA DE TERMOQUIMICA. Retrieved December 6, 2022, from <http://www.eis.uva.es/organica/practicas/P3-Equilibrio.pdf>

La deficiencia de hierro en el viñedo puede tener efectos positivos en el vino. (2022, January 10). Agronews Castilla y León. Retrieved December 6, 2022, from <https://www.agronewscastillayleon.com/la-deficiencia-de-hierro-en-el-vinedo-puede-tener-efectos-positivos-en-el-vino>

LOS 6 CRITERIOS QUE DETERMINAN LA CALIDAD EN EL VINO. Noticias de vinos y bebidas. (2016, June 21). espaciovino. Retrieved December 6, 2022, from <https://www.espaciovino.com.ar/noticia/Los-6-Criterios-Que-Determinan-La-Calidad-En-El-Vino>

McKee, T., & McKee, J. R. (2014). *Bioquímica: las bases moleculares de la vida* (M. E. Araiza Martínez & A. Hurtado Chong, Trans.). McGraw-Hill.

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS. (n.d.). FMVZ / UNAM. Retrieved December 6, 2022, from https://fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_bioquimica/Unidad_8.pdf

Metabolismo de los carbohidratos | Bioquímica. Las bases moleculares de la vida, 5e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical. (n.d.). AccessMedicina. Retrieved December 6, 2022, from <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1960§ionid=148095471#1137987423>

Método de FERRE MICHEL Fundamento - Material y reactivos Espátula. (n.d.). 1Library.Co. Retrieved December 6, 2022, from <https://1library.co/article/m%C3%A9todo-ferre-michel-fundamento-material-r-activos-esp%C3%A1tula.6zk1218y>

"*Microbiology and Technology of Fermented Foods*", Robert W. Hutkins; 2006; Ed. Blackwell Publishing
Ochoa, J. L., & Vázquez, R. (2004). *Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas* (Especial I ed., Vol. 1).

1 Principio de Le Chatelier (I) IES La Magdalena. Avilés. Asturias Fe (ac) 6 SCN (ac) Fe(SCN) (ac) → +
← Amaril. (n.d.). FisQuiWeb. Retrieved December 6, 2022, from <https://fisquiweb.es/Laboratorio/EquiTioCianato/LeChatelierGuion.pdf>

Stryer, Lubert (1975). *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company.

Rebelein, H. (1971). *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* (1st ed., Vol. 1). Hans Rebelein.
TECNICAS ANALITICAS PARA VINOS - PDF Free Download. (n.d.). DocPlayer. Retrieved December 6, 2022, from https://docplayer.es/7160468-Tecnicas-analiticas-para-vinos.html#show_full_text

Anexos

Anexo n°1:

Gráfico 1: Número de burbujas de CO₂ liberadas por minuto durante la vinificación

